

FERNANDA SANTORO NOGUEIRA

**A INFLUÊNCIA DAS TÉCNICAS DE REMINERALIZAÇÃO BIOMIMÉTICA DA
DENTINA NA DURABILIDADE DA UNIÃO DENTINA-RESINA**

BRASÍLIA

2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

FERNANDA SANTORO NOGUEIRA

**A INFLUÊNCIA DAS TÉCNICAS DE REMINERALIZAÇÃO BIOMIMÉTICA DA
DENTINA NA DURABILIDADE DA UNIÃO DENTINA-RESINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Profa. Dra. Fernanda Cristina Pimentel Garcia

Co-Orientador: Profa. Dra. Ana Paula Dias Ribeiro

BRASÍLIA

2017

FERNANDA SANTORO NOGUEIRA

**A INFLUÊNCIA DAS TÉCNICAS DE REMINERALIZAÇÃO BIOMIMÉTICA DA
DENTINA NA DURABILIDADE DA UNIÃO DENTINA-RESINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 03 de março de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fernanda Cristina Pimentel Garcia (Presidente)
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. André Ferreira Leite
Universidade de Brasília – UnB

Prof. Dr. Paulo Yamaguti
Universidade de Brasília – UnB

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha mãe **Mônica**, que é e sempre será a pessoa mais importante da minha vida, minha maior fonte de força de vontade e meu maior exemplo a ser seguido. Você estará sempre junto de mim, em tudo que eu fizer, em todas minhas escolhas, minhas lutas e meus empreendimentos. Que, de onde quer que você esteja, você possa se orgulhar de mim. A você dedicarei todas as minhas vitórias pois tudo que sou devo a você. Obrigada por tudo. Te amo, mãe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à **Deus**, por ser minha fortaleza de todas as horas e pela sabedoria providencial divina, que se revela tanto nas pequenas coisas como nas grandes, buscando sempre nos mostrar o caminho da felicidade e da realização, qual um artesão de destinos, iluminando cada passo em nossas vidas.

Aos meus pais, **Mônica Abraham Santoro Nogueira** e **Carlos Murilo Frade Nogueira**, pela formação moral, pelo apoio incondicional durante toda a minha educação acadêmica, pela paciência, pelo afeto e por se projetarem como exemplos de vida para mim. Meus maiores amores!

Aos meus avós, **Marilza Abraham** e **José Francisco Santoro**, por todo o apoio, incentivo e por aquele carinho tão doce e puro característico da relação entre avós e netos. Amo-os demais.

Ao meu avô **Octaciano Nogueira**, por ser o meu maior exemplo de que o estudo e o conhecimento podem ser um dos bens mais valiosos que alguém pode adquirir. “Quando ficares cego de tanto ler, é sinal de que saberás alguma coisa”.

Ao meu irmão **Ricardo**, por sempre acrescentar uma dose de alegria, doçura, risos, leveza, simplicidade e descontração aos meus dias.

A **toda minha família**, por representarem a raiz e a âncora da minha vida e o laço mais forte que alguém pode estabelecer. A família é a maior escola de educação moral e espiritual que há, uma verdadeira oficina santificante onde se lapidam

caracteres, como um laboratório superior em que se encadeiam sentimentos, estruturam aspirações, refinam idéias e transformam mazelas antigas em possibilidades preciosas para a elaboração de misteres edificantes. Assim, agradeço a todos vocês por fazerem parte da minha jornada.

À **Julianna**, por todo o apoio e força dados a mim durante a redação final desta tese, especialmente no que diz respeito à formatação de cada tabela presente nesta pesquisa. Seus conhecimentos de informática e sua dedicação em me ajudar foram incríveis. Meu mais sincero agradecimento!

Aos amigos **Bruna, Erich e Yuri**, por me darem força e por compartilharem comigo suas próprias experiências de mestrados.

À minha orientadora, **Fernanda Cristina Pimentel Garcia**, pela oportunidade em abrir para mim as portas do meio acadêmico, pela paciência diante das dúvidas, pela tranquilidade em todos os momentos, pelo exemplo profissional e pelas orientações valiosas durante a execução deste trabalho.

À minha co-orientadora, **Ana Paula Dias Ribeiro**, pela co-orientação neste trabalho, por toda a ajuda dada nos aspectos mais laboriosos desta pesquisa, pelos ensinamentos, pela disponibilidade, pelo incentivo em buscar uma filosofia científica crítica e investigativa e por me mostrar que a Odontologia vai muito além dos consultórios, que há todo um campo de pesquisa a ser explorado.

À **Profa. Dra. Marcela Carrilho**, pela confiança depositada em nos oferecer parceria nesta linha de pesquisa tão promissora e a todos os professores e alunos que me auxiliaram durante minha ida à Faculdade Anhanguera, em São Paulo, para realização de parte deste trabalho.

À **Profa. Dra. Eliete Guerra Neves**, por todo o auxílio dado durante este mestrado, pelas orientações acerca da revisão sistemática e por ter disponibilizado a infraestrutura do laboratório de Histopatologia Bucal quando precisei.

Ao **Prof. Dr. Jacy Ribeiro de Carvalho Júnior** e ao **Prof. Dr. Laudimar Alves de Oliveira** por cederem a infraestrutura e alguns equipamentos do Laboratório de Endodontia e pela disposição em ajudar sempre.

À **Prof.Dra. Taia Maria Berto Rezende** por todo o suporte, auxílio e boa vontade durante o desenvolvimento de parte deste trabalho.

Aos professores **Prof. Dr. André Ferreira Leite, Prof. Dr. Leandro Hilgert** e **Dr. Paulo Yamaguti** por terem aceitado o convite em fazer parte da minha banca de defesa.

Ao querido amigo **Gabriel Álvares Borges**, que foi o primeiro a despertar em mim o interesse pela área de pesquisa, por todo o apoio e dicas durante este mestrado e por me ajudar a vislumbrar soluções e alternativas nos aspectos mais árduos que surgiram durante a realização desta pesquisa.

Aos colegas de Mestrado, **Bruno e Josy**, por dividirem comigo suas trajetórias durante seus respectivos mestrados. A vocês desejo todo o sucesso!

À doutoranda **Isabela Porto**, pela disponibilidade e pelas preciosas considerações fornecidas para a minha revisão sistemática

À todos os **professores do departamento de Odontologia da Universidade de Brasília**, pela maestria de ensino e por todo o encorajamento dado durante a Graduação e também durante o Mestrado para exercer esta profissão linda que é a Odontologia, pela qual sou apaixonada.

