

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Dentística



Dissertação

**Efeito da adição de um inibidor de metaloproteinase
sobre a resistência à microtração e citotoxicidade de
um sistema adesivo autocondicionante**

Sandrina Henn

Pelotas, 2009

SANDRINA HENN

**EFEITO DA ADIÇÃO DE UM INIBIDOR DE METALOPROTEINASE SOBRE A
RESISTÊNCIA À MICROTRAÇÃO E CITOTOXICIDADE DE UM SISTEMA
ADESIVO AUTOCONDICIONANTE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia, Área de concentração
em Dentística da Faculdade de
Odontologia da UNIVERSIDADE
FEDERAL DE PELOTAS, como
requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Piva

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana Fernandes da
Silva

Pelotas, 2009

Banca examinadora

Prof. Dr. Evandro Piva

Dr. Rodrigo Varella de Carvalho

Prof^a. Dra Carmen Borges Fortes

Prof^a. Dra Patrícia dos Santos Jardim (Suplente)

Prof. Dr. Rafael Guerra Lund (Suplente)

DEDICATÓRIA

A meus pais **Vitor e Maria Luiza**
a minhas irmãs **Sandra e Sabine**, ao meu sobrinho **Pedro**, e,
ao meu grande amor da minha vida, **Tiago**. Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À DEUS que me escuta em todos os momentos, que me dá força e me ilumina em tudo que eu faço!!! Obrigada Senhor!!!!

Aos meus pais, **Vitor e Maria Luiza**, por terem dado a mim a base para tudo, educação, amor, carinho e principalmente a vida. Pai, obrigada pelas palavras de força e incentivo nas horas difíceis que muito me ajudaram dando ânimo e coragem para continuar, principalmente por estar tanto tempo longe de vocês. Mãezinha, obrigada pelo amor incondicional pelas suas filhas, pela doçura e pelos abraços apertados sempre que chego ou vou embora. Obrigada por suportarem a distância e entenderem minha ausência. Falta pouco para estarmos todos próximos novamente. Tudo que sou, sou por vocês. AMO VOCÊS.

As manas, **Sandra e Sabrina**, pelo convívio durante as diferentes fases de nossas vidas. Pela amizade, cumplicidade, carinho e apoio. Por estarem sempre unidas para enfrentar qualquer batalha com qualquer uma de nós. Pelo amor, que nos aproxima e ameniza a saudade e ao Pedro, por ser esse menino tão amado e querido. AMO VOCÊS. Ao Márcio, pelos momentos divertidíssimos que compartilhamos e pelos churros espetaculares.

Ao **Tiago**, exemplo de ternura, humildade e principalmente perseverança! Obrigada amor, pelo amor, carinho, incentivo, ajuda e principalmente pela paciência que tem comigo e que estas me ensinando a ter. Obrigada por me ensinar a praticar e a amar a Odontologia. Se não tivesse você em minha vida, talvez isso não tivesse acontecido. Obrigada, minha vida, por ser parte de mim. Amo-te mais que tudo.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Dentística, **Professor Doutor Flávio Fernando Demarco**, por ser um exemplo a ser seguido como professor e pesquisador. Obrigada pela amizade, pelo apoio e pelo carinho que tem conosco. Obrigada, também, pelo carinho de sua bela família, Sandra, Giulia e Giovana.

Ao meu orientador **Professor Doutor Evandro Piva** pela orientação durante todos esses anos (Iniciação Científica e Mestrado). Obrigada Piva pela oportunidade do contato com a docência, pela confiança depositada em mim muitas vezes e por me ajudar a percorrer esse caminho. E principalmente

orientador, obrigada pela paciência que sempre teve comigo. E a sua esposa, Adri, minha co-orientadora, que também foi importante na realização deste trabalho.

À Tati e ao Max, pela colaboração com este e outros trabalhos, pelo carinho e pela amizade. Tati, muito obrigada pela ajuda, por ser essa pessoa sempre em disposição a ajudar. Estarão sempre guardados num cantinho do meu coração. Adoro vocês!!!!

Aos colegas e amigos Rodrigo (Baiano), Rafael Lund e Fernanda Nedel pela parceria nos trabalhos, pelas discussões na sala de informática e Fe, pelas nossas idas ao campus nos finais de semana. Foi muito bom trabalhar com vocês!

Aos meus colegas e amigos do mestrado e doutorado, Sinval, César (Tino), Marcus, Giana, Françoise, Marina, Marília, Glória, Silvia, Raquel, Luís Eduardo (Neno), Márcio, Thiago pelas trocas de conhecimento e pelas contribuições para o aprendizado mútuo. E principalmente, ao Marcos Britto Correa, pelo companheirismo de 7 anos e pela grande amizade que construímos.

À Josi, por sempre estar pronta para me ajudar, em todos os momentos. Pela competência, amizade e atenção!!! Vou sentir saudades!!!!

À Professora Doutora Márcia Bueno Pinto, diretora da Faculdade de Odontologia / UFPel, pelas mudanças e melhorias na nossa Faculdade.

Aos técnicos do CDC Bio, Tati, Airton e Marcelo. Por facilitarem nosso trabalho no laboratório. Por sempre estarem dispostos a ajudar.

A família Donassollo, pelo grande carinho que sempre tiveram comigo, pelo incentivo e principalmente pelas orações. Em especial, a Bere e Plínio, exemplo de garra, fé e carinho.

Ao Vanderlei Piva, Magnei, Bru e Aline. Obrigada por tudo que estão fazendo por nós, obrigada pelo carinho e pela oportunidade de conviver perto de pessoas tão especiais. Vamos ser muito felizes aí!!!!

A todos os meus parentes e amigos que torcem por mim, que tornam a minha vida mais colorida, que brindam ou que choram comigo, obrigada pela amizade, pela compreensão da ausência, e esperamos todos vocês em Tapejara!!!!

NOTAS PRELIMINARES

A presente dissertação foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2006, adotando o Nível de Descrição 4 – estruturas em Artigos, que consta no Apêndice D do referido manual. Disponível no endereço eletrônico: (www.ufpel.tche.br/prg/sisbi/documentos/Manual_normas_UFPel_2006.pdf).

RESUMO

HENN, Sandrina. **Efeito da adição de um inibidor de metaloproteinase sobre a resistência à microtração e citotoxicidade de um sistema adesivo autocondicionante.** 2009. 70f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Odontologia. Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da incorporação de um inibidor de metaloproteinase 2, (MMP-2) metacrilato de zinco (MZ), na resistência de união (μ TBS) e citotoxicidade de um sistema adesivo autocondicionante comercial, Clearfil SE Bond (CSE). O primer do sistema adesivo autocondicionante foi modificado com o acréscimo de 1% ou 5% em massa de MZ. Clearfil SE Bond sem MZ foi utilizado como controle. Para o ensaio de resistência de união, vinte e oito terceiros molares humanos foram utilizados, formando quatro grupos (7 dentes por grupo): CSE_{controle}, CSE_{ZM1} e CSE_{ZM5} foram armazenados em água destilada e CSE_{CHX} armazenado em digluconato de clorexidina 2%. Os dentes foram restaurados, seccionados para obtenção de palitos e armazenados em estufa a 37 °C por 24h, 6 ou 12 meses. Após, os palitos foram submetidos a ensaio de microtração (μ TBS) em máquina de ensaios mecânicos. Para o ensaio de citotoxicidade, fibroblastos de ratos imortalizados (3T3/NIH) foram expostos aos três *primers* (CSE, CSE_{ZM1} e CSE_{ZM5}) por 12h e 24h. Meio DMEM (Meio Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco) foi utilizado como controle. As células foram plaqueadas em concentrações de 2×10^4 células por poço e distribuídas em duas placas de cultivo celular. Teste de viabilidade celular MTT (sal tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium brometo] foi utilizado para avaliar função metabólica das células. A absorbância de cada poço foi medida em um espectrofotômetro a 570 nm. Os dados de μ TBS foram analisados por Análise de Variância uma Via e teste complementar de Tukey ($\alpha=0.05$). Grupo CSE_{control} demonstrou silimar μ TBS após armazenamento. O grupo CSE_{ZM5} revelou queda na μ TBS após 6 meses de armazenamento quando comparados ao controle. Os valores de citotoxicidade foram submetidos ao teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* e método *Sudent-Newmans-Keuls*). Houve redução na atividade mitocondrial para todos os *primers* testados quando comparados ao controle contendo apenas DMEM. No entanto, os grupos CSE_{ZM1} e CSE_{ZM5} apresentaram efeito citotóxico inferior ao primer comercial. De acordo com as limitações do presente estudo é possível concluir que os possíveis mecanismos de inibição de metaloproteinase testados, acréscimo de metacrilato de zinco ou armazenagem em clorexidina pode afetar negativamente a resistência de união do Clearfil SE Bond. No entanto, a citotoxicidade do primer comercial foi diminuída com o acréscimo de Metacrilato de Zinco.

Palavras Chave: Ensaio de tração. Clearfil SE Bond. Materiais dentários. Citotoxicidade. Metaloproteinase da Matriz extracelular. Adesão.

ABSTRACT

HENN, Sandrina. **The effect of a matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) inhibitor on the microtensile bond strength and cytotoxicity of a self-etching primer**. 2008, 25f. Dissertation (Master's degree) – Graduate Program, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

The aim of this study was to investigate the effect of zinc methacrylate (ZM) as a matrix metalloproteinase2 (MMP- 2) inhibitor on the microtensile bond strength (μ TBS) and cytotoxicity of a self-etching adhesive system (Clearfil SE Bond – CSE). For mechanical test, the self-etching primer was modified with 1 or 5 % (wt) of ZM, while adhesive system served as control (CSE). Twenty-eight human third molars were randomly assigned into four groups (n=7 teeth per group): CSE, CSE_{ZM1} and CSE_{ZM5} were stored in distilled water and CSE_{CHX} was stored in 2% chlorhexidine digluconate. After restorative procedures, teeth were sectioned to obtain beams, stored at 37° C for 24 hour, 6 and 12 months. After, μ TBS was measured. For cytotoxicity test, mouse fibroblasts (3T3/NIH) were exposed to extracts of three different primers (CSE, CSE_{ZM1} and CSE_{ZM5}) for 12 and 24h. Medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) as used as control. The cell was plated (2×10^4 /well) in two 96 round-bottomed tissue culture plates. The MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was used to asses cell metabolic function by mitochondrial dehydrogenase activity. The absorption at 570nm was determined spectrophotometrically. Data of μ TBS were analyzed by One-Way Anova and Tukey test ($\alpha=0.05$). Control group show similar μ TBS after storage times. The CSE_{ZM5} disclosed a decrease of bond strength after six moth storage and statistically lower μ TBS means when compared with control group ($p<0.05$) Cytotoxicity was analyzed using Kruskal-Wallis test and Sudent-Newmans-Keuls method. There was a reduction in cell viability after exposure in all tested groups when compared to the Control. However, cytotoxicity of CSE_{ZM1} and CSE_{ZM5} were lower than CSE. The addition of zinc methacrylate on self-etching primer or storage in chlorhexidine may negatively affect μ TBS of CSE. However, cytotoxicity of the commercial primer may decreased with ZM addition.

Keywords: matrix metalloproteinase, microtensile bond strength, self-etching, zinc methacrylate.

Lista de Figuras

Introdução

- Figura 1 Zimografia demonstrando a inibição de MMP-2 por metacrilato de zinco (MZ) em diferentes concentrações, após 24h de incubação. Como controle foi utilizado somente o tampão Tris- CaCl_2 sem metacrilato de zinco e NEM e EDTA foram utilizados como caracterizadores enzimáticos de metaloproteinase..... 19
- Figura 2 Fórmula química do monômero metacrilato de Zinco..... 19

Projeto

- Figura 1 Zimografia demonstrando a inibição de MMP-2 por metacrilato de zinco (MZ) em diferentes concentrações, após 24h de incubação. Como controle foi utilizado somente o tampão Tris- CaCl_2 sem metacrilato de zinco e NEM e EDTA foram utilizados como caracterizadores enzimáticos de metaloproteinase..... 24
- Figura 2 Fórmula química do monômero metacrilato de zinco..... 25

Artigo

- Figura 1 Failure pattern distribution from different groups tested after storage for 12 months..... 53

Apêndice

- Figura 3 Padrão de fratura dos diferentes grupos testados após armazenamento por 24 horas..... 62
- Figura 4 Padrão de fratura dos diferentes grupos testados após armazenamento por 6 meses..... 62

Lista de tabelas

Projeto

Tabela 1	Descrição dos materiais utilizados.....	27
Tabela 2	Disposição dos grupos que serão utilizados na pesquisa.....	30

Artigo

Table 1	Composition, stored and pH of groups used in the study.....	52
Table 2	Microtensile bond strength (μ TBS) means ($\pm$ S.D.).....	53
Table 3	Cytotoxicity test means results.....	54

Lista de Abreviaturas

Bis GMA	Bisfenol Glicidil Metacrilato
°C	graus Celsius
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHX	Digluconato de Clorexidina 2%
cm	centímetro
CSE	Clearfil SE Bond
CSE _{ZM1}	Clearfil SE Bond contendo 1% de metacrilato de zinco
CSE _{ZM5}	Clearfil SE Bond contendo 5% de metacrilato de zinco
CSE _{CHX}	Clearfil SE Bond armazenado em digluconato de Clorexidina 2%
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Meio Essencial de Eagle Modificado por Dulbecco)
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i> (Dimetilsulfóxido)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético)
g	grama
h	hora
HEMA	2-hidroxietil metacrilato
LED	<i>Light Emitting Diode</i> (diodo emissor de luz)
MDP	Fosfato Biácido Metacriloiloxidecilo -10
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
μTBS	<i>Microtensile Bond Strenght</i> (resistência de união à microtração)
μL	microlitro

MZ	Metacrilato de Zinco
MMP	Metaloproteinase da Matriz Extracelular
MPa	Megapascal
MTT	sal tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium brometo]
N	Newton
NEM	<i>N-ethyl-maleimide</i> (n-etil maleimida)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (tampão fosfato salino)
s	segundos
SDI	<i>Southern Dental Industrier</i>
SIC	Carbeto de Silício
TEGDMA	Trietileno Glicol Dimetacrilato
TIM	Inibidor Tecidual de Metaloproteinase
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
Zn	Zinco
ZnSO ₄	Sulfato de Zinco
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	Introdução Geral	16
2	Projeto de Pesquisa.....	21
2.1	Introdução.....	21
2.2	Objetivo.....	26
2.2.1	Objetivo geral.....	26
2.2.2	Objetivos específicos.....	26
2.3	Materiais e métodos.....	27
2.3.1	Aspectos éticos	27
2.3.2	Incorporação de metacrilato de zinco no <i>primer</i> do sistema adesivo autocondicionante	27
2.3.3	Obtenção e restauração dos dentes.....	28
2.3.4	Armazenamento.....	29
2.3.5	Grupos experimentais.....	29
2.3.6	Ensaio de resistência de união à microtração e análise do modo de fratura	30
2.3.7	Tratamento estatístico	31
2.4	Referências	32
2.5	Orçamento	35
2.6	Cronograma	36
3	Artigo.....	37
4	Referências.....	56
5	Apêndices.....	61

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os sistemas adesivos odontológicos mudaram os conceitos de materiais restauradores a partir da possibilidade de aderir um material restaurador aos tecidos dentais. A hibridização, criação de uma camada híbrida nos tecidos dentais duros, proposta por Nakabayashi (1982) pode ser reconhecida como um marco histórico para a consolidação das restaurações adesivas. A adesão de materiais restauradores ao esmalte, dentina e/ou cimento tornou-se possível através da desmineralização da superfície e subsuperfície dentária e posterior infiltração de monômeros seguida de polimerização (NAKABAYASHI; KOJIMA; MASUHARA, 1982).

