

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
CONCENTRAÇÃO EM DENTÍSTICA RESTAURADORA – DOUTORADO**

Avaliação clínica de restaurações indiretas em resina composta cimentadas com material
resinoso convencional e autoadesivo

&

Avaliação da expressão de metaloproteinase da matriz da dentina humana usando diferentes
quelantes metálicos

Maurem Leitão Marcondes

Porto Alegre

2014

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
CONCENTRAÇÃO EM DENTÍSTICA RESTAURADORA – DOUTORADO**

Avaliação clínica de restaurações indiretas em resina composta cimentadas com material resinoso convencional e autoadesivo

&

Avaliação da expressão de metaloproteinase da matriz da dentina humana usando diferentes quelantes metálicos

Maurem Leitão Marcondes

Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de Concentração em Dentística Restauradora.

ORIENTADOR: Prof. Dra. Ana Maria Spohr

Porto Alegre, Março de 2014

AGRADECIMENTOS

À professora Ana Maria Spohr, por ter acreditado no meu potencial de pesquisadora, me incentivado e orientado sempre com seu entusiasmo, dedicação e sabedoria. Foi uma honra ter sido sua aluna e orientanda.

Aos professores da Faculdade de Odontologia, Luiz Henrique Burnett Jr., Eduardo Gonçalves Mota e José Pedro Peixoto de Oliveira, pelo conhecimento transmitido e pelo auxílio na captação de pacientes para a pesquisa clínica.

À professora Luciana Mayumi Hirakata, que sempre esteve disponível para me auxiliar no Laboratório de Materiais Dentários.

Aos professores da Faculdade de Química, André Arigony Souto e Rosane Angélica Ligabue, por terem disponibilizado seus laboratórios e conhecimento, e ao aluno do Programa de Pós-Graduação de Química, Leonardo Moreira por ter me auxiliado.

Ao Prof. Carlos Graeff Teixeira por ter disponibilizado o laboratório de parasitologia biomédica e pela dedicação e conhecimentos da Profa. Alessandra Morassutti e da aluna de pós-graduação Carolina De Marco Veríssimo.

Ao Dr. Rafael Taglialegna pelos conhecimentos e assistência técnica nos experimentos de eletroforese.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Diego Fabris Ferreira Da Silva, Fernanda Borguetti Manfroi, Rafael Melara, Danilo Renato Schneider e Tomas Geremia, pela amizade e disponibilidade em sempre ajudar.

À colega Niélli Caetano de Souza pela boa vontade e dedicação em me auxiliar na pesquisa clínica, em compartilhar com alegria o aprendizado de odontologia e especialmente pela amizade sincera.

Aos funcionários do Centro de Microscopia e Microanálises e da clínica de Dentística do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da PUCRS, em especial à funcionária Neuza Custodio Soares que não mediu esforços para me atender.

Ao Prof. José Antônio Poli de Figueiredo, ex-coordenador do curso de Pós-Graduação em Odontologia, pela sua incansável dedicação e competência na busca por um ensino de qualidade e à atual coordenadora, Profa. Ana Maria Spohr que igualmente trabalha com dedicação para o crescimento do Programa.

Aos pacientes que foram voluntários na pesquisa clínica, minha gratidão.

À CAPES, pela bolsa de estudos que possibilitou a conclusão deste doutorado, e à 3M-ESPE que disponibilizou parte do material para a pesquisa clínica.

Aos meus pais Carmem Lucia e Mario Marcondes e às minhas irmãs Juliana e Adriana, por terem me amparado nas dificuldades e vibrado nas vitórias, amo vocês!

Ao meu marido Eduardo Hostyn Sabbi, pelo companheirismo, amor, paciência e por ter participado ativamente para a realização e conclusão de mais essa etapa da minha vida, te amo.

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina"

(Cora Coralina)

LISTA DE TABELAS ARTIGO 1

Tabela 1. Critérios de Inclusão	14
Tabela 2. Material, composição e fabricante	16
Tabela 3. Critérios do USPHS modificado de acordo com Peumans et al. 2010.....	18
Tabela 4. Resultados de distribuição de frequência para todas as restaurações testadas nos diferentes tempos.....	19
Tabela 5. Valores de p do teste de Wilcoxon para comparação entre os tempos	20
Tabela 6. Teste exato de Fisher	20

LISTA DE FIGURAS ARTIGO 1

Fig. 1: Imagens de restaurações avaliadas nos três períodos de tempos 20

LISTA DE FIGURAS ARTIGO 2

Fig. 1 (A) Diagrama do uso da doxicilina (DOX) e clorexidina (CHX) em tampão de incubação. (B) Diagrama do uso de diferentes concentrações de tetraciclina (TETRA) em tampão de incubação 34

Fig. 2 (A) Diagrama do uso de diferentes concentrações de doxicilina (Dox) e Clorexidina (CHX) em Tampão de extração. (B) Diagrama do uso de diferentes concentrações Tetraciclina (Tetra) em Tampão de extração.....35

Fig. 3: gel de investigação da influência do uso de APMA e DMSO em extratos proteicos de dentina mineralizada e desmineralizada. O lado esquerdo mostra valores do padrão de peso molecular e o lado direito valores estimados das proteínas dos Lotes 1 (canaleta 11) e Lote 2 (demais canaletas).....37

Fig. 4. Atividade proteolítica em tampões de incubação em controle positivo (Ca⁺), doxicilina 50mg/ml (DOX 50), clorexidina 0,05% (CHX 0,05) e controle negativo (EDTA). Extrato proteico do Lote 1 de pó de dentina.....38

Fig. 5. Atividade proteolítica em tampões de incubação com diferentes concentrações de tetraciclina (TETRA). Extrato proteico do Lote 1 de pó de dentina.....38

Fig. 6. Ação da doxicilina (DOX) e clorexidina (CHX) sobre metaloproteases da dentina em tampão de extração. Extrato proteico do Lote 1 de pó de dentina.....39

Fig. 7. Ação de diferentes concentrações de Tetraciclina (TETRA) nas metaloproteases da dentina em tampão de extração. Extrato proteico do Lote 2 de pó de dentina.....39

Fig. 8. Atividade de doxicilina (DOX 5), tetraciclina (TETRA 2,5), clorexidina (CHX 2%) e controles positivo (Ca⁺) e negativo (EDTA), nas metaloproteases da dentina em tampão de extração. Extrato proteico do Lote 2 de pó de dentina. A esquerda valores dos padrões de peso moleculares.....40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS: ARTIGOS 1 e 2

	Significado
%	Porcentagem
Min	Minuto (s)
µm	Micrometro
Mm	Milímetro(s)
mW/cm²	Miliwatts por centímetro quadrado
BisGMA,	Bisfenol glicidil metacrilato
TEGDMA	Trietilenoglicol dimetacrilato
HEMA	Hidroxietil metacrilato
Bis-EMA	Bisfenol-A dimetacrilato etoxilado
UDMA	Uretano dimetacrilato
ZrO₂	Oxido de zircônio
SiO₂	Oxido de silício
cm	Centímetro(s)
>	Maior
<	Menor
P	Probabilidade
A	Significância
LED	(Light emitter diode) diodo emissor de luz
Max.	Máximo
et al.	E outros (abreviatura de <i>et alli</i>)
g/mm²	Gramas por milímetro quadrado
~	Aproximadamente
µg/ml	Micrograma por mililitro
µl	Micro litro
ml	Mililitro
M	Molar (molaridade)

mM	Milimolar
°C	Graus Celsius
H	Hora
mA	Miliampere
G	Gramma
Ng	Nanograma
G	Gravidade
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
ZnSO₄	Sulfato de Zinco
SDS	Dodecil sulfato de sódio
KDa	Kilodalton(s)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	10
ARTIGO 1: Avaliação clínica de restaurações indiretas em resina composta cimentadas com material resinoso convencional e autoadesivo.....	11
Introdução	13
Materiais e Métodos.....	14
Resultados	19
Discussão	21
Conclusão.....	25
Referências Bibliográficas	26
ARTIGO 2: Avaliação da expressão de metaloproteinase da matriz da dentina humana usando diferentes quelantes metálicos	29
Introdução	31
Materiais e Métodos.....	32
Discussão	40
Conclusão.....	44
Referências Bibliográficas	45
ANEXO A- Aprovação do protocolo de pesquisa CEP 10/05226.....	49
ANEXO B- Termo de consentimento livre e esclarecido	50
ANEXO C- Aprovação do projeto de pesquisa CEP 11/05650	52
ANEXO D- Resultado da análise por espectrometria de massa.....	53

INTRODUÇÃO GERAL

Essa tese é composta por dois artigos de linhas de pesquisa diferentes.

O artigo 1: *Avaliação clínica de restaurações indiretas em resina composta cimentadas com material resinoso convencional e autoadesivo* é o resultado de pesquisa nas áreas de Dentística Restauradora e Materiais Dentários sobre cimentos resinosos.

O artigo 2: *Avaliação da expressão de metaloproteinase da matriz da dentina humana usando diferentes quelantes metálicos* é o resultado da pesquisa na área de biologia molecular sobre extração proteica do tecido dentinário e estudo de soluções com potencial de inibição enzimática.

ARTIGO 1

Avaliação clínica de restaurações indiretas em resina composta cimentadas com material resinoso convencional e autoadesivo**Resumo**

O objetivo deste estudo foi avaliar clinicamente o desempenho de restaurações indiretas de resina composta cimentadas com cimento resinoso convencional e autoadesivo no período de 12 meses. Foram realizadas 24 restaurações em resina composta (Filtek Supreme XT), executadas pela técnica indireta e cimentadas com dois cimentos resinosos: um convencional (RelyX ARC) e um autoadesivo (RelyX U100). Dois avaliadores independentes analisaram as restaurações através dos critérios do USPHS (*United States Public Health Service*) modificado após duas semanas, seis meses e 12 meses. Para a análise dos dados do USPHS, entre os cimentos no mesmo tempo, foi utilizado o teste estatístico de Wilcoxon e, para avaliação nos diferentes tempos, o Mann-Whiney ao nível de significância de 5%. O teste exato de Fisher foi usado para avaliar a ocorrência de falhas absolutas. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos no mesmo período e entre os grupos nos diferentes tempos, havendo diferença estatística apenas para o critério combinação de cor. Pode-se concluir que restaurações de resina composta indireta cimentadas com cimento resinoso autoadesivo tiveram um desempenho similar às cimentadas com cimento resinoso convencional após um ano de avaliação.

Palavras-chave: avaliação clínica, cimento resinoso, resina composta

Abstract

The aim of this study was to clinically evaluate the performance of indirect composite resin restorations cemented with conventional and self-adhesive resin cement, during a 12-month period. Twenty-four composite resin restorations were performed through indirect technique and cemented with two resin cements: a conventional (RelyX ARC) and a self-adhesive (RelyX U100). Two independent evaluators analyzed the restorations using the criteria of the USPHS (United States Public Health Service) modified after two weeks, six months and 12 months. For the analysis of data from USPHS, between the cements at the same time, it was used the Wilcoxon statistical test and for evaluation at different times, it was used the Mann-Whiney test, at significance level of 5 %. The Fisher exact test was used to assess the occurrence of absolute failures. No statistically significant differences were found between groups in the same period and between groups at different times, one statistical difference was found only for the criteria color match. We conclude that indirect composite resin restorations cemented with self-adhesive resin cement showed a similar performance of restorations cemented with conventional resin cement after a year of analysis.

Keywords: clinical trials, resin cement, resin

Introdução

Restaurações indiretas são preferidas às diretas em cavidades posteriores extensas em função de suas vantagens como melhor adaptação marginal e forma anatômica, e maior controle da contração de polimerização no caso das resinas compostas.^{1,2,3} Para tanto, o agente de cimentação desempenha papel fundamental para a longevidade destes trabalhos, pois o sucesso restaurador está relacionado à estabilidade, à resistência e à duração da união entre a estrutura dentária, o cimento e a restauração.²

Os cimentos resinosos, associados a sistemas adesivos, unem-se à estrutura dentária por meio da camada híbrida, enquanto os cimentos convencionais, como o cimento de fosfato de zinco e os cimentos de policarboxilato, produzem simplesmente uma retenção micromecânica. Ainda, os cimentos convencionais possuem a desvantagem de terem maior solubilidade, menor resistência flexural e menos cores disponíveis quando comparados aos resinosos.⁴

A técnica de cimentação adesiva pode ser classificada em função do sistema adesivo utilizado: a) sistema adesivo de condicionamento ácido prévio (ácido fosfórico a 35% ou 37%) de esmalte/dentina e aplicação de adesivo multifrasco ou de frasco único; b) sistema adesivo autocondicionante (contém monômeros ácidos que condicionam esmalte/dentina sem lavagem); c) cimento resinoso autoadesivo que não utiliza sistema adesivo previamente.⁵

Os cimentos resinosos autoadesivos se caracterizam por possuírem monômeros ácidos multifuncionais que tem a função de condicionar o substrato dentário. No entanto, estes materiais não formam uma camada híbrida.⁶ Estudos^{5,7} apontam que essa nova categoria de cimentos não é coesa, ou seja, as características de união ao substrato dentário não são similares para as diferentes marcas. A literatura é evidente em mostrar a superioridade do RelyX U100, que além de ter sido o primeiro produto dessa categoria, é o mais estudado e o que apresenta os resultados mais promissores.^{5,8,9}

Embora os estudos *in vitro* apresentem resultados promissores para os cimentos resinosos autoadesivos unidos à dentina^{7,10,11} e a materiais restauradores como cerâmica,^{7,12} estudos *in vivo* são fundamentais para confirmar os resultados dos estudos laboratoriais para validar ou não a qualidade destes novos materiais. Até o momento, há apenas um estudo clínico¹⁵ que compara o uso desse cimento autoadesivo com outro convencional para a

cimentação de restaurações indiretas. Dessa forma, é imperativo que outros estudos clínicos sejam conduzidos a fim de embasar o uso clínico do cimento autoadesivo RelyX U100 para a cimentação de restaurações indiretas.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar clinicamente o desempenho de restaurações de resina compostas executadas pela técnica indireta e cimentadas com dois cimentos resinosos, um convencional (grupo controle) e um autoadesivo (grupo experimental), após duas semanas, seis meses e 12 meses da cimentação. A hipótese nula testada foi que os critérios do USPHS modificado do grupo experimental e do grupo controle não apresentam diferenças significativas entre si para nenhum tempo avaliado.