À Universidade de Brasília, na pessoa do reitor **Prof. Dr. Ivan Marques de Toledo Camargo**.

À Faculdade de Ciências de Saúde, na pessoa da diretora **Profa. Dra. Maria Fátima Sousa**.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na pessoa do coordenador **Prof.Dr. Francisco de Assis Neves** e aos funcionários.

Ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação, por tornar viável a realização desta pesquisa.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

“Antes de poderem nos servir, todos os materiais naturais exigem alguma intervenção artificial, mesmo que ela se limite à recolhê-los do seu solo para transportá-los a seu destino.”

(Augusto Comte)

RESUMO

Várias estratégias têm sido desenvolvidas com o intuito de promover a remineralização da dentina através de mecanismos biomiméticos. O objetivo desta revisão foi de avaliar como as distintas técnicas de remineralização biomimética influenciam na longevidade da união dentina-resina. A pesquisa foi realizada nas bases de dados Pubmed, Lilacs, Cochrane, Web of Science, Scopus e, como fonte de literatura cinzenta, pesquisa no Google Scholar. Na busca foram encontrados 1837 artigos, dos quais 1731 foram excluídos após a seleção final. Após leitura completa dos estudos, 16 artigos foram incluídos nesta revisão. Todos os estudos foram submetidos à análise de qualidade pelo método GRADE e análise de risco de viés pelo CRIS Guideline. Sete artigos relataram o uso de análogos biomiméticos e / ou moléculas polianiônicas como fonte de cálcio e um meio para favorecer a remineralização. Seis estudos descreveram métodos que utilizam agentes do tipo cross-linkers, tais como proantocianidina e clorexidina. Dois estudos descreveram a utilização do peptídeo E8DS e a utilização de ácido meta-fosfórico.

A atual revisão sistemática confirma o potencial das técnicas de remineralização biomimética em favorecer a longevidade da união dentina -resina. De acordo com os achados desta revisão, são necessários mais estudos que avaliem os efeitos a longo prazo, os mecanismos individuais envolvidos em cada abordagem de remineralização biomimética e a aplicabilidade clínica

Palavras-chave: Remineralização, biomimética, dentina.

ABSTRACT

Various strategies have been developed in order to promote the remineralization of dentin by the use of biomimetic mechanisms. The aim of this systematic review is to evaluate how these strategies influence the durability of the resin-dentin bond. Studies were gathered by searching the databases Pubmed, Lilacs, Cochrane, Web of Science, Scopus and, as a grey literature, in Google Scholar. A total of 1837 studies were found, and 1731 were excluded after initial screening. After retrieving the full text, 16 were included in this systematic review. All studies were submitted to quality assessment and risk of bias analyses by the GRADE method and CRIS Guideline, respectively. Seven papers reported the use of biomimetics analogs and/or polyanionic molecules as a calcium source and as a path to favor remineralization. Six studies have described methods that use cross-linking agents, such as proanthocyanidin and chlorhexidine. Two studies described the use of peptide E8DS and the use of meta-phosphoric acid. The present systematic review confirms the potential value of the biomimetic techniques in favoring the durability of dentin-resin bond. According to the findings, it is required more studies that evaluate the long-term effects, the individual mechanisms involved in each approach and the clinical applicability.

Keywords: Remineralization, biomimetic, dentin, dentine.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP – Fosfato de cálcio amorfo

BAG –Fosfosilicato de sódio

CHX - Clorexidina

CIV- Cimento de ionômero de vidro

CPP-ACP – Caseína de fosfato de cálcio amorfo

DMP-1- Proteínas da matriz dentinária

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPC –Células endoteliais progenitoras

E8DS – Peptídeo E8DS

EWB – Técnica úmida simplificada de adesão

FTIV – Espectroscopia por infravermelho por transformada de Fourier

GA – Glutaraldeído

GSE – Extrato da semente de uva

HAP – Hidroxiapatita

HPN – Hesperidina

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MMPs -Metaloendoproteinases

Mpa- Megapascal

MOE – Módulo de elasticidade

MPA- Ácido metafosfórico

MSCs- Células-tronco mesenquimais

MTA – Agregado de trióxido mineral

OPA- Ácido ortofosfórico

PA –Proantocianidinas

PAA- Ácido poliacrílico

PAMAM – Polidopamina

PAVP - Ácido polivinilfosfônico

PBS – Tampão fosfato

PILP – Polímero indutor de precursores líquidos

PLA – Ácido poliláctico

RU – Resistência de união

SBMP – Adesivo Scotchbond Multipurpose

SDF-1- Fator 1 derivado de células estromais

STMP – Trimetafosfato de sódio

UTS – Resistência de união à tração

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

> - Maior que

< - Menor que

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1. BIOMINERALIZAÇÃO	17
2.2. INTERFACE DE UNIÃO RESINA-DENTINA.....	20
2.3. ESTRÁTEGIAS ATUAIS DE REMINERALIZAÇÃO BIOMIMÉTICA DA DENTINA.....	22
2.3.1. Polímeros induzidos por precursores líquidos (PILP).....	22
2.3.2. Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	23
2.3.3. Chá	31
2.3.4. Extratos naturais.....	Erro! Indicador não definido.
2.3.5. Produção recombinante de macromoléculas.....	Erro! Indicador não definido.
2.3.6. Síntese de moléculas biomiméticas promissoras	24
2.3.7. Infiltração de nanopartículas de hidroxiapatita e sílica.....	25
2.3.8. Incorporação de zinco (Zn).....	31
2.3.9. Agregado de Trióxido Mineral (MTA) e cimento Portland.....	34
2.3.10. Trimetafosfato de sódio (STMP)	26
2.3.11. Regeneração pulpo-dentinária	Erro! Indicador não definido.
2.3.12. Sais de cálcio, fosfato de cálcio e silicato de cálcio.....	22
2.3.13. Polidopamina.....	36
2.3.14. Gel de agarose.....	37
2.3.15. Clorexidina.....	31
2.3.16. Glutaraldeído.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. PROTOCOLO E REGISTRO.....	40
3.2. CRITÉRIO DE INCLUSÃO.....	40
3.3. CRITÉRIO DE EXCLUSÃO	41
3.4. FONTES DE INFORMAÇÃO E ESTRATÉGIA DE BUSCAS.....	41
3.5. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE DADOS	42
3.6. ANÁLISE DE QUALIDADE E RISCO DE VIÉS.....	42

4. RESULTADOS.....	43
4.1. RESULTADO DA BUSCA.....	20
4.2. RISCO DE VIÉS E ANÁLISE DE QUALIDADE.....	44
4.3. CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS.....	20
4.4. RESULTADOS INDIVIDUAIS DOS ESTUDOS.....	46
5. DISCUSSÃO.....	47
6. CONCLUSÃO.....	58
7. REFERÊNCIAS.....	59

1. INTRODUÇÃO

Naturalmente, a dentina reveza entre os processos de desmineralização e remineralização (1), sendo que o equilíbrio entre estes dois processos é um fator fundamental no estabelecimento de propriedades mecânicas como resistência e dureza nos tecidos dentários (2). A reposição de minerais dentro das fibrilas de colágeno tipo I é um ponto crítico para a estabilização de propriedades mecânicas dos tecidos calcificados, como a dentina e o esmalte. Na dentina, cerca de 90% de seu conteúdo orgânico é constituído por colágeno tipo I, sendo que as proteínas não-colagênicas representam 10% deste conteúdo (3). Essas proteínas não-colagênicas exercem papel fundamental no processo de mineralização, pois são componentes altamente aniônicos, fosforilados e multifuncionais (4).