Segundo De Munck et al. (2005), os sistemas adesivos atuais podem ser classificados de acordo com o tipo de condicionamento e o número de passos utilizados. Assim, os sistemas adesivos apresentam-se como convencionais de dois ou três passos ou autocondicionantes de um ou dois passos. Nos sistemas adesivos convencionais (*total etching adhesives*), o condicionamento ácido ocorre separado das etapas da aplicação do primer e da resina adesiva. O condicionamento é realizado normalmente com ácido fosfórico com concentrações que variam entre 30 e 40%. Após a aplicação, o ácido fosfórico é completamente removido através de lavagem abundante, o que torna essa técnica mais sensível. Estes sistemas podem estar disponíveis em dois frascos (ácido e primer/adesivo) ou três frascos (ácido + primer + adesivo) sendo chamados respectivamente como sistemas adesivos de dois passos e três passos.

Por outro lado, os sistemas adesivos autocondicionantes (*self-etch adhesives*) baseiam-se no uso de monômeros ácidos que condicionam e infiltram os tecidos dentais duros simultaneamente. Estes sistemas dispensam a etapa de lavagem, o que diminui o tempo clínico de aplicação do sistema adesivo, mas principalmente reduz a sensibilidade da técnica e/ou minimiza o risco de produzir erros durante a aplicação (DE MUNCK et al., 2005). Os sistemas adesivos autocondicionantes podem ser classificados em dois passos (2 frascos, primer e adesivo) ou de um passo (frasco único, primer + adesivo ou

ainda primer e adesivo em frasco separados) necessitando de mistura prévia antes da aplicação (DE MUNCK, et al., 2005).

Atualmente sabe-se que sistemas adesivos em geral demonstram resistência de união satisfatória nas avaliações imediatas. Contudo, existe uma maior preocupação frente a estabilidade desta resistência de união através do tempo (BRESCHI et al., 2008), visto que, após envelhecimento a resistência de união desses sistemas diminui tanto *in vitro* quanto *in vivo* (DE MUNCK, et al., 2005). Assim, geralmente os sistemas adesivos simplificados de um passo demonstram menor durabilidade, enquanto sistemas adesivos de condicionamento total de 3 passos e autocondicionantes 2 passos demonstram desempenho superior aos primeiros (BRESCHI, et al., 2008).

A degradação da interface de união vem sendo amplamente associada a inúmeros fatores relacionados ao polímero. No entanto, o próprio substrato pode ser um fator envolvido na queda da resistência de união, já que, a dentina apresenta maior dificuldade de união aos adesivos devido à grande presença de água e grande quantidade de material orgânico, o que dificulta a penetração de sistemas adesivos devido à composição hidrofóbica (PERDIGAO et al., 2000). Buscando minimizar essa dificuldade, surgiram os sistemas adesivos com componentes hidrofílicos. No entanto, esses sistemas funcionam como uma membrana permeável, absorvendo água do meio, possibilitando a formação de bolhas na interface de união, o que irá contribuir para a falha da adesão (TAY; PASHLEY, 2003). Além disso, sistemas adesivos hidrofílicos, permitem a transudação de fluido dentinário para a interface, ou seja, adesivos hidrofílicos (simplificados) não promovem um selamento hermético em dentes vitais (TAY; PASHLEY, 2003). Outro fator que contribui para a degradação do polímero é a presença e não volatilização adequada do solvente, trazendo prejuízos para a polimerização (YIU et al., 2005), além disso, a camada híbrida apresenta sensibilidade à fenômenos mecânicos, como contração de polimerização e fadiga (NIKAIDO et al., 2002). No entanto, o maior fator que afeta a durabilidade da interface de união é a degradação hidrolítica dos seus dois principais componentes: polímero e o colágeno (DE MUNCK, et al., 2005).

Apesar do reconhecido efeito da degradação do polímero sobre a queda na resistência de união ao longo do tempo (TAY; PASHLEY, 2003, YIU, et al., 2005) atualmente a degradação do colágeno também vem sendo associada à

queda da resistência de união, (CARRILHO et al., 2007, NISHITANI et al., 2006, TAY et al., 2006) já que o colágeno é também um componente importante da camada híbrida. O colágeno pode ser degradado através de diversos mecanismos inclusive através da ação de enzimas Metaloproteinasas da Matriz Extracelular (MMPs). Uma vez ativadas, as MMPs são capazes de realizar a degradação enzimática das fibras colágenas presentes na camada híbrida (CARRILHO et al., 2007, CARRILHO, et al., 2007, HEBLING et al., 2005, PASHLEY et al., 2004).

As MMPs constituem uma família de 24 endoproteinasas (RAFFETTO; ROSS; KHALIL, 2007) com capacidade de juntas degradarem todas as proteínas da matriz extracelular, como colágeno, fibronectina e proteoglicanas (BODE; MASKOS, 2003). Essas enzimas estão associadas com o remodelamento tecidual, processo de metástase tumoral (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993) e na Odontologia, participam da formação dos tecidos dentais, após isso, são incubadas pela mineralização dos tecidos, permanecendo inativas (MARTIN-DE LAS HERAS; VALENZUELA; OVERALL, 2000). No entanto, estímulos específicos, como ácidos liberados por bactérias em lesões cáries (TJADERHANE et al., 1998) e a utilização de sistemas adesivos autocondicionantes, são capazes de ativar as enzimas, que passam então a degradar o colágeno do local onde elas estão presentes (DONMEZ et al., 2005, LEHMANN et al., 2009, NISHITANI, et al., 2006). A Metaloproteinase da Matriz Extracelular 2 (MMP-2) ou gelatinase A, é a enzima em maior quantidade encontrada na dentina (MARTIN-DE LAS HERAS; VALENZUELA; OVERALL, 2000).

Baseado nisso, a inibição das MMPs vem sendo discutida como um fator importante para a longevidade dos sistemas adesivos, visto que, a inibição das MMPs impediria a degradação do colágeno, mantendo um dos principais componentes da camada híbrida (CARRILHO, et al., 2007, CARRILHO, et al., 2007, HEBLING, et al., 2005). Alguns materiais foram identificados como inibidores de MMPs. A clorexidina, há algum tempo, já demonstrou inibição da atividade desta enzima (GENDRON et al., 1999) e por isso tem sido preconizada a aplicação de digluconato de clorexidina 2% após o condicionamento ácido com o objetivo de inibir as MMPs (BRACKETT et al.,

2007, CARRILHO, et al., 2007, CARRILHO, et al., 2007, HEBLING, et al., 2005).

Além da clorexidina, materiais utilizados na Odontologia contendo zinco em sua composição, tais como, sulfato de Zinco (Zn) (DE SOUZA; GERLACH; LINE, 2000), cimento de óxido de Zn (SANTOS et al., 2004) e amálgama contendo Zn mostraram-se com forte potencial inibidor de MMP-2 e MMP-9 (SOUZA; GERLACH; LINE, 2001). Mais recentemente, um polímero contendo zinco em sua estrutura, Metacrilato de Zinco (MZ) (SIGMA-ALDRICH, Missouri, EUA) foi testado e analisado por meio de zimografia e pode-se observar efeito inibitório sobre MMP-2 (Figura 1) (HENN S, 2007).

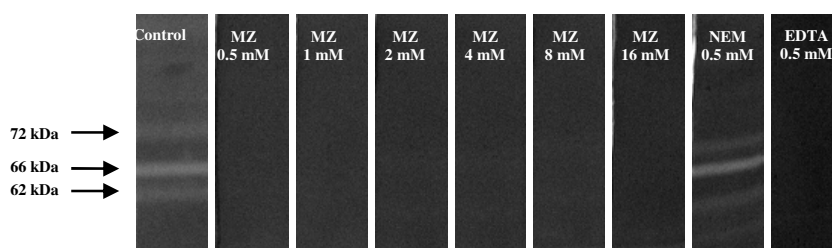


Figura 1: Zimografia demonstrando a inibição de MMP-2 por metacrilato de zinco em diferentes concentrações, após 24h de incubação. Como controle foi utilizado somente o tampão Tris-CaCl₂ sem metacrilato de zinco e NEM e EDTA foram utilizados como caracterizadores enzimáticos de metaloproteinase.

A adição de um inibidor de MMP capaz de co-polimerizar em um sistema adesivo parece promissora, visto que, as enzimas são liberadas lentamente ao longo do tempo (TJADERHANE, et al., 1998). O metacrilato de zinco (Figura 2), além da capacidade inibitória, possui grupo funcional metacrilato, podendo co-polimerizar com outros componentes do sistema adesivo, como Bis-GMA, HEMA e TEGDMA, proporcionando maior estabilidade ao polímero.

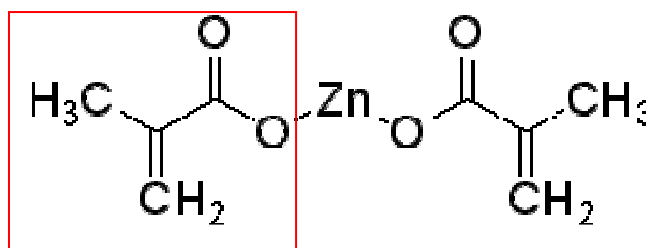


Figura 2: Fórmula química do monômero metacrilato de Zinco destacando grupo funcional metacrilato.

No entanto, qualquer material que entre em contato com tecidos vivos deve ser avaliado em relação a seu efeito citotóxico. Normalmente, sistemas adesivos liberam monômeros residuais que podem causar citotoxicidade nas células pulpares, pela geração de espécies de oxigênio reativas (DEMIRCI et al., 2008). A citotoxicidade de qualquer material adicionado a um sistema adesivo deve ser igual ou inferior a citotoxicidade de sistemas adesivos comerciais já utilizados clinicamente.

Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar através de resistência de união e teste de citotoxicidade a influência do acréscimo de um inibidor de MMPs no *primer* de um sistema adesivo autocondicionante comercial.

2 PROJETO DE PESQUISA

2.1 INTRODUÇÃO

Sistemas adesivos odontológicos são amplamente utilizados na Odontologia, buscando unir restaurações adesivas aos tecidos dentais, através da difusão de monômeros metacrilatos constituintes desses sistemas, nas porosidades criadas e na malha de colágeno exposta após o condicionamento ácido, formando então, após a polimerização, a camada híbrida (NAKABAYASHI; KOJIMA; MASUHARA, 1982).

Os sistemas adesivos são classificados de acordo com o método de condicionamento da superfície e o número de passos clínicos (DE MUNCK et al., 2003). Assim sistemas adesivos convencionais são aqueles que utilizam o condicionamento com ácido fosfórico, separado dos passos seguintes de aplicação do *primer* e aplicação da resina adesiva (*total etching*). Os sistemas adesivos convencionais são divididos em dois (ácido + *primer* e adesivo no mesmo frasco) e três passos clínicos (ácido + *primer* + adesivo em frascos separados).

Já nos autocondicionantes (*self-etching*), a presença de monômeros ácidos polimerizáveis no *primer* condicionam a superfície ao mesmo tempo em que a infiltram. Desse modo a aplicação de *primer* autocondicionante simplifica a uma única etapa os 3 procedimentos clínicos; 1) condicionamento com ácido fosfórico, 2) procedimento de lavagem para remoção do ácido e 3) aplicação de *primer*. Os sistemas adesivos autocondicionantes por sua vez podem ser divididos, segundo o modo de aplicação em: a) um passo (*primer* + adesivo em frasco único) e dois passos (*primer* e adesivo em frasco separado) (DE MUNCK et al., 2005).