Materiais e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) (OF.CEP-1169/10). Foram selecionados 10 pacientes (seis mulheres, com média de idade de 47 anos, e quatro homens com média de idade de 46 anos) da clínica de Dentística da PUCRS, que necessitavam cada um de duas restaurações classe II e que preencheram os requisitos dos critérios de inclusão da Tabela 1. Todos os pacientes deram sua aquiescência assinando um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B. Foram realizadas 24 restaurações, 12 em pré-molares e 12 em molares, sendo seis inlays e 18 onlays.

Tabela 1. Critérios de Inclusão

Paciente saudável e adulto (entre 18 e 70 anos).

Dentes vitais e com antagonista hígido ou restaurado com resina.

Ausência de dor e de qualquer atividade de doença pulpar no dente a ser restaurado.

Inlay MO ou OD ou MOD com istmo de, no máximo, 2/3 da distância vestibulo-lingual, ou *Onlay* com tamanho de cavidade similar, sendo que as duas restaurações sejam feitas em pré-molares ou em molares no mesmo paciente.

Bom nível de Higiene Oral (índice de Placa Visível e Sangramento Gengival < 30%).

Ausência de bruxismo e apertamento.

Ausência de dor orofacial

Um único operador treinado realizou os procedimentos restauradores.

1º consulta: Anestesia local, remoção de tecido cariado e/ou restauração, preparo e acabamento da cavidade com pontas diamantadas (Kit *inlay/onlay* KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil). Nenhum forramento foi usado. Moldagem com silicone por adição (Express XT, 3M-ESPE, St. Paul, MN, EUA) com moldeira parcial plástica (Moldex, Angelus, Londrina, PR, Brasil) e restauração provisória com material restaurador provisório fotopolimerizável (Bioplic, Biodinâmica, Ibiporã, PR, Brasil). A escolha da cor das restaurações foi realizada com a escala de cor Vitapan Classical (Vita-Zahnfabrik, Alemanha).

Etapa Laboratorial: O molde foi enviado para um laboratório de prótese para confecção dos modelos de trabalho em gesso e da restauração em resina composta Filtek Supreme XT, caracterizada com pigmentos da Adoro (Ivoclar Vivadent, Liechtenstein), que foi construída sobre o modelo de gesso pela técnica incremental usando um ativador de LED (Ivoclar Targis Quick, Ivoclar Vivadent, Liechtenstein) para a fotoativação dos incrementos por 10 s. Após o término da restauração, a adaptação, contatos proximais e oclusão foram checados em modelos posicionados em articulador semi-ajustável. Acabamento e polimento foram feitos com fresas de tungstênio de corte cruzado fino e borrachas de carbeto de silício. Em seguida foi realizada uma polimerização adicional em unidade fotoativadora externa Ivoclar Targis Power (Ivoclar Vivadent, Liechtenstein), onde as peças foram embebidas em glicerina e colocadas no forno, em vácuo, por 22 min. Para finalizar, foi dado brilho superficial com polidores de pêlo de cabra, rouge barra de polir (Shofu, San Marcos, CA, EUA) e roda de algodão.

2º Consulta: Após duas semanas, as peças foram cimentadas de acordo com os seguintes passos: 1) Sorteio do dente que recebeu o cimento resinoso convencional RelyX ARC, cor A3, e o que recebeu o cimento resinoso autoadesivo RelyX U100, cor A2 (Tabela 2); 2) Isolamento absoluto ou relativo dependendo do caso clínico; 3) Remoção da restauração provisória e limpeza da cavidade com pedra pomes e água; 4) Preparo da peça: jateamento interno da peça com óxido de alumínio de 50 µm por 5 s, seguido de lavagem de ar e água e aplicação de uma camada de Silano (Dentsply, York, EUA). 5) Cimentação com RelyX ARC: o preparo cavitário foi condicionado com ácido fosfórico a 37% por 15 s, lavado com água por 10 s e a umidade da dentina foi controlada com bolinha de algodão. Foi aplicado o *primer*, seguido de leve jato de ar, e após o adesivo do sistema Scotchbond, sendo fotoativado por 10 s com o aparelho Optilight Plus (Gnatus, Ribeirão Preto, SP, Brasil). A

intensidade do aparelho fotoativador ficou na faixa de 500 a 550 mW/cm², sendo que o mesmo foi aferido, constantemente, por meio de radiômetro Modelo 100 (Demetron/Kerr, Dambury, CT, EUA). As pastas base e catalisadora do RelyX ARC foram misturadas por 10 s, conforme as instruções do fabricante, colocado sob a peça e imediatamente posicionado no preparo, seguido de pressão digital por 3 min. Os excessos do cimento foram removidos, seguido de fotoativação por 60 s em cada face (oclusal, vestibular e lingual). O ajuste oclusal foi realizado, finalizando com o acabamento e polimento empregando discos Soflex (3M-ESPE, St. Paul, MN, EUA) e bisturi lâmina 12. 6) Cimentação com RelyX U100: as pastas base e catalisadora do cimento resinoso autoadesivo foram misturadas por 20 s, conforme as instruções do fabricante, colocado sob a peça e imediatamente essa foi posicionada no preparo, seguido de pressão digital por 3 min. Os excessos do cimento foram removidos, seguido de fotoativação por 60 s em cada face (oclusal, vestibular e lingual). Ajuste oclusal foi realizado, finalizando com o acabamento e polimento empregando discos Soflex e bisturi lâmina 12.

Tabela 2. Material, composição e fabricante.

Material	Composição	Fabricante
RelyX U100 (cimento resinoso autoadesivo)	Pasta Base (Branca): Monômeros metacrilatos contendo grupos ácidos fosfóricos, monômeros metacrilatos, carga inorgânica silanizada, componentes iniciadores e estabilizadores. Pasta Catalisadora (Amarela): Monômeros metacrilatos, carga inorgânica alcalina (básica), carga inorgânica silanizada, componentes iniciadores, estabilizadores e pigmentos	3M-ESPE, Seefeld, Alemanha Lote 424360
RelyX ARC (cimento resinoso convencional)	Paste A: BisGMA, TEGDMA, sílica tratada com silano, polímero funcional dimetacrilato, 2-benzotriazolil-4-metilfenol, 4-(Dimetilamino)-Benzenoetanol. Paste B: cerâmica tratada com silano, TEGDMA, Bis-GMA, sílica tratada com silano, polímero funcional dimetacrilato, 2-benzotriazolil-4-metilfenol, benzoil peroxide (72% em peso)	3M/ESPE, Seefeld, Alemanha Lote N221530
Primer do Scotchbond Multi-Purpose	HEMA, ácido poliacenóico, água	3M/ESPE, St. Paul, MN, EUA.
Adesivo do Scotchbond Multi-Purpose	Bis-GMA, HEMA, amina terciária (ambos para cura dual), fotoiniciador.	3M/ESPE, St. Paul, MN, EUA.
Silano	Silano	Dentsply, York, EUA
Filtek Supreme XT (resina composta)	Carga inorgânica: ZrO ₂ /SiO ₂ (aglomerados de 0.6–1.4 µm, tamanho individual das partículas de 5- 20 nm) 78% em peso Matrix da resina: Bis-EMA, UDMA, Bis-GMA, TEGDMA	3M/ESPE, St. Paul, MN, EUA

Avaliação das restaurações

Os pacientes foram chamados para a avaliação das restaurações duas semanas, seis meses e 12 meses após os procedimentos de cimentação. Os pacientes receberam instrução de higiene oral e tratamento de raspagem, alisamento e polimento supra gengival em todos os dentes quando ingressaram no estudo e nas re chamadas de seis e 12 meses. Dois avaliadores independentes usando espelho, sonda e fio dental preencheram um questionário de acordo com os critérios da USPHS (*United States Public Health Service*) modificado² (Tabela 3). Quando havia discordância em algum critério, eles entravam em consenso. Nas consultas de *baseline* e de 12 meses foram realizadas radiografias periapicais de cada dente restaurado empregando posicionador e parâmetros de irradiação padronizados. As radiografias também foram analisadas pelos avaliadores.

Tabela 3. Critérios do USPHS Modificado de acordo com Peumans et al 2010

Critério USPHS	Alfa 1	Alfa 2	Bravo	Charlie	Delta
Critério Modificado	Clinicamente excelente/ muito bom	Clinicamente bom (leve desvio do desempenho ideal, possível correção sem dano para o dente ou restauração)	Clinicamente suficiente/ satisfatório (Pouco defeito, correção impossível sem dano para o dente ou restauração. Nenhum efeito negativo esperado).	Clinicamente insatisfatório (Muitos defeitos, remoção profilática para a prevenção de muitas falhas)	Clinicamente pobre (Necessidade de recolocação imediata)
Rugosidade	Lisa	Aspero (com capacidade de polimento)	Aspero (sem capacidade de polimento e sem causar dano)	N/a ver integridade marginal	N/a ver integridade marginal
Combinação de cor	Combinando	Clinicamente boa (menor divergência de cor)	Clinicamente satisfatório	Clinicamente insatisfatória	N/a
Integridade Marginal	· Contorno harmonioso	· Fenda marginal (máx 100µm) · Excesso de preenchimento · Descoloração (removível)	· Fenda marginal (>100µm) · Descoloração (não removível)	· Fenda marginal (>200µm) · Descoloração marginal na qual se estende em profundidade ao longo do preenchimento ou dente	· Perda da restauração · Cárie secundária
Integridade da Inlay	Nenhuma fenda, rachadura, fratura	Formação de Rachadura/ fenda (não sondável)	Formação de Rachadura/ fenda (sondável)	Rachadura/ fenda não corrigível	Fratura com perda da restauração
Integridade do dente	Completa integridade	Rachadura/ fenda pequena (não sondável)	Rachadura/ fenda sondável	Fenda com exposição de dentina	Fratura da cúspide/ dente
Contato Proximal	· Fisiológico	· Muito fraco · Muito forte	· Muito fraco (nenhuma indicação de dano para o dente, gengiva ou periodonto, >100µm)	· Traumatização da gengiva (impactação alimentar)	· N/a
Sensibilidade	Nenhuma sensibilidade	· N/a	· Prematura/ forte (sem queixa subjetiva- sem tratamento) · Atrasada/ fraca (sem queixa subjetiva- sem tratamento)	· Prematura/ forte (tratamento é prioritário) · Atrasada/ fraca (tratamento é prioritário)	· Negativa
Complicações	Sem complicações	Tratamento relacionado com complicações pos-operatórias (nenhum tratamento)	Continuidade ou recorrência de complicações a médio prazo (meses) nenhum tratamento	Complicações de dor permanente (necessidade de tratamento)	Permanente e insuporável complicações, imediato tratamento endodôntico
Satisfação do Paciente	Inteiramente satisfeito	N/a	Critica de baixa estética, falta de conforto mastigatório, tempo consumido para o procedimento	N/a	Completamente insatisfeito
Exame Radiográfico	· Harmonioso contorno	· Excesso de cimento · Degrau positivo ou negativo (<100µm)	· Fenda Marginal (>100µm) · Degrau negativo (>100µm)	· Fenda Marginal (>200µm) · Excesso de cimento não removível · Degrau negativo (>200µm)	· Cárie secundária · Dente ou restauração fraturada

· N/a: Não aplicável

Análise estatística

Para a análise das variáveis ordinais pareadas dos dados do USPHS foi utilizado o teste estatístico de Wilcoxon (*Wilcoxon Signed Ranks Test*). Para a análise entre os grupos no mesmo tempo e para avaliação nos diferentes tempos (duas semanas, seis meses e 12 meses) foi usado o Mann-Whiney ao nível de significância de 5%. O teste exato de Fisher foi usado para avaliar a ocorrência de falhas absolutas.

Resultados

Um total de 12 pares de restaurações foram avaliadas (n=12), sendo que, na rechamanda de seis meses, um paciente não compareceu (n=11). Observou-se predomínio de Alfa 1 em todos os tempos (Tabela 4), com exceção para a categoria combinação de cor, em que o predomínio de Alfa 1 foi substituído ao longo do tempo pelo Alfa 2 (Figura 1), havendo diferença estatística ($p < 0,05$) do *baseline* para 12 meses entre os dois grupos (Tabela 5). Embora não tenha ocorrido diferença estatística para nenhum critério quando comparou-se os grupos controle e experimental nos diferentes tempos pelo teste estatístico de Mann-Whiney ($\alpha = 0,05$), observou-se uma tendência de Alfa 1 passar a Alfa 2 nos critérios rugosidade e integridade marginal (Tabela 4). Todas as falhas que ocorreram ao longo dos 12 meses (Tabela 6) foram nas restaurações cimentadas com o RelyX U100, porém não houve diferença estatística entre as restaurações cimentadas com RelyX U100 e RelyX ARC na comparação de frequência de ocorrência de falhas absolutas ($p = 0,109$). Na primeira avaliação (duas semanas após a cimentação), um paciente que teve dor permanente e insuportável foi encaminhado para tratamento endodôntico. Não houve a perda desta restauração, e o acesso à câmara pulpar, após a endodontia, foi restaurado com resina composta Filtek Supreme XT. No entanto, considerou-se essa restauração como falha absoluta, isto é, restauração perdida. Em seis meses houve outra falha absoluta, pois um paciente apresentou dor permanente e insuportável e, durante o tratamento endodôntico, houve perda completa da cimentação da onlay. Na rechamada de 12 meses ocorreu uma falha relativa, correspondente à pequena fratura do esmalte que foi reparada com resina composta Filtek Supreme XT, e uma falha absoluta devido à cárie secundária na parede gengival proximal que foi diagnosticada pelo exame radiográfico.