A remineralização da dentina pode ocorrer tanto pela incorporação espontânea de íons, na forma de cálcio, fosfato ou flúor nos cristais remanescentes do tecido desmineralizado que fora acometido por lesão cáriosa ou pela desmineralização causada pelo condicionamento ácido nos procedimentos restauradores (23) ou através de tratamentos que incorporam os mesmos íons a partir de fontes externas. Quando comparado à remineralização do esmalte, o processo de remineralização em dentina é mais complexo, em consequência da maior escassez de núcleos de apatita na dentina (5) e de características morfológicas do próprio substrato, como o alto conteúdo orgânico e umidade. Neste contexto, a degradação da camada híbrida constitui um dos principais mecanismos que levam a perda da união da interface adesiva culminando em uma menor longevidade das restaurações. Apesar dos avanços observados nos sistemas adesivos, a adesão em dentina ainda representa um dos principais desafios para a Odontologia Restauradora.

As técnicas de remineralização biomimética da dentina têm mostrado resultados promissores na recuperação do tecido dentinário (Figura 1), a exemplo da utilização de agentes do tipo *cross-linkers*, do desenvolvimento de sistemas envolvendo nanopartículas de fosfato de cálcio amorfo e do uso da clorexidina (6). Alternativamente, além do aumento da resistência à degradação da matriz, estas técnicas também têm apresentado uma possível ação no mecanismo de hidrólise, tanto dos componentes da matriz orgânica como nos componentes monoméricos da

resina, através da remoção de água na camada híbrida e troca por conteúdo mineral (7) por.

Sabe-se ainda que uma das queixas mais frequentes entre os pacientes no que diz respeito aos procedimentos restauradores refere-se à perda de retenção da restauração. Frequentemente, as restaurações precisam ser confeccionadas novamente em virtude da presença de cáries secundárias ou por perda da adesão oriunda da degradação da camada híbrida, o que gera insatisfação por parte dos pacientes. O procedimento restaurador ideal poderia ser caracterizado por aquele capaz não apenas de devolver a morfologia dentária perdida, mas também de favorecer a durabilidade de união, reduzindo o risco de perda da restauração pela degradação da camada híbrida e prevenindo o estabelecimento de lesões de cárie secundárias.

Atualmente, diversas estratégias objetivam a remineralização do tecido dentinário perdido, em congruência com a atual tendência observada nas ciências da saúde em buscar terapias regenerativas, as quais mimetizam os processos biológicos inatos do organismo. Assim, a remineralização biomimética se apresenta como uma alternativa extremamente vantajosa, especialmente em razão das limitações com as quais os procedimentos restauradores atuais ainda se deparam como a degradação da matriz de colágeno e a impossibilidade de total infiltração dos monômeros resinosos, ocasionado pela discrepância entre desmineralização e infiltração. (8) Existem evidências na literatura, as quais afirmam que a remineralização promovida por estas técnicas biomiméticas é capaz de induzir um processo de remineralização intrafibrilar e interfibrilar, de modo a atuar como um reforço na interface resina-dentina infiltrada incompletamente.

Embora muitas técnicas tenham sido apresentadas, não há consenso que promova o melhor resultado com relação ao aumento da força de ligação ao longo do tempo. Portanto, esta revisão sistemática visou responder à pergunta: qual é a influência das atuais técnicas de remineralização da dentina na durabilidade da resistência da ligação dentina-resina?

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. BIOMINERALIZAÇÃO

Os biominaerais apresentam uma variedade de estruturas e funções bioquímicas, além de possuírem propriedades notáveis, tais como a dureza e o refinado arranjo espacial, sendo componentes onipresentes em quase todos os sistemas vivos. A biomineralização pode ser definida como o processo no qual organismos vivos secretam minerais inorgânicos (9), a partir dos quais são formadas estruturas rígidas como osso, dente, esqueleto e conchas. Ou seja, a geração deste precursor de partículas amorfas na formação de biominaerais parece estar presente na própria natureza. Este processo ocorre sobre um refinado controle hierárquico e exibe um alto controle espacial, já que a reação de mineralização usualmente se dá em um ambiente confinado (7). Sabe-se que a mineralização de ossos e dentina ocorre sobre uma matriz organizada de fibrilas de colágeno tipo I, na qual a fase de cristalização consiste em um agregado de nanocristais lamelados de apatita carbonatada, orientada conforme a disposição estrutural das fibrilas de colágeno.(10)

A Teoria Clássica da Cristalização considera que a nucleação e o crescimento dos cristais ocorrem a partir de componentes elementares, como íons em uma solução supersaturada, com a formação de mesoestruturas cristalinas a partir da agregação de pequenos cachos que atuam como unidades de crescimento através da formação de precursores. A Teoria Não-Clássica se baseia na mediação por partículas e, diferente do modelo clássico, este modelo consegue reproduzir a complexa estrutura hierárquica da deposição intrafibrilar de apatita no interior da matriz, proporcionando assim técnicas mais efetivas(11). O insucesso das técnicas remineralizadoras convencionais decorre ainda do fato de que estas técnicas se baseavam apenas na deposição de íons cálcio e fosfato nas áreas dentinárias que apresentavam núcleos de cristais. No entanto, a remineralização não ocorria nas áreas onde estes núcleos estavam ausentes, configurando uma incompleta remineralização do tecido.