Os sistemas adesivos autocondicionantes apresentam algumas vantagens sobre os sistemas adesivos convencionais: apresentam uma técnica simplificada de aplicação, reduzindo o tempo clínico e a sensibilidade da técnica, visto que, dispensam etapa de lavagem do ácido fosfórico e secagem da dentina (TAY; PASHLEY, 2003). Além disso, o uso de autocondicionantes

reduz a sensibilidade pós operatória, já que, os monômeros infiltram ao mesmo tempo em que desmineralizam os tecidos, assim, toda a superfície desmineralizada será infiltrada não permanecendo espaços onde foi realizada a desmineralização (VAN MEERBEEK et al., 2005). No entanto, apesar da evolução desses sistemas, a durabilidade da interface adesiva em sistema adesivos autocondicionantes ainda é um problema (REIS et al., 2005), tanto *in vitro* e *in vivo* (DONMEZ et al., 2005, PEUMANS et al., 2005)

Os sistemas adesivos atuais apresentam resistência de união satisfatória imediatamente após a hibridização. No entanto, sabe-se que esta resistência diminui com o passar do tempo (DE MUNCK, et al., 2005). As falhas dos adesivos dentinários vêm sendo amplamente associadas à degradação do polímero. Entre os fatores conhecidos estão; a) a presença de solvente decorrente de procedimento e volatilização mal realizada, com prejuízos a polimerização (YIU et al., 2005), b) a sensibilidade da camada híbrida a fenômenos mecânicos, como contração de polimerização e fadiga (NIKAIDO et al., 2002) e principalmente c) a degradação química por hidrólise, sendo este o fator de maior importância para a degradação da adesão (DE MUNCK, et al., 2005).

A camada híbrida desempenha um importante papel na manutenção da adesão. Atualmente, a degradação da camada híbrida, além da degradação do polímero, também vem sendo associada à degradação do colágeno através de enzimas presentes no hospedeiro, as Metaloproteinases da Matriz Extracelular (MMPs) (PASHLEY et al., 2004).

As MMPs são proteases zinco-dependentes encontradas em várias regiões do organismo. Constituem uma família de aproximadamente 24 endoproteinases com capacidade de degradar diferentes tipos de colágeno (BIRKEDAL-HANSEN et al., 1993). Essas enzimas são capazes de degradar componentes da matriz extracelular durante o desenvolvimento normal da embriogênese, morfogênese ou remodelamento tecidual (STACK et al., 1996). Estão presentes em processos inflamatórios e invasivos, atuando no processo de metástase, facilitando a expansão das neoplasias (TRYGGVASON; HOYHTYA; PYKE, 1993). As MMPs também são responsáveis pelo desarranjo e remodelamento fisiológico de matriz extracelular em vários tecidos, incluindo dental (BIRKEDAL-HANSEN, et al., 1993).

Na dentina humana hígida foi identificada a capacidade de síntese pelas células odontoblásticas de MMP-2 e MMP-9 (gelatinases A e B respectivamente), havendo uma maior prevalência de MMP do tipo 2 (MARTIN-DE LAS HERAS; VALENZUELA; OVERALL, 2000). Também em dentina cariada, foram identificadas, MMP-2 (gelatinase A), MMP-9 (gelatinase B) e MMP-8 (colagenase 2), sendo que a MMP 9 está presente em maiores quantidades que as outras enzimas (TJADERHANE et al., 1998).

As metaloproteínases em condições normais participam da formação e manutenção do complexo dentino-pulpar e após cumprirem sua função são confinadas pela mineralização dos tecidos, permanecendo inativas (MARTIN-DE LAS HERAS; VALENZUELA; OVERALL, 2000). No entanto, alguns estímulos são capazes de ativá-las desencadeando a degradação de fibras colágenas, neste caso, mais especificamente o colágeno do tipo IV. O colágeno é constituinte importante da camada híbrida, assim, metaloproteínases da matriz extracelular, por serem associadas à degradação do colágeno (PASHLEY, et al., 2004), estão sendo relacionadas a degradação da interface de união.

Diversos estímulos podem contribuir para a ativação desta substância, dentre eles, a desmineralização por ácido proveniente de bactérias em lesões cáries (TJADERHANE, et al., 1998), o condicionamento com ácido fosfórico, e os sistemas adesivos autocondicionantes (NISHITANI et al., 2006), todos têm sido associados ao fato de serem ácidos e assim capazes de ativar as MMPs.

A inibição destas enzimas ocorre através de inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) presentes no organismo (GOMIS-RUTH et al., 1997). Além deles, alguns materiais têm demonstrado capacidade de inibir a ação dessas enzimas. A clorexidina (CHX) mostrou ser um potente inibidor de MMPs na dentina quando aplicada após o condicionamento com ácido fosfórico (PASHLEY, et al., 2004). Estudo *in vitro*, demonstrou que a resistência de união da interface adesiva não apresentou redução significativa ao longo do tempo (14 meses) em restaurações, nas quais houve a aplicação de CHX após condicionamento, quando comparadas ao controle (sem CHX), que diminuiu significativamente a resistência de união (CARRILHO et al., 2007). Além disso, o uso de CHX como inibidor de MMP, também mostrou eficiência na prevenção da degradação do colágeno da camada híbrida em estudos realizados *in vivo*,

nos quais a avaliação foi realizada com 6 meses de acompanhamento (BRACKETT et al., 2007, HEBLING et al., 2005). Ambos os estudos relacionam a manutenção do colágeno da camada híbrida ao uso de CHX como inibidor de MMP.

Além da CHX, diversos materiais de uso Odontológico contendo zinco vêm sendo associados à inibição de MMP-2. Tais como, cimentos de óxido de zinco, amálgama contendo zinco e sulfato de zinco (ZnSO_4) (DE SOUZA; GERLACH; LINE, 2000, SANTOS et al., 2004, SOUZA; GERLACH; LINE, 2001). Além destes, um monômero contendo zinco em sua estrutura, o metacrilato de zinco (SIGMA-ALDRICH, Missouri, EUA), demonstrou através de zimografia, possuir efeito inibidor de MMP 2 em diferentes concentrações utilizadas (0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM, 8 mM e 16 mM) (Figura 1) e não influenciou na resistência coesiva quanto utilizada concentrações que variaram entre 0.5 e 20% (HENN, S et al, 2007). O monômero avaliado, além de ter demonstrado inibição de MMP, possui em sua estrutura um grupo funcional metacrilato (Figura 2), também encontrado na estrutura de outros componentes de sistemas adesivos, como HEMA e Bis-GMA, o que facilitaria a copolimerização deste monômero com os outros componentes do sistema, se este fosse inserido em um sistema adesivo.

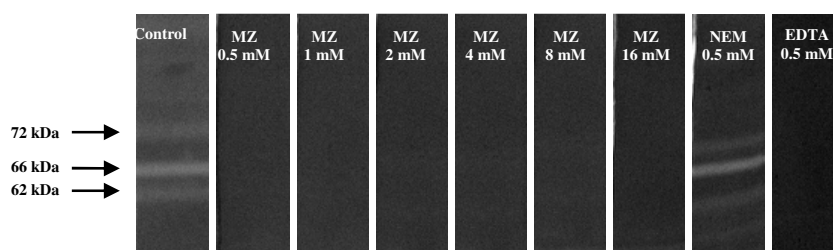


Figura 1: Zimografia demonstrando a inibição de MMP-2 por metacrilato de zinco (MZ) em diferentes concentrações, após 24h de incubação. Como controle foi utilizado somente o tampão Tris-CaCl sem metacrilato de zinco e NEM e EDTA foram utilizados como caracterizadores enzimáticos de metaloproteinase.

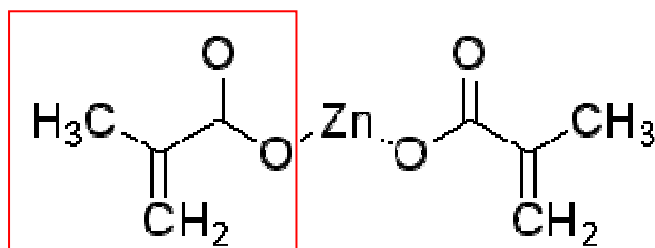


Figura 2: fórmula química do monômero metacrilato de Zinco.

Com base em algumas evidências torna-se estratégico a identificação de componentes e substâncias com potencial de inibição de MMPs e uso para uma incorporação desses inibidores na composição de materiais restauradores. Hipoteticamente, um sistema adesivo com a presença de um material inibidor em permanente contato com a camada híbrida pode ser relevante, visto que, no momento da ativação das MMPs, teoricamente, o material inativaria as enzimas minimizando a degradação do colágeno via metaloproteinase, assim, minimizando a degradação das fibrilas colágenas da camada híbrida e favorecendo a manutenção da interface de união, o que poderia influenciar diretamente no sucesso em longo prazo da restauração adesiva. O metacrilato de zinco parece ser um material favorável para a incorporação em um sistema adesivo com a finalidade de inibir metaloproteinase, visto que, demonstrou efeito inibitório e poderá copolimerizar com outros componentes, devido ao grupo funcional metacrilato presente em sua estrutura.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo será testar a hipótese nula de que a presença de metacrilato de zinco na composição de um sistema adesivo autocondicionante não afetará a resistência de união à microtração em diferentes concentrações e meios de armazenamento.

2.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar se a adição de metacrilato de zinco nas concentrações de 1 e 5%, em um sistema adesivo autocondicionante afetará a resistência de união à dentina.
- b) Avaliar se o armazenamento em digluconato de clorexidina 2% influenciará na resistência de união à dentina.
- c) Avaliar a camada híbrida formada pelos sistemas adesivos, com e sem a adição de metacrilato de zinco.
- d) Avaliar o modo de fratura.

2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas sob parecer n° 004/2008 (parecer em anexo).

2.3.2 Incorporação de metacrilato de zinco no *primer* do sistema adesivo autocondicionante

Tabela 1- Descrição dos materiais utilizados.

Nome comercial	Composição (*)	Marca comercial	Lote
Sistema adesivo autocondicionante Clerafil Self-Etching Bond	Primer HEMA*, MDP**, Dimetacrilato hidrófilico, N, N dietanol p-toluidina, Canforoquinona Água	Kuraray Medical Inc., Tokyo, Japan.	51400
	Adesivo HEMA*, MDP**, Bis-GMA***, Dimetacrilato hidrófilico, N, N dietanol p-toluidina, Canforoquinona Sílica coloidal silanizada.		
Metacrilato de Zinco	Metacrilato de zinco 99%	Sigma-Aldrich, Missouri, EUA	1032PD
Resina composta Glacier	Éster metacrilato multifuncional e carga inorgânica	Southern Dental Industries, Bayswater, Victoria, Austrália	050437

Abreviações: *HEMA: 2-hidroxietil metacrilato, **MDP: 10-metacrilóiloxidecil diidrogeno fosfato, ***BisGMA- bisfenol glicidil metacrilato.

Um inibidor de MMPs, metacrilato de zinco, será incorporado a um *primer* de um sistema adesivo autocondicionante comercial, Clearfil Self-Etching Bond (CSE). O metacrilato será adicionado em concentrações de 1% e 5% em massa, utilizando, para tal fim, balança analítica de precisão (Shimadzu modelo AUW-220-D). Para isso, o *primer* do sistema adesivo será dividido em três partes iguais de 0,5 ml cada. As partes serão pesadas em balança

analítica e a massa do metacrilato será determinada de acordo com a massa de cada porção do *primer*, visto que, a massa molar do *primer* não é conhecida. Em seguida, os frascos dos *primers* modificados serão colocados em cuba ultrassônica (Plana TC, CBU 100/ ILDG, Brasil) por 30 min para proporcionar uma mistura homogênea. O pH do primer será mensurado antes e após a modificação por acréscimo das concentrações de MZ com a utilização de pHmetro digital dotado de sonda de pequenas dimensões para mensuração em pequenas alíquotas (Analyon, FM 608, Brasil). Todos os adesivos na forma original e na forma experimental serão realocados em embalagens apropriadas com a presença de códigos de modo que o operador não tenha conhecimento de qual material está aplicando no momento da hibridização.

2.3.3 Obtenção e restauração dos dentes

A coleta de dentes deverá ser realizada imediatamente após a remoção cirúrgica, com prévia autorização do banco de dentes da escola. Os dentes serão armazenados em água destilada em freezer até seu uso, não ultrapassando 3 meses após a extração.

Vinte e oito terceiro molares hígidos serão limpos e a raiz seccionada. O esmalte oclusal será removido através de lixas d'água de SiC (carbeto de silício) com granulação número 180 montadas em uma máquina politriz com abundante irrigação de água. A dentina superficial exposta receberá um polimento com lixas de SiC em sequência decrescente de granulometria (180, 320, 400 e 600) com o objetivo de padronizar a lama dentinária, simulando o desgaste com broca. Os dentes serão lavados e a dentina inspecionada em estereomicroscópio ótico com aumento de 40X para assegurar a ausência de esmalte remanescente na superfície.

Em seguida, a dentina será lavada abundantemente e seca com filtro de papel, então serão aplicados os primers autocondicionante, vigorosamente com agitação por 20s, sobre a dentina seca, de acordo com os diferentes grupos propostos. Um leve jato de ar será aplicado por 5s a uma distância de 10 cm para evaporação do solvente. Em seguida uma fina camada do componente adesivo será aplicada e fotoativada durante 20s com fotopolimerizador tipo LED, Radii® (SDI – Southern Dental Industrer, Austrália) com irradiância de

aproximadamente 1400 mW/cm²). Após a aplicação do sistema adesivo será realizada a aplicação em incrementos de até 2 mm de um compósito restaurador Glacier cor B2 (SDI - Southern Dental Industrier, Austrália) utilizando o tempo de fotoativação de 20s por incremento. Os procedimentos foram realizados de acordo com as recomendações dos fabricantes. Em seguida, as amostras serão seccionadas em forma de palito em cortadeira de precisão (ISOMET 1000, Buheler) e armazenadas em água destilada ou CHX (de acordo com o grupo), a uma temperatura de 37°C por 24h, 6 meses e 12 meses.

2.3.4 Armazenamento

Os palitos confeccionados a partir dos dentes restaurados de acordo com o detalhamento do estudo, serão colocados em água destilada estéril e armazenados em estufa à 37°C, com exceção dos palitos do grupo 4 que será armazenado em solução contendo digluconato de clorexidina 2%, visto que, é um conhecido inibidor de metaloproteinase. O grupo 4 também permanecerá em estufa à 37°C. O meio de armazenamento será trocado semanalmente, para evitar contaminação bacteriana. Além disso, o controle da contaminação será realizado através da turbidez do meio, no qual será realizada a quantificação do inóculo bacteriano através de leitura mensal no espectrofotômetro. Se em algum momento, for observada contaminação do meio, a ele será adicionado um agente antibacteriano.

