

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA-DOCTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM DENTÍSTICA RESTAURADORA

**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO EXPERIMENTAL INIBIDORA DE
METALOPROTEINASE NA RESISTÊNCIA DE UNIÃO MEDIATA DE SISTEMAS
ADESIVOS**

Rafael Melara

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia, curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração em Dentística Restauradora, pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Burnett Jr.

Porto Alegre
2013

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Delci** e **Lorena** por permitirem que eu chegasse até aqui, através de uma educação sólida, alicerçada em valores e princípios que felizmente incorporei em minha vida pessoal e profissional; pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida e pela compreensão nos momentos em que não pude estar presente como gostaria.

À minha irmã e colega **Simone**, um exemplo profissional, e ao meu cunhado **Luiz Miguel**, pela amizade e parceria, pelos momentos agradáveis de convívio e por me darem todo o suporte que precisei durante esses anos em Porto Alegre.

À minha namorada **Richele**, pela atenção, carinho, e ajuda em todos os momentos que estivemos juntos, pela confiança depositada e pelo constante incentivo na busca dos meus objetivos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Luiz Henrique Burnett Jr.**, pelo apoio durante os anos de convívio no Mestrado e no Doutorado, pelos ensinamentos científicos e clínicos transmitidos e pela confiança e reconhecimento ao meu trabalho.

À Prof^ª. Dra. **Ana Maria Spohr**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, com quem também tive o prazer de conviver durante os último quatro anos, pelos momentos de aprendizado e pela dedicação com que encara o ensino.

Ao ex-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia e meu Paraninfo, Prof. Dr. **José Antônio Poli de Figueiredo**, pela constante preocupação e incentivo à pesquisa.

À colega e amiga **Eliana do Nascimento Torre**, pelos ensinamentos e apoio, fundamentais durante a execução do meu trabalho.

À Prof^ª. **Dra. Adriana Etges**, orientadora da amiga **Eliana Torre**.

Aos colegas de doutorado **Maurem Marcondes, Nielli Caetano de Souza, Diego Fabris Ferreira da Silva e Fernanda Montini** pelos bons momentos de convívio e pela amizade construída.

À **CAPES**, pela bolsa de estudos concedida.

Ao Prof. Dr. **Ewerton Nocchi Conceição**, pelo incentivo e estímulo para o início da minha carreira docente.

Aos colegas da disciplina de Dentística da Faculdade de Odontologia da UFRGS, Prof^ª. Dra. **Andréa Brito Conceição**, Prof. Me. **Aurélio Salaverry**, Prof. Dr. **Ewerton Nocchi Conceição**, Prof. Dr. **Fábio Herrmann Coelho-de-Souza**, Prof^ª. Dra. **Juliana Nunes Rolla**, Prof^ª. Dra. **Maria Carolina Guilherme Erhardt**, Prof^ª. Dra. **Thaís Thomé Feldens, Ana Luíza Tolentino e Giovani Paiva Chiossi** pela amizade, convívio e pelo prazer de poder aprender ao lado deles.

Ao amigo Prof. **Giovani Paiva Chiossi**, pela amizade, pelos ensinamentos sobre fotografia e pelo exemplo de dedicação.

Aos meus **Pacientes** e **Alunos**, motivos da minha busca constante pelo conhecimento e crescimento.

O Céu eterno, o homem sonhador.

O rio flui.

O Céu eterno, o homem que se esforça.

O rio flui.

O Céu eterno, o homem que vence.

Richard Bach

Esta pesquisa faz parte de um projeto guarda-chuva relacionado ao título de capa deste trabalho escrito. Dentro deste amplo projeto foram realizados dois artigos que serão descritos a seguir.

RESUMO GERAL

Este estudo teve por objetivo avaliar, *in vitro*, a resistência de união à microtração (RUM) mediata (12 meses) dos sistemas adesivos Adper Scotchbond SE / 3M/ESPE (Adper SE) e Adper Scotchbond Multi-Usado / 3M/ESPE (Adper SMP) à superfície dentinária sadia, tratada ou não com uma solução ácida experimental inibidora de metaloproteinases (MMPs), bem como o padrão predominante de falha por fractografia; e avaliar, *in vitro*, a inibição da atividade gelatinolítica por uma solução ácida experimental para condicionamento de superfície dentinária contendo tetraciclina em comparação com uma solução experimental contendo tetraciclina. Para avaliação da RUM mediata, nos grupos Adper SE Controle e Adper SMP Controle, o sistema adesivo foi aplicado de acordo com as instruções do fabricante. No grupo Adper SE Experimental foi aplicada a solução experimental previamente ao sistema adesivo, e no grupo Adper SMP Experimental, o condicionamento com ácido fosfórico a 37% foi substituído pela aplicação da solução experimental. Após a aplicação dos sistemas adesivos, os dentes foram preparados para o teste de RUM, e os palitos obtidos foram armazenados em estufa a 37°C. Após 12 meses, foi realizado o teste RUM e os palitos foram avaliados em MEV. Para avaliação da atividade enzimática, amostras salivares foram coletadas de doadores saudáveis, centrifugadas e o sobrenadante foi usado através da técnica zimográfica. Esta técnica baseou-se no uso da eletroforese, no qual um substrato proteico (gelatina) foi co-polimerizado com acrilamida. As enzimas foram separadas sob condições não redutoras, renaturadas e então incubadas em tampão adequado, baseando-se na associação entre digestão do substrato e verificação do peso molecular das proteases. Para quantificar a inibição relativa pelas duas soluções foi usado o programa Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) e comparadas com o controle. Em relação à RUM mediata, de acordo com o teste de Tukey ($\alpha=0.05$), não houve diferença entre os grupos controle e experimental para cada sistema adesivo. O padrão predominante de falha para o sistema adesivo Adper SE foi coesiva em resina composta enquanto que para o Adper SMP foi coesiva em camada híbrida. Na análise zimográfica, as enzimas foram caracterizadas como metaloproteinases da matriz, pois a sua expressão foi inibida pelo EDTA (um conhecido inibidor de MMPs), enquanto o

NEM (um inibidor de proteases serinas) não teve nenhum efeito sobre a atividade enzimática. A MMP identificada no estudo, foi caracterizada como MMP-2, apresentando um peso molecular de 62KDa. A solução ácida experimental apresentou um percentual de inibição da atividade gelatinolítica de 93.66% (concentração de 0.05%) e de 58.58% (concentração de 0.01%), enquanto que a solução experimental teve um percentual de inibição de 31.28% e 6.83%, respectivamente. Com base nos resultados encontrados é possível concluir que após 12 meses de armazenagem, o sistema adesivo Adper SE mostrou desempenho superior ao Adper SMP no teste de RUM, parecendo também ser mais efetivo na manutenção da integridade da interface adesiva, sob análise fractográfica; e que a solução ácida experimental condicionadora de superfície dentinária foi capaz de inibir quase completamente a atividade enzimática da MMP-2, de uma maneira dose dependente.

Palavras-chave: adesão, resistência de união, metaloproteinases da matriz, tetraciclina.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate, *in vitro*, the mediate microtensile bond strength- μ TBS (12 months) of adhesive systems Adper Scotchbond SE / 3M/ESPE (Adper SE) and Adper Scotchbond Multi-Purpose / 3M/ESPE (Adper SMP) to sound dentin surface, treated or not with an experimental acid solution inhibitor of metalloproteinases (MMPs), as well as the predominant pattern of failure by fractography; and evaluate, *in vitro*, the inhibition of gelatinolytic activity by an experimental acid solution for dentin surface etching containing tetracycline compared with an experimental solution containing tetracycline. For mediate μ TBS evaluation, in Adper SE Control and Adper SMP Control groups, the adhesive system was applied according to the manufacturer's instructions. In Adper SE Experimental group was applied the experimental solution prior to the adhesive system, and in the Adper Experimental SMP group, the etching with 37% phosphoric acid was replaced by applying the experimental solution. After applying the adhesive systems, the teeth were prepared for μ TBS test, and the sticks were stored in an oven at 37°C. After 12 months μ TBS test was realized and the sticks were evaluated by SEM. For enzymatic activity evaluation, saliva samples were collected from healthy donors, centrifuged and the supernatant was used by technique of zymography. This technique was based on the use of electrophoresis, in which a protein substrate (gelatin) was co-polymerized with acrylamide. The enzymes were separated under non-reducing conditions, renatured and then incubated in suitable buffer, based on the association between the substrate digestion and verification of the molecular weight of proteases. To quantify the relative inhibition by the two solutions was used the Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) and compared with the control. For mediate μ TBS evaluation, according to the Tukey test ($\alpha = 0.05$), no difference between the control and experimental groups was found for each adhesive system. The predominant pattern of failure for the system Adper SE was cohesive in composite while for Adper SMP was cohesive in hybrid layer. In the enzymatic activity evaluation, the enzymes were characterized as matrix metalloproteinases, because its expression was inhibited by EDTA (a known inhibitor of MMPs), while NEM (an inhibitor of serine proteases) had no effect on enzymatic activity. The MMP identified in the study, was characterized as

MMP-2, with a molecular weight of 62KDa. The experimental acid solution presented an inhibition of the gelatinolytic activity of 93.66% (concentration 0.05%) and 58.58% (0.01% concentration), while the experimental solution had a percentage inhibition of 31.28% and 6.83%, respectively. Based on these results we conclude that after 12 months of storage, the adhesive system Adper SE showed better performance than Adper SMP in the microtensile bond strength test, also seeming to be more effective in maintaining the integrity of the adhesive interface, under fractographic analysis; and that the experimental acid solution for dentin surface etching was capable of almost completely inhibits the enzymatic activity of MMP-2 in a dose dependent manner.

Keywords: adhesion, bond strength, matrix metalloproteinases, tetracycline

ARTIGO 1

AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO EXPERIMENTAL INIBIDORA DE METALOPROTEINASES NA RESISTÊNCIA DE UNIÃO MEDIATA DE SISTEMAS ADESIVOS

RESUMO

Objetivo: Avaliar, *in vitro*, a resistência de união à microtração (RUM) mediata (12 meses) dos sistemas adesivos Adper Scotchbond SE / 3M/ESPE (Adper SE) e Adper Scotchbond Multi-Use / 3M/ESPE (Adper SMP) à superfície dentinária sadia, tratada ou não com uma solução ácida experimental inibidora de metaloproteinases (MMPs), bem como o padrão predominante de falha por fractografia.

Materiais e Métodos: Nos grupos Adper SE Controle e Adper SMP Controle, o sistema adesivo foi aplicado de acordo com as instruções do fabricante. No grupo Adper SE Experimental foi aplicada a solução experimental previamente ao sistema adesivo, e no grupo Adper SMP Experimental, o condicionamento com ácido fosfórico a 37% foi substituído pela aplicação da solução experimental. Após a aplicação dos sistemas adesivos, os dentes foram preparados para o teste de RUM, e os palitos obtidos foram armazenados em estufa a 37°C. Após 12 meses, foi realizado o teste RUM e os palitos foram avaliados em MEV.

Resultados: De acordo com o teste de Tukey ($\alpha=0.05$), não houve diferença entre os grupos controle e experimental para cada sistema adesivo. O padrão predominante de falha para o sistema adesivo Adper SE foi coesiva em resina composta enquanto que para o Adper SMP foi coesiva em camada híbrida.

Conclusão: Após 12 meses de armazenagem, o sistema adesivo Adper SE mostrou desempenho superior ao Adper SMP no teste de resistência de união à microtração, parecendo também ser mais efetivo na manutenção da integridade da interface adesiva, sob análise fractográfica.

Palavras-chave: adesão; resistência de união; metaloproteinases da matriz, tetraciclina

ARTIGO 1

ASSESSMENT OF METALLOPROTEINASE INHIBITOR EXPERIMENTAL SOLUTION APPLICATION ON MEDIATE BOND STRENGTH OF ADHESIVE SYSTEMS

ABSTRACT

Purpose: To evaluate, in vitro, the mediate microtensile bond strength- μ TBS (12 months) of adhesive systems Adper Scotchbond SE / 3M/ESPE (Adper SE) and Adper Scotchbond Multi-Purpose / 3M/ESPE (Adper SMP) to sound dentin surface, treated or not with an experimental acid solution inhibitor of metalloproteinases (MMPs), as well as the predominant pattern of failure by fractography.

Materials and Methods: In Adper SE Control and Adper SMP Control groups, the adhesive system was applied according to the manufacturer's instructions. In Adper SE Experimental group was applied the experimental solution prior to the adhesive system, and in the Adper Experimental SMP group, the etching with 37% phosphoric acid was replaced by applying the experimental solution. After applying the adhesive systems, the teeth were prepared for μ TBS test, and the sticks were stored in an oven at 37°C. After 12 months μ TBS test was realized and the sticks were evaluated by SEM.

Results: According to the Tukey test ($\alpha = 0.05$), no difference between the control and experimental groups was found for each adhesive system. The predominant pattern of failure for the system Adper SE was cohesive in composite while for Adper SMP was cohesive in hybrid layer.

Conclusion: After 12 months of storage, the adhesive system Adper SE showed better performance than Adper SMP in the microtensile bond strength test, also seeming to be more effective in maintaining the integrity of the adhesive interface, under fractographic analysis.

Keywords: adhesion, bond strength, matrix metalloproteinases, tetracycline

ARTIGO 2

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE UMA SOLUÇÃO EXPERIMENTAL PARA CONDICIONAMENTO DE SUPERFÍCIE DENTINÁRIA

RESUMO

Objetivo: Avaliar, *in vitro*, a inibição da atividade gelatinolítica por uma solução ácida experimental para condicionamento de superfície dentinária contendo tetraciclina em comparação com uma solução experimental contendo tetraciclina.

Materiais e Métodos: Amostras salivares foram coletadas de doadores saudáveis, centrifugadas e o sobrenadante foi usado. Para avaliação da atividade enzimática, foi utilizada a técnica de zimografia. Esta técnica baseou-se no uso da eletroforese, no qual um substrato proteico (gelatina) foi co-polimerizado com acrilamida. As enzimas foram separadas sob condições não redutoras, renaturadas e então incubadas em tampão adequado, baseando-se na associação entre digestão do substrato e verificação do peso molecular das proteases. Para quantificar a inibição relativa pelas duas soluções foi usado o programa Image J (NIH, Bethesda, MD, USA) e comparadas com o controle.

Resultados: As enzimas foram caracterizadas como metaloproteinases da matriz, pois a sua expressão foi inibida pelo EDTA (um conhecido inibidor de MMPs), enquanto o NEM (um inibidor de proteases serinas) não teve nenhum efeito sobre a atividade enzimática. A MMP identificada no estudo, foi caracterizada como MMP-2, apresentando um peso molecular de 62KDa. A solução ácida experimental apresentou um percentual de inibição da atividade gelatinolítica de 93.66% (concentração de 0.05%) e de 58.58% (concentração de 0.01%), enquanto que a solução experimental teve um percentual de inibição de 31.28% e 6.83%, respectivamente.

Conclusão: A solução ácida experimental condicionadora de superfície dentinária foi capaz de inibir quase completamente a atividade enzimática da MMP-2, de uma maneira dose dependente.

Palavras-chave: metaloproteinases da matriz, colágeno, tetraciclina.

ARTIGO 2

ASSESSMENT OF GELATINOLYTIC ACTIVITY OF AN EXPERIMENTAL SOLUTION FOR DENTIN SURFACE ETCHING

ABSTRACT

Purpose: To evaluate, in vitro, the inhibition of gelatinolytic activity by an experimental acid solution for dentin surface etching containing tetracycline compared with an experimental solution containing tetracycline.

Materials and Methods: Saliva samples were collected from healthy donors, centrifuged and the supernatant was used. For enzymatic activity evaluation, was used the technique of zymography. This technique was based on the use of electrophoresis, in which a protein substrate (gelatin) was co-polymerized with acrylamide. The enzymes were separated under non-reducing conditions, renatured and then incubated in suitable buffer, based on the association between the substrate digestion and verification of the molecular weight of proteases. To quantify the relative inhibition by the two solutions was used the Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) and compared with the control.

Results: The enzymes were characterized as matrix metalloproteinases, because its expression was inhibited by EDTA (a known inhibitor of MMPs), while NEM (an inhibitor of serine proteases) had no effect on enzymatic activity. The MMP identified in the study, was characterized as MMP-2, with a molecular weight of 62KDa. The experimental acid solution presented an inhibition of the gelatinolytic activity of 93.66% (concentration 0.05%) and 58.58% (0.01% concentration), while the experimental solution had a percentage inhibition of 31.28% and 6.83%, respectively .

Conclusion: The experimental acid solution for dentin surface etching was capable of almost completely inhibits the enzymatic activity of MMP-2 in a dose dependent manner.

Keywords: matrix metalloproteinases, collagen, tetracycline.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1. Dente incluído em resina acrílica. Vista oclusal.	28
Figura 2. Corte da superfície oclusal (A) e dentina oclusal exposta (B).	29
Figura 3. Sistemas adesivos utilizados. Adper Scotchbond SE (A) e Adper Scotchbond Multi-Usa (B).	32
Figura 4. Resina composta utilizada - Z350 (A) e Condicionador Dental Gel - Dentsply (B).	32
Figura 5. Inserção incremental (A) e fotopolimerização dos incrementos de resina composta (B).	33
Figura 6. Pintura para identificação dos palitos da região central.	34
Figura 7. Corte dos dentes nos eixos x e y.	34
Figura 8. Vista oclusal do corte dos dentes nos eixos x e y (A) e palitos de dente/resina após o corte (B).	35
Figura 9. Palito fixado ao dispositivo para ensaio de microtração.	36
Figura 10. Palito fraturado após teste de microtração (A) e armazenado em Eppendorf numerado para posterior avaliação em MEV (B).	37
Figura 11. Palitos posicionados em stub após fratura (A) e metalizados com ouro para avaliação em MEV (B).	38

Figura 12. Grade posicionada sobre fotomicrografia para avaliação do tipo de falha predominante.	39
Figura 13. Canaleta realizada no centro do dente no sentido vestibulo-lingual.	40
Figura 14. Gráfico dos valores médios de resistência de união mediatos (MPa) obtidos no ensaio de microtração.	42
Figura 15. Gráfico percentual de distribuição de frequência de falhas coesivas mediatas predominantes por grupo.	44
Figura 16. Fotomicrografia em MEV (aumento de 180x) de corpo de prova com presença predominante de falha coesiva em camada híbrida. (A) Falha coesiva em resina composta. (B) Falha coesiva em adesivo. (C) Falha coesiva em camada híbrida. Área demarcada presente em maior aumento na Figura 17.	45
Figura 17. Fotomicrografia em MEV (aumento de 500x). (A) Falha coesiva em resina composta. (B) Falha coesiva em adesivo. (C) Falha coesiva em camada híbrida.	45
Figura 18. Fotomicrografia em MEV (aumento de 180x) de corpo de prova com presença predominante de falha coesiva em dentina. (A) Falha coesiva em resina composta. (B) Falha coesiva em adesivo. (C) Falha coesiva em dentina. Área demarcada presente em maior aumento na Figura 19.	46
Figura 19. Fotomicrografia em MEV (aumento de 500x). (B) Falha coesiva em adesivo. (C) Falha coesiva em dentina.	46
Figura 20. Fotomicrografia em MEV (aumento de 180x) de corpo de prova com presença predominante de falha coesiva em camada híbrida. (A) Falha	47

coesiva em resina composta. (B) Falha coesiva em adesivo. (C) Falha coesiva em camada híbrida. Área demarcada presente em maior aumento na Figura 21.

Figura 21. Fotomicrografia em MEV (aumento de 500x). (A) Falha coesiva em resina composta. (B) Falha coesiva em adesivo. (C) Falha coesiva em camada híbrida. 47

Figura 22. Fotomicrografia em MEV (aumento de 8000x) do condicionamento dentinário promovido pelo ácido fosfórico a 37%. Observação da presença de túbulos dentinários abertos. (Grupo Adper SMP Controle). 48

Figura 23. Fotomicrografia em MEV (aumento de 8000x) do condicionamento dentinário promovido pela solução ácida experimental. Observação da presença de túbulos dentinários abertos. (Grupo Adper SMP Experimental). 48

Figura 24. Fotomicrografia em MEV (aumento de 8000x) do condicionamento dentinário promovido pelo adesivo autocondicionante. Observação da presença de túbulos dentinários parcialmente abertos. (Grupo Adper Scotchbond SE Controle). 49

Figura 25. Fotomicrografia em MEV (aumento de 8000x) do condicionamento dentinário promovido pela solução ácida experimental associada ao adesivo autocondicionante. Observação da presença de túbulos dentinários abertos. (Grupo Adper Scotchbond SE Experimental). 49

LISTA DE TABELAS E QUADROS

ARTIGO 1

Tabela 1. Grupos e tratamentos realizados.	29
Tabela 2. Resultados da análise de variância two-way.	41
Tabela 3. Valores médios de resistência de união mediatos (MPa) obtidos no ensaio de microtração.	42
Tabela 4. Valores percentuais de falhas predominantes mediatas e valores médios de resistência de união mediatos (MPa) por grupo.	43
Quadro 1. Descrição e composição química dos sistemas adesivos, resina composta e produtos de tratamento de superfície utilizados, e protocolos de aplicação de acordo com os respectivos grupos.	30

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 2

- Figura 1.** Matriz plástica descartável de 10 cm x 10 cm para preparo do gel de largada e de corrida. 68
- Figura 2.** Amostras/tampão adicionadas aos poços do gel de largada com o auxílio de uma micropipeta, em um volume de 25 µl/poço na cuba de eletroforese (X Cell Sure Lock - Invitrogen). 70
- Figura 3.** Cubo de eletroforese (X Cell Sure Lock - Invitrogen). 71
- Figura 4.** Dispositivo elétrico para controle de amperagem e voltagem durante a eletroforese (Bio Rad). 71
- Figura 5.** Gel de poliacrilamida após eletroforese. 72
- Figura 6.** Gel de poliacrilamida após ser corado e descorado, evidenciando as bandas negativas (não coradas) onde ocorreu atividade gelatinolítica pelas MMPs. 76
- Figura 7.** Padrão de peso molecular (A) (Benchmark Protein Ladder - Invitrogen) e bandas correspondentes aos pesos moleculares, expressos em KDa, a partir de 20 KDa. Banda de 62 KDa do controle, correspondente à forma ativa da MMP-2 (B). 78
- Figura 8.** Géis de zimografia. 79
- Figura 9.** Esquema estrutural geral das MMPs (adaptado de Hannas *et al*, 2007). 84

LISTA DE TABELAS E QUADROS

ARTIGO 2

Tabela 1. Descrição numérica da intensidade das bandas, do percentual em relação ao controle e do percentual de inibição de atividade gelatinolítica de cada concentração das soluções experimentais em relação ao controle. 80

Quadro 1. Descrição dos reagentes dos géis de poliacrilamida. 69

Quadro 2. Reagentes e respectivas quantidades para o uso na zimografia. 73

Quadro 3. Composição da duas soluções experimentais usadas no estudo. 75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIGNIFICADOS

ARTIGOS 1 E 2

%	Por cento
α	Nível de significância
Bis-GMA	Bisfenol Glicidil Metacrilato-A
Bis-EMA	Bisfenol A Dimetacrilato Etoxilado
°C	Grau Celsius
μ l	Microlitro
μ m	Micrometro
Ca ⁺²	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm	Centímetro
cp	Corpo de prova
cv	Coeficiente de variação
dp	Desvio padrão
EDTA	Ácidoetilenodiamino Tetra-Acético
g	Gramas
h	Hora
HEMA	2-Hidroxietil Metacrilato
ICTP	Telopectídeo C-Terminal
KDa	Quilodalton (unidade de medida de massa)
Kg	Quilograma
MEC	Matriz Extracelular
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MMP	Metaloproteinase da Matriz
min	Minuto
mA	Miliampere
ml	Mililitro
mm	Milímetro

mM	Milimolar
mm/min	Milímetro por minuto
mm ²	Milímetro quadrado
MPa	Mega Pascal
mW/cm ²	MiliWatt por centímetro quadrado
N	Newton
n	Número de corpos de prova
n°	Número
NaCl	Cloreto de Sódio
NEM	N-Etil-Maleimida
p	Probabilidade calculada
pH	Potencial Hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
rpm	Rotações por minuto
RUM	Resistência de União à Microtração
s	Segundo
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SE	Self Etching
SEM	Scanning Electron Microscopy
SMP	Scotchbond Multi Purpose
TEGDMA	Trietileno Glicol Dimetacrilato
TEM	Transmission Electron Microscopy
TIMP	Inibidor Tecidual de Metaloproteinases
TMPTMA	Trimetacrilato Hidrofóbico
Tris-HCl	Tri-Hidroximetilamino Metano Cloridrato
UDMA	Uretano Dimetacrilato
V	Volt
v	Volume
W	Watt
x	Indica o número de vezes. Ex: 200x
Zn ⁺²	Zinco