Uma das principais estratégias de biomineralização envolve a formação de uma fase precursora amorfa que subseqüentemente se transforma em estruturas homólogas cristalinas mais estáveis, fenômeno observado primeiramente em moluscos (12). O

fosfato de cálcio amorfo (ACP) é o principal biomineral presente na composição de ossos e dentes, sendo um componente não citotóxico, osteocondutivo, bioativo e com alta capacidade de adesão às células. Acredita-se que a fase inicial do ACP esteja envolvida com o processo de mineralização que culmina na formação de hidroxiapatita e sua síntese pode ser realizada *in vitro* a partir de soluções supersaturadas (13). As proteínas da matriz dentinária realizam o controle do processo de biomineralização através da estabilização dos nanoprecusores de cálcio fosfato amorfo e pela nucleação da apatita no interior do arcabouço de colágeno. Sabe-se que polímeros sintéticos conseguem assumir funções relativas à biopolímeros em sistemas naturais (14). Assim, análogos biomiméticos das fosfoproteínas da matriz dentinária têm sido utilizados para remineralizar a matriz colágena que não foi completamente infiltrada pelos monômeros resinosos na formação da camada híbrida durante os procedimentos adesivos.

As partículas amorfas como precursores na formação de sais minerais solúveis em sistemas aquosos sob condições ambiente representam uma estratégia viável, uma vez que este método de cristalização possibilita a formação de estruturas complexas e é capaz de controlar fatores como força da ligação iônica e pressão osmótica (15).. A síntese do ACP pode ser obtida através de um processo denominado processo indutor líquido-polímero, o qual preconiza a adição de pequenas quantidades de ácido polipeptídico à solução remineralizadora (16). Desta forma, o polímero captura íons cálcio e fosfato, culminando na formação do ACP. Este processo representa um novo paradigma baseado no modelo contemporâneo de cristalização e constitui um processo biologicamente induzido(17). Uma representação esquemática do processo de remineralização biomimética da dentina está ilustrada na Figura 1.

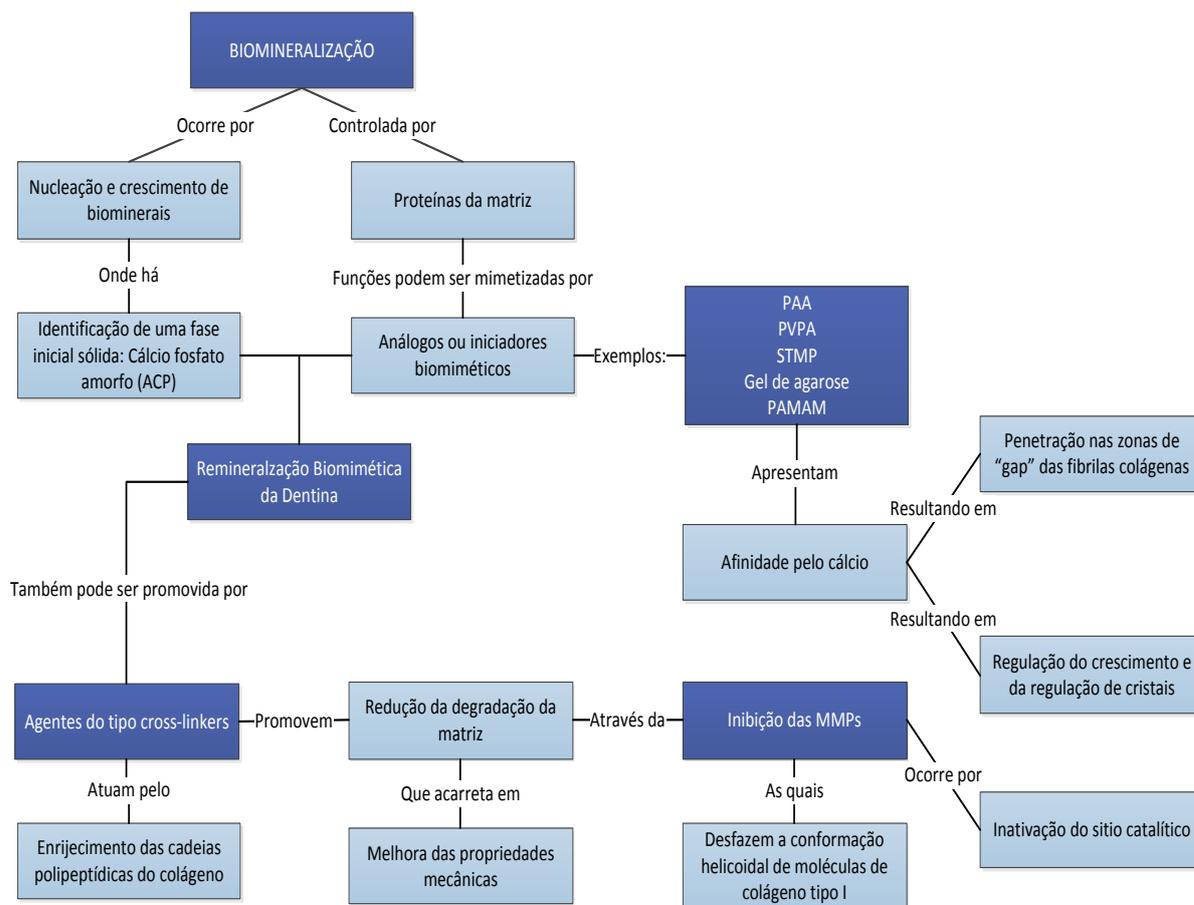


Figura 1– Esquema do processo de remineralização biométrica da dentina

Assim como o cálcio, a sílica é um composto de papel extremamente relevante no processo de mineralização. Evidências sugerem que há uma indissociável relação entre a biossílica e os biominaerais à base de cálcio (18). A biossilificação intrafibrilar no arcabouço de colágeno quando utilizada como técnica de regeneração tecidual apresenta grande benefício no que tange ao potencial osteocondutivo. O arcabouço colágeno infiltrado por sílica intrafibrilar é biodegradável e altamente biocompatível, com propriedades biomecânicas e osteocondutividade otimizadas.

No que tange à regeneração tecidual, sabe-se, por exemplo, que a terapia com células-tronco representa significativo avanço e constitui uma abordagem promissora. No entanto, esta técnica apresenta algumas limitações, tais quais a rejeição do sistema imunológico pelas células do hospedeiro e alto custo de execução da técnica (19). Assim, novas técnicas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de alcançar a regeneração de tecidos duros. Nesse contexto, os biomateriais

à base de sílica têm apresentado propriedades desejáveis e resultados satisfatórios. Quando um sítio sofre uma injúria tecidual, células-tronco mesenquimais (MSCs) e células endoteliais progenitoras (EPCs) são recrutadas e favorecem processos como a osteogênese e angiogênese. A mobilização e o alojamento destas células é realizado pela proteína do fator 1 derivado de células estromais (SDF-1). Na silificação, o arcabouço colágeno com presença de sílica se liga reversivelmente ao SDF-1, constituindo assim uma nova alternativa terapêutica para a regeneração de tecidos duros *in situ* (20). Na natureza, o processo de biosilificação pode ser encontrado em esponjas e diatomáceas, as quais já são utilizadas para diversos fins biológicos e terapêuticos (18).