Os grupos serão armazenados por 24h, 6 meses e 12 meses.

2.3.5 Grupos experimentais

Os grupos experimentais utilizados neste estudo estão descritos na tabela 2. O número de repetições será definido baseado no delineamento adotado pelas metodologias de microtração (artigos publicados em Qualis A Internacional) e com base em um estudo piloto, uma vez que torna-se inviável a realização de cálculo amostral a partir de dados encontrados na literatura, por se tratar de composição inédita até o presente momento (APÊNDICE). Serão utilizados no mínimo 7 dentes por grupo, sendo que a distribuição dos

dentes será realizada de forma aleatória por sorteio. O número de palitos para cada grupo deverá ser no mínimo, igual ou superior a 20 (n=20) sendo esses palitos provenientes de 7 diferentes dentes.

Tabela 2: Disposição dos grupos que serão utilizados na pesquisa.

Grupos	Grupo 1 CSE (controle negativo)	Grupo 2 CSE 1%	Grupo 3 CSE 5%	Grupo CSE CHX (controle positivo)
Primer	<i>Primer</i> autocondicionante sem metacrilato de zinco	<i>Primer</i> autocondicionante contendo 1% de metacrilato de zinco	<i>Primer</i> autocondicionante contendo 5% de metacrilato de zinco	<i>Primer</i> autocondicionante sem metacrilato de zinco
Bond	resina adesiva Clearfil SE Bond	Resina adesiva Clearfil SE Bond	resina adesiva Clearfil SE Bond	resina adesiva Clearfil SE Bond
Armazenamento	Água	água	água	Clorexidina 2%

2.3.6 Ensaio de microtração e análise do modo de fratura

Após armazenagem, os palitos terão suas áreas mensuradas individualmente com auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm, sendo em seguida fixados em um dispositivo próprio para ensaios de microtração, com o auxílio de um adesivo à base de cianocrilato (Super Bonder Gel, Loctite). Os palitos deverão conter em torno de 0,7 mm² de área de secção transversal. As amostras serão tracionadas a uma velocidade de 0,5mm/min com uma célula de carga de 100N, até a fratura em uma máquina de ensaios mecânico (Emic DL500, São José dos Pinhais, PR) e a resistência de união será mensurada (MPa). As amostras fraturadas correspondentes à dentina serão examinadas por meio de microscopia óptica (MO) acoplada em microdurômetro (Futuretech FM, 700), com aumento de 100 e 500 vezes para a determinação do modo de falha de cada amostra. As espécimes representativas de cada tipo de falha serão classificadas em coesivas (adesivo, resina ou dentina), em adesiva e em mistas. Espécimes representativos serão analisados em microscópio eletrônico de varredura.

2.3.7 Tratamento estatístico

De posse dos resultados dos experimentos, o método estatístico mais apropriado será escolhido com base na aderência no modelo de distribuição normal e igualdade de variâncias. Atingindo esses requisitos será utilizado Análise de Variância e teste complementar de Tukey. Durante a realização do estudo piloto, e de posse de dados preliminares será realizado o cálculo amostral que fornecerá o parâmetro de número de repetições que serão utilizadas em cada grupo, de modo obter um poder do teste superior a 0,8. Para todos os testes será considerado o valor $p < 0,05$, como estatisticamente significativo. Para a realização da análise estatística, será utilizado o programa SigmaStat 3.01. (Systat, INC)

2.4 REFERÊNCIAS

BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W. G.; BODDEN, M. K.; WINDSOR, L. J.; BIRKEDAL-HANSEN, B.; DECARLO, A.; ENGLER, J. A. Matrix metalloproteinases: a review **Crit Rev Oral Biol Med**, v.4, n.2, p.197-250, 1993.

BRACKETT, W. W.; TAY, F. R.; BRACKETT, M. G.; DIB, A.; SWORD, R. J.; PASHLEY, D. H. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo **Oper Dent**, v.32, n.2, p.107-111, 2007.

CARRILHO, M. R.; CARVALHO, R. M.; DE GOES, M. F.; DI HIPOLITO, V.; GERALDELI, S.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; TJADERHANE, L. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro **J Dent Res**, v.86, n.1, p.90-94, 2007.

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**, v.84, n.2, p.118-132, 2005.

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

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

DONMEZ, N.; BELL, S.; PASHLEY, D. H.; TAY, F. R. Ultrastructural correlates of in vivo/in vitro bond degradation in self-etch adhesives **J Dent Res**, v.84, n.4, p.355-359, 2005.

GOMIS-RUTH, F. X.; MASKOS, K.; BETZ, M.; BERGNER, A.; HUBER, R.; SUZUKI, K.; YOSHIDA, N.; NAGASE, H.; BREW, K.; BOURENKOV, G. P.; BARTUNIK, H.; BODE, W. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1 **Nature**, v.389, n.6646, p.77-81, 1997.

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

MARTIN-DE LAS HERAS, S.; VALENZUELA, A.; OVERALL, C. M. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine **Arch Oral Biol**, v.45, n.9, p.757-765, 2000.

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

NIKAIDO, T.; KUNZELMANN, K. H.; CHEN, H.; OGATA, M.; HARADA, N.; YAMAGUCHI, S.; COX, C. F.; HICKEL, R.; TAGAMI, J. Evaluation of thermal cycling and mechanical loading on bond strength of a self-etching primer system to dentin **Dent Mater**, v.18, n.3, p.269-275, 2002.

NISHITANI, Y.; YOSHIYAMA, M.; WADGAONKAR, B.; BRESCHI, L.; MANNELLO, F.; MAZZONI, A.; CARVALHO, R. M.; TJADERHANE, L.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives **Eur J Oral Sci**, v.114, n.2, p.160-166, 2006.

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

PEUMANS, M.; KANUMILLI, P.; DE MUNCK, J.; VAN LANDUYT, K.; LAMBRECHTS, P.; VAN MEERBEEK, B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: a systematic review of current clinical trials **Dent Mater**, v.21, n.9, p.864-881, 2005.

REIS, A.; GRANDI, V.; CARLOTTO, L.; BORTOLI, G.; PATZLAFF, R.; RODRIGUES ACCORINTE MDE, L.; DOURADO LOGUERCIO, A. Effect of smear layer thickness and acidity of self-etching solutions on early and long-term bond strength to dentin **J Dent**, v.33, n.7, p.549-559, 2005.

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

SOUZA, A. P.; GERLACH, R. F.; LINE, S. R. Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam **Biomaterials**, v.22, n.14, p.2025-2030, 2001.

STACK, M. S.; ITOH, Y.; YOUNG, T. N.; NAGASE, H. Fluorescence quenching studies of matrix metalloproteinases (MMPs): evidence for structural rearrangement of the proMMP-2/TIMP-2 complex upon mercurial activation **Arch Biochem Biophys**, v.333, n.1, p.163-169, 1996.

TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Have dentin adhesives become too hydrophilic? **J Can Dent Assoc**, v.69, n.11, p.726-731, 2003.

TJADERHANE, L.; LARJAVA, H.; SORSA, T.; UITTO, V. J.; LARMAS, M.; SALO, T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions **J Dent Res**, v.77, n.8, p.1622-1629, 1998.

TRYGGVASON, K.; HOYHTYA, M.; PYKE, C. Type IV collagenases in invasive tumors **Breast Cancer Res Treat**, v.24, n.3, p.209-218, 1993.

VAN MEERBEEK, B.; VAN LANDUYT, K.; DE MUNCK, J.; HASHIMOTO, M.; PEUMANS, M.; LAMBRECHTS, P.; YOSHIDA, Y.; INOUE, S.; SUZUKI, K. Technique-sensitivity of contemporary adhesives **Dent Mater J**, v.24, n.1, p.1-13, 2005.

YIU, C. K.; PASHLEY, E. L.; HIRAISHI, N.; KING, N. M.; GORACCI, C.; FERRARI, M.; CARVALHO, R. M.; PASHLEY, D. H.; TAY, F. R. Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation **Biomaterials**, v.26, n.34, p.6863-6872, 2005.

2.5. ORÇAMENTO

Quadro 1. Orçamento previsto para viabilização do projeto.

Descrição	Quantidade	Custo (unidade)	Custo (total)
Adesivo Clearfil SE Bond	2 um	R\$ 110,00	R\$220,00
Metacrilato de zinco	1 um	R\$ 150,00	R\$ 150,00
Compósito restaurador	4 um	R\$ 50,00	R\$ 200,00
Cera pegajosa em bastão	2 cx	R\$ 25,00	R\$ 50,00
Digluconato de Clorexidina 2%	500 ml	R\$ 20,00	R\$ 20,00
Disco de precisão para corte	1 um	R\$ 1.600,00	R\$ 1.600,00
Impressões	10 um	R\$ 50,00	R\$ 500,00
Lixas para desgaste (#600)	30 um	R\$ 1,00	R\$ 30,00
Luvras para procedimento	1 cx	R\$ 12,00	R\$ 12,00
Pincel descartável	1 cx	R\$ 10,00	R\$ 10,00
Serviço de revisão do inglês	2 revisão	R\$ 200,00	R\$ 400,00
Inscrições em congressos	5 um	R\$ 100,00	R\$ 500,00
		Total	R\$ 3692,00

Quadro 2: Equipamentos necessários já disponíveis para pesquisa.

Descrição	Quantidade	Custo (un)	Custo (total)
Máquina de ensaio universal	1	R\$ 45,000,00	R\$ 45,000,00
Microscópio eletônico de varredura	1	R\$ 290,000,00	R\$ 290,000,00
Cortadeira de precisão (ISOMET 1000)	1	R\$ 45,000,00	R\$ 45,000,00
Aparelho fotopolimerizador do tipo LED Raddi	1	R\$1350,00	R\$ 1350,00
		Total	R\$ 381.350,00

Esse projeto será custeado com recurso CNPq, edital Universal, processo N° 478731/2007-8.

2.6. CRONOGRAMA

Quadro 2. Cronograma de execução do projeto.

Mês/Ano	Revisão de literatura	Qualificação	Teste piloto	Testes laboratoriais	Resultados e análise estatística	Redação	Defesa	Submissão do artigo
Dez/2007	X							
Jan/2008	X							
Fev/2008	X							
Mar/2008	X							
Abr/2008	X		X					
Mai/2008	X	X		X				
Jun/2008	X			X	X	X		
Jul/2008	X					X		
Ago/2008	X							
Set/2008	X							X
Out/2008	X							
Nov/2008								
Dez/2008	X							
Jan/2009	X			X	X			
Fev/2009	X							
Mar/2009	X							
Abr/2009	X							
Mai/2009	X							
Jun/2009	X							
Jul/2009	X			X	X			
Ago/2009	X					X	X	
Set/2009	X							X

3. ARTIGO *

Title: The effect of zinc methacrylate addition on bond strength and cytotoxicity of a self etching primer

Authors: Sandrina Henn^a, Adriana Fernandes da Silva^a, Evandro Piva^{a§}.

Institutional affiliations:

^a Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

§Corresponding author: Evandro Piva

CDC-Bio, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, RS, Brazil.

Rua Gonçalves Chaves, 457, Pelotas, RS, Brasil.

CEP: 96015-560. Tel/Fax: +55-53-3222-6690.

E-mail: piva@ufpel.edu.br (Evandro Piva)

***Nota:** A formatação do artigo foi baseada nas normas do periódico Acta Biomaterialia disponível no site

http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/702994/authorinstructions

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of zinc methacrylate (ZM) as a matrix metalloproteinase2 (MMP- 2) inhibitor on the microtensile bond strength (μ TBS) and cytotoxicity of a self-etching adhesive system (Clearfil SE Bond – CSE). For mechanical test, the self-etching primer was modified with 1 or 5 % (wt) of ZM, while adhesive system served as control (CSE). Twenty-eight human third molars were randomly assigned into four groups (n=7 teeth per group): CSE, CSE_{ZM1} and CSE_{ZM5} were stored in distilled water and CSE_{CHX} was stored in 2% chlorhexidine digluconate. After restorative procedures, teeth were sectioned to obtain beams, stored at 37° C for 24 hour, 6 and 12 months. After, μ TBS was measured. For cytotoxicity test, mouse fibroblasts (3T3/NIH) were exposed to extracts of three different primers (CSE, CSE_{ZM1} and CSE_{ZM5}) for 12 and 24h. Medium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) as used as control. The cell was plated (2×10^4 /well) in two 96 round-bottomed tissue culture plates. The MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was used to asses cell metabolic function by mitochondrial dehydrogenase activity. The absorption at 570nm was determined spectrophotometrically. Data of μ TBS were analyzed by One-Way Anova and Tukey test ($\alpha=0.05$). Control group show similar μ TBS after storage times. The CSE_{ZM5} disclosed a decrease of bond strength after six moth storage and statistically lower μ TBS means when compared with control group ($p<0.05$) Cytotoxicity was analyzed using Kruskal-Wallis test and Sudent-Newmans-Keuls method. There was a reduction in cell viability after exposure in all tested groups when compared to the Control. However, cytotoxicity of CSE_{ZM1} and CSE_{ZM5} were lower than CSE. The addition of zinc methacrylate on self-etching primer or storage in chlorhexidine may negatively affect μ TBS of CSE. However, cytotoxicity of the commercial primer may decreased with ZM addition.

Keywords

matrix metalloproteinase; microtensile bond strength; self-etching adhesive; zinc methacrylate; cytotoxicity

1. Introduction

The immediate bonding effectiveness of contemporary adhesive systems may be considered favourable [1]. However, in long-term evaluations, the bond strength of various adhesive systems dramatically diminishes [1] especially in simplified adhesive systems based on self-etching primers [2].