Tabela 4 - Resultados de distribuição de frequência para todas as restaurações testadas nos diferentes tempos

	2 semanas (n=12 / 12)					6 meses (n=11 / 11)					12 meses (n=12 / 12)				
	Alfa 1	Alfa 2	Bravo	Charlie	Delta	Alfa 1	Alfa 2	Bravo	Charlie	Delta	Alfa 1	Alfa 2	Bravo	Charlie	Delta
Rugosidade	11/12	1/0	0/0	N/a	N/a	10/9	1/0	0/0	N/a	N/a	7/5	5/4	0/0	N/a	N/a
Combinação de cor	9/9	3/3	0/0	0/0	N/a	2/4	9/5	0/0	0/0	N/a	1/1	11/8	0/0	0/0	N/a
Integridade Marginal	11/11	1/1	0/0	0/0 ^b	0/0 ^a	10/7	1/2	0/0	0/0 ^b	0/0 ^a	8/7	4/2	0/0	0/0 ^b	0/1 ^a
Integridade da Inlay	12/10	0/2	0/0	0/0 ^b	0/0 ^a	11/8	0/1	0/0	0/0 ^b	0/1 ^a	12/9	0/0	0/0	0/0 ^b	0/1 ^a
Integridade do dente	12/12	0/0	0/0	0/0 ^b	0/0 ^a	11/9	0/0	0/0	0/0 ^b	0/0 ^a	12/8	0/0	0/0	0/1 ^b	0/0 ^a
Contado Proximal	12/11	0/1	0/0	0/0	N/a	10/8	0/0	0/0	0/0	N/a	12/8	0/1	0/0	0/0	N/a
Sensibilidade	12/11	N/a	0/0	0/0	0/1	11/9	N/a	0/0	0/0	0/0	12/9	N/a	0/0	0/0	0/0
Complicações	12/11	0/0	0/0	0/0	0/1 ^a	11/9	0/0	0/0	0/0	0/2 ^a	12/9	0/0	0/0	0/0	0/2 ^a
Satisfação do paciente	12/12	0/0	0/0	N/a	0/0	11/9	0/0	0/0	N/a	0/0	12/9	0/0	0/0	N/a	N/a
Exame radiográfico	12/10	0/2	0/0	0/0	0/0 ^a	N/a	N/a	N/a	N/a	N/a	10/8	1/0	0/0	0/0	0/1 ^a

(N/a) Não aplicável; (a) Falha Absoluta; (b) Falha Relativa.

Tabela 5. Valores de p do teste de Wilcoxon para comparação entre os tempos

Tempo	Cimento	Rugosidade	Combinação de cor	Integridade Marginal	Integridade da Inlay	Integridade do dente	Contato Proximal	Sensibilidade	complicações	Satisfação do paciente	Exame Radiográfico
baseline e 12 meses	ARC	0,125	0,008*	0,250	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	U100	0,125	0,031*	0,250	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
baseline e 6 meses	ARC	1,000	0,031*	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	N/a
	U100	1,000	0,625	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	N/a
6 e 12 meses	ARC	0,125	0,500	0,250	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	U100	0,125	0,250	0,500	1,000	0,500	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Wilcoxon signed-rank test (*) $p < 0,05$ Tabela 6. Teste exato de Fisher ($p = 0,109$)

Cimento	Falha		Total
	Não	Absoluta	
ARC	12	0	12
U100	9	3	12
Total	21	3	24

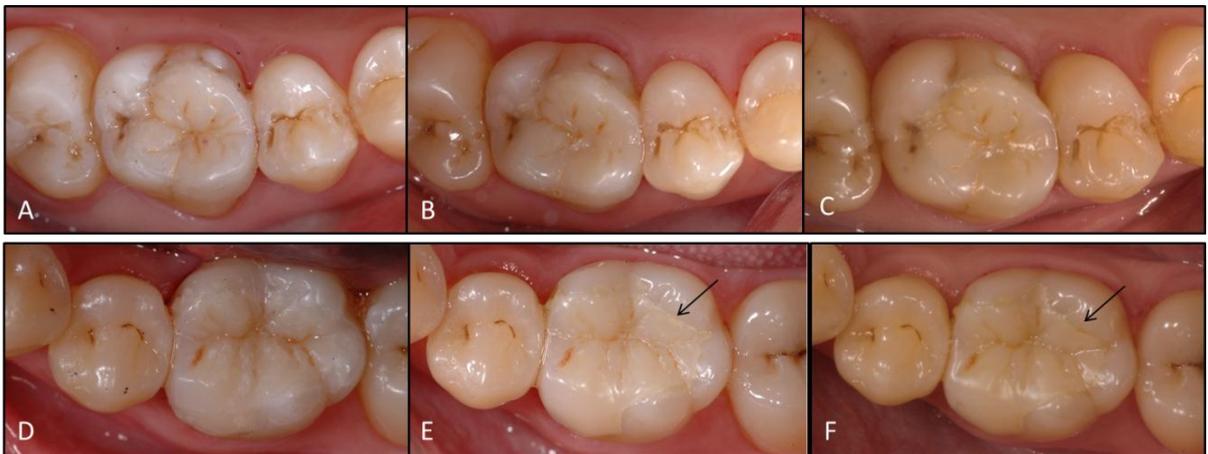


Fig. 1: Imagens de restaurações avaliadas nos três períodos de tempos - Neste paciente, restaurações antigas de amálgama no primeiro molar superior direito e no primeiro molar inferior direito foram substituídas por restaurações indiretas em resina composta. A onlay (Fig. 1 A, B e C) foi cimentada com RelyX ARC. A) duas semanas: foram registrados escores Alfa 1 para o critério combinação de cor e integridade marginal. B) seis meses: integridade marginal foi registrada como escore Alfa 1 e, combinação de cor, como Alfa 2. C) 12 meses: integridade marginal foi registrada como escore Alfa 1, e combinação de cor, como Alfa 2. A onlay (Fig. 1 D, E e F) foi cimentada com RelyX U100. D) duas semanas: combinação de cor e integridade marginal foram registrados como escores Alfa 1. E) seis meses: combinação de cor e integridade marginal foram registradas como escores Alfa 2. F) 12 meses: combinação de cor e integridade marginal foram registradas como escores Alfa 2.

Discussão

Delineamento do Estudo

Os critérios clínicos USPHS¹³ para avaliar restaurações é o instrumento de escolha da maioria dos pesquisadores por serem simples e por construírem definições sobre a qualidade (aceitável ou não aceitável) dos tratamentos restauradores e/ou materiais. Porém, com a evolução dos materiais restauradores, modificações desses critérios têm sido propostas. Em 2007, Hickel et al.¹⁴ sugeriram recomendações para a realização de estudos clínicos controlados de materiais restauradores e entre elas está a padronização dos chamados critérios modificados de Ryge. Acompanhando essas diretrizes, Peumans et al.² propuseram o seu USPHS modificado para avaliação da cimentação de restaurações cerâmicas indiretas, que foi seguido no presente estudo.

Hickel et al.¹⁴ sugerem que a amostra deva incluir um grupo teste e um controle, com pacientes da comunidade e não estudantes de Odontologia. Também sugerem que o estudo seja de restaurações pareadas, de modo que ambos os materiais, teste e controle, sejam colocados no mesmo tipo de dente, com tamanho de cavidade similar, sempre que possível em lados contralaterais da mandíbula/maxila e, de preferência, na mesma consulta. Dessa forma, no presente estudo, ao recrutar os pacientes que preenchessem os critérios de inclusão, encontrou-se a mesma dificuldade alertada pelos autores de que, neste *design* de estudo, a disponibilidade de encontrar paciente pode drasticamente ficar limitada.

No entanto, estudos prospectivos *split-mouth* são reportados como altamente adequados para comparar modalidades de tratamento,¹⁵ pois fatores relativos ao paciente que influenciam a longevidade das restaurações, como a higiene oral e dieta, são os mesmos para o grupo teste e controle. Assim, embora o tamanho da amostra desse estudo tenha sido reduzido em função dos rígidos critérios de inclusão adotados, seu delineamento, execução e análises seguiram as normas de boas práticas.

Avaliação Clínica

A hipótese nula testada no presente estudo clínico foi parcialmente rejeitada, pois os resultados dos grupos controle e experimental, avaliados pelo USPHS modificado, não apresentaram diferenças estatísticas nem entre si nem nos diferentes tempos (duas semanas, seis meses e 12 meses), exceção feita ao critério combinação de cor.

O predomínio de Alfa 1 (cl clinicamente excelente), observado no *baseline* para o critério combinação de cor, foi substituído ao longo dos 12 meses pelo Alfa 2 (cl clinicamente bom) para os dois grupos, isto é, após 12 meses, a pequena alteração de cor encontrada não foi relevante a ponto de comprometer a satisfação dos pacientes com as restaurações. Esta pequena alteração de cor pode ter ocorrido devido a vários fatores que estão relacionados com as propriedades mecânicas e com a estabilidade de cor das restaurações de resina composta, tais como reações químicas da matriz orgânica da resina, sua interação com as partículas de carga, o tamanho das partículas, sorção de água e o grau de conversão do monômero em polímero.¹⁶ É importante salientar que foi utilizado um sistema de pigmentos para resina (Adoro, Ivoclar) para fazer as caracterizações das *inlays/onlays*. Esses pigmentos foram utilizados como base, quando era necessário fazer alguma opacificação, ou entre as camadas da resina para se obter efeito de caracterização oclusal, e nunca utilizado em última camada. Logo, a alteração de cor pode também ter acontecido em função da reação desses pigmentos com a matriz orgânica da resina composta.

Não foi observada diferença estatística para os critérios contato proximal e rugosidade aos 12 meses. Embora os resultados para o critério rugosidade tenham mostrado uma tendência do escore Alfa 1 passar para Alfa 2, esse é um comportamento esperado e está de acordo com outros estudos clínicos a respeito de restaurações indiretas de resina composta.^{3,17,18,19} Sabendo que um maior grau de conversão está diretamente relacionado à melhora das propriedades de resinas compostas,^{3,18} utilizou-se um protocolo de polimerização com LED seguido de uma polimerização adicional com calor e pressão (Ivoclar Targis Power). Assim, apesar de se ter observado uma pequena instabilidade em relação ao comportamento da cor da resina composta, obteve-se resultados satisfatórios para os critérios rugosidade e contato proximal, que denotam a qualidade do material restaurador utilizado.

No presente estudo, não se observou diferença estatística para o critério integridade da *inlay* no período de 12 meses, o que demonstra as boas propriedades mecânicas da resina Filtek Supreme XT para restaurações indiretas. Este resultado está de acordo com os achados de Azevedo et al.²⁰ que compararam restaurações indiretas de resina Filtek Supreme XT cimentadas com RelyX U100 e não observaram nenhuma falha após um ano. A Filtek Supreme XT é uma resina composta com nanopartículas de carga esféricas que são responsáveis pela boa qualidade do polimento e pelo aumento da resistência à fratura, pois as tensões mecânicas que tendem a concentrar-se nos ângulos e protuberâncias das partículas de carga são minimizadas nesse material.¹⁶ Cabe explicar que a perda de uma restauração do

grupo experimental em seis meses ocorreu como consequência do tratamento endodôntico, onde se fez necessária a remoção parcial da restauração que resultou em sua fragilização e fratura.

Para padronizar o desgaste das restaurações, teve-se o cuidado de incluir nesse estudo apenas dentes que tivessem antagonista hígido ou antagonista restaurado em resina composta, uma vez que a integridade marginal das restaurações indiretas é influenciada pelo material presente no dente antagonista. De maneira geral obteve-se escores excelentes (Alfa 1) e muito bons (Alfa 2) para o critério integridade marginal, não havendo, em 12 meses, diferenças significativas tanto entre os grupos como nos diferentes tempos de avaliação, o que significa dizer também que não foram observadas pigmentações não removíveis ou em profundidade. Esse achado está de acordo com as considerações de avaliação de curto prazo proposta por Hickel et al.¹⁴ No entanto, teve-se um escore Delta em 12 meses, relacionado a uma falha absoluta, em função de cárie secundária no grupo experimental. É interessante observar que, para essa restauração no *baseline*, foi registrado escore Alfa 2 para o mesmo critério (exame radiográfico), ou seja, degrau negativo <100µm. É sabido que um aumento no tamanho da abertura marginal resulta em degradação do sistema de união, por sua vez levando à microinfiltração e à cárie secundária.¹⁸ Nesse sentido, é interessante analisar o estudo de Peumans et al.²¹ que avaliaram por MEV réplicas de restaurações indiretas em cerâmica cimentadas com RelyX U100, com e sem condicionamento ácido prévio em esmalte. Eles observaram que, embora a integridade marginal fosse clinicamente aceitável, as microscopias revelaram que o parâmetro contorno harmonioso, que era de 70% no *baseline*, passou a ser de 5% depois de quatro anos. Contudo, quando a integridade marginal é avaliada clinicamente e por MEV, a maioria dos estudos não mostra uma correlação evidente entre os resultados.¹⁴ Alguns trabalhos apontam que o *gap* de até 400 µm ou mais em áreas de fácil higienização é necessário para o desenvolvimento de cáries secundárias. Já áreas de difícil acesso, como a margem cérvico-proximal, a presença de placa cariogênica é suficiente no desenvolvimento da cárie, independentemente do tamanho do *gap*. Até o momento, não há dados que correlacionem o tamanho da discrepância marginal clinicamente relevante com o desenvolvimento de cárie.²² Uma margem descolorida, no entanto, não é indicativa de cárie secundária, mas a deterioração marginal e a descoloração cavosuperficial podem ser preditoras de futuras falhas.²³ Assim, tais alterações merecem a atenção dos dentistas quanto ao prognóstico, bem como o uso de exames radiográficos são imprescindíveis para avaliações das áreas interproximais.