2.2. CARACTERÍSTICAS DO SUBSTRATO DENTINÁRIO E ANÁLISE DA INTERFACE DE UNIÃO DENTINA -RESINA

Uma das características estruturais do substrato dentinário é a presença de túbulos, sendo que estas estruturas influenciam diretamente na permeabilidade da dentina (65). Circundando a luz dos túbulos dentinários, encontra-se a dentina peritubular, rica em cristais de hidroxiapatita e, separando os túbulos, há a dentina intertubular, composta por uma matriz de colágeno reforçada por cristais de hidroxiapatita. Os túbulos representam ainda o trajeto realizado pelos odontoblastos presentes na câmara pulpar até o cemento, de modo a convergir em direção à polpa, em um formato cônico, fato ao qual pode ser atribuída a variedade de densidade e de distribuição tubular observada. O diâmetro tubular localizado na região mais profunda da dentina é de aproximadamente 2,5µm, enquanto que na região mais próxima à junção amelo-dentinária, este valor é cerca de 0,9µm(76). Dessa forma, a dentina profunda apresenta-se mais permeável e, conseqüentemente, com maior umidade, sendo mais difícil de se otimizar uma adesão em comparação à dentina superficial (67).

A infiltração de monômeros resinosos no interior das fibrilas de colágenos previamente desmineralizadas representa uma etapa fundamental para o estabelecimento de uma união eficaz da interface dentina-resina (80). Os sistemas adesivos empregados nos procedimentos adesivos baseiam-se em estratégias de união baseados em um condicionamento ácido prévio do substrato ou em um

procedimento autocondicionante. Nos sistemas que preconizam um condicionamento ácido prévio da dentina, a desmineralização corre em maior grau em comparação à infiltração dos monômeros resinosos, resultando em fibrilas de colágeno desprotegidas devido a discrepâncias entre região desmineralizada e infiltrada. Dessa forma, a fibrila de colágeno sem o suporte mineral ou monomérico está sujeita a degradação pelas MMPs que estão presentes no próprio substrato dentinário. Nos sistemas adesivos autocondicionantes, os monômeros acídicos promovem a desmineralização e infiltração monomérica simultânea em esmalte e dentina (81), gerando uma menor discrepância entre região desmineralizada e região infiltrada. Dessa forma espera-se que ocorra uma menor suscetibilidade à degradação pelas MMPs, porém tem se verificado que para alguns sistemas simplificados que apresentam um pH mais baixo, essa degradação pode ocorrer. Um dos mecanismos principais para a perda da resistência de união ao longo do tempo pode ser atribuído principalmente à degradação da matriz colágena ou dos componentes resinosos da interface adesiva. Diversos fatores podem influenciar neste fenômeno, tais quais: a ação das MMPs, a taxa de sorção, solubilidade dos monômeros resinosos e até mesmo a umidade do meio oral. A degradação da interface resina-dentina ocorre em três fases: na fase inicial, ocorre a degradação química resultante da absorção de água pelos polímeros; na segunda fase, os produtos de degradação são lixiviados da camada híbrida; por fim, na terceira fase, ocorre a degradação das fibrilas de colágeno expostas pela ação das MMPs (69). Por esta razão, várias pesquisas tem sido realizados para inibir a ação das MMPs com intuito de estabilizar a interface adesiva levando a uma maior longevidade das restaurações. Neste sentido, as técnicas que preconizam o uso da clorexidina, a utilização de análogos sintéticos e também o uso de agentes capazes de estabelecer ligações cruzadas entre as fibrilas de colágeno têm apresentado resultados favoráveis (77). Por fim, observa-se também uma tendência crescente em buscar inspiração na natureza para desenvolver métodos que mimetizem processos biológicos inatos, os quais podem exercer uma influência significativa na durabilidade da união entre resina e dentina (79).

2.3. ESTRÁTEGIAS ATUAIS DE REMINERALIZAÇÃO BIOMIMÉTICA DA DENTINA

A remineralização da dentina tem como objetivo último o restabelecimento da funcionalidade do tecido afetado. Sob a ótica biomecânica, a matriz de dentina mineralizada preserva a função do dente, ajudando a evitar a propagação de rachaduras no esmalte fragilizado através da junção dentina-esmalte(19). Neste sentido, cabe ainda ressaltar que quando a lesão cariosa atinge a matriz dentinária, ela progride muito mais rapidamente em relação ao que ocorre no esmalte, criando assim distintas zonas que refletem diferenças de conteúdo mineral e, conseqüentemente, de propriedades mecânicas entre os tecidos(22).

Diversos métodos têm sido propostos para promover a bioremineralização, que estão listados a seguir:

2.3.1. Utilização de análogos biomiméticos

O modelo polímero-líquido-indutor (PILP) é baseado na utilização de uma dupla de análogos biomiméticos. Estes análogos ajudam a sequestrar o nanoprecursor de ACP fluídico e funcionam como modelos para guiar a nucleação homogênea da apatita dentro das fibrilas de colágeno. Ao adotar este sistema na dentina completamente desmineralizada, foi demonstrada a deposição de apatita nas regiões intra e extrafibrilar da matriz colágena desmineralizadas que foi incompletamente infiltrada por monômeros resinosos(24).

A remineralização intrafibrilar em dentina completamente desmineralizada (Figura 2) foi avaliada por Kim *et al* (25), bem como a existência de um mecanismo de desidratação. Sabe-se que o processo de biomineralização em si já apresenta naturalmente uma fase de desidratação, na qual a água é substituída por cristais. Neste trabalho, a partir de 144 terceiros molares recém-extraídos, foi realizado o seccionamento da superfície dentinária, aplicação de adesivos dentinários nos espécimes e restauração com resina composta. Os espécimes experimentais foram envelhecidos em meio remineralizante contendo análogos biomiméticos e amostras de controle em fluido corporal simulado por 12 meses. Os espécimes foram

examinados por microscopia de varredura para verificação da presença de regiões ricas em água usando um marcador de prata e para a degradação do colágeno dentro das interfaces adesivas. O resultado deste estudo confirmou a existência deste mecanismo de desidratação, a qual permite que estas interfaces adesivas resistam à degradação ao longo de um envelhecimento de 12 meses como verificado pela conservação da sua resistência à tração.