Chemical and mechanical factors are responsible for the degradation of adhesive bond strength. Water sorption by hydrophilic monomers present in contemporary self-etching adhesive systems [3] dentin fluid movement [4] smear layer undergoes fatigue load stress [5] and presence of solvent when partially volatilized are well-known characteristics in adhesive systems that lead to adverse effects on polymerization of the adhesive monomers [6].

Despite the chemical degradation of the smear layer [7], it has been suggested that collagen degradation is related to the presence of an enzyme, the matrix metalloproteinase (MMP) [8, 9]. The matrix metalloproteinase family (MMPs) is zinc dependent proteinases with a role in degradation of collagen and extracellular matrix components [10]. Also, the matrix metalloproteinases are involved in enamel and dentine formation. After mineralization, MMPs could be trapped in the mineralization phase bound to matrix components or to hydroxyapatite crystals, indeed remaining inactive [11].

However, some stimuli are capable of activating these enzymes. Mild acids are known to activate matrix metalloproteinase. The pH levels present in bone resorption lacunae and dental caries lesions are sufficient to activate the latent MMPs [12]. Self-etching adhesives may activate latent MMP and increase the activity to near-maximum levels and contribute to the degradation of resin-dentin bonds over time [8, 13, 14]. Thus, the inhibition may prevent collagen degradation in resin-dentin bond, thereby improving their longevity [9].

The proteolytic activity of the human matrix metalloproteinase is regulated by endogenous tissue inhibitors of MMP (TIMPs) [15]. Chlorhexidine also inhibits the MMP activity near zero-levels [9]. *In vivo* studies suggest that the application of chlorhexidine after acid-etched dentin prior to the use of total-etch adhesives may prevent the degradation of hybrid layers [16-18].

Additionally, it is known that the activity of oral tissue MMPs may be modulated by materials containing zinc [19-21]. A zinc, containing monomer,

Zinc methacrylate, has demonstrated inhibition of MMP [22] A feasible alternative is to include MMP inhibitors in self-etching adhesives to inhibit the enzymes immediately after they are exposed. Zinc methacrylate count a functional methacrylate group, also found in other monomers present in adhesive systems, with a highly promising possibility of use as a copolymerizable material with the other methacrylate monomers. Thus, the incorporation of zinc methacrylate is not expected to increase the cytotoxicity effect, since polymerized dental resin materials usually release residual monomers that may interact with pulp tissues [23].

Thus the aim of this study was to evaluate the effect of the addition of a matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) inhibitor, zinc methacrylate, in a commercial self-etching primer, Clearfil SE Bond, on the microtensile bond strength (μ TBS) to dentine. The null hypothesis tested was that the addition of a potential inhibitor would not affect bond strength and cytotoxicity of the adhesive system.

2. Materials and methods

2.1. Self-etching primer formulation

Zinc Methacrylate powder (99%, 2-methylprop-2-enoic acid; zinc) was obtained from Aldrich Chemical Co (Aldrich, USA) and was added in weight in self-etching primer of the commercial adhesive Clearfil SE Bond (Kuraray, Japan) in 1 and 5 (wt%) concentrations. The pH of all the materials was recorded using a digital pHMeter (Analion FM 608, Brazil), calibrated in the solutions 1 minute prior to the measurements (Table 1).

2.3 Microtensile bond strength (μ TBS) evaluation

2.3.1 Specimen preparation

Twenty eight freshly human third molar were used in this study. After surgical extraction, teeth were immediately cleaned and stored (-4°C) up to six months (according to ISO TS11403;2003). The study was approved by the Ethical Research Committee of Pelotas School of Dentistry / UFPel, Brazil (protocol 004/2008). The teeth were randomly assigned into four groups with seven teeth. The occlusal enamel was removed to expose a flat superficial

coronal dentin, which was wet polished with 600-grit silicon carbide paper to create a standardized smear layer. The bonding procedures were performed according to manufacturers' instructions. Water from the surface was removed with absorbent paper leaving the surface visibly dried. Thus, the primers were applied as follow: CSE (control-primer – without zinc), CSE_{ZM1} (primer containing zinc methacrylate 1%), CSE_{ZM5} (primer containing 5% zinc methacrylate) and CSE_{CHX} (primer without zinc methacrylate, stored in chlorhexidine). The primer was applied for 20 seconds and gently air-dried for 10s. One coat of a bond was applied and light-activated for 20 seconds with a LED light curing unit (Radii, SDI, Australia) set at a power of 1400 mW/cm² during the experiment (Ophir Optronics, MA, USA).

Composite resin was placed in increments (2 mm) and light-activated for 40 seconds each increment to built up a 4mm-height crown of resin composite (Glacier, SDI, Germany). The specimens were stored at 37°C in sterile distilled water or 2% solution of chlorhexidine digluconate (group CSE_{CHX}) for 24h. Following storage, the restored teeth were sectioned in two perpendicular directions to the bonded interface using a cooled diamond saw in a low-speed precision cutter (Isomet 1000, Buehler, USA), yielding approximately ten beams per tooth with a cross-sectional surface area of approximately 0.7 mm². Measurement of the bonding area was carry out using a digital caliper (Mitutoyo, Japan). The beams were kept in distilled and sterile water or 2% solution of chlorhexidine digluconate for 24h, 6 or 12 months. The solution was changed once a week to avoid bacterial contamination.

2.3.2 Microtensile bond strength evaluation and fracture analysis

The microtensile bond strength test (μ TBS) was performed in a mechanical testing machine (Model DL500, EMIC, Brazil), at a cross-head speed of 0.5 mm/min until failure. Twenty beams were tested for each group. The bond strength values were calculated in MPa.

Half of the beams corresponding to the dentine in each beam was removed from the microtensile device and evaluated under a light microscope (Futuretech, Japan) at 100X and 500X magnification. The failure modes were

classified as follows: adhesive failure, cohesive failure (in dentine, in adhesive or composite) or mixed failure.

2.4 Cytotoxicity assay

2.4.1 Cell Culture

Mouse embryonic fibroblasts cells line (NIH/3T3) was purchased from the RJCB Collection (Rio de Janeiro Cell Bank, Rio de Janeiro, Brazil. The cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, - Gibco™, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, - Gibco™, NY, USA) and 1% antibiotic-antimycotic solution (Sigma Chemical Co, St Louis, MO) and maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Before the cytotoxicity test (MTT assay), cells were trypsinized and plated (2×10^4 /well) in 96-well round-bottomed tissue culture plates, and maintained for one day in a humidified air 5% CO₂ atmosphere at 37°C. The study was carried out according to the principles of the Declaration of Helsinki and with the approval of the Human Research Ethics Committee.

2.4.2 Cytotoxicity assay (MTT assay)

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to assess cell metabolic function by mitochondrial dehydrogenase activity. The primers were dissolved using 0.5% of dimethyl sulfoxide (DMSO, Vetec®), and supplement with DMEM and 10% FBS to obtain the final extracts. Primer without zinc methacrilate was used as control. After incubation of 24 h, the media was removed and replaced with 200 µL of the extracts and maintained in a humidified air 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Cytotoxicity produced by different primers containing 1 or 5% of zinc methacrilate were assessed at 12 and 24 h cell exposure time. After removing the extracts, 180 µL of medium supplemented with 10% FBS and 20 µL of MTT solution (5 mg of MTT/mL PBS) was added to each well. After 5 h of incubation at 37°C in darkness the blue formazan precipitate was extracted from the

mitochondria using 200 μ L/well DMSO on a shaker for 5 minutes at 150 rpm. The absorption at 570 nm was determined spectrophotometrically.

Statistical Analysis

Data were submitted to Normality Test and Equal variance test ($p < 0.05$ indicates rejection) as conditional requisite for parametric statistics (Sigma Stat 3.01, Systat Inc, IL, USA). The significance level for all statistical tests was set at $p < 0.05$. Microtensile bond strength means were compared using One-Way ANOVA and Tukey's test. Kruskal-Wallis non-parametric test and Student-Newmans-Keuls method (Post-Hoc test) were used to compare median values of cytotoxicity test.

3. Results

3.1 μ TBS evaluation

Comparisons of the μ TBS means of groups used in this study are showed in Table 2.

Analysis of variance showed that groups with addition of zinc methacrylate on the self-etching primer showed lower bond strength were found after 6 and 12 months storage when compared with control group. CSE_{ZM5} showed statistically lower μ TBS than groups $CSE_{control}$, CSE_{ZM1} and CSE_{CHX} . ($p < 0.05$). The μ TBS of group CSE_{ZM5} showed a statistically significant decrease after 6 months storage time ($p < 0.05$).

3.2 Optical Microscopy fractographic analysis

The modes of failure are shown in figure 1. Analysis of the surfaces fractured during the microtensile bond strength test after 12 months of storage, showed mixed failures and adhesive failures for all groups, however the group CSE_{ZM5} presented predominance of adhesive failures.

3.3 Cytotoxicity test

The effect of mitochondrial reducing activity after cell contact with the extracts for 12 and 24 hours are presented in Table 3. Kruskal-Wallis Analysis of variance on ranks showed statistically significant differences between groups ($p < 0.001$). The cell viability after exposing mouse's fibroblasts 3T3/NIH to the extracts of group CSE_{ZM1} and CSE_{ZM5} when compared to CSE, commercial adhesive was statistically higher ($p < 0.05$) in 12h incubation time (Student Newman-Keuls method).

4. Discussion

4.1 Bond strenght

The combined degradation of resin and collagen have been considered the main factor responsible for the further degraded dental bonding strength [24]. The detrimental process related to dental bonding adhesives is well known and can be attributed to the acidity required for dentine infiltration of simplified adhesive systems [1, 25]. Notwithstanding that studies have shown the contributions of host-derived proteinases, a matrix metalloproteinase, in dentine bonding degradation [9] the inhibition of these enzymes may theoretically prevent the degradation of hybrid layers, corroborating for the longevity of the adhesive restorations [9].

Studies have been indicating the viability of short-term application of chlorhexidine to acid-etched dentine prior to hybridization with dental adhesives, advocating that chlorhexidine arrests degradation of collagens fibrils in dentine hybrid layer [16-18, 26]. However, until now, it is not clear how durable the MMP inhibition is after dentine treatment with chlorhexidine *in vivo*. The incorporation of MMPs inhibitors as an attempt to provide long-term inhibition of MMPs can be a reasonable strategy to be investigated.

Self-etching primers are known MMP activators, as it is sufficiently acid to activate MMP in dentine [8]. On the other hand a recent study showed that some adhesive monomers may have active role in MMP inhibition, since MMP-2 were inhibited by HEMA in a dose-dependent manner [27]. The efforts to incorporate MMP inhibitors in self-etching primer of Clearfil SE can be considered viable if there is a inhibition of the enzymes as they are activated,

preventing the degradation of the collagen and increasing the longevity of resin monomers. However, incorporation of MMPs inhibitors makes sense only if properties like mechanical strength, chemical stability and cytotoxicity are not dramatically affected in adhesive systems. Strategies in development of new dentine adhesives should consider that chlorhexidine cannot be stabilized in the polymer matrix due to the hydrophilicity of the molecule, while Zinc methacrylate has one functionalized molecular ending that can be integrated with methacrylates after resin polymerization.

Zinc is a known inhibitor of human gelatinases (MMP-2 and MMP-9) [19-21], but the mechanism of the enzyme inactivation remains unclear. A study showed that the inhibition is due to the formation of zinc monohydroxide that bridges the catalytic zinc ion to a side chain in the active site of the enzyme [28]. A zinc methacrylate also demonstrated strong inhibition potential of MMP [22]. This monomer possesses a functional methacrylate group also found in other monomers constituents of the adhesive system. This is the rationale why it can be capable of copolymerizing with the system in which it was added, resulting in an integrated system. Besides, this monomer showed improved degree of conversion [29]. Yet, zinc methacrylate addition would not influence the mechanical properties of the adhesive system.

The null hypothesis tested was rejected since the addition of zinc methacrylate affected microtensile bond strength and cytotoxicity of self-etching adhesive. The presence of zinc methacrylate can hinder the acid monomers infiltration and dentin demineralization, due to the high concentration used. The concentrations were chosen due to previous studies that revealed the potential inhibition [22] and did not influence the ultimate tensile strength considering these concentrations. Lower concentrations have been used and may not decrease the bond strength. Therefore, considering experimental groups our results corroborate the theory that the major factor affecting durability *in vivo* is still the hydrolysis of the interface components [1, 30].

It can be hypothesised is that zinc methacrylate in the used concentrations considerably affect the effectiveness of water as solvent in the primer. In the self-etching primers, water is extremely important because the demineralization of dentine is induced by the hydrated hydrogen ion (hydroniumion H_3O^+) [31]. In the absence of water, this ion cannot be formed.

Water is essential to ionize the acid functional groups of self-etching adhesive monomers [32]. Likewise, the water concentration present in the primer solvent exerts a significant influence on the bond strength in the self-etching adhesive system [31].

Moreover, the ZM added might have increased primer viscosity, decreasing its moisturizing capacity. A correct monomer dispersion through dentine is mandatory for a successful adhesion [33]. The higher the substrate moisture, the higher will be the probability of obtaining an effective adhesion [34]. Additionally, zinc methacrylate is a hydrophobic monomer (Sigma-Aldrich), which is a contributing factor in the reduction of the amount of hydrophilic monomers. The decrease of moisture and the reduction of hydrophilic monomers hinder substrate penetration of modified primers.

In this study, a group was stored in 2% chlorhexidine digluconate solution in order to investigate the effect of chlorhexidine in permanent contact with dentine hybrid layers *in vitro*. In this study, the results of group stored in CHX after six months revealed reduced μ TBS compared with CSE group (control). Despite differences among *in vivo* and *in vitro* models, our findings suggest that the contact with chlorhexidine did not improve bond strength for adhesive systems used as previously suggested [16-18, 26]. It is known that Clearfil SE Bond is a two-step mild self-etching adhesive that has shown stability of bond strength after a storage of one year [30,35] when investigated in microtensile bond tests. In addition, bonding mechanism of Clearfil SE Bond was suggested to result from the simultaneous demineralization and infiltration of enamel and dentine which allow uniform hybridization decreasing exposure of collagen fibrils without further infiltration of monomers as found in total etching technique. Thus, availability of chlorhexidine simulated in one group (ie. storage of beams in CHX solution) did not result in a benefit over microtensile bond strength.