SUMÁRIO

ARTIGO 1	25
1. INTRODUÇÃO	25
2. MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1 Obtenção dos corpos de prova	28
2.2 Tratamentos realizados	30
2.2.1 Aplicação dos sistemas adesivos e resina composta	30
2.3 Obtenção dos palitos para o ensaio de microtração	33
2.4 Ensaio de microtração mediato 12 meses	35
2.5 Análise estatística	37
2.6 Preparo das amostras para análise em MEV	37
2.7 Análise do tipo de fratura - Fractografia	38
2.8 Análise estatística do tipo de fratura	39
2.9 Microscopia eletrônica de superfície	39
3. RESULTADOS	41
3.1 Análise da resistência de união à microtração	41
3.2 Análise do padrão de fratura	43
3.3 Análise de superfície dentinária	48
4. DISCUSSÃO	50
4.1 Degradação da camada híbrida	50
4.2 Metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs)	51
4.2.1 Classificação	52
4.3 Avaliação da resistência de união mediata	53
4.4 Fractografia mediata	60
5. CONCLUSÕES	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

ARTIGO 2	65
1. INTRODUÇÃO	65
2. MATERIAIS E MÉTODOS	67
2.1 Técnica de extração da MMP-2 da saliva	67
2.2 Zimografia	67
2.2.1 Preparo do gel de separação e de largada	68
2.2.2 Corrida e incubação dos géis	69
2.2.3 Controles	74
2.2.4 Padrão de peso molecular	74
2.2.5 Identificação da MMP por inibição química específica	74
2.2.6 Inibição da MMP-2 pelas soluções experimentais	74
2.2.7 Coloração e descoloração dos géis	75
2.2.8 Digitalização das imagens	76
2.2.9 Análise estatística da inibição da atividade gelatinolítica	77
3. RESULTADOS	78
3.1 Avaliação da atividade colagenolítica - Zimografia	78
3.1.1 Percentual de inibição de cada solução em relação ao controle	80
4. DISCUSSÃO	81
4.1 Degradação da camada híbrida	81
4.2 Metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs)	81
4.2.1 Classificação	82
4.2.2 Estrutura	83
4.2.3 Função	84
4.2.4 Identificação e localização das MMPs na dentina	86
4.2.5 Inibidores de MMPs e mecanismos de inibição	87
4.2.5.1 Inibidores teciduais (TIMPS)	88
4.2.5.2 Inibidores sintéticos	88
4.2.5.3 Inibição da produção de MMPs	90
4.3 Avaliação da atividade gelatinolítica	90
5. CONCLUSÕES	96

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
ANEXOS	109
ANEXO 1 - Carta de aprovação do CEP	109
ANEXO 2 - Tabelas dos testes estatísticos	110
ANEXO 3 - Valores de área, resistência de união e tipo de falha	112

ARTIGO 1

AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO EXPERIMENTAL INIBIDORA DE METALOPROTEINASE NA RESISTÊNCIA DE UNIÃO MEDIATA DE SISTEMAS ADESIVOS

1. INTRODUÇÃO

A interação dos polímeros odontológicos com os substratos dentários tem se mostrado suscetível aos efeitos higroscópicos e hidrolíticos, variando de acordo com sua química e estrutura (FERRACANE, 2006). Vários pesquisadores têm mencionado uma potencial degradação da união adesiva ao longo do tempo (FERRACANE, 2006; HASHIMOTO *et al.*, 2000). Apesar do fato dos adesivos serem sensíveis à fadiga mecânica, um dos principais fatores que afetam a sua durabilidade, *in vivo*, é a hidrólise dos componentes da interface e sua posterior eluição. Assim sendo, a estabilidade hidrolítica dos adesivos passa a ser de crucial importância (DE MUNCK *et al.*, 2005). Os adesivos mais hidrofílicos, como os que empregam a técnica de condicionamento ácido total de frasco único e os autocondicionantes também de frasco único, são os mais críticos, pois devido a sua natureza hidrofílica, se comportam como membranas semi-permeáveis, atraindo água e degradando mais rapidamente que os adesivos hidrofóbicos, onde o primer e o adesivo estão em frascos separados (DE MUNCK *et al.*, 2005; BRESCHI *et al.*, 2008).

O impacto mais profundo deste processo de degradação ocorre sobre a camada híbrida, a qual é responsável por fazer a transição entre sistema adesivo e estrutura dentinária. Este processo de deterioração está intimamente relacionado a fatores como a impregnação deficiente da dentina pelo adesivo, alta permeabilidade da interface adesiva, subpolimerização do adesivo e ativação de enzimas endógenas colagenolíticas (BRESCHI *et al.*, 2008). Essa degradação, que ocorre com o passar do tempo, pode ser verificada por trabalhos *in vitro*, onde os valores de resistência de união imediatos mostram-se estatisticamente superiores àqueles após armazenagem das amostras (LOGUERCIO *et al.*, 2005). As enzimas colagenolíticas

(metaloproteinases da matriz extracelular – MMPs), por sua vez, na presença de fibras colágenas incompletamente infiltradas, podem degradar as mesmas (PASHLEY *et al.*, 2004; CARRILHO *et al.*, 2007^a).

Para tentar diminuir o efeito das MMPs, vários estudos têm sido realizados utilizando inibidores dessas enzimas, com o objetivo de frear a degradação das fibrilas colágenas presentes na camada híbrida. Dentre esses inibidores, o mais pesquisado é a clorexidina. Estudos *in vivo* comparando o comportamento de restaurações de resina composta em dentes hígidos, realizadas com e sem a aplicação de digluconato de clorexidina a 2%, demonstraram que as amostras que receberam tratamento com clorexidina após o condicionamento com ácido fosfórico, mantiveram sua resistência de união após 14 meses, bem como a integridade estrutural da rede colágena, sob análise por microscopia eletrônica de transmissão (CARRILHO *et al.*, 2007^b). Estudos *in vitro* também têm demonstrado a diminuição da perda dos valores de resistência de união em amostras tratadas com clorexidina após 6 meses, em comparação com aquelas não tratadas (CARRILHO *et al.*, 2007^a; CAMPOS *et al.*, 2009; KOMORI *et al.*, 2009; STANISLAWCZUK *et al.*, 2009; LOGUERCIO *et al.*, 2009) e também após 12 meses (BRESCHI *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2009).

No presente estudo, foi utilizada uma solução ácida experimental inibidora de metaloproteinases da matriz (MMPs) com o objetivo de condicionar o tecido dentinário sadio bem como, promover a manutenção da integridade da união adesiva após 12 meses de armazenagem. Dessa forma, a hipótese de nulidade testada foi que o uso de uma solução experimental inibidora de metaloproteinase para condicionamento da superfície dentinária sadia, previamente à aplicação de um sistema adesivo autocondicionante ou de um sistema adesivo de condicionamento ácido total, ambos de dois frascos, promove valores de resistência de união mediatos (após 12 meses) similares à técnica convencional recomendada pelos fabricantes.

Os objetivos deste estudo são os seguintes: avaliar a resistência de união mediata (12 meses) de dois sistemas adesivos, um autocondicionante de dois frascos e um de condicionamento ácido total, também de dois frascos, à superfície dentinária sadia, tratada ou não com uma solução experimental inibidora de metaloproteinase; avaliar, com auxílio de fractografia, o padrão predominante de falha após o ensaio de

microtração mediato; avaliar, com auxílio de microscopia eletrônica de varredura, o efeito de uma solução experimental inibidora de metaloproteinase na superfície dentinária sadia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos Corpos de Prova

Vinte e oito terceiros molares humanos hígidos, extraídos por indicação terapêutica, foram obtidos junto ao banco de dentes da PUCRS. O protocolo de pesquisa (CEP 10/05124) foi submetido ao comitê de ética em pesquisa da PUCRS a fim de obter aprovação para o desenvolvimento do experimento. Os dentes foram limpos com cureta periodontal e desinfetados em solução de cloramina a 2% por 24 h. Após este período, foram lavados em água corrente e armazenados em um frasco fechado contendo água destilada a 4°C, por um período de até 6 meses.

Após o período de armazenamento, as raízes de vinte destes dentes foram incluídas individualmente em resina acrílica autopolimerizável Jet (Clássico Ind., São Paulo, SP, Brasil), com o auxílio de uma matriz de teflon de forma cilíndrica, de modo que a face oclusal do dente estivesse voltada para a parte superior da matriz (Figura 1).



Figura 1. Dente incluído em resina acrílica. Vista oclusal.

O cilindro de acrílico obtido foi adaptado ao suporte metálico da máquina de corte (Labcut 1010 – Extec Corp., Londres, Inglaterra), onde foi realizada a remoção da superfície oclusal com um disco diamantado de dupla face (Extec Corp., Londres, Inglaterra) em baixa rotação (400 rpm) e constante refrigeração, até que todo o esmalte

oclusal fosse removido (Figura 2). Logo após, a superfície dentinária foi planificada com lixas de carbeto de silício de granulações 320 e 600, em uma politriz DPU-10 (Panambra, São Paulo, SP, Brasil), sob refrigeração.

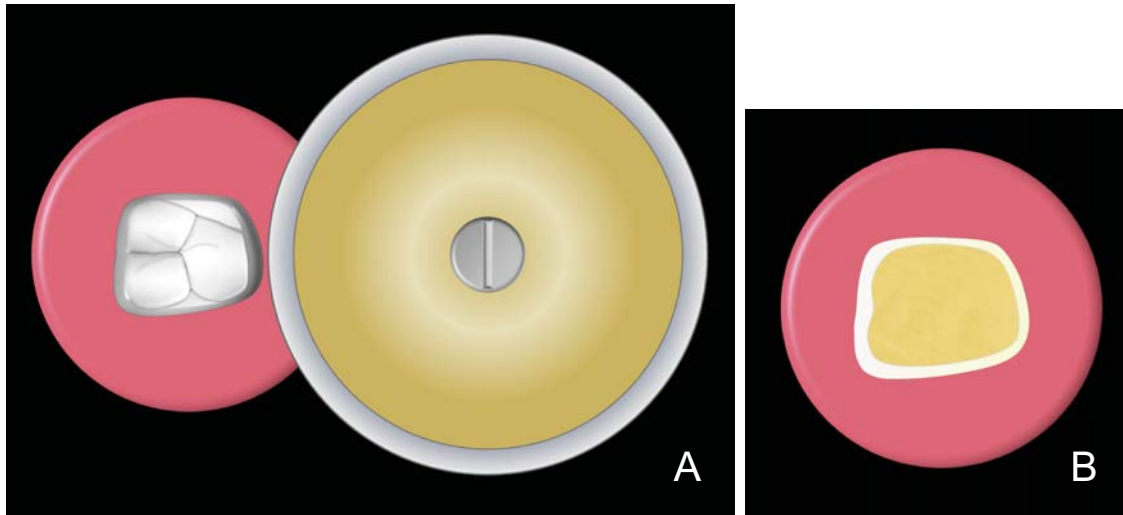


Figura 2. Corte da superfície oclusal (A) e dentina oclusal exposta (B).

Vinte dentes foram aleatoriamente divididos em quatro grupos com cinco dentes cada (Tabela 1).

Tabela 1. Grupos e tratamentos realizados (5 dentes por grupo).

Grupos	Adper Scotchbond Multi-Use (Adper SMP)		Adper Scotchbond SE (Adper SE)	
	Controle	Experimental	Controle	Experimental
	5 dentes	5 dentes	5 dentes	5 dentes

O número de dentes por grupo está de acordo com outros trabalhos de metodologia semelhante, como os de PARANHOS *et al.*, 2009 e DE CASTRO *et al.*, 2003.

2.2. Tratamentos Realizados

2.2.1. Aplicação dos sistemas adesivos e resina composta

Para a realização desta pesquisa foram utilizados os seguintes materiais e protocolos de aplicação (Quadro 1):

Quadro 1. Descrição e composição química dos sistemas adesivos, resina composta e produtos de tratamento de superfície utilizados, e protocolos de aplicação de acordo com os respectivos grupos.

Materiais	Composição Química pH Lote	Grupos Protocolo de Aplicação
Condicionador Dental Gel (Dentsply, Konstanz, Germany)	Ácido Fosfórico 37% Sílica Coloidal Corante pH= 0.6 Lote: 963326	Adper ScotchBond Multi-Us (Grupo Controle) A1, B, C Adper ScotchBond Multi-Us (Grupo Experimental) A2, B, C Adper Scotchbond SE (Grupo Controle) D, E, F
Adper Scotchbond Multi-Us (3M/ESPE, St. Paul, MN, EUA)	Primer Solução Aquosa de HEMA Copolímero do ácido polialquenóico pH= 3.3 Lote: N121785 Adesivo BISGMA HEMA Fotoiniciador pH= 8.2 Lote: N133527	
Adper Scotchbond SE (3M/ESPE, St. Paul, MN, EUA)	Primer Líquido A Água HEMA Surfactante Corante Rosa Lote: 9BL Adesivo Líquido B UDMA,TEGDMA TMPTMA, HEMA, MHP, Nanopartículas de Zircônia, Canforoquinona pH= 0.8 Lote: 9BR	Adper Scotchbond SE (Grupo Experimental) A2, D, E, F
Solução Ácida Experimental	Cloridrato de Tetraciclina a 10% Ácido Fosfórico a 20% Propilenoglicol a 10% em gel pH= 0.5	
Resina Filtek	Bis-GMA	

Z350
(3M/ESPE, St.
Paul, MN, EUA)

Bis-EMA
UDMA
TEGDMA
Nanopartículas de Sílica
Nanoaglomerados de Zircônia e Sílica
Lote: 8FU

Protocolo de Aplicação:

-A1: condicionamento da superfície dentinária com ácido fosfórico gel a 37% por 15s; lavagem durante 30s com água destilada, sendo removido o excesso de água com uma porção de papel absorvente.

-A2: condicionamento da superfície dentinária com solução experimental por 1 minuto com aplicador descartável sob fricção; lavagem com 10ml de água destilada, sendo removido o excesso de água com uma porção de papel absorvente.

-B: aplicação, com aplicador descartável, do primer seguido de secagem com jato de ar por 5s a uma distância de 2cm.

-C: aplicação, com aplicador descartável, do adesivo; fotopolimerização por 10s.

-D: aplicação, com aplicador descartável, do líquido A.

-E: aplicação, com aplicador descartável, do líquido B por 20s sob fricção; jato de ar por 10s a uma distância de 2cm.

-F: nova aplicação, com aplicador descartável, do líquido B; jato de ar por 10s a uma distância de 2cm; fotopolimerização por 10s.

A determinação da composição, das concentrações dos componentes, bem como do tempo de aplicação da solução ácida experimental, foi realizada através de teste piloto, onde avaliou-se a capacidade de remoção de smear layer, sob análise em MEV.



Figura 3. Sistemas adesivos utilizados. Adper Scotchbond SE (A) e Adper Scotchbond Multi-Usado (B).

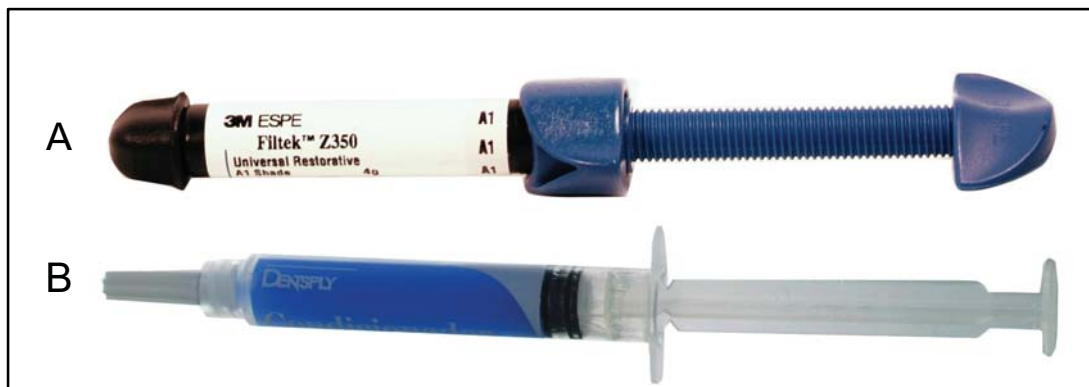


Figura 4. Resina composta utilizada – Z350-3M ESPE (A) e Condicionador Dental Gel-Dentsply (B).

Após a aplicação dos sistemas adesivos, foram inseridos sobre a superfície de dentina 3 incrementos, com aproximadamente 2mm cada, da resina composta Filtek Z350 (3M/ESPE, St. Paul, MN, EUA) cor A1, com o auxílio da espátula Thompson nº 3, totalizando cerca de 6 mm de altura. Cada incremento foi fotopolimerizado por 20s com uma unidade de luz halógena XL3000 (3M/ESPE, St. Paul, MN, EUA), sendo sua potência aferida com radiômetro, estando em uma faixa de aproximadamente 400mW/cm² (Figura 5).

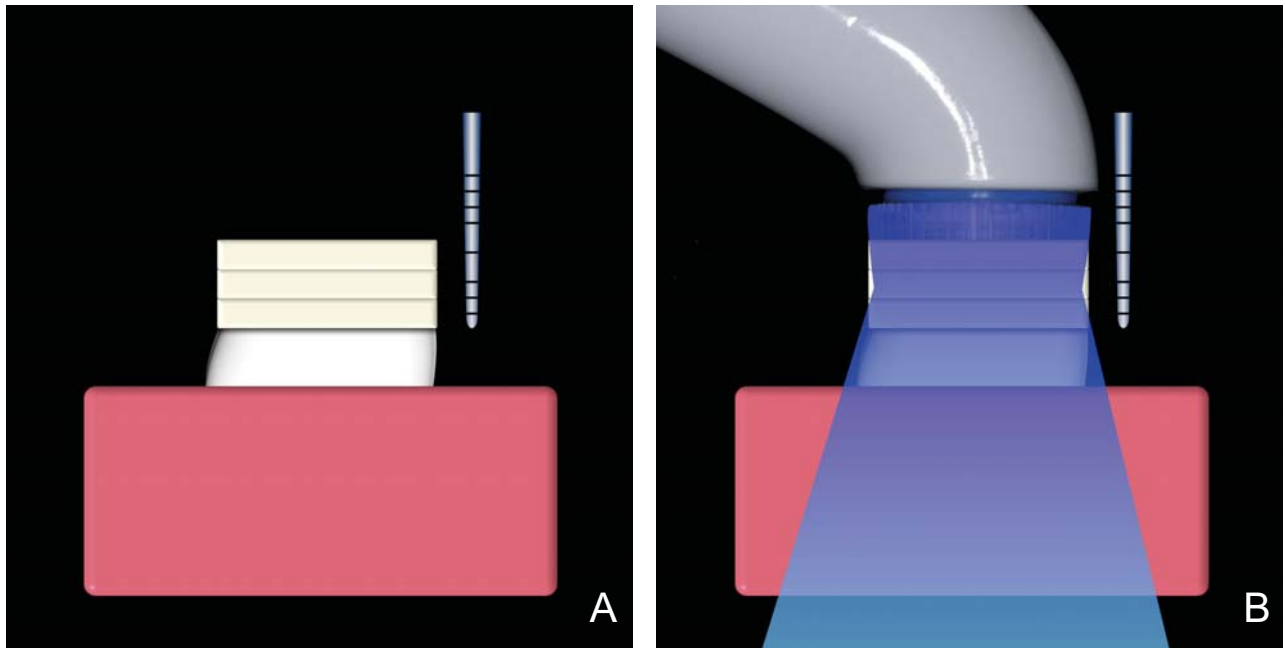


Figura 5. Inserção incremental (A) e fotopolimerização dos incrementos de resina composta (B).

2.3 - Obtenção dos Palitos para o Ensaio de Microtração

Os dentes já restaurados foram armazenados em água destilada por 24 h, em uma estufa de cultura (Modelo 002CB – São Paulo, SP, Brasil) a 37°C. Em seguida, foi feita a inclusão do remanescente coronário e da restauração em resina acrílica autopolimerizável para promover uma maior estabilidade dos palitos durante o corte. Estes dentes foram então, seccionados com um disco diamantado de dupla face - espessura de 0,3 mm (Extec Corp., Londres, Inglaterra) em baixa rotação (500 rpm), sob refrigeração em uma máquina de corte (Labcut 1010), paralelamente ao longo eixo do dente, nos sentidos vestibulo-lingual e méso-distal (Figuras 7 e 8A). Com isso, foram obtidos palitos com uma área adesiva de até 1,0 mm², de modo que a metade superior foi constituída de resina e a inferior de dentina (Figura 8B). Apenas os palitos da região central dos dentes foram selecionados, nos quais foi feita uma inspeção com auxílio de uma lupa estereoscópica (Olympus, Tóquio, Japão), com 30x de aumento, para avaliar a área de adesão e a possível presença de bolhas ou falhas. Para

identificar os palitos da região central, esta região foi pintada (Figura 6). Os palitos que apresentaram falhas foram descartados. Foram selecionados até 6 palitos de cada dente correspondentes à porção mais central da face oclusal. O restante dos palitos foi descartado. Os palitos selecionados por cada dente foram armazenados para serem avaliados de forma mediata, em estufa a 37°C, por 12 meses.

A solução de água destilada continha azida sódica a 0,4%, a fim de impedir o crescimento bacteriano. O ph da solução foi controlado mensalmente, para assegurar que ele permanecesse próximo de neutro (LOGUERCIO, A.D. *et al.*, 2005).



Figura 6. Pintura para identificação dos palitos da região central.

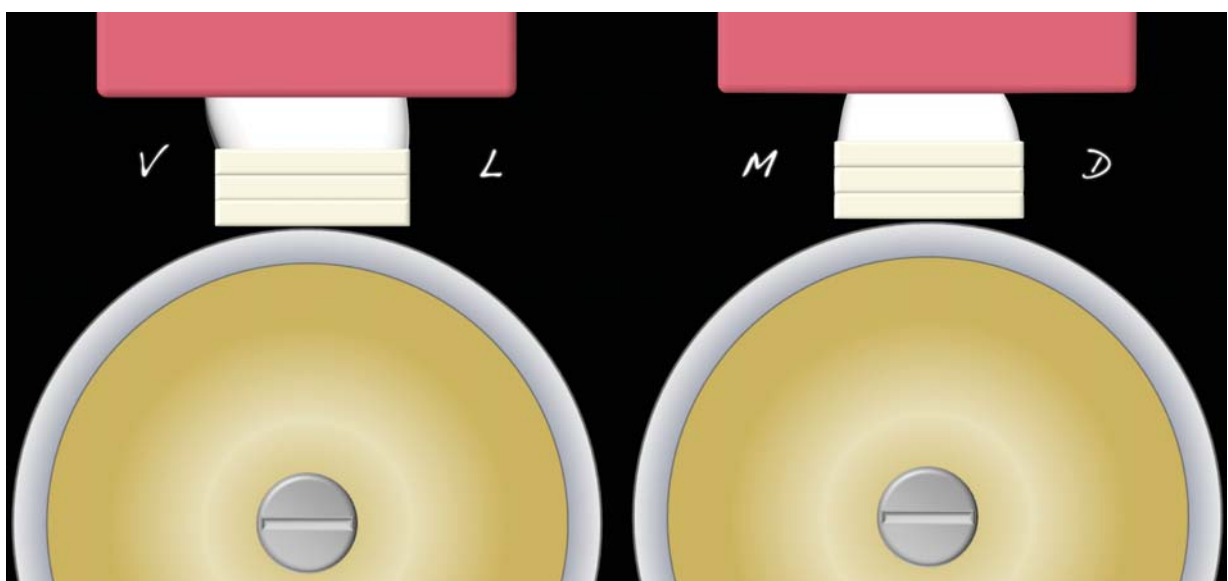


Figura 7. Corte dos dentes nos eixos x e y.