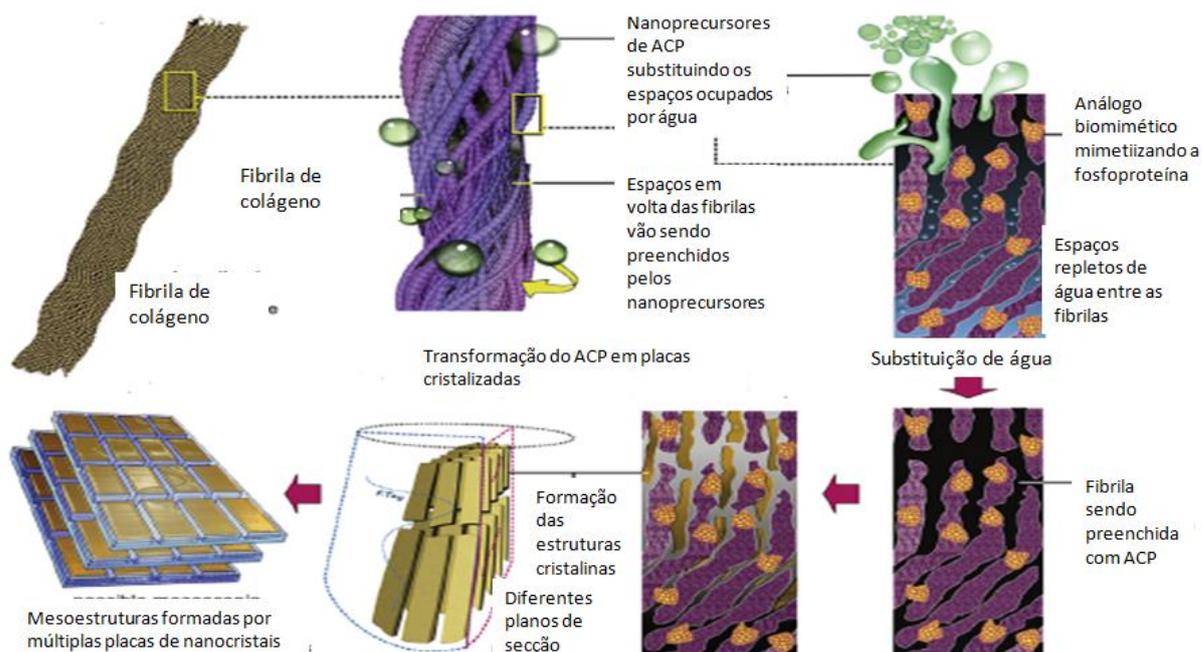


Figura 2 - Esquema ilustrativo do processo de remineralização intrafibrilar em dentina completamente desmineralizada.

Fosfato de cálcio amorfo (ACP)

Diversos outros agentes além do flúor são capazes de promover a remineralização na estrutura dental, dentre os quais: fosfopeptídeos de fosfato de cálcio amorfo (ACP), o fosfosilicato de sódio e cálcio, o ozônio e o xilitol (23). Esta técnica envolve a formação de uma fase precursora amorfa que subsequentemente se transforma em estruturas homólogas cristalinas mais estáveis, fenômeno observado primeiramente em moluscos. O cálcio fosfato amorfo é o principal biomineral presente na composição de ossos e dentes, sendo um componente não citotóxico,

osteocondutivo, bioativo e com alta capacidade de adesão às células (34,35). A utilização do ACP na remineralização da dentina deve ser acoplada à ação de análogos biomiméticos.

Gu *et al* (36) avaliaram a capacidade de remineralização da dentina utilizando fluidos corporais simulados (SBF) com análogos biomiméticos após a utilização de sistemas adesivos convencionais ou autocondicionantes. Para cada adesivo (N = 20) metade das amostras permaneceram imersas em SB e o restante foram imersos em uma solução de remineralização biomimética. Foi avaliado o módulo de elasticidade semanalmente durante 15 semanas. As amostras foram avaliadas por microtomografia de raios X e microscopia eletrônica de transmissão (TEM).. No estudo antes do protocolo adesivo foi adotado um modelo de dentina totalmente desmineralizada a fim de eliminar possíveis ambigüidades que poderiam surgir para distinguir os cristais de apatita remineralizados daqueles cristais remanescentes em dentina parcialmente desmineralizada. Ademais, este modelo também permite verificar se a remineralização ocorreu independentemente da contribuição de outras moléculas liberadas na dentina mineralizada, como as proteoglicanas. A utilização de SBF contendo análogos biomiméticos favoreceu o processo de remineralização da dentina, acarretando em alterações no módulo de elasticidade, na densidade mineral e na ultramorfologia da dentina.

A indução do processo de formação de nanocristais no dente *in vivo* através de método recombinante da produção de proteínas do esmalte, como a amelogenina, se mostrou uma técnica promissora, uma vez que foi capaz de mimetizar o processo de biomineralização. A amelogenina pode ser utilizada na montagem de nanoestruturas funcionais a partir dos peptídeos que formam espontaneamente “andaimes” tridimensionais fibrilares (48). Em resposta a gatilhos ambientais específicos, estes “andaimes fibrilares” podem, potencialmente, ser utilizados na indução da formação de cristais de hidroxiapatita (49).

Tecidos mineralizados como, por exemplo, osso e dentina são altamente organizados em nanocompósitos hierárquicos que possuem interface de mineral e fases orgânicas. Estudos como o de Sfeir *et al* (39) confirmaram a viabilidade da síntese de compostos de nanofibrilas com fases orgânicas e inorgânicas altamente

integradas, inspirados em fibras colágenas mineralizadas de osso e dentina, mimetizando peptídeos naturais como a fosforina presente na dentina (50). Outros estudos relataram o uso de dendrímeros de poliamidoamina (PAMAM) para a remineralização dentinária (51). Estes compostos compõem uma nova geração de nanosistemas, caracterizados por serem uma classe especial de polímeros com estrutura muito ramificada e irregular. Peptídeos derivados de fosfoproteína-1 de matriz de dentina (DMP-1) também podem ser úteis para modular a deposição mineral e a subsequente formação de hidroxiapatita, quando expostos a concentrações fisiológicas de cálcio e fosfato.