Other important factor to be discussed is the pH of the self etching primer. Contemporary self-etching systems may be classified as mild, moderate and aggressive based on their ability to penetrate dentine smear layers and their depth of demineralization into the subsurface dentin. In this study, the pH increased after addition of 1% (2.35) and 5% (2.69) zinc methacrylate when compared with commercial Clearfil SE Bond (2.27). However, all values may still be considered into the classification of mildly or moderate acidic [36]. The small

increase in pH might have influenced the decreased bond strength, since as higher the pH, smaller the depth of penetration into the surface dentin (μm) [36].

4.2 Cytotoxicity

Regarding cytotoxicity, the present findings suggest that the addition of 5% zinc methacrylate in self etching primer present less cytotoxic effect when compared with commercial Clearfil SE Bond. Previous data showed that ZM in a 5% concentration improves the degree of conversion when incorporated in bond bottle of CSE [29]. Probably the increase of conversion degree will improve reticulation and linking of citotoxic components (i.e. HEMA and acidic monomers). However it is important to highlight that the addition of 5%wt of ZM resulted in a decrease of bond strength when compared with control and during the storage period. Additionally, the predominant failure pattern found in that group was an adhesive failure, which means that bonding resin does not fill the requirements for a safe clinical use.

Considering the target of desired long-term adhesion to tooth tissues [1] the inclusion of the MMP inhibitor, zinc methacrylate in the concentration used in the study, did not contribute to an increased durability of the bond strength. It seems rational to understand that efforts in investigations of biological effects of dental polymers also require advances in chemical stability of adhesive systems. News studies are necessary to evaluate the effect of MMP inhibition potential *in vitro* and *in vivo* and the real effect over clinical longevity of adhesive restorations.

5. Conclusion

These findings showed that addition of zinc methacrylate or storage in chlorhexidine may negatively affect bond strength of this commercial self-etching adhesive system. However, the cytotoxicity of a commercially available primer was decreased with the addition of zinc methacrylate.

Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the scholarship and to Esstech Inc for the donation of the reagents.

References

1. 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.
2. Reis A, Grandi V, Carlotto L, Bortoli G, Patzlaff R, Rodrigues Accorinte Mde L, Dourado Loguercio A: Effect of smear layer thickness and acidity of self-etching solutions on early and long-term bond strength to dentin. *J Dent* 2005;33:549-559.
3. Tay FR, Pashley DH: Have dentin adhesives become too hydrophilic? *J Can Dent Assoc* 2003;69:726-731.
4. Purk JH, Dusevich V, Glaros A, Spencer P, Eick JD: In vivo versus in vitro microtensile bond strength of axial versus gingival cavity preparation walls in Class II resin-based composite restorations. *J Am Dent Assoc* 2004;135:185-193; quiz 228.
5. Nikaido T, Kunzelmann KH, Chen H, Ogata M, Harada N, Yamaguchi S, Cox CF, Hickel R, Tagami J: Evaluation of thermal cycling and mechanical loading on bond strength of a self-etching primer system to dentin. *Dent Mater* 2002;18:269-275.
6. Yiu CK, Pashley EL, Hiraishi N, King NM, Goracci C, Ferrari M, Carvalho RM, Pashley DH, Tay FR: Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation. *Biomaterials* 2005;26:6863-6872.
7. Gopferich A: Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 1996;17:103-114.
8. 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.

9. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S: Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004;83:216-221.
10. Stack MS, Itoh Y, Young TN, Nagase H: Fluorescence quenching studies of matrix metalloproteinases (MMPs): evidence for structural rearrangement of the proMMP-2/TIMP-2 complex upon mercurial activation. *Arch Biochem Biophys* 1996;333:163-169.
11. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM: The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol* 2000;45:757-765.
12. 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.
13. Lehmann N, Debret R, Romeas 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.
14. 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.
15. Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, Nagase H, Brew K, Bourenkov GP, Bartunik H, Bode W: Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 1997;389:77-81.
16. 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.
17. Carrilho MR, Geraldeli S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjaderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley D: In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007;86:529-533.
18. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH: The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Oper Dent* 2007;32:107-111.
19. de Souza AP, Gerlach RF, Line SR: Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater* 2000;16:103-108.

20. Souza AP, Gerlach RF, Line SR: Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. *Biomaterials* 2001;22:2025-2030.
21. Santos MC, de Souza AP, Gerlach RF, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Line SR: Inhibition of human pulpal gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by zinc oxide cements. *J Oral Rehabil* 2004;31:660-664.
22. Henn S CRV, Ogliari FA, Souza Prado A P, Line S R P, Etges A, Silva A F, Piva E: Caracterização de um polímero contendo zinco com capacidade de inibição de metaloproteinase da matriz 2. *Brazilian Oral Research* 2007;21:313.
23. Demirci M, Hiller KA, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H: The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mater* 2008;24:362-371.
24. 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.
25. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E: Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater* 2008;24:90-101.
26. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipolito V, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH, Tjaderhane L: Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res* 2007;86:90-94.
27. Carvalho RV, Ogliari FA, de Souza AP, Silva AF, Petzhold CL, Line SR, Piva E, Etges A: 2-hydroxyethyl methacrylate as an inhibitor of matrix metalloproteinase-2. *Eur J Oral Sci* 2009;117:64-67.
28. Larsen KS, Auld DS: Characterization of an inhibitory metal binding site in carboxypeptidase A. *Biochemistry* 1991;30:2613-2618.
29. Nedel F HS, Begnini K, Carvalho RV, Etges A, Piva E, Demarco F: Avaliação da incorporação de um inibidor de metaloproteinase na citotoxicidade e no grau de conversão de uma resina adesiva experimental. *Brazilian Oral Research* 2008;22:124
30. Donmez N, Belli S, Pashley DH, Tay FR: Ultrastructural correlates of in vivo/in vitro bond degradation in self-etch adhesives. *J Dent Res* 2005;84:355-359.

31. Lima Gda S, Ogliari FA, da Silva EO, Ely C, Demarco FF, Carreno NL, Petzhold CL, Piva E: Influence of water concentration in an experimental self-etching primer on the bond strength to dentin. *J Adhes Dent* 2008;10:167-172.
32. Hiraishi N, Nishiyama N, Ikemura K, Yau JY, King NM, Tagami J, Pashley DH, Tay FR: Water concentration in self-etching primers affects their aggressiveness and bonding efficacy to dentin. *J Dent Res* 2005;84:653-658.
33. Pashley NNDH: *Hybridization of Dental Hard Tissues*, ed Quintencensse Publishing 2000.
34. Alessandra Reis ADL: *Materiais Dentários Testauradores Diretos - dos fundametos à aplicação Clínica*, Santos, 2007.
35. Abdalla AI, Feilzer AJ: Four-year water degradation of a total-etch and two self-etching adhesives bonded to dentin. *J Dent* 2008;36:611-617.
36. Tay FR, Pashley DH: Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater* 2001;17:296-308.

Table 1

Design of study, composition, storage media and pH of groups.

Adhesive Systems	Groups			
	CSE	CSE_{ZM1}	CSE_{ZM5}	CSE_{CHX}
Primer¹	Clearfil SE Primer	Clearfil SE Primer + 1% ZM	Clearfil SE Primer + 5% ZM	Clearfil SE Primer
Bond²	Clearfil SE Bond	Clearfil SE Bond	Clearfil SE Bond	Clearfil SE Bond
Storage media	water	water	water	chlorhexidine*
Primer pH	2.27	2.35	2.69	2.27

ZM: zinc methacrylate; CSE: Clearfil SE; pH: potential hydrogenyonic. * 2% digluconate chlorhexidine. 1- Composition of CSE Primer; Dimethacrylate monomer, 2-hydroxylethyl methacrylate, water, 2- composition of Bond of CSE; 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate, 2-hydroxylethyl methacrylate, bis-GMA, hydrophobic dimethacrylates, submicron silica fillers, *N,N*-diethanol-*p*-toluidine, CQ (Batch number 51400)

Table 2

Microtensile bond strength (μ TBS) means in MPa ($\pm$ S.D.).

Groups	Storage time					
	24 hours		6 months		12 months	
CSE _{control}	41.0 (14.9)	a	54.9 (21.9)	a	41.6 (21.4)	a
CSE _{ZM1}	34.2 (14.5)	ab	35.9 (19.7)	b	24.6 (14.3)	bc
CSE _{ZM5}	* 24.4 (7.1)	b	16.1 (16.5)	c	16.2 (15.7)	c
CSE _{CHX}	37.4 (12.8)	a	36.7 (17)	b	31.8 (13.3)	ab

Asterisk represents that group has statistically higher mean in line ($p < 0.05$), comparisons between times for CSE_{ZM5} were made using Kruskal-Wallis and Tukey's Test. Different letters in columns represent differences statistically significant ($p < 0.05$) between means (One-Way Anova and Tukey's test). S.D.= standard deviation.

Table 3

Absorbancy median values of cytotoxicity test .

Grupos	Tempo de exposição	
	12h	24h
**DMEM (control)	1.944 a	* 2.447 a
CSE	0.196 d	* 0.212 c
CSE _{ZM1}	0.205 c	0.220 c
CSE _{ZM5}	0.357 b	0.324 b

Diferentes letras na mesma coluna são estatisticamente diferentes de acordo com Kruskal-Wallis e teste SNK. ($p > 0.05$). Asteriscos representam diferença significativa na mesma linha. **DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

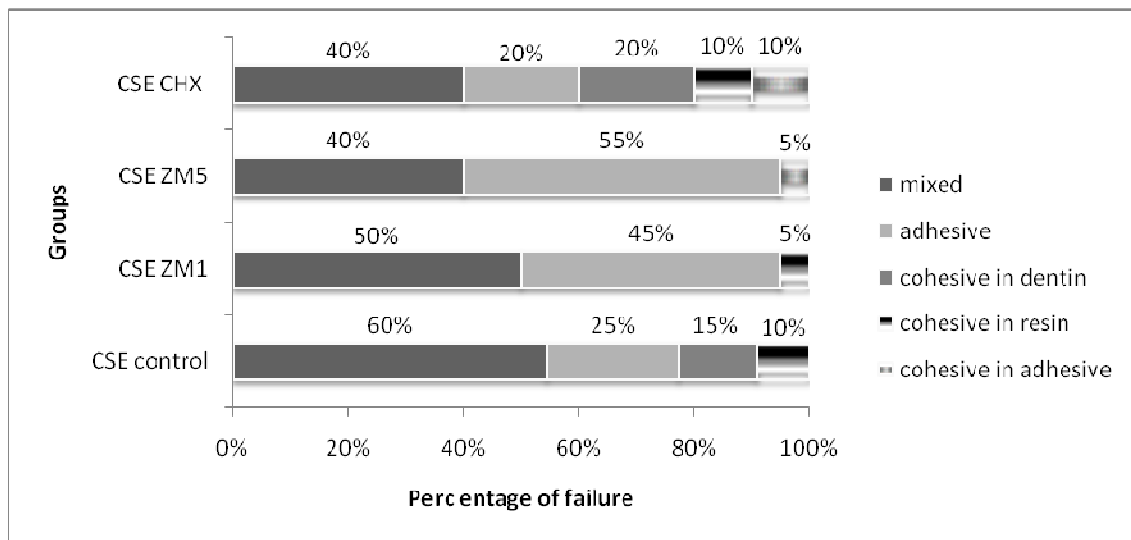


Figure 1: Failure pattern according to s tested groups in tension after a 12-month storage.

4. REFERÊNCIAS

ABDALLA AI, FEILZER AJ. Four-year water degradation of a total-etch and two self-etching adhesives bonded to dentin. **J Dent**; v.36: p.611-617, 2008

ALESSANDRA R, LOGUERCIO AD. Materiais Dentários Testadores Diretos - dos fundamentos à aplicação Clínica, **Santos** ed, 2007.

BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W. G.; BODDEN, M. K.; WINDSOR, L. J.; BIRKEDAL-HANSEN, B.; DECARLO, A.; ENGLER, J. A. Matrix metalloproteinases: a review **Crit Rev Oral Biol Med**, v.4, n.2, p.197-250, 1993.

BODE, W.; MASKOS, K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases **Biol Chem**, v.384, n.6, p.863-872, 2003.

BRACKETT, W. W.; TAY, F. R.; BRACKETT, M. G.; DIB, A.; SWORD, R. J.; PASHLEY, D. H. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo **Oper Dent**, v.32, n.2, p.107-111, 2007.

BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; RUGGERI, A.; CADENARO, M.; DI LENARDA, R.; DE STEFANO DORIGO, E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface **Dent Mater**, v.24, n.1, p.90-101, 2008.

CARRILHO, M. R.; CARVALHO, R. M.; DE GOES, M. F.; DI HIPOLITO, V.; GERALDELI, S.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; TJADERHANE, L. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro **J Dent Res**, v.86, n.1, p.90-94, 2007.

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

CARVALHO RV, OGLIARI FA, DE SOUZA AP, SILVA AF, PETZHOLD CL, LINE SR, PIVA E, ETGES A: 2-hydroxyethyl methacrylate as an inhibitor of matrix metalloproteinase-2. *Eur J Oral Sci* 2009;117:64-67.

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**, v.84, n.2, p.118-132, 2005.

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

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

DEMIRCI, M.; HILLER, K. A.; BOSL, C.; GALLER, K.; SCHMALZ, G.; SCHWEIKL, H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives **Dent Mater**, v.24, n.3, p.362-371, 2008.

DONMEZ, N.; BELLI, S.; PASHLEY, D. H.; TAY, F. R. Ultrastructural correlates of in vivo/in vitro bond degradation in self-etch adhesives **J Dent Res**, v.84, n.4, p.355-359, 2005.