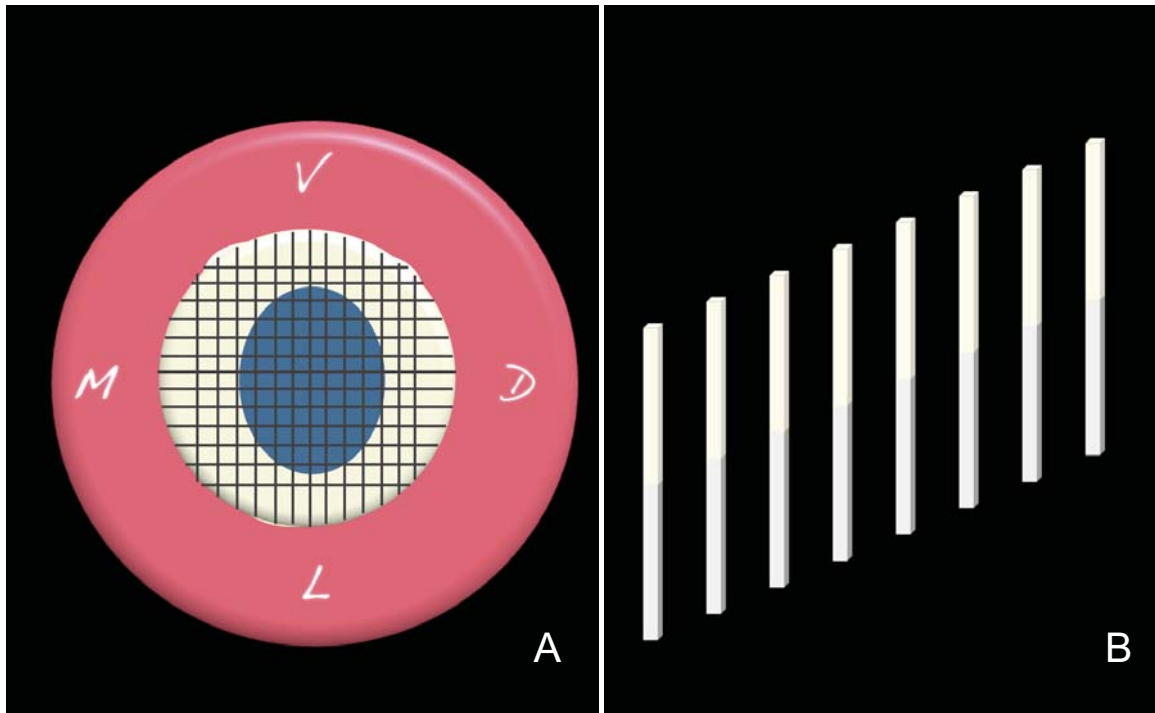


Figura 8. Vista oclusal do corte dos dentes nos eixos x e y (A) e palitos de dente/resina após o corte (B).

2.4 - Ensaio de Microtração Mediato (12 meses)

Antes de iniciar o ensaio de microtração, foi utilizado um paquímetro digital (Mitutoyo, São Paulo, Brasil) para registrar a área de cada corpo de prova. Os corpos de prova selecionados foram unidos pelas suas extremidades a um dispositivo metálico específico para microtração, com um adesivo à base de cianoacrilato (Super Bondar Gel – Loctite Brasil Ltda) e de um acelerador de cura (Zipkicker, Pacer, Rancho Cucamonga, CA, EUA), de modo a posicionar a área adesiva perpendicularmente ao longo eixo da tensão de tração (Figura 9). Em seguida, os corpos de prova foram submetidos à força de tração a uma velocidade de 0,5 mm/min em uma máquina de ensaios mecânicos EMIC DL-2000 (São José dos Pinhais, PR, Brasil), com célula de carga de 50 N, até ocorrer fratura (Figura 10A).

A máquina de ensaios foi acoplada a um computador, o qual opera um programa denominado MT teste 100 e no qual foram registrados os valores referentes à área

adesiva de cada corpo de prova e o valor de tensão máximo obtido no ensaio em MPa. Após o teste, a porção dentinária fraturada foi removida da máquina de ensaios e armazenada em um ependorff numerado para posterior análise em MEV, para se determinar o tipo de falha predominante ocorrido (Figura 10B). Para realização do ensaio de resistência de união, as condições climáticas do laboratório foram monitoradas com auxílio de um termohigrômetro (TESTO, São Paulo, SP, Brasil) ficando na temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $50 \pm 5\%$.



Figura 9. Palito fixado ao dispositivo para ensaio de microtração.

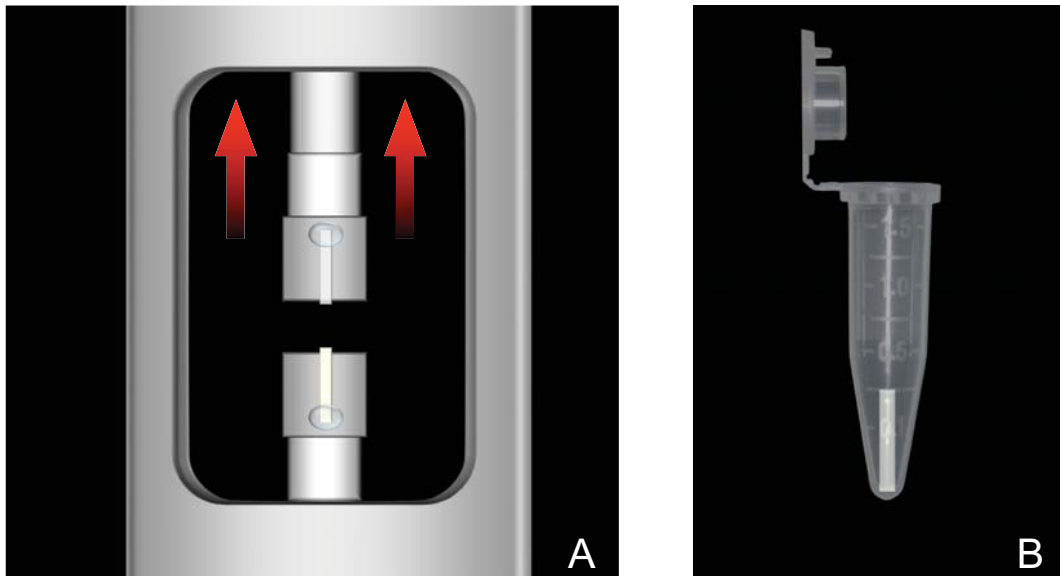


Figura 10. Palito fraturado após teste de microtração (A) e armazenado em Eppendorf numerado para posterior avaliação em MEV (B).

2.5 - Análise Estatística

Os resultados obtidos no teste de resistência de união à microtração foram submetidos ao teste estatístico Shapiro-Wilk para verificação da normalidade. Na presença de distribuição normal, foram submetidos à Análise de Variância de duas vias considerando como fatores fixos adesivos e tratamentos de superfície, seguido do teste de Tukey com nível de confiança de 95% .

2.6 - Preparo das Amostras para Análise em MEV

Para a análise do tipo de fratura, as extremidades dentinárias dos corpos de prova, após o ensaio, foram fixadas em *stubs* para que ficassem com a interface adesiva voltada para cima. Os corpos de prova foram mantidos no dessecador (Xartell, Itália), com sílica em gel (Synth) e mantidos em vácuo por 2 semanas no Centro de Microscopia e Microanálises da PUCRS. Depois de secos, os corpos de prova foram metalizados com ouro a 10 mA (Balzers-sputer coater, Alemanha) por 1 min, podendo assim ser observados no microscópio eletrônico de varredura (Philips modelo XL30) em

aumentos de 180x e 500x (Figura 11).

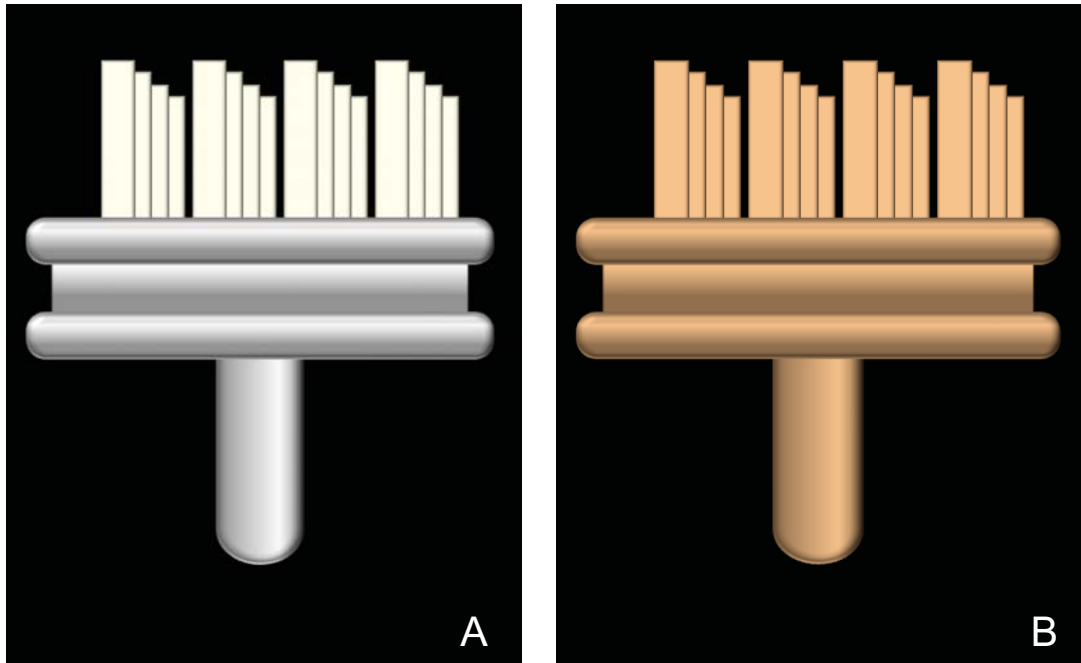


Figura 11. Palitos posicionados em stub após fratura (A) e metalizados com ouro para avaliação em MEV (B).

2.7 - Análise do Tipo de Fratura - Fractografia

Cada corpo de prova fraturado foi levado para observação no MEV (Philips modelo XL 30) para que fossem definidos os tipos de falhas predominantes, que foram classificadas em:

- Falha coesiva em adesivo: rompimento do adesivo.
- Falha coesiva em camada híbrida: rompimento do topo e/ou base de camada híbrida.
- Falha coesiva em dentina: rompimento de estrutura dentinária.
- Falha coesiva em resina composta: rompimento da resina composta.

Para análise das imagens obtidas na MEV, foi utilizado o programa Power Point (Windows XP, Microsoft). As imagens foram inseridas em slides e uma tela quadriculada foi adaptada sobre cada imagem (Figura 12) de acordo com PARANHOS *et al.*, 2009 e DILLENBURG *et al.*, 2009. Com isso foi possível determinar os tipos de

materiais e substratos predominantes encontrados (adesivo, camada híbrida, dentina ou resina composta) em cada corpo de prova. Foi estabelecido, de acordo com os percentuais obtidos, qual o padrão de falha predominante de cada corpo de prova e por consequência de cada grupo.

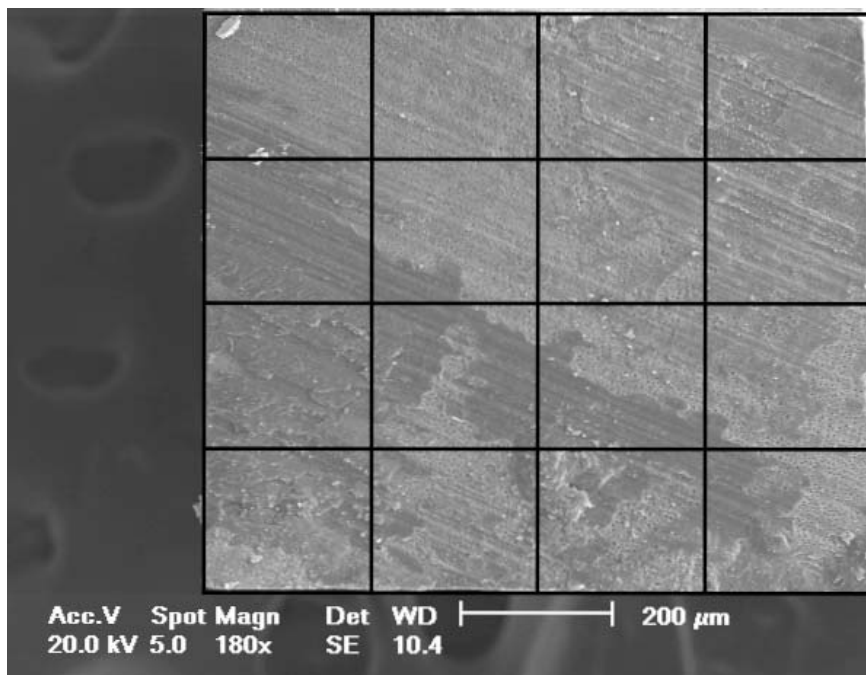


Figura 12. Grade posicionada sobre fotomicrografia para avaliação do tipo de falha predominante.

2.8 - Análise Estatística do Tipo de Fratura

Os resultados da fractografia foram visualizados em gráficos percentuais de distribuição de frequência.

2.9 - Microscopia Eletrônica de Superfície

A análise de superfície (2 dentes por grupo) foi realizada a partir de fatias de dentina submetidas aos diferentes tratamentos de superfície para remoção ou não da

smear layer. Assim, foram observados em MEV:

- Tratamento da dentina após aplicação do ácido fosfórico
- Tratamento da dentina após aplicação da solução experimental
- Tratamento da dentina após o uso do adesivo Adper Scotchbond SE
- Tratamento da dentina após o uso da solução experimental seguida da aplicação do adesivo Adper Scotchbond SE

Foi realizada uma canaleta no centro do dente no sentido vestibulo-lingual a fim de dividir a amostra em duas metades (Figura 13). Em uma delas não foi realizado nenhum tratamento (metade controle) e na outra foi aplicado o tratamento de acordo com o respectivo grupo (metade teste). Nas amostras dos grupos Adper SE, o sistema adesivo foi removido através da imersão em acetona p.a. Após o tratamento, as fatias de dentina foram fixadas em stubs e mantidas em vácuo em um dessecador (Xartell, Itália) com sílica gel (Synth) por 2 semanas. Depois de secos, os corpos de prova foram metalizados com ouro a 10 mA (Balzers-sputer coater, Alemanha) por 1 min, podendo assim ser observados no microscópio eletrônico de varredura (Philips modelo XL30) em aumentos de 8000x.

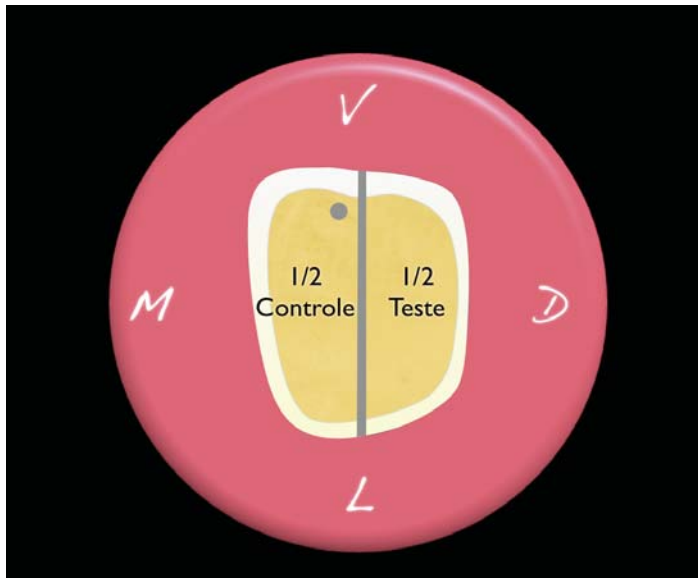


Figura 13. Canaleta realizada no centro do dente no sentido vestibulo-lingual.

3. RESULTADOS

3.1- Análise de Resistência de União à Microtração

Os resultados da análise de variância, considerando como fatores fixos adesivos e tratamentos de superfície (solução experimental) estão listados na Tabela 2.

Tabela 2: Resultados da análise de Variância two-way.

Fonte	Grau de liberdade (DF)	Soma dos quadrados (SS)	Quadrado médio (MS)	F	p
Adesivos	1	4121.13	4121.13	71.21	0.0000
Solução	1	356.83	356.83	6.17	0.0160
Adesivos*Solução	1	29.82	29.82	0.52	0.4758
Erro	56	3240.75	57.87		
Total	59	7748.53			

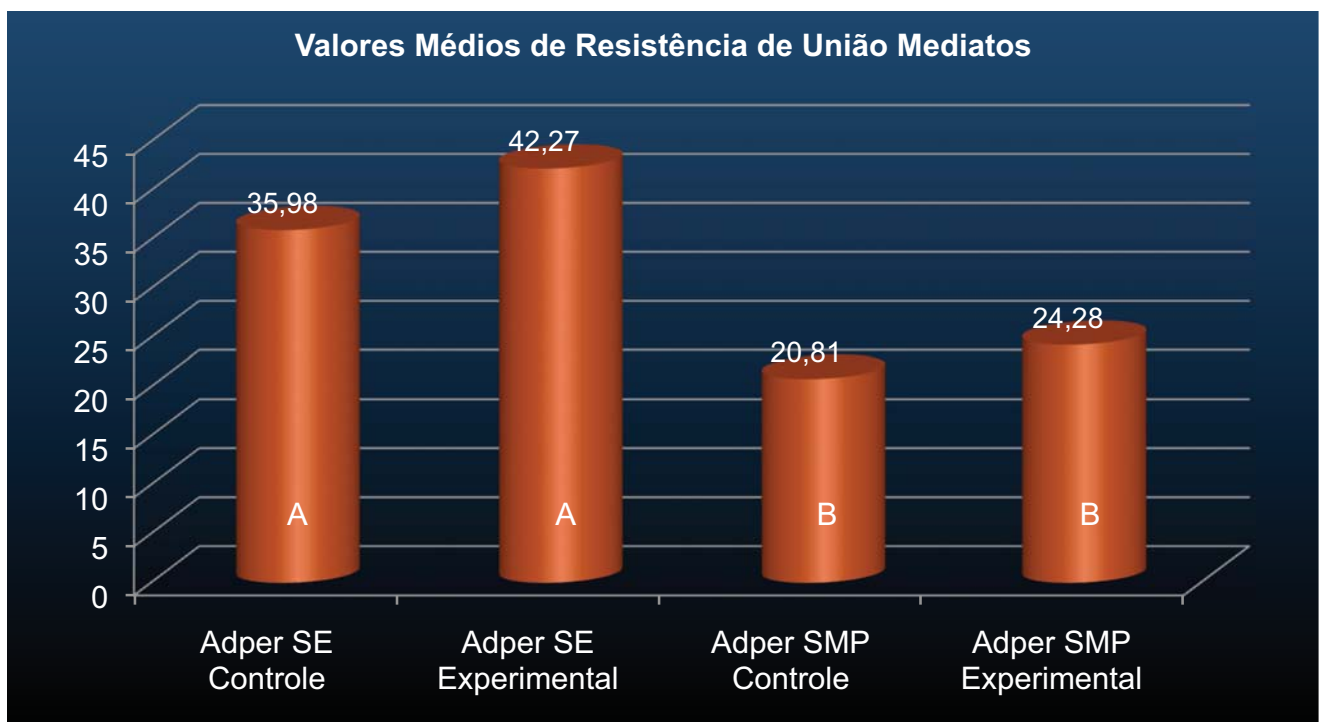
Os valores médios de resistência de união mediatos (MPa) obtidos no ensaio de microtração estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3: Valores médios de resistência de união mediatos (MPa) obtidos no ensaio de microtração.

Grupos	n	Média (MPa)	d.p	c.v
Adper Scotchbond SE Controle	15	35.98 ^(A)	7.61	21.16
Adper Scotchbond SE Experimental	15	42.27 ^(A)	3.78	8.95
Adper Scotchbond Multi-Usó Controle	15	20.81 ^(B)	7.96	38.24
Adper Scotchbond Multi-Usó Experimental	15	24.28 ^(B)	9.78	40.29

*Médias seguidas de mesma letra não apresentam diferença estatística para o Teste de Tukey ($p > 0,05$)

Figura 14. Gráfico dos valores médios de resistência de união mediatos (MPa) obtidos no ensaio de microtração.



3.2- Análise do Padrão de Fratura

Os resultados da análise do padrão de fratura predominante mediato em cada corpo de prova após o ensaio de microtração e seus respectivos valores de área adesiva e de resistência de união mediatos estão dispostos no Anexo 3.

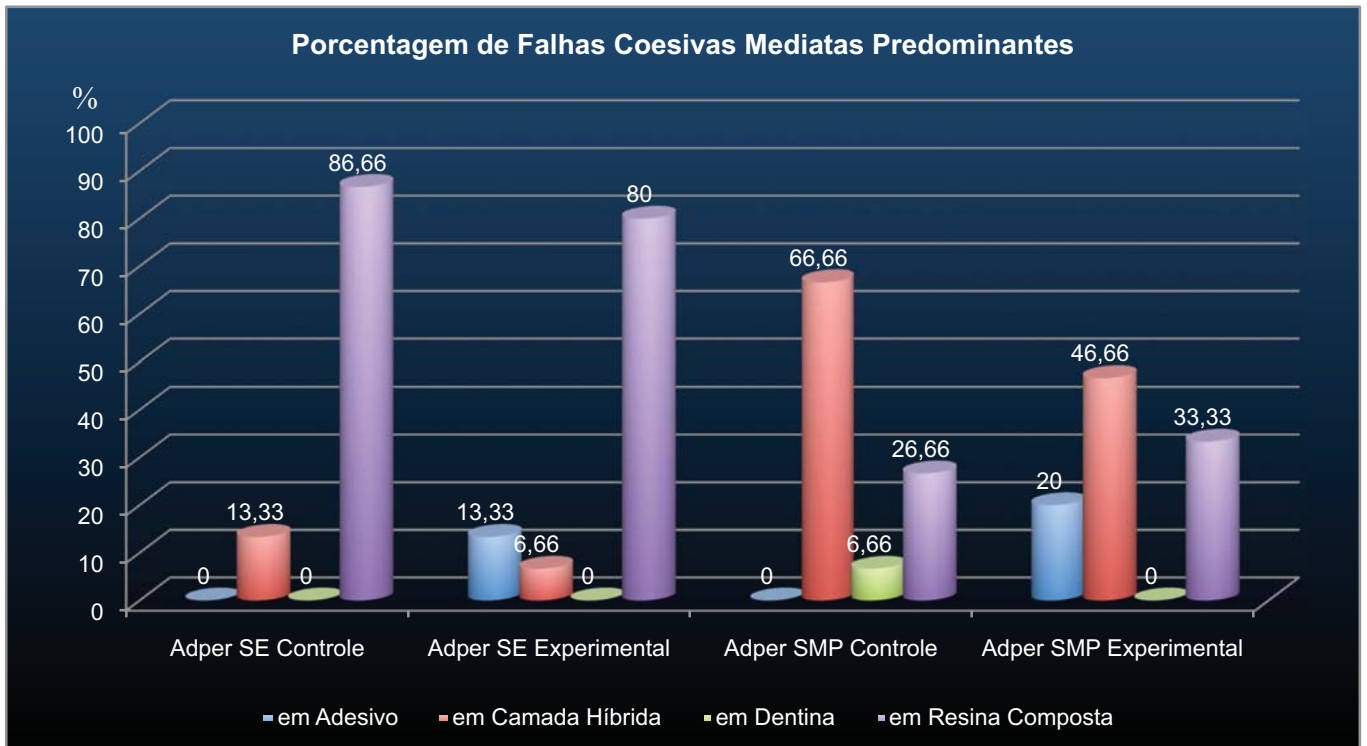
Os tipos de fratura encontrados nos corpos de prova estão ilustrados nas Figuras 16 a 21.

Os valores absolutos e percentuais dos tipos de falhas mediatas predominantes encontradas em cada grupo e os valores médios de resistência de união mediatos para cada grupo estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Valores percentuais de falhas predominantes mediatas e valores médios de resistência de união mediatos (MPa) por grupo.

Grupos	Tipo de Falha Coesiva Mediata Predominante					Médias Mediatas (MPa)
	Adesivo	Camada Híbrida	Dentina	Resina Composta	Total	
- Adper Scotchbond SE Controle	0 (0%)	2 (13.33%)	0 (0%)	13 (86.66%)	15 (100%)	35.98
- Adper Scotchbond SE Experimental	2 (13.33%)	1 (6,66%)	0 (0%)	12 (80%)	15 (100%)	42.27
- Adper SMP Controle	0 (0%)	10 (66.66%)	1 (6.66%)	4 (26.66%)	15 (100%)	20.81
- Adper SMP Experimental	3 (20%)	7 (46.66%)	0 (0%)	5 (33.33%)	15 (100%)	24.28

Figura 15. Gráfico percentual de distribuição de frequência de falhas coesivas mediatas predominantes por grupo.