Infiltração de nanopartículas de hidroxiapatita e sílica

Um estudo de Besinis *et al* (42) demonstrou que a infiltração de nanopartículas de hidroxiapatita em dentina desmineralizada restaurou até 55% dos níveis de fósforo e cálcio. A remineralização da dentina desmineralizada com nanopartículas de sílica por imersão em saliva artificial foi a estratégia mais eficaz, restaurando em 20% os níveis de fosfato. Os resultados mostraram que os cristais de hidroxiapatita depositados densamente entre si cobriram totalmente a superfície da dentina e promoveram a oclusão dos túbulos dentinários após 10 dias de mineralização biomimética *in vitro* (53)

O estudo de Wagner *et al* (53) ressaltou a relevância do estabelecimento de uma concentração adequada para utilização das nanopartículas de hidroxiapatita. Neste trabalho, após diferentes processamentos (biomimético e hidrotérmico), nanopartículas de hidroxiapatita foram incorporadas ao adesivo Adper Scotchbond Multi-Purpose (SBMP) em diversas concentrações para posterior análise da força à microtração e avaliação por MEV. Os espécimes foram fraturados em tensão e submetidos à análise fractográfica. Em ambos os processos, a incorporação de nanopartículas de HAP aumentou significativamente a resistência de união, reforçando coesivamente a camada adesiva na interface dentina-resina. Todavia, similar a estudos anteriores, este efeito depende da concentração utilizada. Quando na concentração de 10%, os efeitos foram negativos e o oposto do desejado. Apesar da análise por MEV ter revelado dispersão das nanopartículas na camada

adesiva, não houve indícios de deposição ou penetração destas partículas dispersas na camada híbrida

No estudo de Wang *et al* (44) discos de dentina obtidos a partir de terceiros molares extraídos foram tratados com partículas de nanohidroxiapatita e imersos em solução contendo o peptídeo sintético E8DS. Os espécimes foram submetidos a testes de resistência contra a abrasão. Este foi o único estudo cuja metodologia divergiu das demais no que tange à análise de propriedades mecânicas, uma vez que os outros estudos analisaram a resistência de união através dos testes usuais de microtração e este trabalho, por sua vez, avaliou a resistência à abrasão. No entanto, não houve divergência durante a decisão de inclusão deste artigo, uma vez que os resultados apontados neste trabalho fornecem uma demonstração válida da influência direta desta abordagem na resistência mecânica do substrato e, conseqüentemente, interferindo positivamente na durabilidade de união. Em virtude da forte afinidade deste peptídeo com a dentina, cerca de 43,7% dos peptídeos imobilizados na dentina exposta permaneceram retidos na dentina mesmo após lavagens subseqüentes com água durante 4 semanas, a uma taxa de lavagem de 1ml/ 1 minuto.

Trimetafosfato de sódio (STMP) e Ácido poliacrílico

O análogo biomimético trimetafosfato de sódio (STMP) tem sido descrito como um agente promissor capaz de induzir a remineralização de áreas com escassez de núcleos de cristais (70). Este nanoprecursor atua como um agente sequestrante de cálcio e fosfato. Outro composto comumente utilizado para exercer este mesmo mecanismo é o ácido poliacrílico. No estudo de Abuna *et al* (51), três primers experimentais foram formulados com a utilização dos análogos biomiméticos ácido poliacrílico a 10%, trimetafosfato de sódio a 10% e o último primer contendo 5% de cada um dos análogos. Foram utilizados discos de dentina a partir de terceiros molares sadios extraídos. Os discos foram desmineralizados com EDTA 17% e imersos em cada uma das soluções de primer. A análise dos espécimes foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e por espectroscopia de Fourier (FTIR) nos períodos de 24h, 7 dias, 2 meses e 6 meses, sendo que durante este

tempo, os espécimes foram submetidos a uma simulação de pressão pulpar. Os espécimes foram submetidos a testes de microtração. Após 24h, nenhum dos espécimes apresentou evidência significativa de precipitação de cálcio fosfato, no entanto, após 6 meses observou-se que a resistência de união fora estabilizada nos espécimes que receberam tratamento prévio com os análogos e a deposição de cristais foi confirmada através da análise MET. De acordo com os autores, este estudo foi o primeiro trabalho a testar um primer autocondicionante impregnado com fosfato de cálcio e usados em combinação a uma solução contendo análogos biomiméticos. O motivo para a escolha deste sistema baseia-se no fato que estes promovem menor desmineralização das fibrilas de colágeno. A primeira hipótese, de que o uso deste sistema adesivo em combinação com os análogos biomiméticos aumentaria a durabilidade da união dentina-resina foi parcialmente aceita. A segunda hipótese, de que este primer autocondicionante, quando utilizado com adesivo contendo cálcio e fosfato, induziria a remineralização biomimética da dentina, foi aceita.

Por sua vez, Ryou *et al* (53) utilizaram o ácido poliacrílico, juntamente com o tripolifosfato de sódio, para análise do comportamento nanodinâmico da dentina. Este estudo testou a hipótese nula de que não há diferença no comportamento mecânico nanodinâmico de camadas híbridas de dentina na presença ou ausência de remineralização biomimética após envelhecimento *in vitro*. A hipótese nula de que a remineralização biomimética não influenciaria no comportamento mecânico foi rejeitada. O estudo concluiu que está técnica é capaz de preservar a integridade de união e de restaurar as propriedades nanomecânicas. Um aspecto que merece ressalva é o fato que, nas regiões basais, aonde não haviam cristais de hidroxiapatita para atuarem como sítios de pré-nucleação, a remineralização não foi induzida para o crescimento epitaxial.

Sauro *et al* (26) avaliaram o tratamento prévio em dentina a partir do uso de análogos biomiméticos. Dois iniciadores experimentais contendo análogos biomiméticos, tais como o trimetafosfato de sódio (TMP) e o ácido poliaspártico (PLA), foram utilizados no preparo da dentina, antes do protocolo adesivo, etapa seguida pela união da dentina a um material experimental à base de resina. As análises incluíram a avaliação da remineralização e a avaliação do módulo de elasticidade do substrato. De acordo com os resultados, foi verificada a presença de

precipitação mineral e conseqüente redução da micropermeabilidade. A maior taxa de remineralização foi observada quando ambos os iniciadores foram utilizados conjuntamente. Diferente da maioria dos estudos, que utilizam majoritariamente o ácido poliacrílico, este trabalho utilizou o ácido poliaspártico. Ambos os ácidos participam no recrutamento de sítios de pré-nucleação para a produção de fosfato de cálcio amorfo estabilizado por polímeros. As evidências deste estudo indicam que a remineralização biomimética da dentina é possível dentro de 90 dias *in vitro*. A combinação de 40% em peso de silicato de cálcio / cargas em um adesivo autocondicionante pode remineralizar os espaços repletos de água na interface resina-dentina, de modo a recuperar o módulo de elasticidade das camadas híbridas quando no pré-tratamento da dentina com iniciadores biomiméticos, tais como ácido poliaspártico (PLA) e / ou trimetafosfato de sódio (TMP).