Outro fator importante em relação à integridade marginal é a capacidade do cimento de se unir ao substrato dentário e ao material restaurador. Em relação ao substrato dentário, o mecanismo de união do RelyX U100 com as estruturas dentárias parece ser mais químico que micromecânico.²⁴ Esta união é estabelecida pelo monômero ácido éster fosfórico metacrilato que é ionizado no momento da mistura e reage com a hidroxiapatita dos tecidos minerais do dente.²⁵ Cimentos resinosos autoadesivos interagem superficialmente com o esmalte e com a dentina, não havendo a formação de uma camada híbrida verdadeira^{6,26} que é observada quando um sistema adesivo é aplicado previamente ao cimento resinoso.⁶ Investigações acerca da adaptação marginal da cimentação de restaurações cerâmicas com RelyX U100 evidenciaram resultados similares em dentina e piores em esmalte.^{7,10,12} Assim, estudos *in vitro*^{6,24} investigaram o uso do condicionamento ácido do esmalte antes da cimentação com RelyX U100 para o teste de resistência de união e encontraram melhores resultados para o grupo onde o RelyX U100 foi usado com condicionamento ácido prévio. No entanto, quando investigações clínicas a respeito desta questão foram feitas para a cimentação de restaurações indiretas de resina composta²⁰ e de cerâmica,^{15,21} os autores concluíram que não havia diferenças significativas entre os tratamentos. Portanto, nessa pesquisa, optou-se por não condicionar o esmalte previamente à aplicação do RelyX U100, visto não haver evidências científicas da real efetividade desse procedimento.

Nenhum caso de perda de restauração por perda da cimentação foi observado em todo o período do estudo. Este achado evidencia que ambos os cimentos resinosos promoveram uma união adequada ao substrato dentário. Sabe-se que os preparos para restaurações do tipo *inlay/onlay* são geralmente bem mais expulsivos do que os preparos para coroa total que apresentam princípios de retenção e estabilidade mecânica. Portanto, a fixação da restauração *inlay* ou *onlay* à estrutura dentária depende basicamente da capacidade de união dos cimentos resinosos ao esmalte e à dentina. No caso do RelyX ARC, esta união é promovida pela formação de uma camada híbrida por meio de sistema adesivo, enquanto que, para RelyX U100, é o próprio cimento que promove a retenção. Assim, em virtude do comportamento tixotrópico do RelyX U100, estudos *in vitro*^{6,27} e *in vivo*²⁸ têm demonstrado que uma pressão constante (de 20 a 40 g/mm²) deve ser aplicada no momento da cimentação para que a viscosidade do cimento possa ser reduzida. Essa pressão promove, além da redução de bolhas de ar, a melhora da adaptação do cimento às paredes da cavidade, pois otimiza as interações físicas como forças de Vander Waals, pontes de hidrogênio e transferência de

carga. Deste modo, acredita-se que essa manobra tenha contribuído para a retenção das restaurações cimentadas com RelyX U100 nesse estudo clínico.

Muitos casos de sensibilidade pós-operatória cessam depois de algumas semanas da colocação da restauração, sendo que alguns dentes requerem tratamento endodôntico a fim de tratar sintomas de hipersensibilidade não mais relacionados a uma simples intercorrência de sensibilidade, e sim de uma inflamação pulpar irreversível. Essas complicações estão relacionadas às falhas prematuras que ocorrem em até seis meses descritas por Hickel et al.¹⁴ e foram observadas nesse estudo, uma no *baseline* e outra em seis meses, ambas do grupo experimental.

Por fim, após um ano observou-se uma pequena fratura em esmalte em uma restauração do grupo experimental. Esta falha relativa, referente à integridade do dente, pode ter acontecido em função de características do paciente (força de mastigação, propriedades intrínsecas do esmalte), do material (falha adesiva do cimento) ou de ambas. Logo, como não houve diferença estatística para nenhum critério quando se comparou os dois cimentos nos diferentes tempos pelo teste estatístico de Mann-Whitney ($\alpha = 0,05$), entende-se que essa foi uma falha que ocorreu pelo acaso.

Conclusão

Pode-se concluir que restaurações indiretas de resina composta cimentadas com cimento resinoso autoadesivo RelyX U100 mostraram um desempenho aceitável e semelhante às cimentadas com cimento resinoso RelyX ARC após de um ano de avaliação.

Referências Bibliográficas

1. Lange RT, Pfeiffer P. Clinical evaluation of ceramic inlays compared to composite restorations. *Oper Dent* 2009;34(3):263-72.
2. Peumans M, De Munck J, Landuyt K, Poitevin A, Lambrechts P, Meerbeek B. Two-year clinical evaluation of a self-adhesive luting agent for ceramic inlay. *J Adhes Dent* 2010;12(2):151-161.
3. Ozakar-Ilday N, Zorba Y, Yildiz M, Erdem V, Seven N, Demirbuga S. Three-year clinical performance of two indirect composite inlays compared to direct composite restorations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013;18(3):e521-8.
4. Burke FJ, Crisp RJ, Richter B. A practice-based evaluation of the handling of a new self-adhesive universal resin luting material. *Int Dent J* 2006; 56(3):142-146.
5. Radovic I, Monticelli F, Goracci C, Vulicevic ZR, Ferrari M. Self-adhesive resin cements: A literature review. *J Adhes Dent*. 2008;10(4):251-258.
6. De Munck J, Vargas M, Van Landuyt K, Hikita K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Bonding of auto-adhesive luting material to enamel and dentin. *Dent Mater* 2004;20(10):963-71.
7. Behr M, Hansmann M, Rosentritt M, Handel G. Marginal adaptation of three self-adhesive resin cements vs. a well-tried adhesive luting agent. *Clin Oral Investig* 2009;13(4):459-464.
8. Abo-hamar SE, Hiller KA, Jung H, Federlin M, Friedl KH, Schmalz G. Bond strength of a new universal self-adhesive resin luting cement to dentin and enamel. *Clin Oral Investig* 2005;9(3):161-7.
9. Hikita K, Van Meerbeek B, De Munck J, Ikeda T, Van Landuyt K, Maida T, et al. Bonding effectiveness of adhesive luting agents to enamel and dentin. *Dent Mater* 2007;23(1):71-80.
10. Behr M, Rosentritt M, Regnet T, Lang R, Handel G. Marginal adaptation in dentin of a self-adhesive universal resin cement compared with well-tried systems. *Dent Mater* 2004;20(2):191-197.
11. Schenke F, Holler KA, Schmalz G, Federlin M. Marginal integrity of partial ceramic crowns within dentin with different luting techniques and materials. *Oper Dent* 2008;33(5):516-525.
12. Frankenberger R, Lohbauer U, Schaible RB, Nikolaenko SA, Naumann M. Luting of ceramic inlay in vitro: Marginal quality of self-etch and etch-and-rinse adhesive versus self-etch cements. *Dent Mater* 2008;24(2):185-191.
13. Cvar JF, Ryge G. Reprint of criteria for the clinical evaluation of dental restorative materials. 1971. *Clin Oral Investig* 2005;9(4):215-32.

14. Hickel R, Roulet J-F, Bayne S, Heintze SD, Mjör IA, Peter M, Rousson V, Randall R, Schmalz G, Tyas M, Vanherle G. Recommendations for conducting controlled clinical studies of dental restorative materials. *Clin Oral Invest* 2007;11(1):5-33.
15. Schenke F, Federlin M, Hiller K, Moder D, Schmalz G. Controlled, prospective, randomized, clinical evaluation of partial ceramic crowns inserted with RelyX Unicem with or without selective enamel etching. Results after 2 years. *Clin Oral Invest* 2012;16(2):451-461
16. Pires-de-Souza FC, Garcia LF, Hamida HM, Casemiro LA. Color stability of composites subjected to accelerated aging after curing using either a halogen or a light emitting diode source. *Braz Dent J* (2007) 18(2): 119-123
17. Thordrup M, Isidor F, Hörsted-Bindslev P. A 5-year clinical study of indirect and direct resin composite and ceramic inlays. *Quintessence Int* 2001;32(3):199-205.
18. Manhart J, Chen HY, Mehl A, Hickel R. Clinical study of indirect composite resin inlays in posterior stress-bearing preparations placed by dental students: results after 6 months and 1, 2, and 3 years. *Quintessence Int* 2010;41(5):399-410.
19. D'Arcangelo C, Zarow M, De Angelis F, Vadini M, Paolantonio M, Giannoni M, D'Amario M. Five-year retrospective clinical study of indirect composite restorations luted with a light-cured composite in posterior teeth. *Clin Oral Investig* 2013 May 22. [Epub ahead of print].
20. Azevedo CGS, De Goes MF, Ambrosano GMB, Chan DCN. 1-Year clinical study of indirect resin composite restorations luted with a self-adhesive resin cement: effect of enamel etching. *Braz Dent J* 2012;23(2):97-103.
21. Peumans M, Voet M, De Munck J, Landuyt KV, Ende AV, Meerbeek BV. Four-year clinical evaluation of a self-adhesive luting agent for ceramic inlays. *Clin Oral Invest* 2013;17(3):739-50.
22. Heintze SD. Systematic reviews: I. The correlation between laboratory tests on marginal quality and bond strength. II. The correlation between marginal quality and clinical outcome. *J Adhes Dent* 2007;9 Suppl 1:77-106.
23. Hayashi M, Tsuchitani Y, Kawamura Y, Miura M, Takeshige F, Ebisu S. Eight-year clinical evaluation of fired ceramic inlays. *Oper Dent* 2000;25(6):473-81.
24. Duarte S Jr, Botta AC, Meire M, Sadan A. Microtensile bond strengths and scanning electron microscopic evaluation of self-adhesive and self-etch resin cements to intact and etched enamel. *J Prosthet Dent* 2008;100(3):203-10.
25. Gerth HUV, Dammaschke T, Züchner H, Schäfer E. Chemical analysis and bonding reaction of RelyX Unicem and Bifix composites: a comparative study. *Dent Mater* 2006;22(10):934-41.
26. Yang B, Ludwig K, Adelung R, Kern M. Micro-tensile bond strength of three luting resins to human regional dentin. *Dent Mater* 2006;22(1):45-56.

27. Goracci C, Cury AH, Cantoro A, Papacchini F, Tay FR, Ferrari M. Microtensile bond strength and interfacial properties of self-etching and self-adhesive resin cements used to lute composite onlays under different seating forces. *J AdhesDent* 2006;8(5):327-35.
28. Taschner M, Krämer N, Lohbauer U, Pelka M, Breschi L, Petschelt A, Frankenberger R. Leucite-reinforced glass ceramic inlays luted with self-adhesive resin cement: a 2-year in vivo study. *Dent Mater.* 2012;28(5):535-40.

ARTIGO 2

Avaliação da expressão de metaloproteinase da matriz da dentina humana usando diferentes quelantes metálicos

Resumo

A preservação da interface de união dos procedimentos restauradores que se utilizam da técnica adesiva requer a prevenção enzimática da degradação das fibras colágenas na camada híbrida. O propósito desse estudo foi avaliar três diferentes fármacos: glucanato de clorexidina (CHX), doxiciclina (DOX) e tetraciclina (TETRA), na inibição da atividade de metaloproteinases (MMPs) dentinária, em tampão de extração e incubação, por meio de análise por zimografia. Pó de dentina foi obtido de molares humanos extraídos. Para o ensaio em tampão de incubação, as proteínas foram extraídas de alíquotas de 0,25 g em tampão de extração, e as amostras aplicadas em géis de poliacrilamida para a realização da zimografia e posterior incubação nos tampões com as soluções a serem testadas. Para o ensaio em tampão de extração, concentrações de CHX, DOX e TETRA foram testados na etapa de extração das proteínas para posterior eletroforese em gel de poliacrilamida. Houve inibição das MMPs apenas quando CHX 0,05% e 2% foram usadas. Para as concentrações inferiores de CHX e todas as concentrações testadas de TETRA e DOX, não foi observada inibição das MMPs. Concluiu-se que a CHX em alta concentração foi mais eficaz na inibição das proteases extraídas do que as concentrações de DOX e TETRA testadas, tanto em tampão de extração como de incubação.

Palavras-Chave: clorexidina, gelatinase, metaloproteinase, tetraciclina, zimografia.

Abstract

The preservation of the resin-dentin interface of restorative procedures which use the adhesive technique requires the prevention of enzymatic degradation of collagen fibers in the hybrid layer. The aim of this study was to evaluate three different metal ions chelating: chlorhexidine gluconate (CHX), doxycycline (DOX) and tetracycline (TETRA), in the inhibition of dentin's metalloproteinases (MMPs) activity, in extraction and incubation buffers by zymography analysis. Dentin powder was obtained from extracted human molars. Towards the assay incubation buffer, proteins were extracted in 0.25 g aliquots of extraction buffer, and the samples were applied inside polyacrylamide gels for holding the zymography and subsequent incubation in buffers containing the solutions to be tested. As for the assay extraction buffer, concentrations of CHX, DOX and TETRA were tested in step extraction of proteins for subsequent electrophoresis in polyacrylamide gel. There was inhibition of MMPs only when CHX 0.05 % and 2 % were used. For lower concentrations of CHX and all concentrations of DOX and TETRA, no inhibition of MMPs were observed. It was concluded that the CHX in a high concentration was more effective in inhibiting the extracted proteases than on the concentrations of DOX and TETRA tested in extraction as in incubation buffers.

Keywords: chlorhexidine, gelatinase, matrix metalloproteinase, tetracycline, zymography.