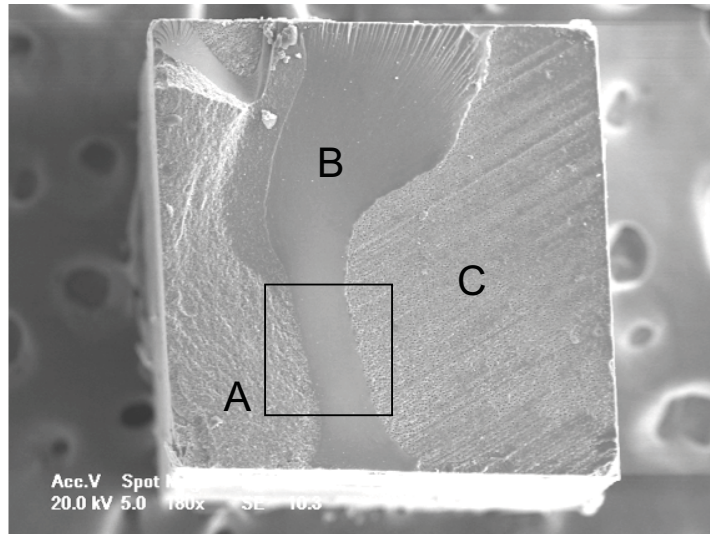


Figura 16. Fotomicrografia em MEV (aumento de 180x) de corpo de prova com presença predominante de falha coesiva em camada híbrida. (A) Falha coesiva em resina composta. (B) Falha coesiva em adesivo. (C) Falha coesiva em camada híbrida. Área demarcada presente em maior aumento na Figura 17.

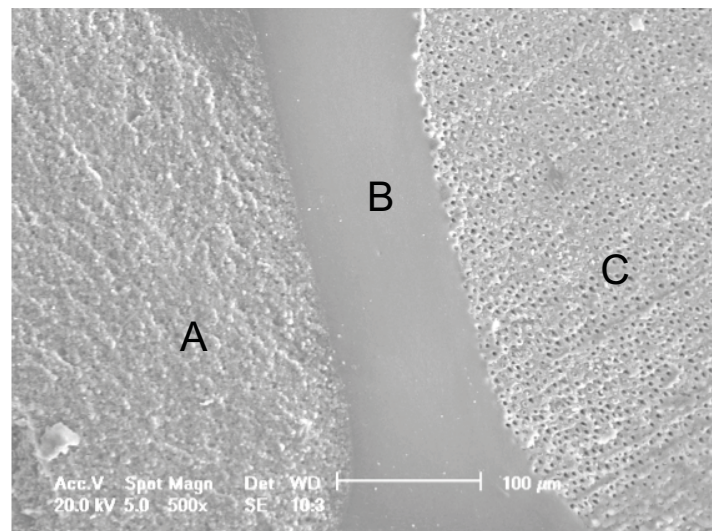


Figura 17. Fotomicrografia em MEV (aumento de 500x). (A) Falha coesiva em resina composta. (B) Falha coesiva em adesivo. (C) Falha coesiva em camada híbrida.

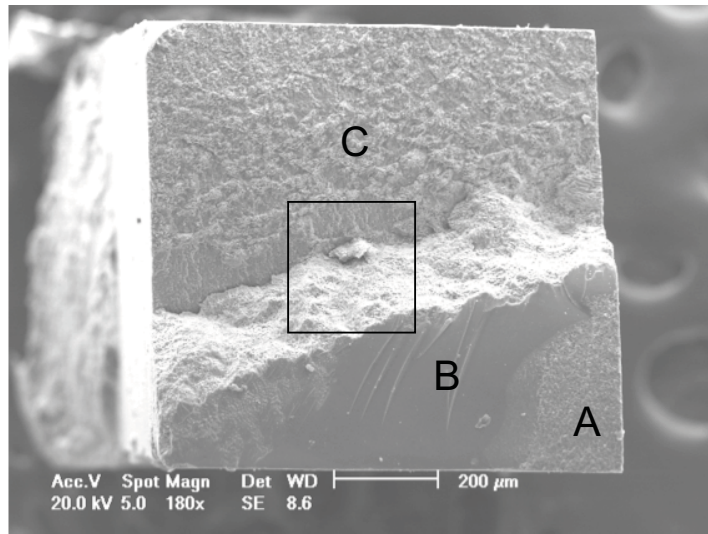


Figura 18. Fotomicrografia em MEV (aumento de 180x) de corpo de prova com presença predominante de falha coesiva em dentina. (A) Falha coesiva em resina composta. (B) Falha coesiva em adesivo. (C) Falha coesiva em dentina. Área demarcada presente em maior aumento na Figura 19.

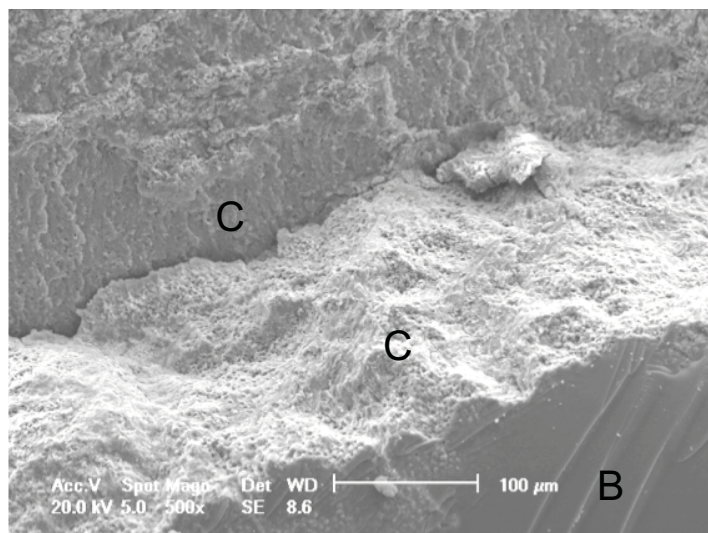


Figura 19. Fotomicrografia em MEV (aumento de 500x). (B) Falha coesiva em adesivo. (C) Falha coesiva em dentina.

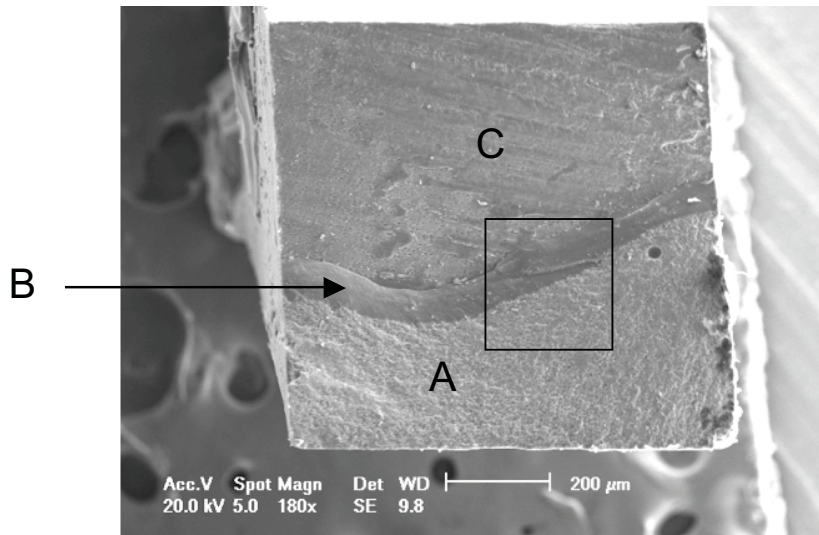


Figura 20. Fotomicrografia em MEV (aumento de 180x) de corpo de prova com presença predominante de falha coesiva em camada híbrida. (A) Falha coesiva em resina composta. (B) Falha coesiva em adesivo. (C) Falha coesiva em camada híbrida. Área demarcada presente em maior aumento na Figura 21.

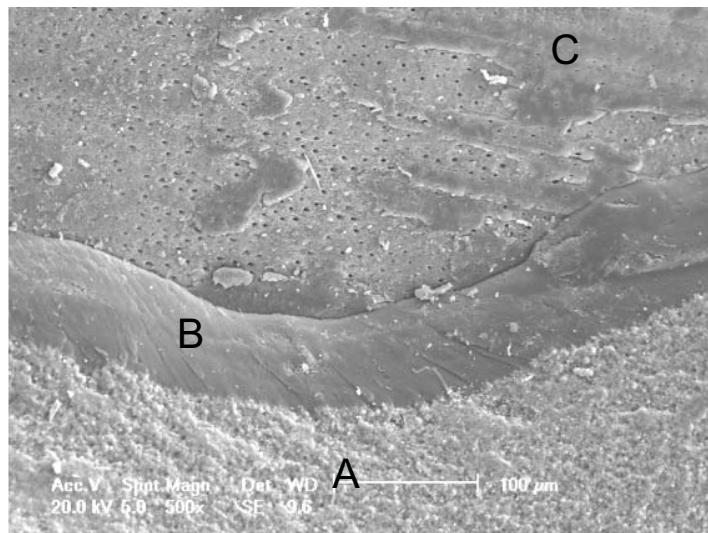


Figura 21. Fotomicrografia em MEV (aumento de 500x). (A) Falha coesiva em resina composta. (B) Falha coesiva em adesivo. (C) Falha coesiva em camada híbrida.

3.3- Análise de Superfície Dentinária

As alterações de superfície dentinária promovidas pelos protocolos adesivos observadas em MEV, para os 4 grupos, estão dispostas nas Figuras 22 a 25:

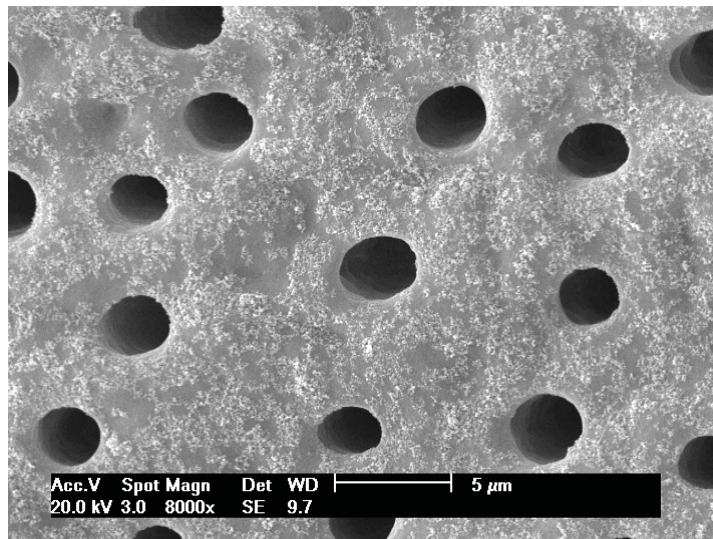


Figura 22. Fotomicrografia em MEV (aumento de 8000x) do condicionamento dentinário promovido pelo ácido fosfórico a 37%. Observação da presença de túbulos dentinários abertos. (Grupo Adper SMP Controle)

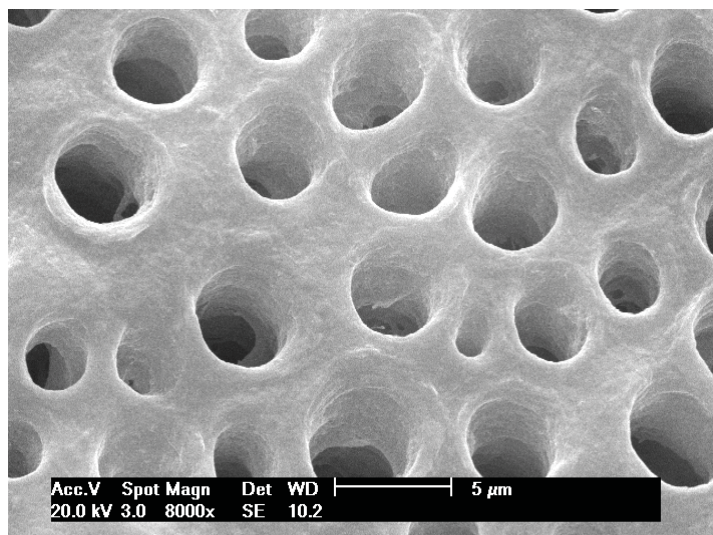


Figura 23. Fotomicrografia em MEV (aumento de 8000x) do condicionamento dentinário promovido pela solução ácida experimental. Observação da presença de túbulos dentinários abertos. (Grupo Adper SMP Experimental)

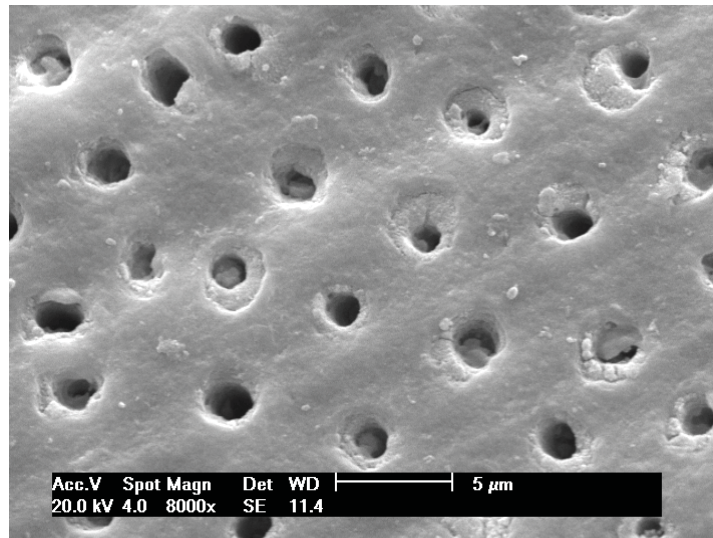


Figura 24. Fotomicrografia em MEV (aumento de 8000x) do condicionamento dentinário promovido pelo adesivo autocondicionante. Observação da presença de túbulos dentinários parcialmente abertos. (Grupo Adper SE Controle)

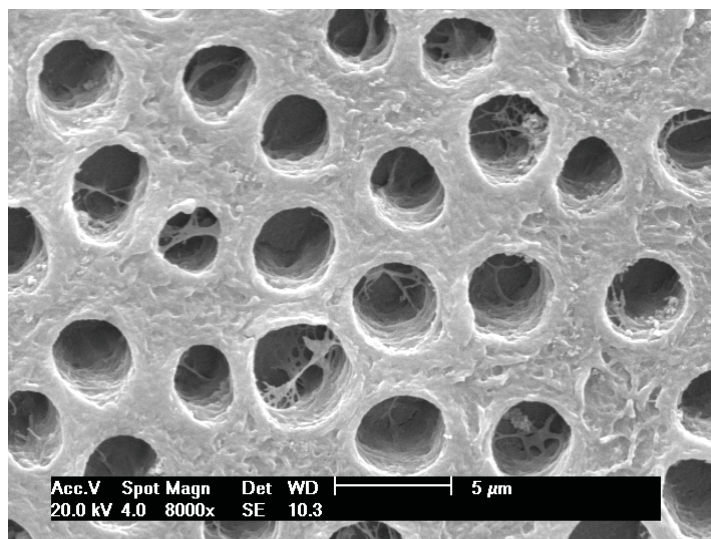


Figura 25. Fotomicrografia em MEV (aumento de 8000x) do condicionamento dentinário promovido pela solução ácida experimental associada ao adesivo autocondicionante. Observação da presença de túbulos dentinários abertos. (Grupo Adper SE Experimental)

4. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, a hipótese de nulidade foi aceita, ao passo que o uso da solução experimental inibidora de metaloproteinase para condicionamento da superfície dentinária, previamente à aplicação do sistema adesivo autocondicionante ou do sistema adesivo convencional, promoveu valores de resistência de união mediatos similares à técnica tradicional recomendada pelos fabricantes.

4.1- Degradação da Camada Híbrida

A justificativa para a incorporação da tetraciclina na solução condicionadora, foi o fato de esta substância ser capaz de remover smear layer, pois apresenta um pH relativamente baixo (TORABINEJAD *et al.*, 2003; SAMPAIO, *et al.*, 2007) e principalmente pelo fato de a tetraciclina ser um inibidor de metaloproteinases da matriz (LLAVANERAS *et al.*, 2001; BEZERRA *et al.*, 2002; ACHARYA *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2005).

Sabe-se que a efetividade imediata dos adesivos contemporâneos é bastante favorável, independente da técnica usada (BRESCHI *et al.*, 2008). Entretanto, a longo prazo, a efetividade da união de alguns adesivos cai drasticamente (DE MUNCK *et al.*, 2005). Os polímeros odontológicos têm se mostrado suscetíveis a efeitos higroscópicos e hidrolíticos, variando de acordo com sua química e estrutura (FERRACANE, 2006). Enquanto a aplicação de agentes acídicos na dentina abre caminho para a difusão dos monômeros para a rede de colágeno, isto também facilita a difusão do fluido intratubular da polpa para a superfície dentinária, deteriorando a ligação de alguns adesivos de uso corrente (PERDIGÃO, 2010).

Entre os diferentes fenômenos que ocorrem nas interfaces adesivas dentinárias, pode-se destacar: insuficiente impregnação dentinária pelo adesivo, alta permeabilidade da interface adesiva, sub-polimerização, separação de fase e ativação de enzimas colagenolíticas endógenas. Esses fatores reduzem a longevidade da interface de união (BRESCHI *et al.*, 2008; ZHANG e KERN, 2009). TAY *et al.* (2002) relataram que a infiltração de nitrato de prata em camadas híbridas formadas por adesivos

autocondicionantes de diferentes pHs em dentina sadia não é necessariamente causada por disparidades nas profundidades de desmineralização e de infiltração resinosa. Essas zonas de infiltração representam áreas de aumento de permeabilidade dentro de uma matriz resinosa polimerizada, na qual a água é incompletamente removida durante a secagem do solvente, resultando em regiões de incompleta polimerização e/ou formação de hidrogéis permeáveis, devido à copolimerização do HEMA com monômeros resinosos ácidos.

Frente a fibras colágenas expostas localizadas na base da camada híbrida (devido a uma impregnação deficiente pelo adesivo), pode ocorrer a degradação das mesmas, pela ativação de fatores colagenolíticos endógenos (BRESCHI *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2011; STANISLAWCZUK *et al.*, 2011^b). A ativação dessas enzimas (metaloproteinases da matriz extracelular) pode ser iniciada pelos procedimentos adesivos, acelerando a degradação da adesão (DE MUNCK *et al.*, 2009; LEHMANN *et al.*, 2009).

Essa degradação decorrente da atividade enzimática colagenolítica foi também demonstrada por PASHLEY *et al.* (2004) quando avaliaram a degradação das fibras colágenas por enzimas durante o envelhecimento de amostras após 24 horas, 90 e 250 dias sob MET. As matrizes colágenas parcialmente desmineralizadas foram quase completamente destruídas nas amostras armazenadas por 250 dias, mas não quando incubadas com inibidores de enzimas ou óleo mineral.

Portanto, a incorporação de uma substância inibidora de metaloproteinases da matriz na solução experimental (cloridrato de tetraciclina), objetivou a manutenção da integridade da interface adesiva ao longo do tempo.

4.2- Metaloproteinases da Matriz Extracelular (MMPs)

As metaloproteinases da matriz (MMPs), coletivamente conhecidas como matrixinas, formam uma família multigênica dentro da classe das metaloproteinases endopeptidases, que modulam a degradação de praticamente todas as moléculas da matriz extracelular (MEC), incluindo colágeno desnaturado (gelatina) e nativo. Até hoje, 24 diferentes MMPs foram identificadas, das quais 23 são encontradas em seres

humanos (HANNAS *et al.*, 2007).

As metaloproteinases da matriz (MMPs) pertencem a um grupo diverso de enzimas que não estão apenas envolvidas na reestruturação da matriz extracelular (ACHARYA *et al.*, 2004; NAVARRO *et al.*, 2006), mas também desempenham um papel maior em várias condições fisiopatológicas em virtude de sua complicada expressão, ativação e processos de regulação. Elas têm estado amplamente envolvidas na progressão do câncer, devido ao seu papel na invasão, proliferação e metástase (ACHARYA *et al.*, 2004). Dentre os processos patológicos que acometem a cavidade bucal e envolvem a participação das metaloproteinases da matriz, destacam-se a destruição tecidual periodontal, as lesões de cárie radicular, as metástases em alguns tipos de tumores e as desordens da articulação temporomandibular (NAVARRO *et al.*, 2006).

Essas proteinases são um grupo de enzimas zinco-dependentes responsáveis pela degradação da matriz extracelular e membranas basais, sendo secretadas em uma forma latente e tornando-se ativas no ambiente pericelular, sendo relacionadas a processos fisiológicos e patológicos na área odontológica (NAVARRO *et al.*, 2006; ZHANG e KERN, 2009). De acordo com pesquisas recentes, as MMP presentes na matriz dentinária humana são as MMP-2, -3, -8, -9 e -20 (BRESCHI *et al.*, 2010).

4.2.1- Classificação das Metaloproteinases da Matriz

Com base na especificidade do substrato, similaridade de seqüência, e organização do domínio, as MMPs podem ser divididas em seis grupos (colagenases, gelatinases, estromelisinases, matrisilinas, MMPs tipo membrana e outras MMPs (VISSE e NAGASE, 2003; HANNAS *et al.*, 2007).

As colagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13, e MMP-18) apresentam como principal característica a capacidade de clivar colágeno intersticial I, II, e III. As gelatinases A (MMP-2) e gelatinase B (MMP-9) prontamente digerem os colágenos desnaturados, ou seja, as gelatinas. A estromelisina 1 (MMP-3) e estromelisina 2 (MMP-10), têm especificidades de substrato semelhantes, mas a MMP-3 tem uma eficiência proteolítica maior. Além de digerir componentes da matriz extracelular, a

MMP-3 ativa algumas proMMPs. As matrilisinas, por sua vez, são caracterizadas pela ausência de um domínio de hemopexina. Matrilisina 1 (MMP-7) e matrilisina 2 (MMP-26), são também chamadas de endometases. As MMPs tipo membrana apresentam seis variações (MMP-14, MMP-15, MMP- 16, MMP-24, MMP-17 e MMP-25). Outras sete MMPs não são classificados nas categorias acima (MMP-11, MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-22, MMP-23, MMP-28), possuindo diferentes funções (VISSE e NAGASE, 2003).

4.3- Avaliação da Resistência de União Mediata

O Scotchbond Multi-Usado apresenta-se comercialmente em 2 frascos, um contendo o primer e o outro o adesivo. Este sistema adesivo preconiza o condicionamento com ácido fosfórico prévio à sua aplicação. O condicionamento com ácido fosfórico a 37% desmineraliza a dentina intertubular a uma profundidade de 5-8 µm criando nanoporosidades que servem de canais para infiltração resinosa de monômeros dissolvidos durante a adesão (PASHLEY *et al.*, 2011).

Após o condicionamento ácido, deve ser realizada a lavagem do mesmo, seguido de secagem cuidadosa a fim de evitar o colapamento das fibras colágenas, o que pode dificultar a difusão do adesivo na dentina, causando sensibilidade pós-operatória e a obtenção de baixos valores de resistência de união (PASHLEY *et al.*, 2011). Após o condicionamento ácido, deve ser aplicado o primer, seguido de secagem para evaporação do solvente, que vai evaporar levando consigo grande parte da umidade presente na dentina, preparando este substrato para receber o adesivo hidrofóbico, que deve ser aplicado e fotopolimerizado, resultando em um processo de aplicação de 3 passos. O solvente presente no primer do Scotchbond Multi-Usado é à base de água, o que torna a técnica menos sensível, sendo considerado o “padrão ouro” em termos de durabilidade de adesão (DE MUNCK *et al.*, 2005).

O outro sistema adesivo usado foi o Adper Scotchbond SE, um sistema adesivo autocondicionante. Os sistemas adesivos autocondicionantes constroem-se em uma técnica alternativa para o tratamento da superfície dentinária antes da inserção do material restaurador. Estes sistemas dispensam o condicionamento ácido prévio, pois

no primer ou no próprio adesivo, há a incorporação de monômeros ácidos. Isso diminui o tempo clínico e também diminui a sensibilidade técnica, levando à formação de uma camada híbrida mais delgada sem remover completamente a smear layer (DE MUNCK *et al.*, 2005). Por seu pH ser menor que 1, o Adper Scotchbond SE pode ser classificado como um adesivo autocondicionante forte (MINE *et al.* 2009). Este sistema adesivo é composto por dois frascos (líquido A e líquido B). Ele apresenta uma característica peculiar, pois o líquido A é composto por uma solução rosa, que ajuda o profissional a controlar o local de aplicação da solução. O líquido B, por sua vez, tem coloração amarela, e vai ser responsável por iniciar o processo de condicionamento de superfície. O primeiro líquido (rosa) é composto por uma solução aquosa de HEMA e não tem portanto, capacidade de condicionamento. O autocondicionamento é iniciado apenas quando a solução de monômeros ácidos amarela é aplicada e misturada com a solução aquosa de HEMA (MINE *et al.* 2009).