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

GOMIS-RUTH, F. X.; MASKOS, K.; BETZ, M.; BERGNER, A.; HUBER, R.; SUZUKI, K.; YOSHIDA, N.; NAGASE, H.; BREW, K.; BOURENKOV, G. P.; BARTUNIK, H.; BODE, W. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1 **Nature**, v.389, n.6646, p.77-81, 1997.

GOPFERICH A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. **Biomater**, v.17, p.103-114, 1996;

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

HENN S, C. R. V., OGLIARI FA, SOUZA PRADO A P, LINE S R P, ETGES A, SILVA A F, PIVA E Caracterização de um polímero contendo zinco com capacidade de inibição de metaloproteínase da matriz 2 **Brazilian Oral Research**, v.21, n.1, p.313, 2007.

HIRAISHI N, NISHIYAMA N, IKEMURA K, YAU JY, KING NM, TAGAMI J, PASHLEY DH, TAY FR Water concentration in self-etching primers affects their aggressiveness and bonding efficacy to dentin. **J Dent Res** v.84, p.653-658, 2005.

LARSEN KS, AULD DS Characterization of an inhibitory metal binding site in carboxypeptidase A. **Biochemistry** v.30, p.2613-2618, 1991.

LEHMANN, N.; DEBRET, R.; ROMEAS, 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**, v.88, n.1, p.77-82, 2009.

LIMA GDA S, OGLIARI FA, DA SILVA EO, ELY C, DEMARCO FF, CARRENO NL, PETZHOLD CL, PIVA E: Influence of water concentration in an experimental self-etching primer on the bond strength to dentin. **J Adhes Dent** 2008;10:167-172.

MARTIN-DE LAS HERAS, S.; VALENZUELA, A.; OVERALL, C. M. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine **Arch Oral Biol**, v.45, n.9, p.757-765, 2000.

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

NEDEL F, HENN S, BEGNINI K, CARVALHO RV, ETGES A, PIVA E, DEMARCO F Avaliação da incorporação de um inibidor de metaloproteinase na citotoxicidade e no grau de conversão de uma resina adesiva experimental. **Braz Oral Res**, v.22, p.124, 2008.

NIKAIDO, T.; KUNZELMANN, K. H.; CHEN, H.; OGATA, M.; HARADA, N.; YAMAGUCHI, S.; COX, C. F.; HICKEL, R.; TAGAMI, J. Evaluation of thermal cycling and mechanical loading on bond strength of a self-etching primer system to dentin **Dent Mater**, v.18, n.3, p.269-275, 2002.

NISHITANI, Y.; YOSHIYAMA, M.; WADGAONKAR, B.; BRESCHI, L.; MANNELLO, F.; MAZZONI, A.; CARVALHO, R. M.; TJADERHANE, L.; TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives **Eur J Oral Sci**, v.114, n.2, p.160-166, 2006.

PASHLEY, D. H. Hybridization of Dental Hard Tissues, ed Quintencensse Publishing 2000.

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

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

PEUMANS, M.; KANUMILLI, P.; DE MUNCK, J.; VAN LANDUYT, K.; LAMBRECHTS, P.; VAN MEERBEEK, B. Clinical effectiveness of contemporary adhesives: a systematic review of current clinical trials **Dent Mater**, v.21, n.9, p.864-881, 2005.

PURK JH, DUSEVICH V, GLAROS A, SPENCER P, EICK JD. In vivo versus in vitro microtensile bond strength of axial versus gingival cavity preparation walls

in Class II resin-based composite restorations. **J Am Dent Assoc** v.135, p.185-193, quiz 228, 2004.

RAFFETTO, J. D.; ROSS, R. L.; KHALIL, R. A. Matrix metalloproteinase 2-induced venous dilation via hyperpolarization and activation of K⁺ channels: relevance to varicose vein formation **J Vasc Surg**, v.45, n.2, p.373-380, 2007.

REIS A, GRANDI V, CARLOTTO L, BORTOLI G, PATZLAFF R, RODRIGUES ACCORINTE MDE L, DOURADO LOGUERCIO A Effect of smear layer thickness and acidity of self-etching solutions on early and long-term bond strength to dentin. **J Dent** v.33, p.549-559, 2005.

REIS, A.; GRANDI, V.; CARLOTTO, L.; BORTOLI, G.; PATZLAFF, R.; RODRIGUES ACCORINTE MDE, L.; DOURADO LOGUERCIO, A. Effect of smear layer thickness and acidity of self-etching solutions on early and long-term bond strength to dentin **J Dent**, v.33, n.7, p.549-559, 2005.

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

SOUZA, A. P.; GERLACH, R. F.; LINE, S. R. Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam **Biomaterials**, v.22, n.14, p.2025-2030, 2001.

STACK, M. S.; ITOH, Y.; YOUNG, T. N.; NAGASE, H. Fluorescence quenching studies of matrix metalloproteinases (MMPs): evidence for structural rearrangement of the proMMP-2/TIMP-2 complex upon mercurial activation **Arch Biochem Biophys**, v.333, n.1, p.163-169, 1996.

TAY FR, PASHLEY DH Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. **Dent Mater**, v.17, p.296-308, 2001.

TAY, F. R.; PASHLEY, D. H. Have dentin adhesives become too hydrophilic? **J Can Dent Assoc**, v.69, n.11, p.726-731, 2003.

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

TJADERHANE, L.; LARJAVA, H.; SORSA, T.; UITTO, V. J.; LARMAS, M.; SALO, T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions **J Dent Res**, v.77, n.8, p.1622-1629, 1998.

TRYGGVASON, K.; HOYHTYA, M.; PYKE, C. Type IV collagenases in invasive tumors **Breast Cancer Res Treat**, v.24, n.3, p.209-218, 1993.

VAN MEERBEEK, B.; VAN LANDUYT, K.; DE MUNCK, J.; HASHIMOTO, M.; PEUMANS, M.; LAMBRECHTS, P.; YOSHIDA, Y.; INOUE, S.; SUZUKI, K. Technique-sensitivity of contemporary adhesives **Dent Mater J**, v.24, n.1, p.1-13, 2005.

YIU, C. K.; PASHLEY, E. L.; HIRAISHI, N.; KING, N. M.; GORACCI, C.; FERRARI, M.; CARVALHO, R. M.; PASHLEY, D. H.; TAY, F. R. Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation **Biomaterials**, v.26, n.34, p.6863-6872, 2005.

APÊNDICES

Apêndice A – Distribuição do padrão de falhas dos grupos após armazenamento de 24h (Figura 3) e 6 meses (Figura 4).

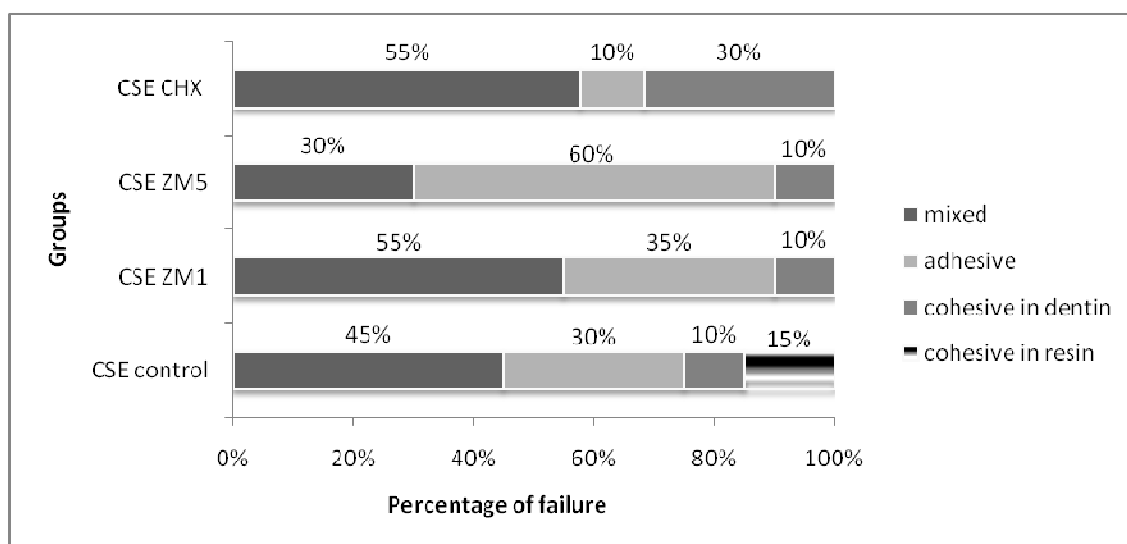


Figure 3: Failure pattern distribution from different groups tested after storage for 24 hours.

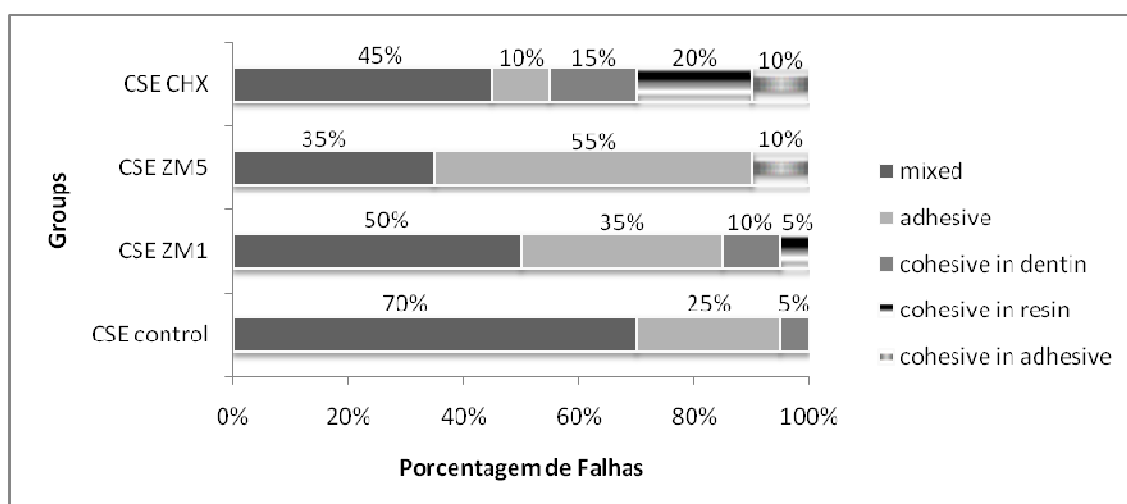


Figure 4: Failure pattern distribution from different groups tested after storage for 6 months.

APÊNDICE B – Relatório da análise estatística.

1. DADOS MICROTRAÇÃO

Descriptive Statistics:

Data source: Dados Microtração

Column	Size	Missing	Mean	Std Dev	Std. Error	C.I. of Mean
CSE24h	20	0	41,026	14,866	3,324	6,958
CSE6m	20	0	54,863	21,934	4,905	10,265
CSE12m	20	0	41,599	21,441	4,794	10,035
CSE24h_1%	20	0	34,220	14,512	3,245	6,792
CSE6m_1%	20	0	35,878	19,671	4,399	9,206
CSE12m_1%	20	0	24,633	14,290	3,195	6,688
CSE24h_5%	20	0	24,381	7,074	1,582	3,311
CSE6m_5%	20	0	16,125	16,542	3,699	7,742
CSE12m_5%	20	0	16,211	15,714	3,514	7,354
CSE24h_CHX	20	0	37,370	12,847	2,873	6,012
CSE6m_CHX	20	0	36,673	17,000	3,801	7,956
CSE12m_CHX	20	0	31,799	13,258	2,965	6,205

Column	Range	Max	Min	Median	25%	75%
CSE24h	53,320	67,220	13,900	44,775	28,820	51,035
CSE6m	84,010	103,330	19,320	51,045	36,890	73,945
CSE12m	61,870	68,390	6,520	44,515	15,635	59,295
CSE24h_1%	53,430	69,270	15,840	33,765	22,385	38,150
CSE6m_1%	69,490	76,360	6,870	33,855	23,965	50,665
CSE12m_1%	50,010	58,500	8,490	23,740	12,555	32,885
CSE24h_5%	27,390	39,420	12,030	24,175	17,320	29,585
CSE6m_5%	53,530	53,560	0,0300	11,185	5,290	19,035
CSE12m_5%	47,250	47,930	0,680	9,500	4,390	29,295
CSE24h_CHX	57,460	71,910	14,450	34,445	31,430	40,875
CSE6m_CHX	54,920	65,570	10,650	34,390	22,745	47,280
CSE12m_CHX	49,060	57,000	7,940	32,345	24,760	40,025

Column	Skewness	Kurtosis	K-S Dist.	K-S Prob.	Sum	Sum of Squares
CSE24h	-0,234	-0,519	0,148	0,287	820,510	37860,971
CSE6m	0,344	-0,510	0,110	0,681	1097,260	69339,769
CSE12m	-0,432	-1,291	0,181	0,086	831,970	43343,073
CSE24h_1%	0,925	0,473	0,188	0,062	684,390	27420,967
CSE6m_1%	0,291	-0,513	0,0998	0,769	717,570	33097,341
CSE12m_1%	0,936	0,402	0,163	0,173	492,660	16015,746
CSE24h_5%	0,253	-0,488	0,140	0,369	487,610	12838,985
CSE6m_5%	1,511	1,296	0,226	0,009	322,490	10399,169
CSE12m_5%	0,936	-0,545	0,201	0,033	324,220	9947,577
CSE24h_CHX	1,194	2,197	0,252	0,002	747,410	31066,831
CSE6m_CHX	0,178	-0,819	0,0952	0,802	733,460	32389,413
CSE12m_CHX	-0,218	-0,303	0,118	0,597	635,980	23563,080

One Way Analysis of Variance

Data source: COMPARAÇÕES ENTE GRUPOS PARA 24 HORAS

Normality Test: Passed (P = 0,136)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,149)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
CSE24h	20	0	41,026	14,866	3,324
CSE24h_1%	20	0	34,220	14,512	3,245
CSE24h_5%	20	0	24,381	7,074	1,582
CSE24h_CHX	20	0	37,370	12,847	2,873

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	3061,058	1020,353	6,311	<0,001
Residual	76	12287,177	161,673		
Total	79	15348,235			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,930

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
CSE24h vs. CSE24h_5%	16,645	4	5,854	<0,001	Yes
CSE24h vs. CSE24h_1%	6,806	4	2,394	0,335	No
CSE24h vs. CSE24h_CHX	3,655	4	1,286	0,800	Do Not Test
CSE24h_CHX vs. CSE24h_5%	12,990	4	4,569	0,010	Yes
CSE24h_CHX vs. CSE24h_1%	3,151	4	1,108	0,862	Do Not Test
CSE24h_1% vs. CSE24h_5%	9,839	4	3,461	0,077	No

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

One Way Analysis of Variance

Data source: COMPARAÇÕES ENTE GRUPOS PARA 6 MESES

Normality Test: Passed (P = 0,058)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,261)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
CSE6m	20	0	54,863	21,934	4,905
CSE6m_1%	20	0	35,878	19,671	4,399
CSE6m_5%	20	0	16,125	16,542	3,699
CSE6m_CHX	20	0	36,673	17,000	3,801

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	15025,257	5008,419	14,003	<0,001
Residual	76	27183,213	357,674		
Total	79	42208,470			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0,001$).