Introdução

A longevidade das restaurações adesivas está diretamente relacionada a fatores extrínsecos de natureza física, tais como forças oclusais, e expansão e contração dente/material restaurador devido a mudanças de temperatura¹. Outros fatores são de natureza química, como a presença de monômeros hidrofílicos que se comportam como uma membrana semipermeável por reterem água, monômeros não polimerizados, sorção de água e hidrólise¹. Além desses fatores extrínsecos, fatores intrínsecos relacionados à atividade enzimática também podem atuar de maneira importante nesse processo.

As metaloproteinases (MMPs) da matriz são enzimas capazes de degradar todas as proteínas componentes da matriz extracelular e das membranas basais, regulando o metabolismo fisiológico e patológico dos tecidos à base de colágeno. No tecido dentinário, essas enzimas são secretadas pelos odontoblastos durante a dentinogênese e, após a mineralização do tecido, elas ficam ligadas às fibrilas de colágeno. Estudos^{2, 3, 4} encontraram as seguintes MMPs em dentina e seus respectivos substratos de atividade: MMP- 1, MMP-13 e MMP-8, colágeno, MMP-2 e MMP-9, gelatina e MMP-20 (enamelinina). Essas MMPs constitutivas do tecido atuam dramaticamente na degradação do colágeno dentinário em lesões de cárie^{5, 6} e na deterioração das restaurações adesivas^{7, 3, 8}.

Alguns autores sugerem que, durante a etapa de condicionamento ácido da dentina, as MMPs que estão normalmente ligadas às fibrilas de colágeno mineralizado ficam expostas e podem tornar-se ativas, especialmente nas áreas em que o colágeno não foi adequadamente infiltrado pelo adesivo^{3, 9}, e nas áreas de degradação hidrolítica do sistema adesivo¹⁰. Assim, diferentes substâncias químicas, como o glucanato de clorexidina (CHX), galardín, doxiciclina (DOX), cloreto benzalcônico e cloreto de zinco estão sendo testados com a intenção de inibir a ação das MMPs da dentina e, conseqüentemente, preservar e/ou retardar a degradação da camada híbrida^{11, 12, 1, 13, 14, 9, 10}.

Estudos *in vitro*^{15, 16, 1} e *in vivo*^{17, 18} têm demonstrado que a aplicação do 2% de CHX, após o condicionamento ácido da dentina, previne a diminuição da resistência de união e da nanoinfiltração em dentes decíduos e permanentes, por ter habilidade de inativar MMPs- 2, 8 e 9. Ainda, outros estudos têm demonstrado que a aplicação de concentrações menores (0,2%) pode ser igualmente efetiva^{1, 19}. Apesar destes promissores resultados, sabe-se que o CHX não é um inibidor específico de MMPs^{1, 20}, além de seu uso representar um passo a mais à técnica

adesiva. Assim, estudos acerca de outros agentes que possam inibir as MMPs nos procedimentos adesivos estão sendo sugeridos^{13, 21, 22}.

Wang et al. (2005) avaliaram a citotoxicidade, inibição de MMPs e remoção de *smear layer* após raspagem e polimento radicular no tratamento periodontal com o uso de diferentes concentrações de tetraciclina (TETRA) como substância irrigadora. Os pesquisadores observaram que, embora a solução com TETRA não tenha sido efetiva para a remoção da *smear layer* em concentrações de ~25µg/ml, houve 90% de sobrevivência de células periodontais (baixa toxicidade) e inibição de MMP-2 e 9. Segundo Golub et al. (2009), a família das TETRA (TETRA, DOX, minoxiciclina) pode trazer benefícios terapêuticos significativos, de característica não antimicrobianas, relacionados a sua capacidade de se ligar a íons metálicos, havendo evidências de inibição das MMP-1, 2, 3, 8 provenientes de diferentes tecidos e fontes celulares.

Dessa forma o objetivo desse estudo foi avaliar três diferentes quelantes de íons metálicos (CHX, DOX e TETRA) na inibição da atividade de MMP dentinária, em tampão de extração e incubação, por meio de análise de zimografia. A hipótese nula testada foi que a atividade proteolítica da dentina não é afetada pelas diferentes concentrações de CHX, DOX e TETRA.

Materiais e Métodos

Obtenção do pó de dentina

Para a obtenção do pó de dentina foram coletados 20 terceiros molares humanos hígidos da clínica de cirurgia da Faculdade de Odontologia da PUCRS. Os dentes foram obtidos após o paciente assinar o Termo de Doação de Dentes, sendo que a idade média dos pacientes foi de 28 anos. No 1º lote, 10 dentes ficaram por duas semanas estocados em água a temperatura ambiente para posterior obtenção do pó de dentina e, no 2º lote, outros 10 dentes foram submetidos aos procedimentos para a obtenção do pó de dentina imediatamente após sua extração. Os dentes foram limpos e, em seguida, o esmalte, a polpa e a raiz foram removidos com ponta diamantada em alta rotação sob refrigeração. A dentina foi congelada em nitrogênio líquido e triturada em particulador ósseo, tipo pilão (Dentoflex, São Paulo, SP, Brasil).

Os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), salvo indicação contrária.

Investigação da influência do ativador de MMP APMA, do solvente DMSO e da desmineralização da dentina sobre a atividade das enzimas por zimografia.

Para a extração primária das proteínas foram realizados três métodos: (1) extração da dentina mineralizada: alíquota de 0,25 g de pó de dentina foram tratadas com 750 µl de tampão de extração (Tris 1 M pH 6,8, NaCl 1 M, azida sódica 0,02 %, triton X-100 0,1%), sob agitação com barra magnética a 4°C por 4 h; (2) extração da dentina mineralizada com o APMA (4-aminofenol mercúrico-acetato): seguiu-se o mesmo protocolo anterior com o acréscimo de APMA 2 mM; (3) extração da dentina desmineralizada: alíquota de 0,25 g de pó de dentina foi desmineralizada com ácido fosfórico a 1% por 20 minutos, sob agitação a 4°C, seguido de lavagem com Tris 1 M pH 6,8 + água, por três vezes; o sobrenadante foi removido e o precipitado foi tratado com 750 µl de tampão de extração, sob agitação com barra magnética a 4°C por 4 h.

Para a incubação das amostras com APMA, 20 µl de cada extrato, da extração primária, foi tratado com 2 mM de APMA seguido da incubação a 37°C por 1 h. Para a incubação com DMSO (Dimetilsulfóxido), 20 µl de cada extrato foi tratado com 20 µl de DMSO e também incubado a 37°C por 1 h. Ainda, incluiu-se uma amostra de proteínas extraídas com tampão de extração do pó de dentina mineralizada do Lote 1, e por fim, repetiu-se o protocolo da extração primária, porém com os extratos proteicos diluídos (1:5).

Para cada 15 µl de cada extrato foi acrescentado 5 µl de tampão de amostra (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0,004% de Bromophenol Blue e 0,125 M Tris-HCl pH 8,8). As amostras foram aplicadas em géis de poliacrilamida a 9% com 0,1% de gelatina (Difco) e realizada a eletroforese, a 20 mA, por uma hora. Após remoção do SDS com tampão de Triton X-100 (50 ml de Tris-HCl 50 mM pH 8 com 1% de Triton X-100) por 1 h, o gel foi incubado em tampão de incubação (Tris 1 M pH 8 + CaCl₂ 5 mM + ZnSO₄ 0,1 mM), a 37°C, por 18 h.

Avaliação da CHX, DOX e TETRA na atividade proteolítica da dentina, pela técnica de zimografia, em tampão de incubação e em tampão de extração

A CHX e a DOX foram adquiridas em farmácia de manipulação (Farmácia Bioética. Paraguaçu, MG, Brasil).

Em tampão de incubação

Alíquotas de 0,20 g de pó de dentina foram tratadas com 300 μ l de tampão de extração, sob agitação com barra magnética, a 4°C, por 2 h. Após centrifugação a 11000x g por 10 min, o precipitado foi desprezado e o sobrenadante (extrato proteico) reservado e congelado a -20°C até o uso. As proteínas foram então separadas por gel de poliacrilamida a 9% acrescido de 0,1% de gelatina (Difco). Quatro amostras de 20 μ L de extrato proteico com 5 μ L de tampão de amostra foram colocadas em cada canaleta do gel para a realização da eletroforese. Após a remoção do SDS, o gel foi cortado e cada tira foi incubada em um tampão de incubação (Fig. 1 A), como segue: 1) Tampão Ca⁺ (Tris 1M pH 8 + CaCl₂ 5 mM + ZnSO₄ 0,1 mM); 2) Tampão DOX 50 (doxiciclina 50 mg/ml solubilizada em DMSO); 3) Tampão CHX 0,05 (glucanato de clorexidina 0,05%); 4) Tampão EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético 5 mM- controle Negativo). Esse mesmo ensaio foi realizado com tampões de incubação com TETRA solubilizada em DMSO, em diferentes concentrações (Fig. 1 B) como segue: 1) Tampão Ca⁺ (com DMSO); 2) Tampão TETRA 500 (TETRA 500 μ g/ml); 3) Tampão TETRA 100 (TETRA 100 μ g/ml); 4) Tampão TETRA 50 (TETRA 50 μ g/ml) e 5) Tampão TETRA 10 (TETRA 10 μ g/ml).

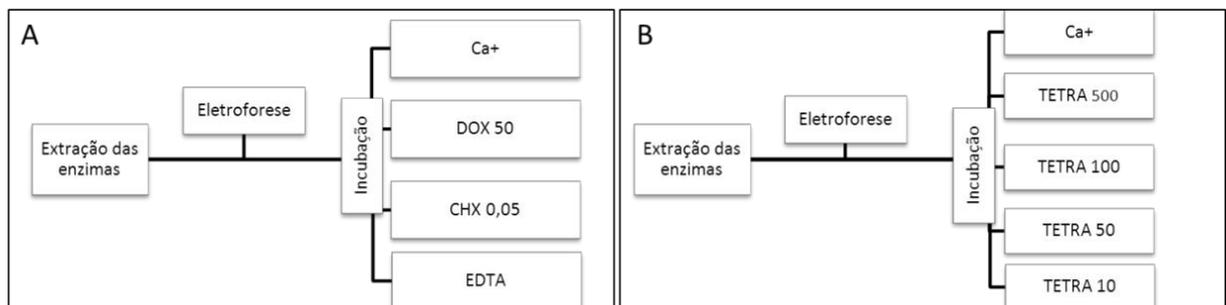


Fig. 1 (A) Diagrama do uso da doxiciclina (DOX) e clorexidina (CHX) em tampão de incubação. (B) Diagrama do uso de diferentes concentrações de tetraciclina (TETRA) em tampão de incubação.

Em Tampão de Extração:

Foi realizada a extração de proteínas com tampão de extração Ca⁺, como descrito no item anterior, e o extrato proteico resultante foi dividido em sete alíquotas de 45 μ l cada, onde foram acrescentados: 1) controle (apenas o extrato proteico); 2) CHX 0,03%; 3) CHX 0,015%; 4) CHX 0,06%; 5) DOX 100 μ g/ml; 6) DOX 50 μ g/ml; 7) DOX 25 μ g/ml. Os extratos (Fig. 2 A) ficaram sob agitação com barra magnética por 12 h a 4°C. Após, 15 μ l de

cada amostra (acrescido de 5 μ l de tampão de amostra) foram colocados em gel de poliacrilamida a 9% acrescido de 0,1% de gelatina (Difco) e a eletroforese realizada. Depois da remoção do SDS, o gel foi incubado, em tampão de incubação (Tris 1M pH 8 + CaCl₂ 5 mM + ZnSO₄ 0,1 mM), a 37°C, por 18 h. Esse mesmo protocolo (Fig. 2 B) foi seguido para análise do uso da TETRA, em diferentes concentrações, como segue: 1) controle Ca⁺ (apenas o extrato proteico); 2) TETRA 1000 μ g/ml; 3) TETRA 500 μ g/ml; 4) TETRA 100 μ g/ml e 5) TETRA 500 μ g/ml, sendo que para esse ensaio foram utilizados 20 μ l de cada amostra nas cinco primeiras canaletas do gel e 5 μ l nas outras cinco.

Também foram analisadas altas concentrações: DOX 5mg/ml, TETRA 2,5 mg/ml e CHX 2% em tampão de extração, seguindo a metodologia anterior.

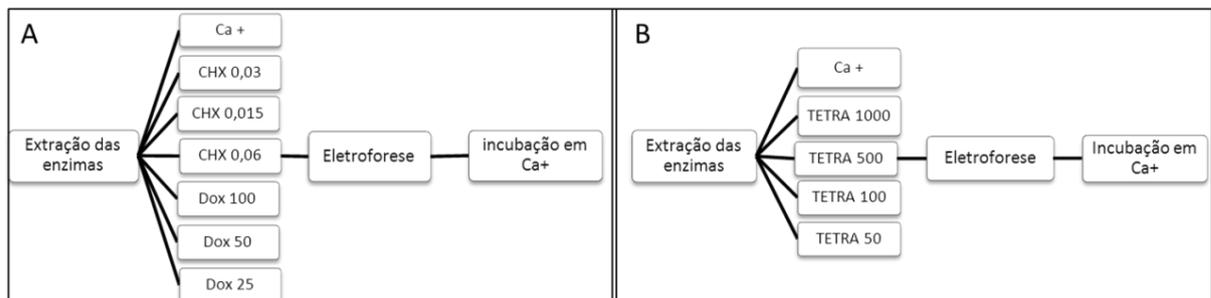


Fig. 2 (A) Diagrama do uso de diferentes concentrações de doxiciclina (DOX) e Clorexidina (CHX) em Tampão de extração. (B) Diagrama do uso de diferentes concentrações Tetraciclina (TETRA) em Tampão de extração.

Para a demonstração da atividade enzimática, após as incubações, os géis foram lavados com água destilada, corados com coomassie blue e após 3 horas descorados. Após, foram analisados e fotografados.