Os resultados deste estudo, para o adesivo Adper SE, não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os valores mediatos de resistência de união entre o grupo Controle (35.98 MPa) e o grupo Experimental (42.27 MPa), onde previamente à aplicação do sistema adesivo foi feito o condicionamento dentinário com a solução experimental. Apesar de não haver diferença significativa, o grupo Adper SE Experimental apresentou uma resistência de união mediata 17,48% maior que o grupo Adper SE Controle. Tal achado talvez possa ser explicado pela presença de inibidores de MMPs na solução experimental, o que pode ter levado a uma menor degradação da interface adesiva ao longo do tempo.

O mecanismo de inibição da solução ácida experimental pode ser explicado pela reação de quelação através da tetraciclina e também por uma possível desnaturação das MMPs pelo ácido fosfórico a 20%, presentes na solução.

Segundo STANISLAWCZUK *et al.* (2011^a), ACHARYA *et al.* (2004) e GENDRON *et al.* (1999) as tetraciclinas são capazes de inibir a atividade das MMPs através da sua habilidade em se unir a íons metálicos, particularmente Ca^{+2} e Zn^{+2} . Esses íons são requeridos pelas MMPs para manter sua conformação e atividade hidrolítica. Dessa forma, inibição de MMPs ou pró-MMPs pode ocorrer devido à quelação dos íons Zn^{+2} no sítio ativo do domínio catalítico da MMP pelas tetraciclinas, alterando assim a

conformação molecular da enzima e bloqueando sua atividade catalítica na matriz extracelular.

O outro possível mecanismo de inibição de MMPs da solução experimental está relacionado à desnaturação protéica através do ácido fosfórico presente na sua composição, também descrito na literatura. Esta substância ácida leva a uma diminuição da atividade gelatinolítica e colagenolítica das amostras de pó de dentina tratadas por este ácido, em trabalhos *in vitro*. Diminuições da atividade enzimática na ordem de 98.1% para o ácido fosfórico a 10% (MAZZONI *et al.*, 2006) e de 65% (PASHLEY *et al.*, 2004) e de 77.03% (NISHITANI *et al.*, 2006) para o ácido fosfórico a 37% foram encontradas. Esses ácidos fortes, por apresentarem um pH bastante baixo, à medida que desmineralizam a dentina, expondo e ativando as MMPs, eles também promovem a sua desnaturação, provocando assim a sua inativação.

Então é provável que no grupo Adper SE Experimental, tenha ocorrido simultaneamente a desmineralização dentinária e a desnaturação das MMPs pelo ácido fosfórico a 20% somado à ação inibitória da tetraciclina sobre as MMPs por meio da quelação do sítio ativo das mesmas. Posteriormente, quando o adesivo autocondicionante foi aplicado, este provavelmente penetrou em uma dentina parcialmente desmineralizada com MMPs desnaturadas e queladas pela solução experimental. Além disso, nova desmineralização de matrizes mineralizadas remanescentes deve ter ocorrido, como descrito por MAZZONI *et al.* (2006), com conseqüente exposição e ativação de novas MMPs pelo adesivo autocondicionante. Entretanto, o baixo pH deste adesivo autocondicionante forte (pH=0.8) pode ter desnaturado, pelo menos parcialmente, tais enzimas gelatinolíticas, favorecendo desta forma a integridade adesiva ao longo dos 12 meses de armazenagem.

Para o adesivo Adper SMP, também não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores mediatos de resistência de união entre o grupo Controle (20.81 MPa) e o grupo Experimental (24.28 MPa), onde o condicionamento com ácido fosfórico a 37% foi substituído pelo condicionamento com a solução experimental. Apesar de não haver diferença significativa, o grupo Adper SMP Experimental apresentou uma resistência de união mediata 16,67% maior que o grupo Adper SMP Controle. Tal achado talvez possa também ser explicado pela presença de inibidores de

MMPs na solução experimental, o que pode ter levado a uma menor degradação da interface adesiva ao longo do tempo, em comparação com o grupo controle, assim como descrito para o grupo experimental do sistema adesivo Adper Scotchbond SE.

O comportamento dos dois sistemas adesivos usados neste estudo foi muito parecido no que diz respeito à comparação entre os grupos controle e experimental.

Entretanto, se compararmos os resultados encontrados entre os dois sistemas adesivos estudados, veremos que o comportamento do sistema adesivo autocondicionante foi estatisticamente superior ao do sistema adesivo de condicionamento ácido total, no que se refere à resistência de união mediata, tanto para os grupos controle quanto para os experimentais.

Diante desta constatação, é possível afirmar que o sistema adesivo autocondicionante testado teve um mecanismo de formação de camada híbrida que proporcionou a manutenção de sua integridade ao longo do tempo, sendo superior ao adesivo de condicionamento ácido total.

A explicação para isto, pode estar relacionada com a capacidade que este sistema adesivo apresenta de realizar uma desmineralização menos profunda, expondo menos fibras colágenas, desmineralizando e impregnando a dentina ao mesmo tempo, deixando assim menos fibras colágenas expostas, as quais são passíveis de degradação hidrolítica e gelatinolítica pelas MMPs (MAZZONI *et al.*, 2012).

Em trabalho de NISHITANI *et al.*, (2006) foi demonstrado que sistemas adesivos autocondicionantes com pH variando de 0.88-2.44, são capazes de ativar MMPs, sem no entanto, serem capazes de desnaturar as mesmas, ativando assim o seu potencial gelatinolítico. Se esses achados *in vitro*, puderem ser extrapolados para este trabalho, então a provável explicação para o desempenho satisfatório do sistema adesivo do grupo Adper SE Controle (pH= 0.8) seja o fato de ele ter conseguido deixar menor quantidade de fibras colágenas expostas após sua aplicação, ativando menos MMPs, mesmo não sendo ácido o suficiente para desnaturar completamente essas MMPs ativadas. Assim, possíveis MMPs ativadas podem ter sido imobilizadas pelo sistema adesivo polimerizado (OSORIO *et al.*, 2011).

Outro ponto importante a ser discutido é o comportamento distinto entre o grupo Adper SE Experimental e o grupo Adper SMP Experimental após 12 meses de

armazenagem. A dentina destes dois grupos sofreu o mesmo tratamento condicionador pela solução ácida experimental, previamente à aplicação do sistema adesivo, ocorrendo completa remoção de *smear layer* e abertura de túbulos dentinários como demonstrado pelas figuras 23 e 25. A diferença em relação ao tratamento é que, após a aplicação da solução experimental (pH=0.5) o substrato dentinário entrou em contato com diferentes sistemas adesivos e com diferentes pHs. O pH do sistema adesivo Adper SE é de 0.8, enquanto o primer do Adper SMP tem um pH de 3.3 e o seu adesivo um pH de 8.2.

As possíveis explicações para essa diferença de desempenho poderiam recair sobre a hidrofília dos dois materiais, entretanto o sistema adesivo Adper SMP (considerado padrão-ouro) é de 3 passos, recebendo a aplicação de uma última camada adesiva hidrofóbica. Portanto, a superioridade do Adper SE não pode ser explicada por esse aspecto.

Outra possível explicação, seria que o sistema adesivo autocondicionante teria exposto uma menor quantidade de fibras colágenas sujeitas à degradação em relação ao outro sistema adesivo. Segundo MAZZONI *et al.* (2013) e DE MUNCK *et al.* (2010), o maior nível de atividade gelatinolítica verificado nos adesivos de condicionamento ácido total em comparação com os autocondicionantes, sabendo que ambos são capazes de ativar MMPs, deve-se ao fato de que o condicionamento prévio com ácido fosfórico expõe mais matriz dentinária do que com os autocondicionantes. Entretanto, esta não parece ser uma explicação plausível neste estudo pois, em ambos grupos experimentais, uma solução ácida experimental foi usada previamente para condicionamento da dentina e, além disso, condicionamento adicional da superfície pré-condicionada pela solução ácida experimental foi realizado pelo sistema adesivo autocondicionante no grupo Adper SE Experimental. Assim, esta também não parece uma explicação aceitável.

Outra possibilidade poderia ser a manutenção maior de solvente residual dentro da dentina desmineralizada pelo condicionamento com ácido fosfórico e devido ao movimento do fluido intratubular para fora, dificultando a substituição de água por resina dentro do substrato dentinário, como descrito por (PASHLEY *et al.*, 2011) e PERDIGÃO (2010). Estas zonas pobres em resina e ricas em água criadas dentro da camada

híbrida são mais suscetíveis à degradação hidrolítica e também à ação das MMPs (PASHLEY *et al.*, 2011; BRESCHI *et al.*, 2010). Entretanto, esta explicação também não parece viável pois ambos sistemas adesivos foram precedidos por uma solução experimental que continha ácido fosfórico a 20% e um pH capaz de remover completamente a smear layer. Em relação aos solventes presentes nos dois sistemas adesivos, ambos apresentam água como solvente nos respectivos primers (Quadro 1).

Outra possibilidade poderia estar relacionada com a atividade distinta de MMPs entre os dois grupos. Talvez a diferença encontrada entre os dois grupos possa ser explicada por poder ter ocorrido uma maior degradação enzimática na camada híbrida das amostras do grupo Adper SMP Experimental. MAZZONI *et al.*, 2006, demonstraram que os adesivos de condicionamento ácido total simplificados (frasco único) utilizados no seu estudo foram capazes de realizar uma "ativação ácida" (como descrito por TJADERHANE *et al.*, 1998) sobre aquele pó de dentina previamente desmineralizado pelo ácido fosfórico, o qual havia provocado uma diminuição da atividade enzimática. Foram identificados no pó de dentina condicionado pelo ácido fosfórico a 10% (pH=0.4) sob análise em MET, matrizes mineralizadas remanescentes, mesmo nas partículas dentinárias mais finas. A explicação levantada pelos autores para tal reativação ácida pelos sistemas adesivos foi que o aumento de atividade enzimática verificado na dentina previamente condicionada com ácido fosfórico a 10% deveu-se a uma desmineralização daquelas matrizes mineralizadas remanescentes e consequente ativação e não desnaturação de outras MMPs, presentes na base de tais matrizes. Estes adesivos de frasco único testados apresentaram um pH que variou de 2.68 a 4.60, os quais foram capazes de iniciar a atividade enzimática das MMPs, entretanto, não sendo ácidos o suficiente para desnaturá-las. Essa capacidade de ativação de gelatinases salivares por sistemas adesivos de pH entre 2.3 e 5 também foi descrito por TJADERHANE *et al.* (1998). No presente estudo, o sistema adesivo de condicionamento ácido total usado é de 3 passos, ou seja, o primer e o adesivo estão em frascos separados. Assim, o primer deste sistema adesivo apresenta um pH de 3.3, que está dentro da faixa de pH referida por MAZZONI *et al.* (2006) e TJADERHANE *et al.* (1998), como possíveis de ativar MMPs sem no entanto ser ácido o suficiente para desnaturá-las. TAY *et al.* (2006) também demonstraram a capacidade de 2 adesivos

autocondicionantes leves ($\text{pH}=2.44$ e 2.8) de ativar MMPs latentes aumentando a atividade enzimática sem, no entanto, serem capazes de desnaturar as mesmas.

Baseado no exposto acima para o grupo Adper SMP Experimental, é possível correlacionar o seu desempenho inferior com uma possível maior ativação de MMPs pelo seu primer ($\text{pH}=3.3$), sem no entanto ser capaz de desnaturar as mesmas, e consequentemente aumentando a atividade gelatinolítica na interface adesiva destas amostras, durante os 12 meses de armazenagem.

Já no grupo Adper SE Experimental, o seu baixo pH (0.8) pode ter sido responsável pela desnaturação de uma quantidade maior de MMPs ativadas pelo condicionamento com a solução experimental e/ou pelo próprio adesivo, diminuindo assim a atividade gelatinolítica nas amostras do grupo Adper SE Experimental.

Vários trabalhos demonstram a manutenção dos valores de resistência de união mediatos quando o sistema adesivo é associado a uma substância inibidora de MMPs. Dentre elas, a mais utilizada é a clorexidina. Esta substância normalmente é aplicada após o condicionamento ácido, previamente ao sistema adesivo. Alguns trabalhos têm sido realizados aplicando a clorexidina diretamente no primer de adesivos autocondicionantes de 2 passos, demonstrando também preservação da união adesiva ao longo do tempo (ZHOU *et al.*, 2009), não apresentando nenhum efeito negativo sobre a resistência de união imediata (ZHOU *et al.*, 2010). Essa manutenção dos valores de resistência de união de sistemas adesivos associados ao uso da clorexidina, ou a diminuição na perda destes valores, podem ser verificados em diversos trabalhos de avaliação mediata da união adesiva obtida. Estudos *in vitro*, avaliando a resistência de união imediata e mediata nos períodos de 6 meses (CARRILHO *et al.*, 2007^a; BRESCHI *et al.*, 2009; CAMPOS *et al.*, 2009; KOMORI *et al.*, 2009; LOGUERCIO *et al.*, 2009; STANISLAWCZUK *et al.*, 2009); nos períodos de 12 meses (BRESCHI *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2009) e nos períodos de 24 meses (BRESCHI *et al.*, 2010) demonstram a diminuição da perda dos valores mediatos de resistência de união nas amostras tratadas com clorexidina em relação àquelas não tratadas. Trabalhos *in vivo*, nos períodos de 14 meses (CARRILHO *et al.*, 2007^b) e 18-20 meses (RICCI *et al.*, 2010) também mostram uma melhora da preservação da união adesiva ao longo do tempo, quando as amostras foram tratadas com clorexidina.

Resultados semelhantes foram obtidos por STANISLAWCZUK, REIS E LOGUERCIO (2011^b) avaliando o efeito de um ácido contendo clorexidina a 2% e uma solução de digluconato de clorexidina a 2% na resistência de união imediata e após 2 anos, e na infiltração de nitrato de prata para dois adesivos de condicionamento ácido total simplificados. Eles concluíram que o uso de clorexidina em uma solução aquosa ou em associação ao condicionador ácido foi eficaz para reduzir a degradação da união dentinária em um período de 2 anos. Segundo CHANG e SHIN (2010) a aplicação da clorexidina com ou sem lavagem, e antes ou após o condicionamento ácido, não interferiu na sua capacidade de preservar a união adesiva após termociclagem.

Diante do exposto, se as amostras do presente estudo tivessem sido armazenadas por mais tempo, talvez essa tendência positiva de manutenção dos valores de resistência de união mediatos verificada para os grupos experimentais, pude-se ter se traduzido em uma diferença estatisticamente significativa.

Este estudo parece ter evidenciado pela primeira vez, uma possível capacidade de ativação de MMPs por um sistema adesivo hidrofóbico de dois frascos (Adper Scotchbond Multi Purpose), considerado padrão ouro em sistema adesivo de condicionamento ácido total, requerendo entretanto, comprovações adicionais por outros trabalhos.

4.4- Fractografia Mediata

Após os testes de resistência de união à microtração, as amostras foram avaliadas em MEV para que fossem observados os padrões predominantes de falhas interfaciais encontrados em cada corpo de prova e conseqüentemente em cada grupo.

Os resultados da análise fractográfica mediata, mostraram para o grupo Adper SE Controle uma predominância de falhas coesivas em resina composta (86.66%). Os outros padrões de falha foram: coesivas em camada híbrida (13.33%), coesivas em adesivo (0%) e coesivas em dentina (0%).

Para o grupo Adper SE Experimental, um padrão muito parecido na distribuição percentual de falhas mediatas predominantes foi observado. As falhas coesivas em resina composta passaram de 86.66% para 80%, as coesivas em camada híbrida

passaram de 13.33% para 6.66%, as coesivas em adesivo passaram de 0% para 13.33% e as coesivas em dentina continuaram com 0%.

Já o sistema adesivo Adper SMP apresentou uma prevalência muito maior de falhas coesivas predominantes em camada híbrida, tanto para o grupo controle quanto para o experimental. O grupo Adper SMP Controle apresentou uma maior prevalência de falhas coesivas em camada híbrida (66,66%), seguido pelas falhas coesivas em resina composta (26.66%), em dentina (6.66%) e em adesivo (0%). O grupo Adper SMP Experimental, por sua vez, também apresentou uma maior prevalência de falhas coesivas em camada híbrida (46,66%), seguido pelas falhas coesivas em resina composta (33.33%), em adesivo (20%) e em dentina (0%).

As falhas coesivas em camada híbrida no sistema adesivo autocondicionante Adper SE passaram de 13.33% no grupo Controle para 6.66% no grupo Experimental. Já para o sistema adesivo Adper SMP, elas passaram de 66.66% no grupo Controle para 46.66% no grupo Experimental.

Diante dessas observações é possível inferir que tanto para o sistema adesivo autocondicionante, quanto, principalmente, para o sistema adesivo de condicionamento ácido total (Adper SMP), as falhas coesivas em camada híbrida diminuíram nos grupos experimentais em relação aos controles, provavelmente devido à ação de inibidores de MMPs presentes na solução experimental, o que parece ter levado a uma menor degradação da interface adesiva após 12 meses de armazenagem.

Além disso, se compararmos o comportamento dos dois sistemas adesivos, pode-se observar que a interface adesiva para o sistema adesivo autocondicionante Adper SE provavelmente tenha sofrido uma menor degradação ao longo do tempo, pois as fraturas não concentraram-se na camada híbrida, como ocorreu com o sistema adesivo de Adper SMP. Essa observação em relação à análise fractográfica foi acompanhada de diferença estatisticamente significativa no teste de resistência de união à microtração, sendo os maiores valores observados para os grupos que apresentaram menos falhas coesivas em camada híbrida (Adper SE Controle e Adper SE Experimental).

Se observarmos o comportamento dos dois grupos experimentais, vemos que ambos tiveram um comportamento bastante distinto, embora ambos tenham sido

condicionados previamente com a solução ácida experimental que removeu completamente a smear layer, como demonstrado pela MEV de superfície.

As possíveis explicações para esse fenômeno já foram levantadas quando da discussão à respeito da análise da resistência de união mediata, onde a hidrofília dos materiais, a quantidade de exposição de fibras colágenas, o volume de solvente residual remanescente e a atividade de MMPs no substrato foram discutidos. Da mesma forma que foi abordado para a análise de resistência de união, a explicação mais lógica para tal diferença entre os padrões de falha predominantes observados, pode estar relacionada com a atividade de MMPs distinta entre os dois grupos. Talvez essa diferença possa ser explicada por uma maior degradação enzimática na camada híbrida das amostras dos grupo Adper SMP Experimental pelas razões já discutidas anteriormente. Entretanto, PASHLEY *et al.* (1995), afirmam que diferentes materiais adesivos podem apresentar diferentes modos de falha baseados nas diferenças de distribuição de stress entre os sistemas.

HASHIMOTO *et al.* (2000) e LELOUP *et al.* (2001) relataram em seus trabalhos que o número de falhas coesivas de substrato (dentina + resina composta) foi diretamente proporcional aos valores de resistência de união. Essa tendência confirmou-se no presente estudo, à medida que as falhas coesivas de substrato (dentina e resina composta) e as respectivas médias de resistência de união foram para os grupos Adper SE Controle (86.66% e 35.98 MPa); Adper SE Experimental (80.00% e 42.27 MPa); Adper SMP Controle (33.32% e 20.81 MPa) e Adper SMP Experimental (33.33% e 24.28 MPa).

HASHIMOTO *et al.* (2000) demonstraram também, que as amostras armazenadas após 1-3 anos, apresentaram maior incidência de falha em camada híbrida, demonstrando que degradação ocorreu neste substrato com o passar do tempo. DE MUNCK *et al.* (2003) também encontraram uma correlação positiva entre a diminuição dos valores de resistência de união após 4 anos de armazenagem e o aumento de falhas adesivas na análise fractográfica.

Resultados semelhantes foram encontrados por CARRILHO *et al.* (2007^a) onde as amostras não tratadas com clorexidina, após 6 meses de armazenagem (grupo controle mediato), demonstraram uma diminuição dos valores de resistência de união e

um aumento no número de falhas coesivas em camada híbrida, tanto em relação ao grupo experimental mediato, quanto em relação aos grupos controle e experimental imediatos.

5. CONCLUSÕES

1. Os sistemas adesivos estudados apresentaram médias distintas de resistência de união à microtração mediata em dentina sadia, sendo o Adper SE estatisticamente superior ao Adper SMP, tanto para os grupos controle quanto para os experimentais.
2. O sistema adesivo Adper SE parece ter sido mais efetivo que o Adper SMP na manutenção da integridade da interface adesiva após 12 meses de armazenagem em água, à medida que na análise fractográfica apresentou falhas predominantes em camada híbrida que variaram de 6.66% a 13.33% apenas.
3. A solução ácida experimental foi capaz de promover um padrão de condicionamento de superfície dentinária semelhante ao ácido fosfórico a 37%, ao passo que conseguiu remover completamente a smear layer, deixando túbulos dentinários abertos.

RELEVÂNCIA CLÍNICA

Este estudo demonstrou que a solução ácida experimental inibidora de metaloproteinases foi capaz de remover smear layer, promovendo valores de resistência de união semelhantes aos respectivos grupos controle, podendo representar uma opção viável para o uso clínico.

ARTIGO 2

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE GELATINOLÍTICA DE UMA SOLUÇÃO EXPERIMENTAL PARA CONDICIONAMENTO DE SUPERFÍCIE DENTINÁRIA

1. INTRODUÇÃO

A obtenção de restaurações adesivas de resina composta com desempenho clínico satisfatório está diretamente relacionada à qualidade da união adesiva obtida, bem como, com a manutenção da mesma. Entretanto, a integridade dessa união tem se mostrado suscetível aos efeitos higroscópicos e hidrolíticos (FERRACANE, 2006). Dessa forma, um dos principais fatores que afetam a sua durabilidade, *in vivo*, é a hidrólise dos componentes da interface e sua posterior elução. (DE MUNCK *et al.*, 2005). Este processo de degradação é mais intenso nos sistemas adesivos de condicionamento ácido total e autocondicionantes de frasco único, devido a sua natureza hidrofílica (DE MUNCK *et al.*, 2005; BRESCHI *et al.*, 2008).

Outro fator apontado pela literatura, relacionado com a degradação da interface adesiva, é a presença e ativação de enzimas colagenolíticas e gelatinolíticas na dentina. Essas enzimas (metaloproteinases da matriz extracelular – MMPs), por sua vez, na presença de fibras colágenas incompletamente infiltradas, podem degradar as mesmas (PASHLEY *et al.*, 2004; CARRILHO *et al.*, 2007^a). As MMPs constituem-se em um grupo de enzimas (endopeptidases) responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular (MEC) e das membranas basais (NAVARRO *et al.*, 2006). O resultado deste processo é a formação de zonas de infiltração que podem levar a um processo carioso e até mesmo ao descolamento da restauração de resina composta (BRESCHI *et al.*, 2008).

Para tentar diminuir o efeito das MMPs, vários estudos têm sido realizados utilizando inibidores dessas enzimas, com o objetivo de frear a degradação das fibrilas colágenas presentes na camada híbrida. Dentre esses inibidores, o mais pesquisado é a clorexidina. Estudos *in vivo* de 14 meses (CARRILHO *et al.*, 2007^b) e *in vitro* têm demonstrado a diminuição da perda dos valores de resistência de união em amostras

tratadas com clorexidina após 6 meses, em comparação com aquelas não tratadas (CARRILHO *et al.*, 2007^a; CAMPOS *et al.*, 2009; KOMORI *et al.*, 2009; STANISLAWCZUK *et al.*, 2009; LOGUERCIO *et al.*, 2009) e também após 12 meses (BRESCHI *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2009).