Power of performed test with $\alpha = 0,050$: 1,000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
CSE6m vs. CSE6m_5%	38,738	4	9,160	<0,001	Yes
CSE6m vs. CSE6m_1%	18,985	4	4,489	0,011	Yes
CSE6m vs. CSE6m_CHX	18,190	4	4,301	0,017	Yes
CSE6m_CHX vs. CSE6m_5%	20,548	4	4,859	0,005	Yes
CSE6m_CHX vs. CSE6m_1%	0,794	4	0,188	0,999	No
CSE6m_1% vs. CSE6m_5%	19,754	4	4,671	0,008	Yes

One Way Analysis of Variance

Data source: COMPARAÇÕES ENTE GRUPOS PARA 12 MESES

Normality Test: Passed ($P = 0,667$)

Equal Variance Test: Passed ($P = 0,153$)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
CSE12m	20	0	41,599	21,441	4,794
CSE12m_1%	20	0	24,633	14,290	3,195
CSE12m_5%	20	0	16,211	15,714	3,514
CSE12m_CHX	20	0	31,799	13,258	2,965

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	3	6968,255	2322,752	8,550	<0,001
Residual	76	20645,619	271,653		
Total	79	27613,874			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = <0,001$).

Power of performed test with $\alpha = 0,050$: 0,989

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
CSE12m vs. CSE12m_5%	25,388	4	6,889	<0,001	Yes
CSE12m vs. CSE12m_1%	16,965	4	4,603	0,009	Yes
CSE12m vs. CSE12m_CHX	9,799	4	2,659	0,245	No
CSE12m_CHX vs. CSE12m_5%	15,588	4	4,230	0,019	Yes
CSE12m_CHX vs. CSE12m_1%	7,166	4	1,944	0,519	No
CSE12m_1% vs. CSE12m_5%	8,422	4	2,285	0,376	No

One Way Analysis of Variance

Data source: COMPARAÇÕES ENTE TEMPOS PARA CSE

Normality Test: Passed ($P = 0,353$)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,136)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
CSE24h	20	0	41,026	14,866	3,324
CSE6m	20	0	54,863	21,934	4,905
CSE12m	20	0	41,599	21,441	4,794

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	2451,678	1225,839	3,165	0,050
Residual	57	22074,301	387,268		
Total	59	24525,979			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,050).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,414

The power of the performed test (0,414) is below the desired power of 0,800.

Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	p	q	P	P<0,050
CSE6m vs. CSE24h	13,837	3	3,145	0,076	No
CSE6m vs. CSE12m	13,264	3	3,014	0,093	Do Not Test
CSE12m vs. CSE24h	0,573	3	0,130	0,995	Do Not Test

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between two means that enclose that comparison. For example, if you had four means sorted in order, and found no difference between means 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed means is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the means, even though one may appear to exist.

One Way Analysis of Variance

Data source: COMPARAÇÕES ENTE TEMPOS PARA CSE_{ZM1}

Normality Test: Passed (P = 0,134)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,290)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
CSE24h_1%	20	0	34,220	14,512	3,245
CSE6m_1%	20	0	35,878	19,671	4,399
CSE12m_1%	20	0	24,633	14,290	3,195

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	1474,097	737,048	2,758	0,072
Residual	57	15233,542	267,255		
Total	59	16707,639			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,072).

Power of performed test with $\alpha = 0,050$: 0,342

The power of the performed test (0,342) is below the desired power of 0,800.

Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists.

Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

One Way Analysis of Variance

Data source: COMPARAÇÕES ENTE TEMPOS PARA CSE_{ZM5}

Normality Test: Failed ($P < 0,050$)

Test execution ended by user request, ANOVA on Ranks begun

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Copy of Copy of Data 1 in SANDRINA ESTAT FINAL

Group	N	Missing	Median	25%	75%
CSE24h_5%	20	0	24,175	17,320	29,585
CSE6m_5%	20	0	11,185	5,290	19,035
CSE12m_5%	20	0	9,500	4,390	29,295

$H = 10,042$ with 2 degrees of freedom. ($P = 0,007$)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ($P = 0,007$)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparison	Diff of Ranks	q	$P < 0,05$
CSE24h_5% vs CSE6m_5%	308,000	3,944	Yes
CSE24h_5% vs CSE12m_5%	298,000	3,815	Yes
CSE12m_5% vs CSE6m_5%	10,000	0,128	No

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

One Way Analysis of Variance

Data source: COMPARAÇÕES ENTE TEMPOS PARA CSE_{CHX}

Normality Test: Passed ($P = 0,124$)

Equal Variance Test: Passed ($P = 0,225$)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
CSE24h_CHX	20	0	37,370	12,847	2,873
CSE6m_CHX	20	0	36,673	17,000	3,801
CSE12m_CHX	20	0	31,799	13,258	2,965

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	368,560	184,280	0,878	0,421
Residual	57	11966,531	209,939		
Total	59	12335,091			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference ($P = 0,421$).

Power of performed test with $\alpha = 0,050$: 0,049

The power of the performed test (0,049) is below the desired power of 0,800.

Less than desired power indicates you are more likely to not detect a difference when one actually exists. Be cautious in over-interpreting the lack of difference found here.

2 . DADOS CITOTOXICIDADE

Descriptive Statistics:

Data source: CITOTOXICIDADE

Column	Size	Missing	Mean	Std Dev	Std. Error	C.I. of Mean
12hCSE	8	0	0,195	0,0146	0,00515	0,0122
12hCSE1%	8	0	0,207	0,0125	0,00442	0,0104
12hCSE5%	8	0	0,365	0,0689	0,0244	0,0576
12hCONTR	8	0	1,857	0,315	0,111	0,264
24hCONTR	8	0	2,474	0,151	0,0534	0,126
24hCSE	8	0	0,213	0,0153	0,00542	0,0128
24hCSE1%	8	0	0,216	0,0115	0,00408	0,00965
24hCSE5%	8	0	0,338	0,0368	0,0130	0,0308

Column	Range	Max	Min	Median	25%	75%
12hCSE	0,0420	0,216	0,174	0,196	0,182	0,206
12hCSE1%	0,0360	0,226	0,190	0,205	0,198	0,217
12hCSE5%	0,163	0,448	0,285	0,357	0,304	0,434
12hCONTR	0,962	2,054	1,092	1,944	1,893	2,020
24hCONTR	0,456	2,741	2,285	2,447	2,361	2,575
24hCSE	0,0500	0,237	0,187	0,212	0,205	0,224
24hCSE1%	0,0310	0,228	0,197	0,220	0,206	0,226
24hCSE5%	0,113	0,424	0,311	0,324	0,319	0,343

Column	Skewness	Kurtosis	K-S Dist.	K-S Prob.	Sum	Sum of Squares
12hCSE	0,0835	-1,092	0,160	0,669	1,556	0,304
12hCSE1%	0,401	-0,803	0,149	0,725	1,654	0,343
12hCSE5%	0,0868	-2,172	0,230	0,236	2,922	1,100
12hCONTR	-2,613	7,092	0,386	<0,001	14,858	28,291
24hCONTR	0,605	-0,327	0,197	0,432	19,792	49,125
24hCSE	-0,137	0,292	0,125	0,797	1,704	0,365
24hCSE1%	-0,667	-1,122	0,228	0,249	1,728	0,374
24hCSE5%	2,245	5,296	0,308	0,024	2,707	0,925

Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks

Data source: Data 1 Comparações citotoxicidade primer

Normality Test: Failed ($P < 0,050$)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
12hCSE	8	0	0,196	0,182	0,206
12hCSE1%	8	0	0,205	0,198	0,217
12hCSE5%	8	0	0,357	0,304	0,434
12hCONTR	8	0	1,944	1,893	2,020

24hCONTR 8	0	2,447	2,361	2,575
24hCSE 8	0	0,212	0,205	0,224
24hCSE1% 8	0	0,220	0,206	0,226
24hCSE5% 8	0	0,324	0,319	0,343

H = 56,154 with 7 degrees of freedom. (P = <0,001)

The differences in the median values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001)

To isolate the group or groups that differ from the others use a multiple comparison procedure.

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Student-Newman-Keuls Method) :

Comparison	Diff of Ranks	q	P<0,05
24hCONTR vs 12hCSE	412,500	7,833	Yes
24hCONTR vs 12hCSE1%	359,500	7,793	Yes
24hCONTR vs 24hCSE	326,500	8,245	Yes
24hCONTR vs 24hCSE1%	309,500	9,360	Yes
24hCONTR vs 24hCSE5%	164,000	6,181	Yes
24hCONTR vs 12hCSE5%	156,000	7,800	Yes
24hCONTR vs 12hCONTR	64,000	4,753	Yes
12hCONTR vs 12hCSE	348,500	7,555	Yes
12hCONTR vs 12hCSE1%	295,500	7,463	Yes
12hCONTR vs 24hCSE	262,500	7,939	Yes
12hCONTR vs 24hCSE1%	245,500	9,253	Yes
12hCONTR vs 24hCSE5%	100,000	5,000	Yes
12hCONTR vs 12hCSE5%	92,000	6,832	Yes
12hCSE5% vs 12hCSE	256,500	6,478	Yes
12hCSE5% vs 12hCSE1%	203,500	6,154	Yes
12hCSE5% vs 24hCSE	170,500	6,426	Yes
12hCSE5% vs 24hCSE1%	153,500	7,675	Yes
12hCSE5% vs 24hCSE5%	8,000	0,594	No
24hCSE5% vs 12hCSE	248,500	7,515	Yes
24hCSE5% vs 12hCSE1%	195,500	7,368	Yes
24hCSE5% vs 24hCSE	162,500	8,125	Yes
24hCSE5% vs 24hCSE1%	145,500	10,805	Yes
24hCSE1% vs 12hCSE	103,000	3,882	Yes
24hCSE1% vs 12hCSE1%	50,000	2,500	No
24hCSE1% vs 24hCSE	17,000	1,262	Do Not Test
24hCSE vs 12hCSE	86,000	4,300	Yes
24hCSE vs 12hCSE1%	33,000	2,451	Do Not Test
12hCSE1% vs 12hCSE	53,000	3,936	Yes

Note: The multiple comparisons on ranks do not include an adjustment for ties.

A result of "Do Not Test" occurs for a comparison when no significant difference is found between the two rank sums that enclose that comparison. For example, if you had four rank sums sorted in order, and found no significant difference between rank sums 4 vs. 2, then you would not test 4 vs. 3 and 3 vs. 2, but still test 4 vs. 1 and 3 vs. 1 (4 vs. 3 and 3 vs. 2 are enclosed by 4 vs. 2: 4 3 2 1). Note that not testing the enclosed rank sums is a procedural rule, and a result of Do Not Test should be treated as if there is no significant difference between the rank sums, even though one may appear to exist.

Apêndice D – Trabalhos realizados para investigação do metacrilato de zinco.

Trabalhos envolvendo o metacrilato de zinco.

1. Desenvolvimento de uma resina adesiva experimental contendo Zinco com capacidade de inibição de Metaloproteinase da Matriz 2. Trabalho de Conclusão de Curso, defendido em março de 2007.
2. Addition of zinc methacrylate in dental polymers: MMP-2 inhibition and ultimate tensile strength evaluation. Enviado para revista Acta Biomaterialia.
3. Degree of conversion, citotoxicity and antimicrobial activity of an experimental dental resin adhesive containing zinc methacrylate. Em fase final de redação.

Participação em congressos de trabalhos envolvendo metacrilato de zinco.

1. Desenvolvimento de um sistema adesivo contendo um inibidor de metaloproteinase. Grupo de Materiais Dentários (GBMD), 2008.
2. Avaliação da incorporação de um inibidor de Metaloproteinase na citotoxicidade e no grau de conversão de uma resina adesiva experimental. Apresentado na 25ª Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica (SBPqO), 2008. Trabalho premiado na categoria Paineis Iniciais - Início.
3. Efeito da adição de um inibidor de metaloproteinase na resistência de união de um sistema adesivo autocondicionante. Apresentado na 25ª Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica (SBPqO), 2008.

4. Efeito antibacteriano e resistência coesiva de uma resina adesiva experimental contendo zinco. Apresentado na 25ª Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica (SBPqO), 2008.
5. Caracterização de um polímero contendo zinco com capacidade de inibição de metaloproteinase da matriz 2. Apresentado na 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica (SBPqO), 2007.
6. Potencial inibitório da metaloproteinase da matriz 2 por um polímero contendo zinco em sua composição.. In: XVI CIC - Congresso de Iniciação Científica, 2007, Pelotas. XVI CIC - Congresso de Iniciação Científica, 2007.