Para a estimativa do peso molecular das enzimas, foi utilizado o padrão de peso molecular: SDS-PAGE Molecular Weight Standards (Broad Range –Biorad: miosina 200.000, b-galactosidase 116.250, fosforilase b 97.400, albumina sérica 66.200, ovalbumina 45.000, anidrase carbônica 31.000, inibidor de tripsina 21.500; lisozima 14.400 e aprotinina 6.500 KDa). Esse padrão de peso molecular foi colocado sempre na primeira canaleta do gel de corrida, sendo que se usaram diferentes concentrações (8%, 9% e 10%) de géis de corrida (dados não mostrados) a fim de verificar o peso molecular das enzimas extraídas. Para calcular o peso molecular das enzimas foi feita uma curva de referência, pela plotagem do logaritmo decimal dos pesos moleculares das proteínas do padrão, em escala semilogarítmica, (eixo y) versus sua mobilidade relativa à frente de migração do corante (R_f): Peso molecular desconhecido = antilog y.

Resultados

Na investigação da influência do uso de APMA e DMSO em extratos proteicos de dentina mineralizada e desmineralizada (Fig. 3), foi observada atividade gelatinolítica devido à presença da banda de 63 KDa (banda mais intensa) em todas as amostras. Quando se usou o APMA durante a extração (canaletas 3, 6 e 9) observou-se também a presença da banda 64 KDa e, quando não se usou o APMA na extração de dentina mineralizada e desmineralizada (canaletas 15, 4, 8, 10), observou-se a presença da banda de 68 KDa. Porém, quando o APMA foi incubado a 37°C por 1 hora nos extratos das três extrações primárias, notaram-se as mesmas bandas (63 KDa e 64 KDa). Assim, não se encontrou diferenças sobre a atividade das enzimas com ou sem o uso do APMA e, por esse motivo, não foi usado nas extrações seguintes. Também não se observou interferência do uso do DMSO nas diferentes extrações: os resultados das bandas da extração primária são os mesmos da extração primária + incubação com DMSO (Fig. 3). Ainda, quando se diluiu os extratos proteicos (1:5), aparece apenas a banda de 63 KDa que é a banda com maior atividade nos extratos não diluídos (1:1). Ao se usar o extrato de proteínas do pó de dentina do Lote 1, observou-se uma banda intensa de 54 KDa e outra menos intensa de 58 KDa. Em estudo piloto prévio, acerca de metodologias de extrações (dados não mostrados), encontrou-se essas mesmas bandas para o Lote 1 do pó de dentina, que apareceram também para os extratos de dentina mineralizada e desmineralizada.

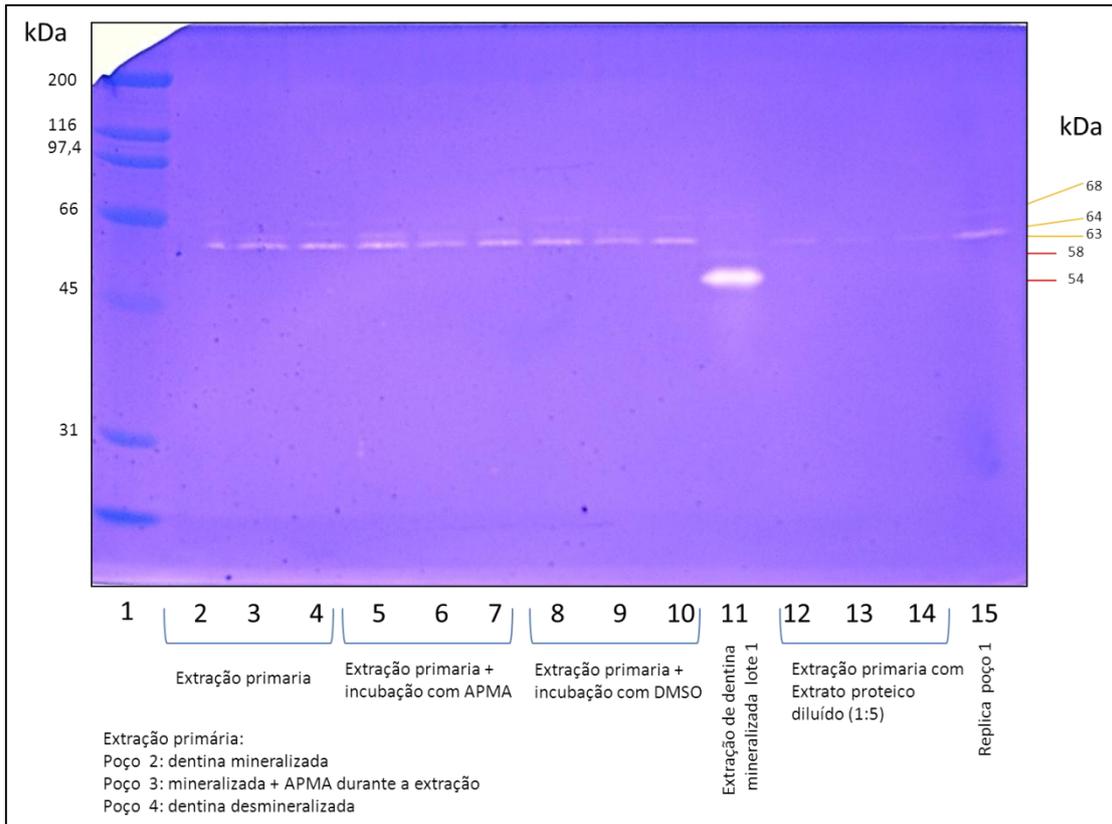


Fig. 3: Gel de investigação da influência do uso de APMA e DMSO em extratos proteicos de dentina mineralizada e desmineralizada. O lado esquerdo mostra valores do padrão de peso molecular e o lado direito valores estimados das proteínas dos Lotes 1 (canaleta 11) e Lote 2 (demais canaletas).

Na atividade proteolítica em diferentes tampões de incubação observou-se a presença de atividade gelatinolítica (Fig. 4) no controle positivo (Canaleta Controle Ca⁺) e ausência no negativo (Canaleta EDTA). Para o mesmo extrato proteico, colocou-se igual volume em cada canaleta do gel que, após a eletroforese, foi cortado e incubado nos seus respectivos tampões de incubação. Nos tampões com DOX e CHX não se observou inibição total da atividade proteolítica, embora as bandas observadas no gel onde o tampão de CHX foi usado tenham sido mais fracas quando comparadas aos controles positivos, demonstrando redução da atividade enzimática. Notou-se que a CHX também alterou as propriedades tintoriais do corante coomassie blue. Quando se testou a TETRA como tampão de inibição, para igual volume do mesmo extrato proteico, a presença de atividade gelatinolítica (Fig. 5) também foi observada para todas as concentrações.

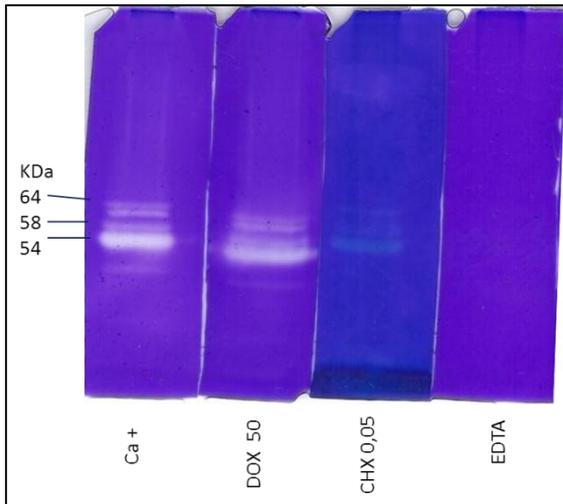


Fig 4. Atividade proteolítica em tampões de incubação em controle positivo (Ca+), doxiciclina 50mg/ml (DOX 50), clorexidina 0,05% (CHX 0,05) e controle negativo (EDTA). Extrato proteico do Lote 1 de pó de dentina.

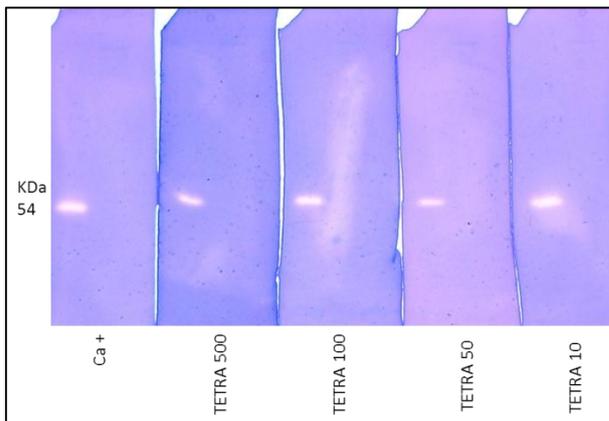


Fig 5. Atividade proteolítica em tampões de incubação com diferentes concentrações de tetraciclina (TETRA). Extrato proteico do Lote 1 de pó de dentina.

Atividade proteolítica em diferentes tampões de extração: Para baixas concentrações de CHX (0,03%, 0,015% e 0,006%) e DOX (100 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$) usadas em tampão de extração (Fig. 6), houve a mesma atividade gelatinolítica do controle, ou seja, não houve inibição nestas condições. O mesmo ocorreu para todas as concentrações de TETRA (Fig. 7), testadas em 20 μl e 5 μl de volume do extrato proteico. Também foi observada a presença de uma banda de 94 KDa na canaleta TETRA 50 $\mu\text{g/ml}$. Quando altas concentrações de DOX 5 mg/ml e de TETRA 2,5 mg/ml foram usadas em tampão de extração (Fig. 8),

encontrou-se a mesma atividade gelatinolítica do controle, isto é, não houve inibição. Porém, quando se comparou o controle com o uso de CHX 2%, encontrou-se diminuição quase que por completo da atividade gelatinolítica.

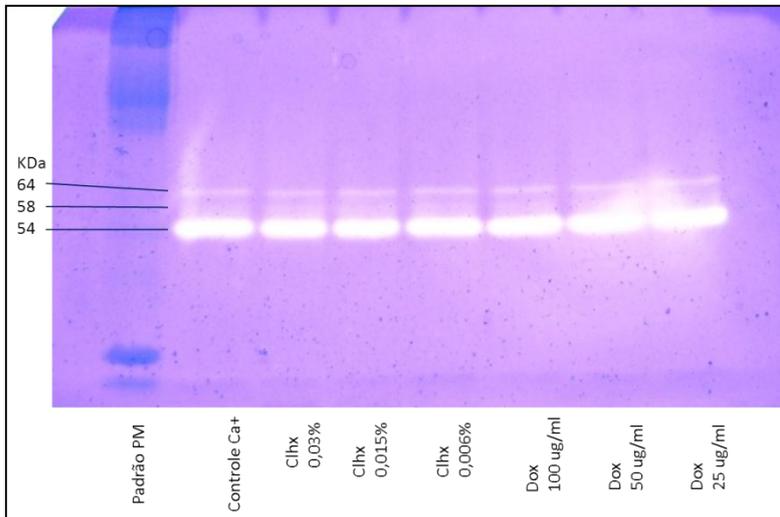


Fig 6. Ação da doxicilina (DOX) e clorexidina (CHX) sobre metaloproteases da dentina em tampão de extração. Extrato proteico do Lote 1 de pó de dentina.

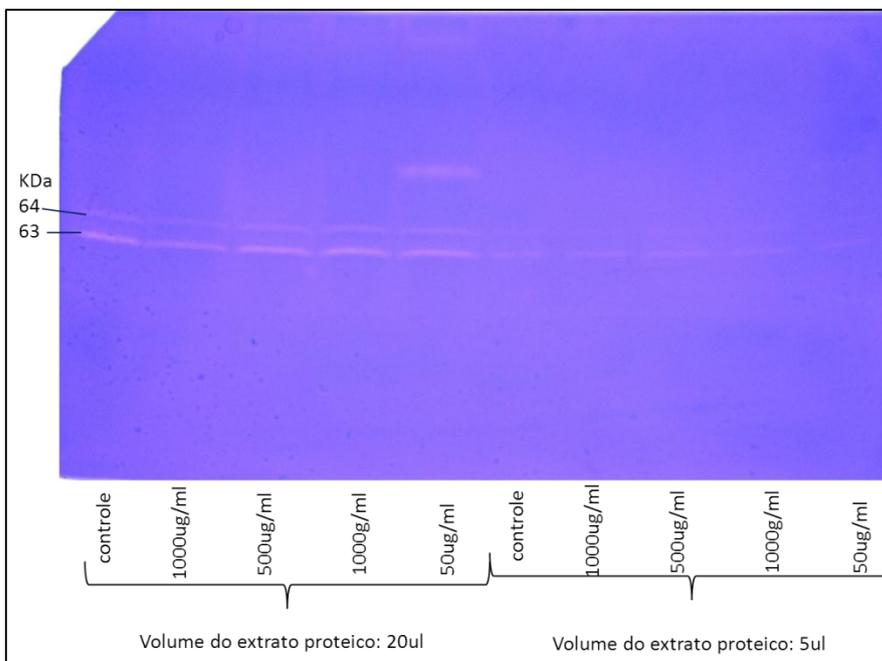


Fig 7. Ação de diferentes concentrações de Tetraciclina (TETRA) nas metaloproteases da dentina em tampão de extração. Extrato proteico do Lote 2 de pó de dentina.