A solução ácida experimental usada neste estudo teve como objetivo ser capaz de inibir MMPs, sendo ao mesmo tempo efetiva na remoção da smear layer, para substituir o ácido fosfórico no condicionamento dentinário. O componente inibidor de MMPs presente na solução experimental é o cloridrato de tetraciclina. Esta substância tem sido amplamente estudada na periodontia, por ser capaz de remover a *smear layer* radicular formada após a raspagem periodontal a fim de expor as fibras colágenas, facilitando assim a inserção do tecido conjuntivo e a adesão dos fibroblastos à estrutura radicular (SAMPAIO *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2005). Em endodontia, a tetraciclina é utilizada após a instrumentação do canal, também para remoção da smear layer, a fim de expor os túbulos dentinários, permitindo uma melhor desinfecção do canal e de possíveis canais colaterais e um melhor contato do material obturador com o canal radicular (TORABINEJAD *et al.*, 2003). A tetraciclina apresenta também, além do seu poder antibiótico e de remover smear layer, a capacidade de inibição de collagenase tecidual (LLAVANERAS *et al.*, 2001; BEZERRA *et al.*, 2002; ACHARYA *et al.*, 2004). Em medicina a tetraciclina tem sido estudada como um inibidor das MMPs, as quais estão também relacionadas com a progressão do câncer (ACHARYA *et al.*, 2004) e com a degradação do colágeno em doenças inflamatórias (BEZERRA *et al.*, 2002). Portanto, a hipótese de nulidade testada foi que o uso de uma solução ácida experimental contendo tetraciclina promoveria uma inibição de atividade gelatinolítica semelhante ao controle, em um ensaio zimográfico.

O objetivo do presente estudo é avaliar a inibição da atividade gelatinolítica por uma solução ácida experimental para condicionamento de superfície dentinária contendo tetraciclina, em comparação com uma solução experimental contendo tetraciclina e com o controle, através da técnica zimográfica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- Técnica de Extração da MMP-2 da Saliva

A técnica de extração da MMP-2 a partir da saliva foi adaptada dos protocolos estabelecidos por TJADERHANE *et al.* (1998); Van Strijp *et al.* (2003) e Nascimento *et al.*, (2011).

A saliva foi coletada em jejum de pelo menos 2 horas (1 ml por doador) de dois doadores. No momento da coleta do material, os doadores foram solicitados a fazer lavagem da cavidade bucal com água e também foram orientados previamente, a fazer sua higiene oral habitual, 2 horas antes da coleta. Imediatamente após a coleta, as amostras salivares foram centrifugadas (Microprocessa, Quimis) a 13.000 rpm, por 20 minutos. O sobrenadante foi separado e armazenado em novos tubos de microcentrífuga, descartando-se o precipitado. O sobrenadante foi então levado ao banho-maria (Biopar, Mod BM03) a 50°C por 30 minutos. Depois de decorridos os primeiros 5 minutos, as amostras foram levemente agitadas. Após 30 minutos, as amostras foram congeladas até que fossem submetidas à análise zimográfica.

2.2- Zimografia

Esta técnica consiste no uso da eletroforese, no qual um substrato proteico, geralmente a gelatina, é co-polimerizado com acrilamida. As enzimas são separadas sob condições não redutoras, renaturadas e então incubadas em tampão adequado, baseando-se na associação entre digestão do substrato e verificação do peso molecular das proteases. Após, o gel é corado com Coomassie Blue e a presença da enzima é verificada pela ausência de coloração (formação de bandas) nas áreas onde o substrato foi degradado. A atividade proteolítica foi examinada em gel de poliacrilamida a 10%, contendo 0,05% de gelatina.

2.2.1 Preparo do gel de separação e gel de largada

Primeiramente foi confeccionado o gel de separação (Quadro 1), o qual foi colocado no interior de uma matriz plástica descartável de 10cm x 10cm (X Cell Sure Lock - Invitrogen) com o auxílio de uma pipeta sorológica e aguardados 30 minutos para a completa polimerização, em temperatura ambiente (Figura 1). Este gel é confeccionado com a adição de gelatina para que sirva de substrato digerível pelas gelatinases.

Após a polimerização do gel de separação, foi iniciada a confecção do gel de largada (Quadro 1), e colocado sobre o primeiro, juntamente com o pente para a formação dos poços de inserção das amostras e armazenado a 4°C *overnight*.



Figura 1 – Matriz plástica descartável de 10cm x 10cm para preparo do gel de largada e de corrida.

Quadro 1. Descrição dos reagentes dos géis de poliácridamida.

Reagente/Solução	Fabricante	Gel de Separação	Gel de Largada
Água destilada	-----	3,33ml	1,66ml
30% Acrilamida + 0,8% Bisacrilamida	Vetec* e Invitrogen ⁺	4ml	0,66ml
Tampão do Gel de Separação (Tris-HCl) pH 8,8	Vetec*	2,66ml	-----
Tampão do Gel de Largada (Tris-HCl) pH 6,8	Vetec*	-----	0,66ml
Gelatina	Vetec*	100µl	-----
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine)	Vetec*	33,33µl	3,33µl
Persulfato de amônio 20%	Vetec*	66,66µl	17µl

* Duque de Caxias - RJ

⁺ São Paulo - SP

2.2.2 Corrida e incubação dos géis

As alíquotas foram retiradas do freezer -80°C (Freezer Indrel/ IULT 335D) alguns minutos antes da eletroforese. Assim, 20 µl da amostra de saliva contendo as proteínas foram misturados com 5 µl do tampão da amostra (4X) (100mM de Tris-HCl, pH 6,8 (Vetec); 4% de SDS, (Vetec); 20% de glicerol (Vetec); 200µg/mL de azul de bromofenol (Vetec) na proporção de 1:4. As amostras/tampão foram incubadas à 60°C em banho-maria (Biopar, Mod BM03) por 10 minutos e logo a seguir, foram delicadamente adicionada aos poços do gel de largada com o auxílio de uma micropipeta, em um

volume de 25 μ l/poço (Figura 2).

As amostras foram submetidas à eletroforese em condições não redutoras (Dodecil Sulfato de Sódio, SDS) e a corrida realizada com a voltagem fixa em 120V, demorando em média 4 horas (Figuras 3 e 4).



Figura 2 – Amostras/tampão adicionadas aos poços do gel de largada com o auxílio de uma micropipeta, em um volume de 25 μ l/poço na cuba de eletroforese (X Cell Sure Lock - Invitrogen).



Figura 3 – Cuba de eletroforese (X Cell Sure Lock - Invitrogen).



Figura 4 – Dispositivo elétrico para controle de amperagem e voltagem durante a eletroforese (Bio Rad).

Logo após o término da corrida, o gel foi cuidadosamente retirado da matriz plástica e transferido para um reservatório contendo Triton 2% (Quadro 2), sob suave agitação por 30 minutos, e então este procedimento foi repetido (Figura 5).



Figura 5 – Gel de poliacrilamida após eletroforese.

Por último, o gel foi cortado em tiras de aproximadamente 1cm e cada tira foi incubada em tampão de incubação (Quadro 2) contendo EDTA (Synth), um inibidor de MMPs; em tampão de incubação contendo NEM (Fluka, BioChemika), um inibidor de proteases serinas; e em tampão de incubação contendo as diferentes concentrações de cada solução experimental, as quais serão relatadas adiante. O tampão contendo as tiras do gel teve o pH ajustado para 7,4 e cada gel foi incubado a 37°C, por 24 horas, para determinar a atividade gelatinolítica das MMPs.

Quadro 2. Reagentes e respectivas quantidades para o uso na zimografia.

Reagente/Solução	Fabricante	Quantidade
A- Tampão de Corrida		
Obs: diluir 1:4 na hora do uso, não é necessário ajustar o pH		
Glicina	Vetec	36g
SDS	Vetec	2,5g
Tris-Base	Vetec	7,55g
Água destilada	-----	500ml
B- Tampão de Incubação		
Obs: ajustar pH em 7,4		
CaCl₂	Synth	1ml
Tris HCl (1M)	Vetec	2ml
Água destilada	-----	197ml
C- Solução Triton 2%		
Obs: a água deve ser quente		
Triton X-100	Vetec	10ml
Água destilada	-----	500ml
D- Solução Corante		
Metanol	Vetec	50%
Ácido acético	Synth	25%
Azul de Coomassie R250	Vetec	0,1%
E- Solução Descorante		
Metanol	Vetec	30%
Ácido acético	Synth	10%
Água destilada	-----	1000ml
F- Tampão Não Redutor		
Tris HCl/SDS pH 6,8	Vetec	7ml
Glicerol	Vetec	3ml
Azul de Bromofenol	Vetec	1,2mg
SDS	Vetec	1g

2.2.3 Controles

Como controle negativo da atividade gelatinolítica, uma tira de cada gel de poliacrilamida, foi incubada somente em tampão de incubação Tris-CaCl₂ (Quadro 2) por 24 horas. Foi usado um controle para cada ensaio.

2.2.4 Padrão de peso molecular

Em um dos poços do gel de poliacrilamida foi adicionado 5µl de um padrão de peso molecular para que se pudesse comparar com o peso molecular da enzima estudada. Como padrão foi utilizado o marcador de peso molecular BenchMark Protein Ladder™, Cat 10747-012, (Invitrogen®, Carlsbad, USA).

2.2.5 Identificação da MMP por inibição química específica

Para identificar as enzimas presentes no meio condicionado, experimentos paralelos de inibição foram realizados. Duas tiras de cada gel contendo gelatina foram incubadas em tubos Tipo Falcon de 50 ml, em tampão de incubação Tris-CaCl₂ a 37°C por 24h. Nestes tubos Tipo Falcon foi adicionado 0,5 mM de EDTA (ácido etilenodiaminotetracético-Synth) um conhecido e poderoso inibidor de MMPs, assim como 0,05mM de NEM (N-ethyl-maleimide- Fluka, BioChemika), o qual foi usado para inibir a atividade das proteinases serinas.

2.2.6 Inibição da MMP-2 pelas soluções experimentais

Para examinar o efeito das duas diferentes soluções experimentais na atividade enzimática, após a eletroforese, os géis foram cortados em tiras de aproximadamente 1cm e cada tira incubada a 37°C por 24h em tampão Tris-CaCl₂ (Quadro 2) contendo cada uma das concentrações testadas (0,01% e 0,05%) de cada uma das soluções (Solução Ácida Experimental e Solução Experimental). Após a adição das soluções no tampão de incubação, o pH foi ajustado para 7,4 e os géis, incubados a 37°C, por 24h.

O quadro 3 mostra a composição das duas soluções experimentais testadas.

Quadro 3. Composição das duas soluções experimentais usadas no estudo.

Composição das Soluções	
Solução Experimental	Solução Ácida Experimental
Cloridrato de Tetraciclina a 10% Propilenoglicol a 10% em gel	Cloridrato de Tetraciclina a 10% Ácido Fosfórico a 20% Propilenoglicol a 10% em gel

A determinação da composição e das concentrações dos componentes das soluções experimentais, foi realizada através de teste piloto, onde avaliou-se a capacidade de remoção de smear layer, sob análise em MEV.

2.2.7 Coloração e descoloração dos géis

Após o período de incubação, o tampão foi substituído em cada Falcon por 40ml de 0,05% de Azul de Coomassie (Vetec) (Quadro 2), por aproximadamente 2 horas, e depois descorados com solução descorante de metanol/ácido acético (Quadro 2), por 60 minutos. Após a adição do descorante, as proteínas com atividade gelatinolítica foram visualizadas como bandas negativas (Figura 6). Os ensaios foram realizados em triplicata.

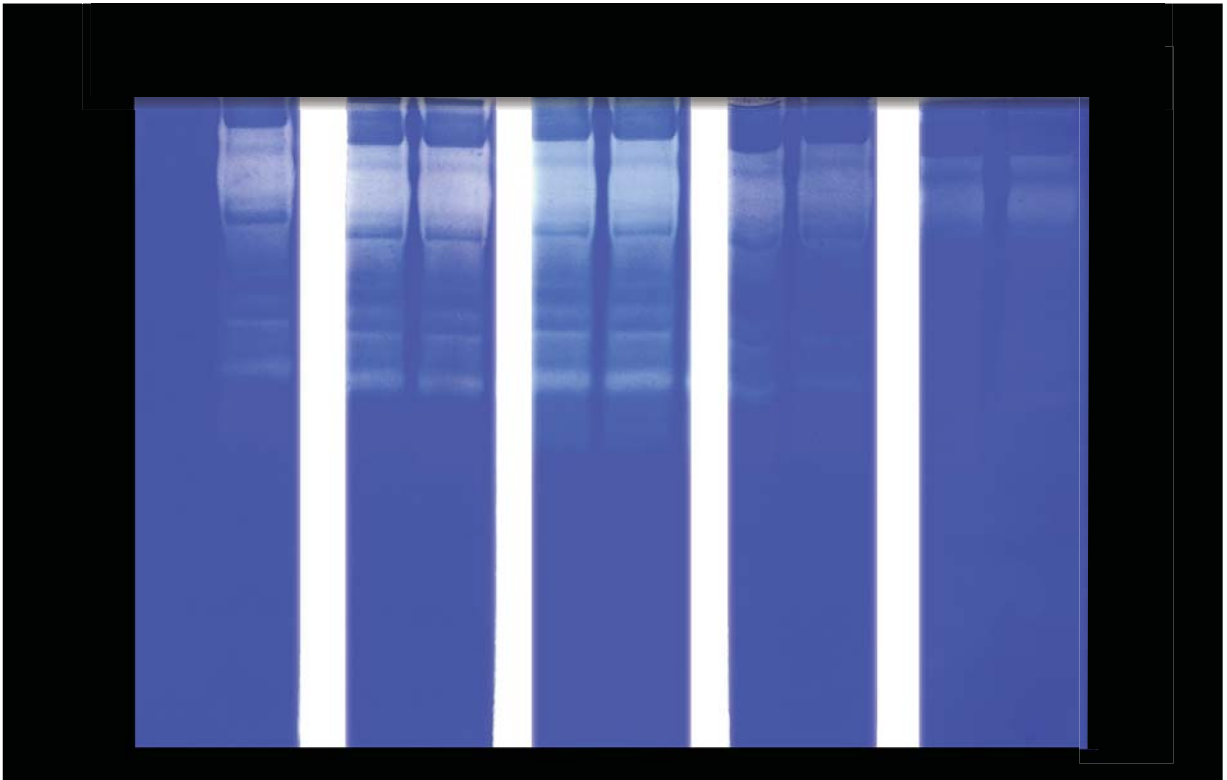


Figura 6 – Gel de poliacrilamida após ser corado e descorado, evidenciando as bandas negativas (não coradas) onde ocorreu atividade gelatinolítica pelas MMPs.

2.2.8 Digitalização das imagens

Para quantificar a inibição relativa pelas duas soluções (Solução Ácida Experimental e Solução Experimental) em diferentes concentrações (0,01% e 0,05%), as bandas foram digitalizadas e as transmitâncias foram analisadas com o programa Image J (NIH, Bethesda, MD, USA). O percentual de inibição foi relacionado com o controle, para cada concentração das duas soluções testadas. A intensidade de transmitância das bandas foi quantificada em pixels, na escala de cinza, com o mesmo programa. Tal programa usado permite remover (igualar) o *background*, e deste modo, somente as bandas são analisadas (Figura 8). Os dados obtidos na análise das bandas do controle (incubação sem a presença de nenhuma das duas soluções) e das bandas experimentais foram transformados em valores numéricos (intensidade das bandas), sendo assim possível a comparação dos valores obtidos nas bandas experimentais com

os valores obtidos na banda controle, calculando-se percentuais de intensidades que foram transformados em percentuais de inibição. Estes ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.9 - Análise Estatística da Inibição da Atividade Gelatinolítica

Os resultados da zimografia foram visualizados em tabela de percentual de inibição em relação ao controle.

3. RESULTADOS

3.1- Avaliação da Atividade Gelatinolítica - Zimografia

Várias bandas foram detectadas nos géis de poliacrilamida no ensaio de zimografia. A banda alvo de interesse corresponde à massa molecular de aproximadamente 62 KDa ou seja, a forma ativa da MMP-2 (Figura 7), de acordo com o padrão de peso molecular usado (Benchmark Protein Ladder, Invitrogen). Estas enzimas foram caracterizadas como metaloproteinases da matriz, pois a sua expressão foi inibida pelo EDTA, enquanto o NEM (um inibidor de proteases serinas) não teve nenhum efeito sobre a atividade enzimática (Figura 8) após a incubação por 24 horas em solução contendo 5mM CaCl₂ em tampão 50mM Tris-HCl (Tris- CaCl₂). A atividade enzimática nas diferentes bandas do gel de zimografia pode ser visualizada na Figura 8.

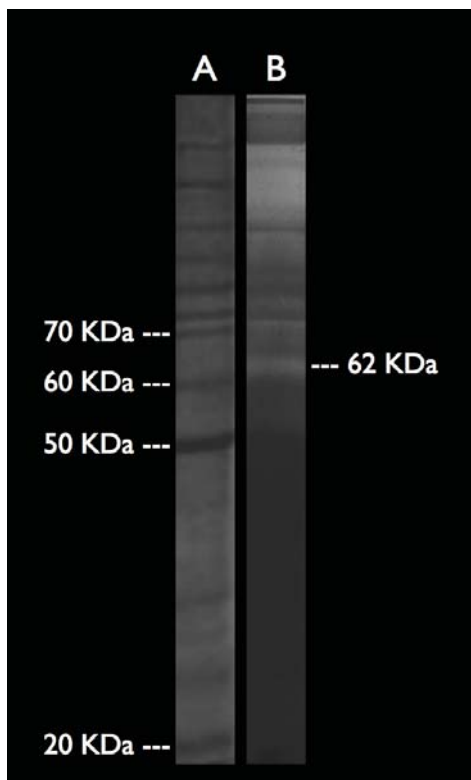


Figura 7 – Padrão de peso molecular (A) (Benchmark Protein Ladder, Invitrogen) e bandas correspondentes aos pesos moleculares, expressos em KDa, a partir de 20KDa. Banda de 62 KDa do controle, correspondente à forma ativa da MMP-2 (B).

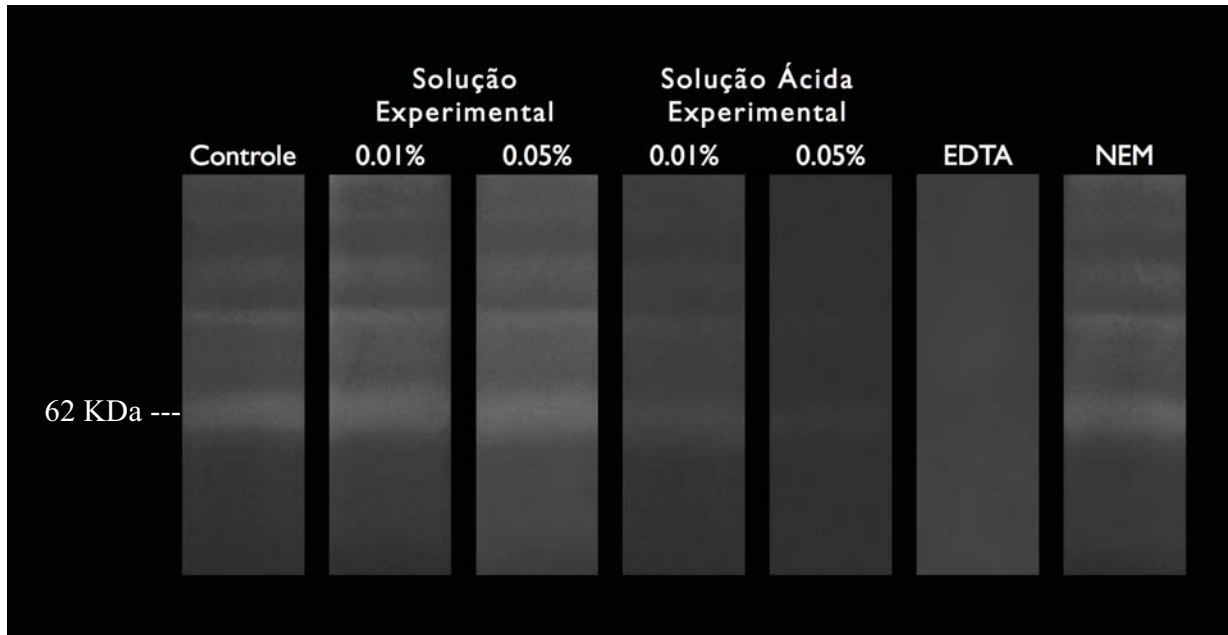


Figura 8 – Géis de Zimografia: as imagens mostram o potencial de inibição da expressão da MMP-2 (62KDa) pelas soluções experimentais condicionadas em tampão Tris-CaCl₂. Controle mostrando que não houve inibição da atividade da MMP-2 (62KDa) quando incubadas apenas em Tris-CaCl₂. Caracterização das enzimas como MMPs pois suas expressões foram inibidas por EDTA, enquanto NEM não teve nenhum efeito sobre a sua atividade.

3.1.1 Percentual de Inibição de Cada Solução em Relação ao Controle

Tabela 1 – Descrição numérica da intensidade das bandas, obtidas a partir do programa Image J, do percentual em relação ao controle e do percentual de inibição da atividade gelatinolítica de cada concentração das soluções experimentais em relação ao controle.

	Controle	Solução Experimental		Solução Ácida Experimental	
		0.01%	0.05%	0.01%	0.05%
	Banda 1	Banda 2	Banda 3	Banda 4	Banda 5
Intensidade das Bandas	14940.966	13921.409	10268.418	6189.953	947.477
Intensidade em Relação ao Controle	100%	93.17%	68.72%	41.42%	6.34%
Inibição em Relação ao Controle	0%	6.83%	31.28%	58.58%	93.66%

4. DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, a hipótese de nulidade foi rejeitada, ao passo que a solução ácida experimental contendo tetraciclina, para condicionamento da superfície dentinária, foi capaz de inibir a atividade gelatinolítica da MMP-2.

4.1- Degradação da Camada Híbrida

A justificativa para a incorporação da tetraciclina na solução condicionadora, foi o fato de esta substância ser capaz de remover smear layer, pois apresenta um pH relativamente baixo (TORABINEJAD *et al.*, 2003; SAMPAIO, *et al.*, 2007) e principalmente pelo fato de a tetraciclina ser um inibidor de metaloproteinases da matriz (LLAVANERAS *et al.*, 2001; BEZERRA *et al.*, 2002; ACHARYA *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2005).

Sabendo que a ativação dessas enzimas (MMPs) pode ser iniciada pelos procedimentos adesivos, iniciando a degradação da adesão (DE MUNCK *et al.*, 2009; LEHMANN *et al.*, 2009), a incorporação de uma substância inibidora de metaloproteinases da matriz (cloridrato de tetraciclina), na solução experimental condicionadora dentinária, objetivou a manutenção da integridade da interface adesiva ao longo do tempo.

4.2- Metaloproteinases da Matriz Extracelular (MMPs)

As metaloproteinases da matriz (MMPs), coletivamente conhecidas como matrixinas, formam uma família multigênica dentro da classe das metaloproteinases endopeptidases, que modulam a degradação de praticamente todas as moléculas da matriz extracelular (MEC), incluindo colágeno desnaturado (gelatina) e nativo. Até hoje, 24 diferentes MMPs foram identificadas, das quais 23 são encontradas em seres humanos (HANNAS *et al.*, 2007).

As metaloproteinases da matriz pertencem a um grupo diverso de enzimas que não estão apenas envolvidas na reestruturação da matriz extracelular (ACHARYA *et al.*,

2004; NAVARRO *et al.*, 2006), mas também desempenham um papel maior em várias condições fisiopatológicas em virtude de sua complicada expressão, ativação e processos de regulação. Elas estão amplamente envolvidas na progressão do câncer, devido ao seu papel na invasão, proliferação e metástase (ACHARYA *et al.*, 2004). Dentre os processos patológicos que acometem a cavidade bucal e envolvem a participação das metaloproteinases da matriz, destacam-se a destruição tecidual periodontal, as lesões de cárie radicular, as metástases em alguns tipos de tumores e as desordens da articulação temporomandibular (NAVARRO *et al.*, 2006).

Essas proteinases são um grupo de enzimas zinco-dependentes responsáveis pela degradação da matriz extracelular e membranas basais, sendo secretadas em uma forma latente e tornando-se ativas no ambiente pericelular, estando relacionadas a processos fisiológicos e patológicos na área odontológica (NAVARRO *et al.*, 2006; ZHANG e KERN, 2009). As MMPs presentes na matriz dentinária humana são as MMP-2, -3, -8, -9 e -20 (TJADERHANE *et al.*, 1998).

4.2.1- Classificação das Metaloproteinases da Matriz

Com base na especificidade do substrato, similaridade de seqüência, e organização do domínio, as MMPs podem ser divididas em seis grupos (colagenases, gelatinases, estromelisinases, matrilisinas, MMPs tipo membrana e outras MMPs (VISSE e NAGASE, 2003; HANNAS *et al.*, 2007).

As colagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13, e MMP-18) apresentam como principal característica a capacidade de clivar colágeno intersticial I, II, e III. As gelatinases A (MMP-2) e gelatinase B (MMP-9) prontamente digerem os colágenos desnaturados, ou seja, as gelatinas. A estromelisina 1 (MMP-3) e estromelisina 2 (MMP-10), têm especificidades de substrato semelhantes, mas a MMP-3 tem uma eficiência proteolítica maior. Além de digerir componentes da matriz extracelular, a MMP-3 ativa algumas proMMPs. As matrilisinas, por sua vez, são caracterizadas pela ausência de um domínio de hemopexina. Matrilisina 1 (MMP-7) e matrilisina 2 (MMP-26), são também chamadas de endometases. As MMPs tipo membrana apresentam seis variações (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-24, MMP-17 e MMP-25). Outras

sete MMPs não são classificados nas categorias acima (MMP-11, MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-22, MMP-23, MMP-28), possuindo diferentes funções (VISSE e NAGASE, 2003).

As gelatinases, portanto, são enzimas que degradam a gelatina, ou seja, o colágeno já desnaturado por outras colagenases. A MMP-2 e MMP-9 são secretadas na forma latente, com um peso molecular de 72 KDa e 92 KDa, respectivamente. A MMP-2 quando clivada adquire a forma ativa com um peso molecular de 62 KDa (HANNAS et al, 2007; CARVALHO et al, 2009).

4.2.2- Estrutura das Metaloproteinases da Matriz

As MMPs partilham de homologia de sequência, mas diferem em termos de especificidade de substrato e regulamento transcricional. Todas as MMPs são consideradas como derivadas de um protótipo de estrutura de 5 domínios, através da adição ou subtração de domínios (HANNAS *et al.*, 2007).

Os constituintes básicos das MMPs são o pré-domínio, o pró-domínio contendo um sítio de cisteína, a região de articulação e o domínio catalítico contendo o sítio de união ao Zn^{+2} . Além destes, as MMPs contêm um domínio hemopexina (exceto as MMPs-7 e MMP-26). As MMPs tipo membrana (TM-MMP) também contêm o domínio transmembrana e as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) contêm o domínio fibronectina com forte afinidade por gelatina (HANNAS *et al.*, 2007). A Figura 9 representa a estrutura geral das MMPs.



Figura 9 - Esquema estrutural geral das MMPs (adaptado de HANNAS *et al.*, 2007).

As MMPs são normalmente expressas como zimógenos inativos (pro-MMP), e o pró-domínio deve ser dissociado do domínio catalítico antes que a enzima seja ativada. Esta dissociação pode ser conseguida por autocatálise ou pela ação de enzimas proteolíticas, tais como a furina, plasmina ou mesmo outras MMPs. Além de serem ativadas por proteinases, as MMPs podem ser ativadas, *in vitro*, por agentes químicos. Mudanças no pH também têm sido demonstradas em trabalhos *in vitro* e *in vivo* serem capazes de ativar as gelatinases, por exemplo, quando o pH da saliva é reduzido. O tratamento térmico também pode levar a sua ativação (HANNAS *et al.*, 2007).

4.2.3- Função das Metaloproteinases da Matriz

As proteinases extracelulares são necessárias para numerosos processos relacionados com o desenvolvimento e a doença. A capacidade de degradar proteínas extracelulares é essencial para qualquer célula individual, afim de interagir adequadamente com as estruturas vizinhas e para os organismos multicelulares se desenvolverem e funcionarem normalmente (STERNLICHT e WERB, 2001). Coletivamente, estas endopeptidases dependentes de zinco podem degradar todos os componentes proteicos da matriz extracelular (MEC), facilitando assim a remodelação

tecidual e a migração celular. As MMPs também estão intimamente ligadas à ativação biológica de muitos processos fisiológicos nos tecidos, quer através da liberação de fatores de crescimento ligados à MEC e a outras moléculas biologicamente ativas, ou por ativar diretamente estas moléculas por proteólise dirigida (HANNAS *et al.*, 2007).

Assim como as muitas proteínas que elas modificam, as MMPs influenciam diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo aspectos do desenvolvimento embrionário, morfogênese tecidual, reparação de ferimentos, doenças inflamatórias e câncer (STERNLICHT e WERB, 2001; WOESSNER Jr., 1999; VISSE e NAGASE, 2003; HANNAS *et al.*, 2007). As MMPs estão invariavelmente relacionadas com a artrite reumatóide e doenças malignas, onde aumentos mais severos das MMPs frequentemente indicam um pior prognóstico. Além disso, uma característica principal destas doenças é a capacidade das células atravessarem os limites dos tecidos e, no caso do câncer, a propagação para locais distantes do corpo. Assim, enzimas de degradação da MEC devem estar presentes para quebrar as barreiras estruturais para a invasão. Na artrite, a perda de certas MMPs surpreendentemente alivia a expressão da doença (STERNLICHT e WERB, 2001; WOESSNER Jr., 1999; HANNAS *et al.*, 2007).

Além disso, a MEC abriga várias outras moléculas de sinalização, tais como fatores de crescimento e proteínas de ligação a fatores de crescimento. Assim, a remodelação mediata da MEC por MMPs altera o conteúdo informacional visto pelas células vizinhas, pelo fato de que a remodelação pode destruir sítios estruturais, descobrir informações estruturais ocultas e de outra forma, liberar moléculas de sinalização seqüestradas (STERNLICHT e WERB, 2001). Portanto, além da capacidade de degradação da matriz extracelular, as MMPs podem irreversivelmente clivar muitas superfícies celulares e proteínas pericelulares. Assim, elas podem ativar ou desativar várias vias de sinalização e aumentar ou diminuir a disponibilidade de moléculas de sinalização pela degradação de seus parceiros de ligação ou pela geração de novos.

Na odontologia as MMPs parecem desempenhar um papel importante na progressão da cárie dentária, uma vez que elas têm um papel crucial na degradação do colágeno da dentina em lesões de cárie, enquanto as bactérias cariogênicas seriam responsáveis pela desmineralização inicial. As MMPs têm sido identificadas em

inflamação pulpar e periapical e estão fortemente correlacionadas com doenças periodontais, já que elas são as principais participantes na degradação do colágeno durante a destruição do tecido periodontal (HANNAS *et al.*, 2007).

As MMPs também são relacionadas à remodelação tecidual e à regulação da interação célula-matriz durante a morfogênese dental. A MMP-20 (Enamelisina) é conhecida por ser quase exclusivamente expressa por células de formação do dente. Tem propriedades estruturais e enzimática únicas, sendo capaz de degradar amelogenina, podendo ter um importante papel durante o desenvolvimento do esmalte. A amelogenina é o principal componente estrutural proteico da matriz do esmalte. Sendo produzida durante a dentinogênese primária, a MMP-20 é incorporada na dentina e pode ser liberada durante a progressão da cárie dental (HANNAS *et al.*, 2007).

4.2.4- Identificação e Localização das Metaloproteinases da Matriz na Dentina

O estudo da localização e distribuição das diversas MMPs presentes em dentina humana tem sido realizado por diversos pesquisadores, afim de procurar estabelecer qual a real localização e concentração dessas enzimas colagenolíticas e gelatinolíticas dentro da matriz dentinária.

Alguns trabalhos têm mostrado que a MMP-2 localiza-se principalmente na região de dentina profunda (próximo à pré-dentina) e na dentina adjacente ao limite amelo-dentinário (BOUSHELL *et al.*, 2008; BOUSHELL *et al.* 2011). Este cenário têm sido pesquisado e demonstrado, principalmente pela utilização da técnica imuno-histoquímica, onde anti-corpos anti-MMPs são usados para se ligarem às MMPs, sendo estes depois identificados e visualizados por diferentes técnicas. Este padrão de distribuição das MMPs tem demonstrado o seu envolvimento na organização da matriz extracelular em pré-dentina e no estabelecimento do limite amelo-dentinário.

Padrão semelhante foi encontrado por NIU *et al.* (2011), quando da avaliação da distribuição e das concentrações de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 (inibidores teciduais de MMPs) em diferentes profundidades de dentina coronal humana e em

odontoblastos, utilizando imuno-histoquímica. A MMP-2 foi a principal gelatinase encontrada na dentina e estava concentrada nos odontoblastos, na dentina profunda e na junção amelo-dentinária. TIMP-2 foi co-localizada com a MMP-2 principalmente nos odontoblastos, mas a sua concentração era baixa. Tanto a MMP-9 como o TIMP-1 mostraram uma diminuição na distribuição das camadas mais profundas para as camadas superficiais da dentina, porém, a concentração de TIMP-1 foi muito mais elevada do que a MMP-9. O potencial gelatinolítico de extratos de proteínas de dentina diminuiu gradualmente da dentina profunda para a dentina superficial.

As gelatinases (MMP-2 e MMP-9) parecem localizar-se mais fortemente na dentina intratubular. MAZZONI *et al.* (2009) utilizando imuno-histoquímica observaram correlação entre MET e MEV, confirmando que a MMP-2 e MMP-9 são componentes endógenos presentes na matriz orgânica de dentina humana, localizando-se principalmente na rede colágena intratubular e mostrando também uma presença mais forte de imuno-marcação para a MMP-2 do que para a MMP-9.

A MMP-3, por sua vez, parece estar localizada predominantemente na rede de fibras colágenas intertubulares, mostrando MMP-3 direta ou indiretamente ligada às fibras colágenas (MAZZONI *et al.*, 2011).

SULKALA *et al.* (2007) também utilizaram a técnica de imuno-histoquímica para identificação de MMPs. Entretanto, o seu objetivo foi avaliar a distribuição das colagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13) e não de gelatinases (MMP-2 e MMP-9). A MMP-8 (colagenase-2), foi detectada em dentina, entretanto nenhuma outra colagenase foi encontrada, concluindo que a MMP-8 representa a mais importante colagenase na dentina humana. A colagenase MMP-8, encontrada em dentina humana coronária, também foi localizada em dentina radicular por SANTOS *et al.* (2009), apresentando igual distribuição na dentina coronária e na dentina radicular.

4.2.5- Inibidores de Metaloproteinases da Matriz e Mecanismos de Inibição

A atividade funcional das MMPs é regulada por quatro mecanismos: controle transcricional positivo e negativo de genes da MMP, por ativação do estado latente,

diferenças na especificidade de substrato e modulação por inibidores do soro ou inibidores teciduais de metaloproteinases (HANNAS *et al.*, 2007).

4.2.5.1- Inibidores Teciduais (TIMPs)

TIMPs são inibidores específicos de MMPs. Quatro TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, e TIMP-4) foram identificados em vertebrados, e as suas expressões são reguladas durante o desenvolvimento e remodelação dos tecidos. Sob condições patológicas associadas com atividades não balanceadas de MMPs, mudanças de níveis de TIMPs são considerados importantes, pois eles afetam diretamente o nível de atividade das MMPs (VISSE e NAGASE, 2003).

Os TIMPs são pequenas proteínas multi-funcionais, tendo a forma geral das suas moléculas a aparência de uma cunha. Ela se encaixa no sítio ativo da MMP de um modo semelhante ao do substrato. Por formação de complexos com as MMPs, os TIMPs podem bloquear a ativação de pró-MMPs latentes ou eles podem influenciar a sua capacidade para hidrolisar determinado substrato (HANNAS *et al.*, 2007). Todos os TIMPs são capazes de inibir todas as MMPs. No entanto, a interação depende tanto do TIMP como da MMP. O domínio terminal -N dos TIMPs parece ser a parte essencial para a inibição, embora haja alguma melhoria da ligação na presença do domínio -C. Pelo menos parte dessa inibição deve-se à quelatação do zinco presente no sítio ativo da MMP (WOESSNER Jr., 1999).

4.2.5.2- Inibidores Sintéticos

A maior parte da atenção para o bloqueio das MMPs ativas tem sido dada aos agentes quelantes, que se ligam ao zinco no sítio ativo da MMP, inativando assim a enzima. No entanto, estes compostos não apresentam especificidade e deveriam bloquear qualquer enzima contendo zinco. Tem sido demonstrado que as tetraciclinas são capazes de inibir a colagenase no fluido gengival e nos tecidos; sendo esta ação independente da atividade antibacteriana do fármaco (WOESSNER Jr., 1999). Segundo STANISLAWCZUK *et al.* (2011) e ACHARYA *et al.* (2004) as tetraciclinas são capazes

de inibir a atividade das MMPs através da sua habilidade de se unir a íons metálicos, particularmente Ca^{+2} e Zn^{+2} . Esses íons são requeridos por essas enzimas para manter sua conformação e atividade hidrolítica. Dessa forma, inibição de MMPs ou pró-MMPs pode ocorrer devido à quelatação dos íons Zn^{+2} presentes no sítio ativo do domínio catalítico da MMP, alterando assim a conformação molecular da enzima e bloqueando sua atividade catalítica na matriz extracelular.

Em odontologia, o inibidor de metaloproteinases da matriz mais pesquisado é a clorexidina. Vários estudos têm sido realizados usando a clorexidina, previamente à aplicação do sistema adesivo, com o intuito de diminuir a perda dos valores de resistência de união ao longo do tempo, através do seu efeito inibidor sobre essas enzimas. A aplicação de clorexidina não interfere nos valores de resistência de união à microtação imediatos (DE CASTRO *et al.*, 2003; KOMORI *et al.*, 2009), bem como o momento da sua aplicação, antes ou após o condicionamento ácido, parece não alterar esses valores (DE CASTRO *et al.*, 2003).

O efeito da degradação das fibras colágenas por enzimas durante armazenagem tem sido motivo de vários estudos. HEBLING *et al.* (2005) avaliaram, *in vivo*, pares contralaterais de restaurações classe I em molares decíduos obtidos depois de 6 meses em função intra-oral, e processados para microscopia eletrônica de transmissão. As camadas híbridas dos dentes tratados com clorexidina exibiram integridade estrutural normal da rede colágena, enquanto nas amostras controle, camadas híbridas anormais foram observadas, com desintegração progressiva da rede fibrilar.

As tetraciclinas têm mostrado reduzir os níveis de proteína de MMP na cartilagem osteoartrítica, em células de melanoma, ou células cancerosas da próstata (WOESSNER Jr., 1999). Inibição da proteólise dentinária pela MMP-2, utilizando doxiciclina como inibidor, também foi demonstrada por OSORIO *et al.* (2011).

Outro inibidor de MMPs que tem sido estudado é o galardin, mostrando capacidade de manutenção dos valores de resistência de união imediatos, não interferindo negativamente nos valores imediatos, como demonstrado por BRESCHI *et al.*, (2010).

4.2.5.3- Inibição da Produção de Metaloproteinases da Matriz

Até o presente momento foram considerados vários métodos de inibir ou reduzir a atividade de MMPs ativas. Entretanto, há muitas possibilidades de inibir a produção ou a ativação de MMPs em fases anteriores. O primeiro passo seria a introdução de perturbações à nível genético. No próximo nível, poderia-se reduzir a produção de RNAm para uma específica MMP ou para um grupo de MMPs. A maior parte das MMPs secretadas são encontradas nos tecidos na forma de pró-enzimas (WOESSNER Jr., 1999). A ativação de pró-MMPs envolve quase sempre um passo final autocatalítico em que a enzima cliva a parte restante do seu próprio propeptídeo. As TIMPs atuam exatamente bloqueando essa etapa final. Sabe-se também que muitas das MMPs podem ativar outros membros do grupo, uma vez que elas se tornar ativas. Dessa forma, deveria ser vantajoso inibir a pró-enzima antes que ela fosse totalmente convertida em enzima ativa ou antes que a enzima ativa tivesse a oportunidade de ativar outras MMPs. Finalmente, pode-se manter os níveis teciduais das MMPs em valores mais baixos, se bloquearmos a entrada das células, tais como macrófagos e células polimorfonucleares a partir do exterior. Isto é geralmente feito com a utilização de drogas antiinflamatórias (WOESSNER Jr., 1999).

4.3- Avaliação da Atividade Gelatinolítica

Grande esforço científico tem sido feito na tentativa de descobrir um inibidor ideal de metaloproteinases da matriz, que tenha uma ótima capacidade de inibição e que essa inibição produzida seja duradoura. Neste sentido, várias substâncias inibidoras têm sido pesquisadas, avaliando o comportamento mecânico de resistência de união de amostras após armazenagem, bem como a degradação da camada híbrida sob análise em microscopia eletrônica de transmissão. Outra metodologia que tem sido muito empregada é a técnica de zimografia, que possibilita avaliar a ativação ou a inibição da atividade colagenolítica ou gelatinolítica para diversas formas de tratamento dentinário, utilizando para tanto, várias substâncias.

Nesta técnica, um pó de dentina é obtido a partir da moagem dentinária e então

esses extratos dentinários em forma de pó são processados para que sejam extraídas as proteínas a serem estudadas (MMPs). Outras possibilidades de obtenção de MMPs são a extração dessas enzimas a partir de amostras salivares (TJADERHANE *et al.*, 1998; VAN STRIJP *et al.*, 2003; NASCIMENTO *et al.*, 2011), de amostras de tecido gengival de ratos (CARVALHO *et al.*, 2009; HENN *et al.*, 2012) ou com a utilização de MMPs recombinantes. Sobre esses extratos de proteínas obtidos é realizado o tratamento a ser estudado, como por exemplo, desmineralização, tratamento com sistema adesivo, aplicação de inibidores de MMPs, dentre outros. Assim, pode-se avaliar a ação inibidora ou ativadora da substância estudada sobre a atividade colagenolítica ou gelatinolítica de determinada MMP.

Há na literatura atual uma variedade de substâncias testadas quanto ao seu efeito ativador ou inibidor sobre as MMPs. Dentre elas podemos citar o HEMA, EDTA, clorexidina, adesivos autocondicionantes e de condicionamento ácido total, condicionamento com ácido fosfórico, dentre outros (GENDRON *et al.*, 1999; TAY *et al.*, 2006; OSORIO *et al.*, 2011; NISHITANI *et al.*, 2006; MAZZONI *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2009).

O inibidor de metaloproteinases mais pesquisado na literatura odontológica é a clorexidina. Sua eficácia tem sido demonstrada por trabalhos avaliando a manutenção dos valores de resistência de união após período de armazenagem, nas amostras tratadas com clorexidina. Seu potencial inibitório também é demonstrado por vários estudos utilizando a técnica zimográfica.

GENDRON *et al.* (1999) avaliaram o efeito inibitório da clorexidina na atividade da MMP-2 (gelatinase A), MMP-9 (gelatinase B). A clorexidina inibiu a atividade de ambas as gelatinases (A e B), mas a MMP-2, pareceu ser mais sensível do que a MMP-9. A adição de cloreto de cálcio nas misturas do ensaio quase impediu completamente a inibição da atividade da MMP-9 pela clorexidina. Esta observação sugeriu que a clorexidina pode atuar através de um mecanismo de quelação. Resultados semelhantes foram encontrados por BRESCHI *et al.* (2010) quando verificaram que o pré-tratamento com clorexidina inibiu toda a atividade gelatinolítica dentinária da MMP-2, independentemente da concentração testada.

KIM *et al.* (2010) quantificaram a afinidade e capacidade de ligação do digluconato de clorexidina ao pó de dentina mineralizado e desmineralizado, e determinaram que quantidade de liberação de clorexidina resultaria da lavagem com água, etanol, hidroxietilmetacrilato (HEMA) ou 0,5 M de NaCl em água. A menor remoção de clorexidina observada foi proporcionada pelo HEMA, sugerindo que a clorexidina pode permanecer ligada à dentina desmineralizada durante o procedimento adesivo, podendo este fato ser responsável pela eficácia a longo prazo como um inibidor de MMPs na união resina-dentina.

Resultados não tão positivos para a clorexidina foram encontrados por OSORIO *et al.* (2011) quando diferentes procedimentos de desmineralização de dentina foram usados (ácido fosfórico, EDTA ou monômeros ácidos de adesivos autocondicionantes) em 24 horas, 1 e 2 semanas. A degradação do colágeno foi medida pela concentração do telopeptídeo C-terminal (ICTP), que indica a quantidade de degradação do colágeno. A ação inibitória parcial da clorexidina na atividade das MMPs produzida pelos adesivos autocondicionantes foi prolongada em comparação com a ação de curta duração na dentina tratada com ácido fosfórico ou EDTA.

O efeito inibitório da clorexidina sobre as metaloproteinases também foi demonstrado sobre as catepsinas cisteínas, enzimas essas que também contribuem para a atividade proteolítica endógena na dentina (SCAFFA *et al.*,2012).

TAY *et al.* (2006) encontraram 15 vezes de aumento na atividade colagenolítica pela utilização de adesivos autocondicionantes suaves, concluindo que esses adesivos suavemente ácidos são capazes de ativar MMPs latentes, sem no entanto serem capazes de desnaturá-las. Esses resultados vão ao encontro aos verificados por NISHITANI *et al.* (2006) que também encontraram aumento da atividade colagenolítica para adesivos autocondicionantes de 1 e 2 frascos, sob análise fluorimétrica, havendo uma correlação direta entre diminuição de pH e aumento de atividade colagenolítica. MAZZONI *et al.* (2013) avaliaram o efeito de adesivos de condicionamento ácido total de 2 passos e autocondicionantes de 1 passo sobre a atividade de MMPs-2 e MMPs-9 sob zimografia e concluíram que todos adesivos testados puderam ativar as MMPs-2 e MMPs-9 em dentina humana.

Os adesivos autocondicionantes também parecem ser capazes de estimular a

secreção de MMPs do complexo dentina-polpa, mais precisamente, pelos odontoblastos, segundo LEHMANN *et al.* (2009) utilizando as técnicas de imunohistoquímica e de zimografia em fatias de dentes cultivadas. Eles concluíram que odontoblastos podem participar da degradação da camada híbrida, pois o tratamento testado resultou em aumento da expressão de MMP-2 em odontoblastos, como mostrado por imuno-histoquímica, enquanto a técnica zimográfica mostrou aumento proMMP-9 e MMP-2 em dentina sob o tratamento com adesivo autocondicionante quando a polpa esteve presente.

Em trabalho de ZHOU *et al.* (2011) foi avaliado o efeito inibidor de MMPs pela clorexidina, quando incorporada no primer de um adesivo autocondicionante de 2 passos (Clearfil SE Bond). A atividade colagenolítica do pó de dentina foi verificada utilizando colágeno marcado com fluoresceína. A fluorescência do substrato colágeno é internamente extinta e é apenas liberada quando o colágeno é clivado enzimaticamente em peptídeos de baixo peso molecular e altamente fluorescentes. O pó de dentina foi tratado durante 20 segundos com primers de Clearfil SE Bond contendo clorexidina (0,5%, 1,0% e 2,0%) reduzindo parcialmente a atividade colagenolítica em 15,6%, 44,9% e 56,7%, respectivamente.

Foi demonstrado que as MMPs-2 podem ser inibidas pelo HEMA, sendo essa inibição dose-dependente. CARVALHO *et al.* (2009) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de 2-hidroxietil-metacrilato (HEMA) na inibição da MMP-2, *in vitro*. Três bandas maiores foram detectadas nos ensaios zimográficos e foram caracterizadas, de acordo com seus respectivos pesos moleculares, para as seguintes formas de MMP-2: zimógeno (72 kDa), intermediária (66 kDa) e ativo (62 kDa). Todas as formas de MMP-2 foram inibidas por HEMA, sugerindo que a MMP-2 pode ser inibida por HEMA, *in vivo*.

Outros trabalhos tem demonstrado resultados positivos em ensaio zimográfico, utilizando materiais contendo zinco na sua composição. SOUZA, GERLACH e LINE (2001) avaliaram o efeito de íons metálicos liberados do amálgama dental nas principais MMPs gelatinolíticas de extratos gengivais. Os sítios foram condicionados com fase dispersa ou fase convencional de amálgama dental. As atividades proteolíticas de MMP-2 e MMP-9 foram fortemente inibidas pelo condicionamento do sítio por amálgama de fase dispersa (que contém zinco), enquanto que o amálgama sem zinco

não apresentou nenhum efeito inibitório sobre as MMPs.

HENN et al. (2012) avaliaram o efeito do metacrilato de zinco incorporado a um polímero dental sobre a inibição da MMP-2 em ensaio de zimografia. MMP-2 (62 kDa) foi detectada no ensaio zimográfico e inibida por metacrilato de zinco em todas as concentrações testadas.