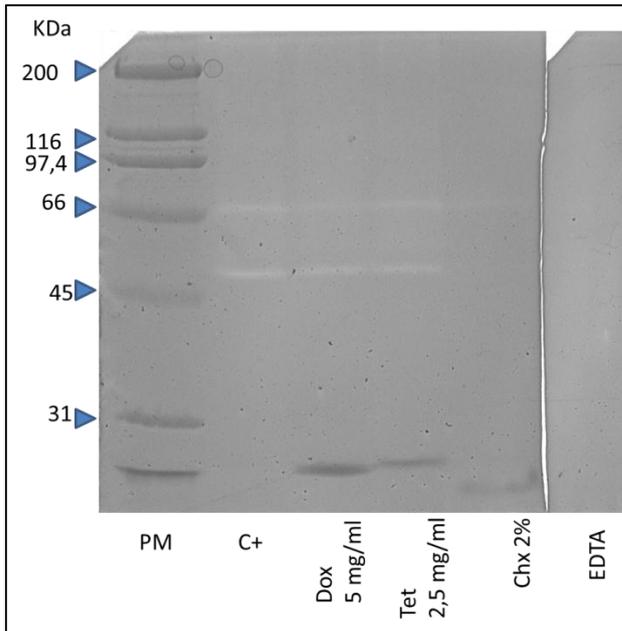


Fig 8. Atividade de doxiciclina (DOX 5), tetraciclina (TETRA 2,5), clorexidina (CHX 2%) e controles positivo (Ca+) e negativo (EDTA), nas metaloproteases da dentina em tampão de extração. Extrato proteico do Lote 2 de pó de dentina. A esquerda valores dos padrões de peso moleculares.

Discussão

A zimografia de substrato é um método simples, sensível e funcional para análise de atividade proteolítica^{25, 26}. A técnica consiste em uma eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida copolimerizado com um detergente iônico (SDS) e com o substrato preferencial da enzima em análise, no caso a gelatina. O SDS deve ser removido com o uso de um detergente não iônico (Triton X-100). Após a renaturação, a incubação em uma solução de desenvolvimento (ou tampão de incubação) rica em íons cálcio e/ou zinco ativa as proteases e essas digerem o substrato (gelatina), que pode ser visualizado pela presença de bandas brancas; isso é, não pigmentadas pelo corante Coomassie²⁷. Contudo, a extração proteica dos tecidos/cultura celular são os passos críticos da zimografia de substrato²⁸. A literatura traz diversos métodos de extração de MMPs do tecido dentinário.

Em 2000, De Las Heras et al. propuseram diferentes técnicas, adaptando e modificando procedimentos usados para a extração de MMPs de osso de porco e de dentina de bovino e rato. Esses pesquisadores testaram três diferentes métodos com cloreto de guanidina, e para todas elas obtiveram sucesso. No entanto, essa metodologia, embora

corroborado por outros autores^{3, 30}, possui relevante complexidade técnica³¹. Outros pesquisadores recomendam a desmineralização do pó de dentina previamente ao uso do tampão de extração. Mazzoni et al. (2007) e Kato et al. (2011) usaram ácido cítrico para essa desmineralização, enquanto Breschi et al. (2010 a e b) utilizaram ácido fosfórico a 10%. Por fim, De Munk et al. (2010) realizou a extração somente através do tampão de Laemmli. Assim, não há um consenso em relação à utilização de um método ou outro e tão pouco a quantidade de proteínas extraídas que deve ser usada na eletroforese. Por isso, neste estudo, testou-se o uso de tampão de extração em dentina mineralizada e desmineralizada com ácido fosfórico a 10%. Não se encontrou diferença entre os métodos, já que em ambos as MMPs foram extraídas com sucesso e de forma funcional. Portanto, para a realização dos ensaios seguintes com DOX, TETRA e CHX, optou-se pelo uso do tampão de extração em dentina mineralizada para a obtenção dos extratos proteicos. Contudo, entende-se que mais estudos devam ser conduzidos a fim de elucidar e padronizar a técnica de extração mais adequada.

Como o próprio procedimento de extração pode ativar enzimas ou causar interações de enzimas ativas com seus respectivos inibidores²⁸, alguns autores^{29, 34, 31} preconizam o uso de inibidores de serino protease (como o PMSF- fluoreto de fenilmetilsulfonilo) e, mais recentemente^{35, 36, 31}, o uso de inibidores de cisteína catépsina, como o E-64. Em estudo piloto prévio, acerca de metodologias de extração de proteínas da dentina, utilizou-se o PMSF e não se observou nenhuma influência desse inibidor nos resultados da atividade gelatinolítica, porém, não se testou o E-64. Também não se observou diferenças na atividade das proteases quando do uso ou não do APMA (4-aminofenol mercúrico-acetato), ativador de proenzimas^{32, 31} e, por isso, não foi usado nos geis apresentados nesse estudo. Segundo Howard et al. (1991), o APMA remove o pró-peptídeo amino-terminal do complexo pro-gelatinase A de 72 KDa + TIMP-2, liberando sua forma ativa gelatinolítica de 62 KDa; porém, o complexo pró-gelatinase A pode sofrer auto-clivagem quando TIMP-2 está ausente e gerar formas ativas. Assim, o uso do APMA parece não contribuir para o aumento da ativação dos zimogênios. De acordo, Mazzoni et al. (2006) consideram essa atividade proteolítica encontrada no pó de dentina mineralizado como um artefato do preparo da amostra; isto é, a ativação autolítica das enzimas latentes em resposta ao estresse mecânico da preparação do pó de dentina. Assim, pode-se especular que talvez esse seja o motivo para não se ter encontrado diferença de atividade com e sem o uso do APMA, assim como se encontrou muitas formas autoclivadas de proteínas (Fig. 3, 4, 5, 6, 7 e 8).

Para os extratos proteicos do Lote 1 do pó de dentina (Fig. 3, 4, 5 e 6), encontrou-se bandas de valores estimados de 54 KDa, 58 KDa e 64 KDa. Já para os extratos do Lote 2 (Fig. 7 e 8), encontrou-se bandas de valores estimados de 63 KDa, 64 KDa e 68 KDa. É possível que a estocagem em água dos dentes do Lote 1, por uma semana em temperatura ambiente antes dos procedimentos de moagem e congelamento do pó, tenha permitido hidrólise das proteínas, o que acarretaria em diferenças nos pesos moleculares das enzimas. Sabe-se que as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) possuem atividade em pH próximo do neutro e na presença de íons cálcio ou zinco, e são totalmente inibidas na presença de seus inibidores específicos, EDTA e/ou 1,10 fenantrolina³⁸. Dessa forma é provável que as proteases encontradas nos experimentos do presente estudo sejam MMPs, uma vez que os tampões de extração estão de acordo com estes parâmetros. Provavelmente as bandas de 64 KDa e 68 KDa representem sua forma ativa^{29, 30} e as outras bandas presentes representem formas complexadas ou autoclivadas de enzimas^{37, 5, 29}.

Estudos^{29, 32} têm detectado a presença de MMP-9, mas em concentração menor que a MMP-2, evidenciando que nem sempre é possível a obtenção de MMP-9 da dentina em quantidades sensíveis ao método de detecção por zimografia. Este fato pode explicar porque não se identificou bandas da sua forma nativa, em torno de 82 KDa, nem de sua forma latente, 92KDa, mesmo utilizando-se dentes de indivíduos com a idade máxima de até 40 anos e preferencialmente menor que 20 anos, já que dentes de pacientes jovens possuem maiores concentrações de MMP-2 e MMP-9.²⁹

Embora a zimografia seja amplamente utilizada como ensaio único para observar a atividade enzimática das MMPs, outras técnicas podem ser associadas a fim de complementar os resultados, especialmente no que se refere à identificação das proteínas. É o caso da espectrometria de massas, ensaios imunohistoquímicos (como o Western Blot), imunofluorescência, radiohímunoensaio (ICTP- Pyridinoline-containing, crosslinked carboxyterminal telopeptide breakdown products of type I collagen), entre outros^{24, 29, 40, 39, 3, 41, 42, 14, 43}. Foram realizadas análises por espectrometria de massas (ANEXO D) para identificação das MMPs nas bandas do Lote 1 (54 KDa e 64 Kda) e Lote 2 (63 Kda e 68 KDa). No entanto, os peptídeos obtidos foram correspondentes à queratina humana, o que é tipicamente esperado em amostras manipuladas⁴⁰. Além disso, a quantidade de proteína presente na banda pode não ter sido o suficiente para gerar dados de identificação. Postula-se que a quantidade mínima necessária para identificação de uma proteína, a partir de um gel, seja em torno de 100 ng. Pode ainda ter ocorrido hidrólise nas proteínas já que o gel

permaneceu armazenado em solução aquosa de ácido acético 7% (oito meses) até o processamento do ensaio.

A hipótese nula foi parcialmente rejeitada, pois houve inibição das proteases com o uso de CHX 2%. Já para as outras concentrações de CHX, DOX e TETRA, tanto em tampão de extração como em tampão de incubação, não se observou inibição. Quanto ao uso dos quelantes de íons metálicos testados em tampão de extração ou de incubação, entende-se que os dois métodos foram sensíveis para a detecção de atividade/inibição, e que o uso em tampão de extração é tecnicamente mais conveniente por não ser necessário cortar o gel para posterior incubação e por viabilizar a observação das bandas do padrão de peso molecular junto às bandas de atividade.

Os dados encontrados nesse trabalho referentes à CHX estão de acordo com a literatura, pois tem sido demonstrado que altas concentrações de clorexidina (CHX 0,2 e 2%) são capazes de inibir MMP-2, -8 e -9^{44; 13; 19} e cisteína catepsina⁴⁵, de reduzir a solubilidade de fibras colágenas em meio aquoso⁴⁶ e de não influenciar negativamente a resistência de união à microtração com sua aplicação em dentina condicionada por ácido^{16, 15, 47}. A CHX é uma molécula anfipática^{33, 20} que, em pH neutro, se liga tanto eletrostaticamente às cargas negativas do fosfato trivalente da hidroxiapatita, quelando íons metálicos, quanto às cargas negativas dos grupos carboxílicos do colágeno²⁰. Dessa forma, pode-se inferir que a CHX, além de permanecer unida ao tecido dentinário mineralizado e desmineralizado, preveniria a ligação dos íons metálicos às MMPs, inibindo sua atividade catalítica. Essa natureza molecular da CHX pode também ter sido responsável pela alteração tintorial do azul de Coomassie observada no gel nela incubado (Fig. 4). Não sendo a CHX um inibidor específico, baixas concentrações não foram capazes de inibir completamente as MMPs, talvez em função da concentração dos extratos proteicos ser muito elevado, pois encontrou-se inibição parcial das gelatinases quando incubadas em tampão de CHX a 0,05%. Em comparação com o que está sendo exposto, um estudo mostrou¹³ que a quantidade de galardin, inibidor específico de MMPs, necessária para inibir atividade gelatinolítica, foi de 10 a 100 vezes menor que a CHX, para a mesma concentração de proteínas. Assim, seria necessária uma curva de atividade para definir a quantidade do fármaco em relação à quantidade de proteínas. Cabe ressaltar, porém, que os estudos onde a técnica zimográfica é empregada, as proteases são extraídas dos tecidos e estão solúveis, diferente da realidade clínica, onde a concentração necessária para completa inibição de MMPs endógenas ligadas à dentina possa ser muito diferente²⁰.

Embora alguns estudos relatem inibição de MMPs com o uso de TETRA e/ou seus análogos em culturas de células do ligamento periodontal^{23, 48, 24}, em tecido dentinário¹⁴ e na resistência de união quando incorporada a adesivos⁴⁷, nesse estudo não se encontrou inatividade das proteases testadas com o uso da TETRA e DOX. Do mesmo modo que a CHX, a TETRA e seus homólogos também não são inibidores específicos. Acredita-se que o mecanismo de ação de inibição das MMPs por esses fármacos ocorra principalmente por suas propriedades de ligação ao Zn^{++} e Ca^{++} , ou ainda, nos casos dos fibroblastos do ligamento periodontal, atuando na sua síntese proteica²⁴. No entanto, mesmo testando altas concentrações dos fármacos, não se obteve inativação das gelatinases (Fig. 8).

No presente estudo não foi utilizado método para quantificação de proteínas, sendo que a padronização foi realizada através do volume do extrato proteico. A literatura diverge sobre a quantidade de proteínas a ser usada, variando de 3 e 6 μl ²⁹, 60 μl ^{3, 34, 31} a 120 μl ³⁰, ou não especificando^{1, 13}. Portanto, como forma de corroborar com os resultados dessa pesquisa e de padronizar a metodologia de extração de proteínas da dentina, sugere-se que futuramente uma curva de atividade seja realizada para testar as diferentes concentrações de proteínas com as dos seus possíveis inibidores.

Conclusão

Dentro das limitações deste estudo, concluiu-se que houve inibição das gelatinases com o uso de CHX 2% e 0,05%. Porém, para as concentrações inferiores a 0,05% de CHX e todas as concentrações testadas de TETRA e DOX, esta inibição não foi observada. O uso dos quelantes de íons metálicos testados em tampão de extração e de incubação foi sensível para a detecção de atividade/inibição proteolítica.

Referências Bibliográficas

1. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, Ruggeri A Jr, Tay FR, Dorigo Ede S, Pashley DH. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: A 2-year in vitro study. *Dent Mater* 2010;26(4):320-5.
2. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 2007;65(1):1-13.
3. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol* 2007; 52(2):121-27.
4. Shimada Y, Ichinose S, Sadr A, Burrow MF, Tagami J. Localization of matrix metalloproteinases (MMPs-2, 8, 9 and 20) in normal and carious dentine. *Aust Dent J* 2009;54(4):347-54.
5. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 1998;77(8):1622-9.
6. Toledano M, Nieto-Aguilar R, Osorio R, Campos A, Osorio E, Tay FR, Alaminos M. Differential expression of matrix metalloproteinase-2 in human coronal and radicular sound and carious dentine. *J Dent* 2010;38(8): 635-40.
7. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, Toledano M, Pashley EL, Tay FR. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials*. 2006;27(25):4470-6.
8. Pashley DH, Tay FR, Imazato S. How to increase the durability of resin-dentin bonds. *Compend Contin Educ Dent* 2011;32(7):60-4, 66.
9. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Gu LS, Zhang K, Agee KA, Carvalho RM, Manso A, Carrilho M, Tay FR, Breschi L, Suh BI, Pashley DH. The anti-MMP activity of benzalkonium chloride. *J Dent*. 2011;39(1):57-64.
10. Perdigão J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: a comprehensive review. *J Esthet Restor Dent*. 2013;25(4):219-41.
11. Pashley DH, Tay FR, Imazato S. How to increase the durability of resin-dentin bonds. *Compend Contin Educ Dent*. 2011;32(7):60-4.
12. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res*. 2005;84(8):741-6.

13. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrillo M, Tjäderhane L, Visintini E, Cadenaro M, Tay FR, Dorigo E, Pashley DH. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater* 2010;26(6):571-78.
14. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley DH, Tay FR, Toledano M. Zinc reduces collagen degradation in demineralized human dentin explants. *J Dent*. 2011;39(2):148-53.
15. Zhou J, Tan J, Chen L, Li D, Tan Y. The incorporation of chlorhexidine in a two-step self-etching adhesive preserves dentin bond in vitro. *J Dent*. 2009;37(10):807-12.
16. Komori PCP, Pashley DH, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Goes MF, Wang L, carrillo M. Effect of 2% Chlordexidine Digluconate on the Bond Strength to Normal Versus Caries-affected Dentin. *Oper Dent* 2009;34(2):157-65.
17. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res*. 2007;86(6):529-33.
18. Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of in vivo resin-dentin bonds. *Eur J Oral Sci*. 2010;118(4):411-6.
19. Mazzoni A, Carrilho M, Papa V, Tjäderhane L, Gobbi P, Nucci C, Di Lenarda R, Mazzotti G, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. MMP-2 assay within the hybrid layer created by a two-step etch-and-rinse adhesive: biochemical and immunohistochemical analysis. *J Dent*. 2011;39(7):470-7.
20. Kim J, Toshikazu U, Carrillo M, Agee Ka, Mazzoni A, Breschi L, Carvalho R, Tjäderhane L, Looney S, Wimmer C, Tezvergil-Mutluay A, Tay FR, Pashley DH. Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin power. *Dent Mater* 2010; 26(8):771-8.
21. Carvalho RV, Ogliari FA, Souza AP, Silva AF, Petzhold CL, Line SRP, Pica E, Etges A. 2-Hydroxyethyl methacrylate as na inhibitor of matrix metalloproteinase-2. *Eur J Oral Sci* 2009; 117(1):64-67.
22. Henn S, Carvalho RV, Ogliari FA, Souza AP, Line SRP, Silva AF, Demarco FF, Etges A, Piva E. Addition of zinc methacrylate in dental polymers: MMP-2 inhibition and ultimate tensile strength evaluation. *Clin Oral Invest* 2012;16(2):531-6.
23. Wang Y, Morlandt AB, Xu X, Carnes DL Jr, Chen Z, Steffensen B. Tetracycline at subcytotoxic levels inhibits matrix metalloproteinase-2 and -9 but does not remove the smear layer. *J Periodontol*. 2005;76(7):1129-39.
24. Golub LM, Lee HM, Greenwald RA, Ryan ME, Sorsa T, Salo T, Giannobile WV. A matrix metalloproteinase inhibitor reduces bone-type collagen degradation fragments and specific collagenases in gingival crevicular fluid during adult periodontitis. *Inflamm Res*. 1997;46(8):310-9.

25. Fernández-Resa P, Mira E, Quesada AR. Enhanced detection of casein zymography of matrix metalloproteinases. *Anal Biochem.* 1995;224(1):434-5.
26. Leber TM, Balkwill FR. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Anal Biochem.* 1997;249(1):24-8.
27. Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem.* 1994;218(2):325-9.
28. Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, Ferdinandy P. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2010;61(2):205-9.
29. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The Matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol* 2000;45(9):757-65.
30. Boushell LW, Nagaoka H, Nagaoka H, Yamauchi M. Increased matrix metalloproteinase-2 and bone sialoprotein response to human coronal caries. *Caries Res.* 2011;45(5):453-9.
31. Kato MT, Hannas AR, Leite AL, Bolanho A, Zarella BL, Santos J, Carrillo M, Tjäderhane L, Buzalaf MAR. Activity of Matrix Metalloproteinases in Bovine Versus Human Dentine. *Caries Res* 2011; 45(5):429-34.
32. Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, Di Lenarda R, Pashley DH, Breschi L. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res.* 2007;86(5):436-40.
33. De Munck J, Mine A, Van den Steen PE, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, Van Meerbeek B. Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2010;118(5):494-501.
34. Santos J, Carrilho M, Tervahartiala T, Sorsa T, Breschi L, Mazzoni A, Pashley D, Tay F, Ferraz C, Tjäderhane L. Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. *J Endod.* 2009;35(5):686-9.
35. Tersariol IL, Geraldeli S, Minciotti CL, Nascimento FD, Pääkkönen V, Martins MT, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, Salo T, Tjäderhane L. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. *J Endod.* 2010;36(3):475-81.
36. Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldeli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, Nader HB, Salo T, Tjäderhane L, Tersariol IL. Cysteine Cathepsins in human carious dentin. *J Dent Res* 2011;90(4):506-11.
37. Howard EW, Bullen EC, Banda MJ. Regulation of the autoactivation of human 72-kDa progelatinase by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J Biol Chem.* 1991;266(20):13064-9.
38. Cotrim P, Andrade CR, Line S, Almeida OP, Coletta R. Expression and Activity of Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) in the development of rat first molar tooth germ. *Braz Dent J* 2002;13(2):97-102.

39. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 2006;312(5771):212-7.
40. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:437-73.
41. Lehmann N, Debret R, Roméas A, Magloire H, Degrange M, Bleicher F, Sommer P, Seux D. Self-Etching Increases Matrix Metalloproteinase Expression in the Dentin-Pulp Complex. *J Dent Res* 2009;88(1):77-82.
42. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley D, Tay F, Toledano M. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. *Eur J Oral Sci*. 2011;119(1):79-85.
43. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldeli S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho MR, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater*. 2013;29(1):116-35.
44. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1999;6(3):437-9.
45. Scaffa PM, Vidal CM, Barros N, Gesteira TF, Carmona AK, Breschi L, Pashley DH, Tjäderhane L, Tersariol IL, Nascimento FD, Carrilho MR. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *J Dent Res*. 2012;91(4):420-5
46. Carrilho MR, Tay FR, Donnelly AM, Agee KA, Tjäderhane L, Mazzoni A, Breschi L, Foulger S, Pashley DH. Host-derived loss of dentin matrix stiffness associated with solubilization of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;90(1):373-80.
47. Stanislawczuk R, Costa JA, Polli LG, Reis A, Loguercio AD. Effect of tetracycline on the bond performance of etch-and-rinse adhesives to dentin. *Braz Oral Res*. 2011;25(5):459-65.
48. Bildt MM, Bloemen M, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. Matrix metalloproteinase inhibitors reduce collagen gel contraction and alpha-smooth muscle actin expression by periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 2009;44(2):266-74.

ANEXO A- Aprovação do protocolo de pesquisa CEP 10/05226.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-1421/10

Porto Alegre, 03 de dezembro de 2010.

Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 10/05226 intitulado **"Avaliação clínica de inlays em cerômero cimentadas com material resinoso autoadesivo"**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Ana Maria Spohr
FO
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000
Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO B- Termo de consentimento livre e esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Avaliação clínica de *inlays* em cerômero cimentadas com material resinoso autoadesivo

Você precisa fazer duas restaurações porque apresenta cárie em dois dentes. Estas restaurações deverão ser feitas pela técnica chamada indireta, em que é feita a remoção da cárie e uma cópia do dente com material de moldagem. A restauração é feita em laboratório protético, e depois cimentadas no seu dente. Existem diferentes cimentos para fazer esta cimentação, e neste estudo iremos avaliar o comportamento de dois tipos de cimentos. Esses materiais são aprovados pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), órgão que no Brasil regulamenta medicamentos, alimentos, materiais para uso médico/ odontológico, sendo que apenas os produtos que são aprovados podem ser comercializados no País, por serem comprovadamente seguros a saúde. Todos os materiais utilizados para o seu atendimento, inclusive os cimentos que serão avaliados possuem esse registro. Este estudo pretende acompanhar o comportamento destas restaurações por um período de 18 meses.

Para fazer cada uma destas restaurações, serão seguidos os seguintes passos: na 1ª consulta, será removida a cárie do dente, o seu dente será moldado para termos uma réplica em gesso, para que no laboratório de prótese seja feita uma restauração em resina na cor dos seus dentes. O dente será fechado com um material provisório até a segunda consulta (não mais que duas semanas). Na 2ª consulta, a restauração definitiva (aquela que foi feita no laboratório) será provada. Se a restauração estiver boa, ela será cimentada no dente e o seu tratamento estará finalizado.

Os custos destes procedimentos serão pagos por você (paciente), conforme tabela de preços e condições de pagamento estipuladas pela Faculdade de Odontologia da PUCRS. Independente do tipo de cimento a ser utilizado, as restaurações tem o mesmo preço. As restaurações serão cimentadas com diferentes cimentos resinosos e após uma semana, seis meses, 12 meses e 18 meses, serão avaliadas clinicamente e moldadas para a avaliação por microscopia.

Durante e após a realização da restauração, existe um pequeno risco de você sentir alguma sensibilidade ou desconforto. Caso isto aconteça, procedimentos para amenizá-los serão realizados. A restauração lhe beneficiará por trazer novamente a forma do dente e diminuirá a sensibilidade causada pela perda da estrutura dental. Ao participar deste estudo,

nas consultas de re-chamadas para avaliação das restaurações, você será beneficiado com exame clínico e limpeza dos seus dentes e não terá nenhum custo por esses atendimentos.

Durante todo o tratamento você terá o direito de solicitar novas informações referentes à pesquisa, bem como ter qualquer dúvida sanada.

Você poderá abandonar a pesquisa sem ter nenhum prejuízo para si e para o tratamento e todos os dados da pesquisa serão confidenciais.

Eu, _____(paciente ou responsável)
CPF _____, fui informado dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada. Recebi informação a respeito do tratamento recebido e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão se assim eu o desejar. A Dra. Maurem Marcondes certificou-me de que todos os dados desta pesquisa referentes aos exames realizados serão confidenciais, bem como o meu tratamento não será modificado em razão desta pesquisa e terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a estas informações.

Caso tiver novas perguntas sobre este estudo, posso chamar o Profa. Dra. Ana Maria Spohr no telefone (51) 99950465, assim como contactar o CEP-PUCRS (Comitê de Ética em Pesquisa) pelo telefone (51) 3320-3345.

Declaro que recebi cópia deste documento.

Porto Alegre, de _____ de 20 _____

Nome do Paciente

Assinatura do Paciente

Maurem Leitão Marcondes

Nome do Pesquisador

Assinatura do Pesquisador

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em particular.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

ANEXO C- Aprovação do projeto de pesquisa CEP 11/05650



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF. CEP- 128/12

Porto Alegre, 24 de janeiro de 2012.

Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 11/05650 intitulado **"Efeito de primer experimental sobre a inibição de MMP da dentina humana"**.

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e final deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
Coordenador do CEP-PUCRS

Ilma. Sra.
Profa. Ana Maria Spohr
FO
Nesta Universidade

PUCRS**Campus Central**

Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000
Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO D- Resultado da análise por espectrometria de massa


MASCOT Search Results
Protein View: gi|119395750**keratin, type II cytoskeletal 1 [Homo sapiens]**

Database: NCBIInr
Score: 179
Nominal mass (M_r): 65999
Calculated pI: 8.15
Taxonomy: [Homo sapiens](#)

This protein sequence matches the following other entries:

- [gi|238054406](#) from [Homo sapiens](#)
- [gi|119617048](#) from [Homo sapiens](#)

Sequence similarity is available as [an NCBI BLAST search of gi|119395750 against nr.](#)

Search parameters

MS data file: Amostra3.mgf

Enzyme: Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Protein sequence coverage: 3%

Matched peptides shown in **bold red**.

```

1  MSRQFSSRSG YRSGGGFSSG SAGIINYQRR TTSSSTRRSG GGGGRFSSCG
51  GGGGSFGAGG GFGSRSLVNL GGSKSISISV ARGGGRGSGF GGGYGGGGFG
101 GGGFGGGGFG GGGIGGGGFG GFGSGGGGFG GGGFGGGGYG GGYGPVCPPG
151 GIQEV TINQS LLQPLNVEID PEIQKVK SRE REQIKSLNNQ FASFIDKVRF
201 LEQQNQVLQT KWELLQQVDT STRTHNLEPY FESFINNLR RVDQLKSDQS
251 RLDSELKNMQ DMVEDYRNKY EDEINKRTNA ENEFVTIKK VDGAYMTKVD
301 LQAKLDNLQQ EIDFLTALYQ AELSQMOTQI SETNVILSMD NNRSLDLDSI
351 IAEVKAQYED IAQKSKAEAE SLYQSKYEEL QITAGRHGDS VRNSKIEISE
401 LNRVIQRLRS EIDNVKKQIS NLQQSISDAE QRGENALKDA KNKLNLEDA
451 LQQAKEDLAR LLRDYQELMN TKLALDLEIA TYRTLLEGEE SRMSGECAPN
501 VSVSVSTSH TISGGGSRGG GGGGYGSGGS SYGSGGGSYG SGGGGGGGRR
551 SYGSGGSSYG SGGGSYGGG GGGGHGSYGS GSSSGGYRGG SGGGGGGSSG
601 GRGSGGGSSG GSIGGRGSSS GGVKSSGGSS SVK FVSTTYS GVTR

```