Neste estudo foram utilizadas duas soluções experimentais (Solução Experimental e Solução Ácida Experimental) em duas concentrações diferentes, para a avaliação da atividade gelatinolítica por meio de zimografia. As duas soluções contêm cloridrato de tetraciclina a 10% e propilenoglicol a 10%, e a segunda contém também ácido fosfórico a 20%. Ambas soluções foram testadas nas concentrações de 0,01% e 0,05% nas respectivas soluções tampão.

Como demonstrado pela análise de densidade das bandas através do programa Image J, nota-se que as duas soluções testadas na técnica zimográfica foram capazes de inibir as MMPs-2, sendo essa inibição maior para a concentração de 0,05% para ambas soluções.

Assim como em outros trabalhos utilizando inibidores de MMPs na técnica zimográfica, como a clorexidina e o HEMA, neste estudo a solução experimental contendo um conhecido inibidor de MMPs (tetraciclina) foi capaz de inibir parcialmente a atividade da MMP-2, principalmente para uma concentração da solução igual a 0.05% (inibição de 31.28%). Já quando a tetraciclina foi associada ao ácido fosfórico a 20% (solução ácida experimental) o poder de inibição foi muito maior, sendo de 58.58% para a concentração de 0.01% e 93.66% para a concentração de 0.05%.

O mecanismo de inibição na solução experimental, provavelmente deveu-se a uma reação de quelação através da tetraciclina. A maior parte da atenção para o bloqueio das MMPs ativas tem sido dada aos agentes quelantes, que se ligam ao zinco no sítio ativo da MMP, inativando assim a enzima. No entanto, estes compostos não apresentam especificidade e deveriam bloquear qualquer enzima contendo zinco. Tem sido demonstrado que as tetraciclinas são capazes de inibir a colagenase no fluido gengival e nos tecidos; sendo esta ação independente da atividade antibacteriana do fármaco (WOESSNER Jr., 1999). Segundo STANISLAWCZUK *et al.* (2011) e ACHARYA *et al.* (2004) as tetraciclinas são capazes de inibir a atividade das MMPs

através da sua habilidade de se unir a íons metálicos, como o Zn^{+2} presente no sítio ativo do domínio catalítico da MMP.

O mecanismo de inibição na solução ácida experimental, por sua vez, provavelmente ocorreu através da reação de quelação pela tetraciclina e também por uma possível desnaturação das MMPs pelo ácido fosfórico a 20% presente na solução.

Este mecanismo de desnaturação protéica pelo ácido fosfórico também está descrito na literatura. O seu baixo pH leva a uma diminuição da atividade gelatinolítica e colagenolítica das amostras de pó de dentina tratadas pelo ácido fosfórico. Diminuições da atividade enzimática na ordem de 98.1% para o ácido fosfórico a 10% (MAZZONI *et al.*, 2006) e de 65% (PASHLEY *et al.*, 2004) e de 77.03% (NISHITANI *et al.*, 2006) para o ácido fosfórico a 37% foram encontradas. No presente estudo, a redução da atividade gelatinolítica para a MMP-2 quando da utilização da solução ácida experimental a 0.05% teve um valor de inibição semelhante a esses trabalhos (93.66%).

Esses ácidos fortes, por apresentarem um pH bastante baixo, à medida que desmineralizam a dentina, expondo e ativando as MMPs, também promovem a sua desnaturação.

5. CONCLUSÕES

1. As duas soluções experimentais contendo tetraciclina foram capazes de inibir a atividade gelatinolítica da MMP-2.
2. A solução ácida experimental condicionadora de superfície dentinária foi capaz de inibir quase completamente a atividade enzimática da MMP-2, na concentração de 0.05% na solução tampão.

RELEVÂNCIA CLÍNICA

Este estudo demonstrou que a solução ácida experimental para condicionamento de superfície dentinária foi capaz de inibir a atividade gelatinolítica da MMP-2. Dessa forma, ela pode favorecer a manutenção da integridade da camada híbrida.

ARTIGO 1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acharya MR, Venitz J, Figg WD, Sparreboom A. Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. *Drug Resist Update* 2004;7:195-208.
2. Bezerra MM, Brito GAC, Ribeiro RA, Rocha FAC. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:613-616.
3. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, Dorigo EDS. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater* 2008;24:90-101.
4. Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, Cadenaro M, Foulger S, Mazzoti G, Tay FR, Di Lenarda R, Pashley D. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. *J Adhes Dent* 2009;11:191-198.
5. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjaderhane L, Ruggeri Jr. A, Tay FR, Dorigo EDS, Pashley DH. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater* 2010;26:320-325.
6. Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Barato-Filho F, Gonzaga CC, ZielaK JC. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. *J Dent* 2009;37:108-114.
7. Carrilho MRO, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH, Tjaderhane L. Chlorhexidine preserves dentin bond *in vitro*. *J Dent Res* 2007^a;86:90-94.
8. Carrilho MRO, Geraldeli S, Tay FR, de Goes MF, Carvalho RM, Tjaderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley DH. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007^b;86:529-533.
9. Chang YE, Shin DH. Effect of chlorhexidine application methods on microtensile bond strength to dentin in class I cavities. *Oper Dent* 2010;35:618-623.
10. De Castro FLA, de Andrade MF, Duarte Júnior SLL, Vaz LG, Ahid FJM. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *J Adhes*

- Dent 2003;5:129-138.
11. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, Lambrechts P, Vanherle G. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2003;82:136-140.
 12. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, Van Meerbeek B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res* 2005;84:118-132.
 13. De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, Van Landuyt K, Poitevin A, Opdenakker G, Van Meerbeek B. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. *J Dent Res* 2009;88:1101-1106.
 14. 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;118:494-501.
 15. Dillenburg ALK, Soares CG, Paranhos MPG, Spohr AM, Loguercio AD, Burnett Jr. LH. Microtensile bond strength of prehybridized dentin: storage time and surface treatment effects. *J Adhes Dent* 2009;11:231-237.
 16. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater* 2006;22:211-222.
 17. 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;6:437-439.
 18. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 2007;65:1-13.
 19. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res* 2000;79:1385-1391.
 20. Komori PCP, Pashley DH, Tjaderhane L, Breschi L, Mazzoni A, de Goes MF, Wang L, Carrilho MR. Effect of 2% chlorhexidine digluconate on the bond strength to normal versus caries-affected dentin. *Oper Dent* 2009;34:157-165.
 21. 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;88:77-82.
22. Leloup G, D'Hoore W, Bouter D, Degrange M, Vreven J. Meta-analytical review of factors involved in dentin adherence. *J Dent Res* 2001;80:1605-1614.
23. Liu Y, Tjaderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, Pashley DH, Tay FR. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res* 2011;90:953-968.
24. Llavanas A, Ramamurthy NS, Heikkilä P, Teronen O, Salo T, Rifkin BR, Ryan ME, Golub LM, Sorsa T. A combination of a chemically modified doxycycline and a bisphosphonate synergistically inhibits endotoxin-induced periodontal breakdown in rats. *J Periodontol* 2001;72:1069-1077.
25. Loguercio AD, Uceda-Gomez N, Carrilho MRO, Reis A. Influence of specimen size and regional variation on long-term resin-dentin bond strength. *Dent Mater* 2005;21:224-231.
26. Loguercio AD, Stanislawczuk R, Polli LG, Costa JA, Michel MD, Reis A. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. *Eur J Oral Sci* 2009;117:587-596.
27. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjaderhane 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;27:4470-4476.
28. Mazzoni A, Nascimento FD, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjaderhane L, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. *J Dent Res* 2012;91:467-472.
29. Mazzoni A, Scajja P, Carrilho M, Tjaderhane L, Di Lenarda R, Polimeni A, Tezvergil-Mutluay A, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res* 2013;92:82-86.
30. Mine A, De Munck J, Cardoso MV, Van Landuyt KL, Poitevin A, Kuboki T, Yoshida Y, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Bonding effectiveness of two contemporary self-etch adhesives to enamel and dentin. *J Dent* 2009;37:872-

883.

31. Navarro VP, Nelson-Filho P, Silva LAB, Freitas AC. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. *Rev Odontol UNESP* 2006;35:233-238.
32. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjaderhane L, Tay FR, Pashley DH. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci* 2006;114:160-166.
33. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley DH, Tay F, Toledano M. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. *Eur J Oral Sci* 2011;119:79-85.
34. Paranhos MPG, Spohr AM, Oshima HMS, Mota EG, Burnett Jr. LH. Influence of Nd:YAG laser irradiation on microtensile bond strength of adhesive systems to sound or carious dentin. *Quintessence Int* 2009;40:145-153.
35. Pashley DH, Sano H, Ciucchi B, Yoshiyama M, Carvalho RM. Adhesion testing of dentin bonding agents: a review. *Dent Mater* 1995;11:117-125.
36. Pashley DH, Tay F, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004;83:216-221.
37. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjaderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, Tezvergil-Mutluay A. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater* 2011;27:1-16.
38. Perdigão J. Dentin bonding-variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dent Mater* 2010;26:e24-e37.
39. 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;118:411-416.
40. Sampaio LM, Sampaio JEC, Rosetti EP, Rached RSGA, Zuza EP. Condicionamento da superfície radicular com cloridrato de tetraciclina: avaliação das diferentes concentrações – parte 2. *Rev Periodont* 2007;17:55-61.
41. Stanislawczuk R, Amaral RC, Zander-Grande C, Gagler D, Reis A, Loguercio AD. Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves the longevity of resin-dentin

- bonds. *Oper Dent* 2009;34:481-490.
42. 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^a;25:459-465.
43. Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. *J Dent* 2011^b;39:40-47.
44. Tay FR, King NM, Chan K, Pashley DH. How can nanoleakage occur in self-etching adhesive systems that demineralize and infiltrate simultaneously? *J Adhes Dent* 2002;4:255-269.
45. Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. *J Endod* 2006;32:862-868.
46. Tjaderhane 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;77:1622-1629.
47. Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K, Kim J, Shabahang S. A new solution for the removal of the smear layer. *J Endod* 2003;29:170-175.
48. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases - structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-839.
49. Wang Y, Morlandt AB, Xu X, Carnes Jr. DL, Chen Z, Steffensen B. Tetracycline at subcytotoxic levels inhibits matrix metalloproteinase – 2 and – 9 but does not remove the smear layer. *J Periodontol* 2005;76:1129-1139.
50. Zhang SC, Kern M. The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *Int J Oral Sci* 2009;1:163-176.
51. 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;37:807-812.
52. Zhou J, Tan J, Yang X, Cheng C, Wang X, Chen L. Effect of chlorhexidine

application in a self-etching adhesive on the immediate resin-dentin bond strength. *J Adhes Dent* 2010;12:27-31.

ARTIGO 2
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acharya MR, Venitz J, Figg WD, Sparreboom A. Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. *Drug Resist Update* 2004;7:195-208.
2. Bezerra MM, Brito GAC, Ribeiro RA, Rocha FAC. Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:613-616.
3. Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Bagnel R, Yamauchi M. Immunohistochemical localization of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Arch Oral Biol* 2008;53:109-116.
4. Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Yamauchi M. Distribution and relative activity of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Int J Oral Sci* 2011;3:192-199.
5. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, Dorigo EDS. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater* 2008;24:90-101.
6. Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, Cadenaro M, Foulger S, Mazzoti G, Tay FR, Di Lenarda R, Pashley D. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. *J Adhes Dent* 2009;11:191-198.
7. Breschi L, Martin P, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Tjaderhane L, Visintini E, Cadenaro M, Tay FR, Dorigo EDS, Pashley DH. Use of a specific MMP-inhibitor (galardin) for preservation of hybrid layer. *Dent Mater* 2010;26:571-578.
8. Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Barato-Filho F, Gonzaga CC, ZielaK JC. Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. *J Dent* 2009;37:108-114.
9. Carrilho MRO, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH, Tjaderhane L. Chlorhexidine preserves dentin bond *in vitro*. *J Dent Res* 2007^a;86:90-94.
10. Carrilho MRO, Geraldeli S, Tay FR, de Goes MF, Carvalho RM, Tjaderhane L,

- Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley DH. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007^b;86:529-533.
11. Carvalho RV, Ogliari FA, de Souza AP, Silva AF, Petzhold CL, Line SRP, Piva E, Etges A. 2-Hydroxyethyl methacrylate as an inhibitor of matrix metalloproteinase-2. *Eur J Oral Sci* 2009;117:64-67.
 12. De Castro FLA, de Andrade MF, Duarte Júnior SLL, Vaz LG, Ahid FJM. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *J Adhes Dent* 2003;5:129-138.
 13. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, Van Meerbeek B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res* 2005;84:118-132.
 14. De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, Van Landuyt K, Poitevin A, Opdenakker G, Van Meerbeek B. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. *J Dent Res* 2009;88:1101-1106.
 15. Ferracane JL. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent Mater* 2006;22:211-222.
 16. 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;6:437-439.
 17. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 2007;65:1-13.
 18. Hebling J, Pashley DH, Tjaderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers *in vivo*. *J Dent Res* 2005;84:741-746.
 19. 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;16:531-536.
 20. Kim J, Uchiyama T, Carrilho M, Agee KA, Mazzoni A, Breschi L, Carvalho RM, Tjaderhane L, Looney S, Wimmer C, Tezvergil-Mutluay A, Tay FR, Pashley DH. Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. *Dent Mater* 2010;26:771-778.

21. Komori PCP, Pashley DH, Tjaderhane L, Breschi L, Mazzoni A, de Goes MF, Wang L, Carrilho MR. Effect of 2% chlorhexidine digluconate on the bond strength to normal versus caries-affected dentin. *Oper Dent* 2009;34:157-165.
22. 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;88:77-82.
23. Llavaneras A, Ramamurthy NS, Heikkilä P, Teronen O, Salo T, Rifkin BR, Ryan ME, Golub LM, Sorsa T. A combination of a chemically modified doxycycline and a bisphosphonate synergistically inhibits endotoxin-induced periodontal breakdown in rats. *J Periodontol* 2001;72:1069-1077.
24. Loguercio AD, Stanislawczuk R, Polli LG, Costa JA, Michel MD, Reis A. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. *Eur J Oral Sci* 2009;117:587-596.
25. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjaderhane 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;27:4470-4476.
26. Mazzoni A, Pashley DH, Tay FR, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri Jr. A, Carrilho M, Tjaderhane L, Di Lenarda R, Breschi L. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentin: correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res* 2009;88A:697-703.
27. Mazzoni A, Papa V, Nato F, Carrilho M, Tjaderhane L, Ruggeri Jr. A, Gobbi P, Mazzotti G, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. Immunohistochemical and biochemical assay of MMP-3 in human dentine. *J Dent* 2011;39:231-237.
28. Mazzoni A, Scajja P, Carrilho M, Tjaderhane L, Di Lenarda R, Polimeni A, Tezvergil-Mutluay A, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res* 2013;92:82-86.
29. Nascimento FD, Minciotti CL, Geraldeli S, Carrilho MR, Pashley DH, Tay FR, Nader HB, Salo T, Tjaderhane L, Tersariol ILS. Cysteine cathepsins in human carious dentin. *J Dent Res* 2011;90:506-511.

30. Navarro VP, Nelson-Filho P, Silva LAB, Freitas AC. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. *Rev Odontol UNESP* 2006;35:233-238.
31. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjaderhane L, Tay FR, Pashley DH. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci* 2006;114:160-166.
32. Niu LN, Zhang L, Jiao K, Li F, Ding YX, Wang DY, Wang MQ, Tay FR, Chen JH. Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. *J Dent* 2011;39:536-542.
33. Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena ME, Pashley DH, Tay F, Toledano M. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. *Eur J Oral Sci* 2011;119:79-85.
34. Pashley DH, Tay F, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004;83:216-221.
35. Sampaio LM, Sampaio JEC, Rosetti EP, Rached RSGA, Zuza EP. Condicionamento da superfície radicular com cloridrato de tetraciclina: avaliação das diferentes concentrações – parte 2. *Rev Periodont* 2007;17:55-61.
36. Santos J, Carrilho M, Tervahartiala T, Sorsa T, Breschi L, Mazzoni A, Pashley D, Tay F, Ferraz C, Tjaderhane L. Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. *J Endod* 2009;35:686-689.
37. Scaffa PMC, Vidal CMP, Barros N, Gesteira TF, Carmona AK, Breschi L, Pashley DH, Tjaderhane L, Tersariol ILS, Nascimento FD, Carrilho MR. Chlorhexidine inhibits the activity of dental cysteine cathepsins. *J Dent Res* 2012;91:420-425.
38. Souza AP, Gerlach RF, Line SRP. Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. *Biomaterials* 2001;22:2025-2030.
39. Stanislawczuk R, Amaral RC, Zander-Grande C, Gagler D, Reis A, Loguercio AD. Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves the longevity of resin-dentin bonds. *Oper Dent* 2009;34:481-490.
40. 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;25:459-465.
41. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:463-516.
 42. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjaderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol* 2007;52:121-127.
 43. Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. *J Endod* 2006;32:862-868.
 44. Tjaderhane 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;77:1622-1629.
 45. Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K, Kim J, Shabahang S. A new solution for the removal of the smear layer. *J Endod* 2003;29:170-175.
 46. Van Strijp AJP, Jansen DC, DeGroot J, Ten Cate JM, Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res* 2003;37:58-65.
 47. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases - structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827-839.
 48. Wang Y, Morlandt AB, Xu X, Carnes Jr. DL, Chen Z, Steffensen B. Tetracycline at subcytotoxic levels inhibits matrix metalloproteinase – 2 and – 9 but does not remove the smear layer. *J Periodontol* 2005;76:1129-1139.
 49. Woessner Jr. JF. Matrix metalloproteinase inhibition-From the jurassic to the third millennium. *Ann N Y Acad Sci* 1999;878:388-403.
 50. Zhang SC, Kern M. The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *Int J Oral Sci* 2009;1:163-176.
 51. 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;37:807-812.

52. Zhou J, Tan J, Yang X, Xu X, Li D, Chen L. MMP-inhibitory effect of chlorhexidine applied in a self-etching adhesive. *J Adhes Dent* 2011;13:111-115.

ANEXOS

ANEXO 1

Carta de aprovação do CEP

ANEXO 2

Tabelas dos Testes Estatísticos

Statistix 8.0
11:18:37

melara_mediato_com c..., 2013/02/11,

Descriptive Statistics

Variable	N	Mean	SD	C.V.
ADEx1	15	42.270	3.7863	8.9573
ADc1	15	35.983	7.6140	21.160
SMPEx1	15	24.285	9.7865	40.299
SMPc1	15	20.817	7.9623	38.248

Statistix 8.0
21:10:22

15 cps mediato, 2013/02/11,

Analysis of Variance Table for valores

Source	DF	SS	MS	F	P
adesivos	1	4121.13	4121.13	71.21	0.0000
tetracicl	1	356.83	356.83	6.17	0.0160
adesivos*tetracicl	1	29.82	29.82	0.52	0.4758
Error	56	3240.75	57.87		
Total	59	7748.53			

Grand Mean 30.839 CV 24.67

Statistix 8.0
21:11:02

15 cps mediato, 2013/02/11,

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of valores for adesivos

adesivos Mean Homogeneous Groups

ADP	39.126	A
SMP	22.551	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.9642
Critical Q Value 2.832 Critical Value for Comparison 3.9329
Error term used: Error, 56 DF
All 2 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of valores for tetracicl

tetracicl Mean Homogeneous Groups

sim	33.277	A
nao	28.400	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 1.9642
Critical Q Value 2.832 Critical Value for Comparison 3.9329
Error term used: Error, 56 DF
All 2 means are significantly different from one another.

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of valores for adesivos*tetracicl

adesivos tetracicl Mean Homogeneous Groups

ADP	sim	42.270	A
ADP	nao	35.983	A
SMP	sim	24.285	B
SMP	nao	20.817	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 2.7778
Critical Q Value 3.745 Critical Value for Comparison 7.3559
Error term used: Error, 56 DF
There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.

ANEXO 3

Áreas adesivas (mm²), valores de resistência de união mediatos (MPa) e tipo de falha mediata predominante.

Grupo Mediato	CP	Área Adesiva (mm ²)	MPa Mediato	Tipo de Falha Mediata Predominante
Adper Scotchbond SE Controle	1	0,75	39,07	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Controle	2	0,82	35,03	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Controle	3	0,80	36,01	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Controle	4	0,77	45,63	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Controle	5	0,75	18,95	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Controle	6	0,80	36,91	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Controle	7	0,77	46,35	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Controle	8	0,78	29,93	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Controle	9	0,81	26,28	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Controle	10	0,80	43,74	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Controle	11	0,75	27,12	Coesiva em Camada Híbrida
Adper Scotchbond SE Controle	12	0,78	39,74	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Controle	13	0,82	38,07	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Controle	14	0,80	36,28	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Controle	15	0,81	40,63	Coesiva em Camada Híbrida
Grupo Mediato	CP	Área Adesiva (mm ²)	MPa Mediato	Tipo de Falha Mediata Predominante
Adper Scotchbond SE Experimental	1	0,76	36,15	Coesiva em Resina

Adper Scotchbond SE Experimental	2	0,79	42,36	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Experimental	3	0,79	41,77	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Experimental	4	0,77	37,43	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Experimental	5	0,82	48,36	Coesiva em Adesivo
Adper Scotchbond SE Experimental	6	0,86	45,37	Coesiva em Camada Híbrida
Adper Scotchbond SE Experimental	7	0,85	47,44	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Experimental	8	0,79	46,58	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Experimental	9	0,83	36,28	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Experimental	10	0,80	41,52	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Experimental	11	0,88	41,69	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Experimental	12	0,87	44,66	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Experimental	13	0,80	40,03	Coesiva em Adesivo
Adper Scotchbond SE Experimental	14	0,83	42,06	Coesiva em Resina
Adper Scotchbond SE Experimental	15	0,80	42,35	Coesiva em Resina
Grupo Mediato	CP	Área Adesiva (mm²)	MPa Mediato	Tipo de Falha Mediata Predominante
Adper SMP Controle	1	0,85	22,85	Coesiva em Camada Híbrida
Adper SMP Controle	2	0,79	16,73	Coesiva em Camada Híbrida
Adper SMP Controle	3	0,87	22,46	Coesiva em Camada Híbrida
Adper SMP Controle	4	0,80	24,42	Coesiva em Camada Híbrida
Adper SMP Controle	5	0,80	37,36	Coesiva em Resina
Adper SMP Controle	6	0,79	10,28	Coesiva em Camada Híbrida
Adper SMP Controle	7	0,85	33,43	Coesiva em Camada Híbrida

Adper SMP Controle	8	0,73	15,92	Coesiva em Camada Híbrida
Adper SMP Controle	9	0,82	29,65	Coesiva em Resina
Adper SMP Controle	10	0,80	14,89	Coesiva em Camada Híbrida
Adper SMP Controle	11	0,80	17,66	Coesiva em Camada Híbrida
Adper SMP Controle	12	0,85	13,17	Coesiva em Resina
Adper SMP Controle	13	0,77	19,64	Coesiva em Camada Híbrida
Adper SMP Controle	14	0,78	22,80	Coesiva em Dentina
Adper SMP Controle	15	0,80	11,00	Coesiva em Resina
Grupo Mediato	CP	Área Adesiva (mm²)	MPa Mediato	Tipo de Falha Mediata Predominante
Adper SMP Experimental	1	0,86	23,89	Coesiva em Resina
Adper SMP Experimental	2	0,82	16,52	Coesiva em Camada Híbrida
Adper SMP Experimental	3	0,83	47,51	Coesiva em Adesivo
Adper SMP Experimental	4	0,85	16,49	Coesiva em Adesivo
Adper SMP Experimental	5	0,80	19,36	Coesiva em Camada Híbrida
Adper SMP Experimental	6	0,82	16,92	Coesiva em Camada Híbrida
Adper SMP Experimental	7	0,82	28,97	Coesiva em Camada Híbrida
Adper SMP Experimental	8	0,80	22,65	Coesiva em Resina
Adper SMP Experimental	9	0,79	33,12	Coesiva em Resina
Adper SMP Experimental	10	0,82	15,25	Coesiva em Camada Híbrida
Adper SMP Experimental	11	0,78	33,19	Coesiva em Resina
Adper SMP Experimental	12	0,80	28,06	Coesiva em Adesivo
Adper SMP Experimental	13	0,83	07,96	Coesiva em Camada Híbrida

Adper SMP Experimental	14	0,81	31,69	Coesiva em Camada Híbrida
Adper SMP Experimental	15	0,85	22,69	Coesiva em Resina