2.3.2. Agentes de Ligações Cruzadas

Diversos estudos têm utilizado o extrato da uva e outros extratos naturais para a remineralização do tecido dentinário desmineralizado. Esta propriedade é oriunda da ação das proantocianidinas (PA), moléculas bioflavonóides disponíveis em várias frutas, vegetais e sementes e, em virtude de sua alta compatibilidade, têm sido estudadas para fins terapêuticos (42). Na Odontologia, constatou-se que o uso das PA em dentina desmineralizada é uma técnica eficaz no que tange à melhora das propriedades mecânicas do substrato (43), sendo capaz, inclusive, de afetar positivamente a resistência da união dentina-resina contra a ação enzimática (34). Já foi demonstrada também a capacidade da hesperidina, um flavonóide cítrico presente na uva, em inibir o processo de desmineralização e favorecer a remineralização da dentina mesmo em ambientes desprovidos de flúor (35).

Epansighe *et al* (46) elaboraram um estudo no qual quatro adesivos hidrofílicos experimentais contendo diferentes concentrações de PA foram preparados por combinação de 50% em peso de misturas de co-monomeros de resina com 50% em peso de etanol. Adicionou-se proantocianidina à resina solvatada com etanol para produzir três adesivos com PA de 1,0, 2,0 e 3,0% em peso, respectivamente. Um adesivo livre de PA serviu como grupo controle. Os espécimes foram obtidos a partir

de terceiros molares extraídos e a resina utilizada foi a Filtek Z250 (3M ESPE). Os espécimes foram submetidos a testes de RU e a nanoinfiltração na interface foi analisada através de MEV. Em concentrações iguais ou inferiores a 2%, as PA não apresentaram efeitos adversos no que tange à união. As PA foram capazes de preservar a estrutura helicoidal tripla do colágeno e de induzir a agregação de microfibrilas de colágeno através do deslocamento da água, criando assim novas interações de ligação de hidrogênio com o colágeno, às quais são atribuídas a estabilização do colágeno e o conseqüente aumento das propriedades mecânicas. Estes aspectos podem ser atribuídos ao fato de que as PA são capazes de formar complexos insolúveis com carboidratos e proteínas. A aplicação das PA parece exigir um tempo de aproximadamente 10-60 minutos, o que é inviável do ponto de vista clínico.

Em outro estudo (47), foram utilizados aproximadamente 60 molares seccionados em feixes pequenos, a partir dos quais foram obtidos os espécimes que foram posteriormente desmineralizados e submetidos aos tratamentos com os três agentes: 6,5% de proantocianidina, 6,5% de quercetina e 6,5% de naringina. Assim como as proantocianidinas, a naringina e a quercetina são outros exemplos de flavonóides que têm sido utilizados nas terapêuticas de saúde, em virtude de suas propriedades biológicas. Apesar do seu maior tamanho molecular, a PA foi mais eficaz do que a quercetina e naringina no aumento das propriedades biomecânicas da dentina desmineralizada. Sabe-se da afinidade entre flavonóides e proteínas ricas em prolina e da capacidade do grupo fenil-hidroxila em formar pontes e hidrogênio com os grupos carbonila presentes nas fibrilas de colágeno. Deste modo, pelo fato da PA apresentar mais grupos fenil-hidroxila que os demais agentes, sendo uma molécula oligomérica, é esperado que apresentasse resultados superiores. Ao avaliar a metodologia empregada no estudo e os resultados, o próprio trabalho aponta diferenças relacionadas à orientação dos túbulos durante o emprego da técnica de desmineralização induzida. Quando da desmineralização em direção perpendicular aos túbulos, os resultados mecânicos foram superiores àqueles observados quando utilizada em direção paralela.

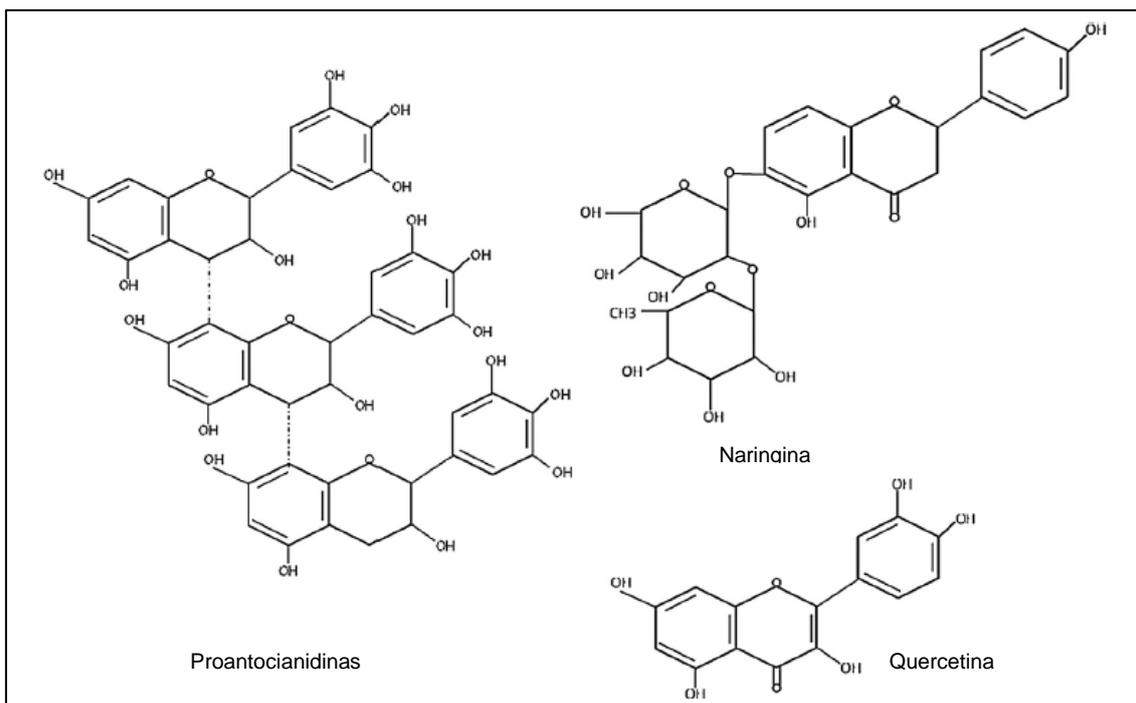


Figura 3 - Estrutura química dos flavonoides

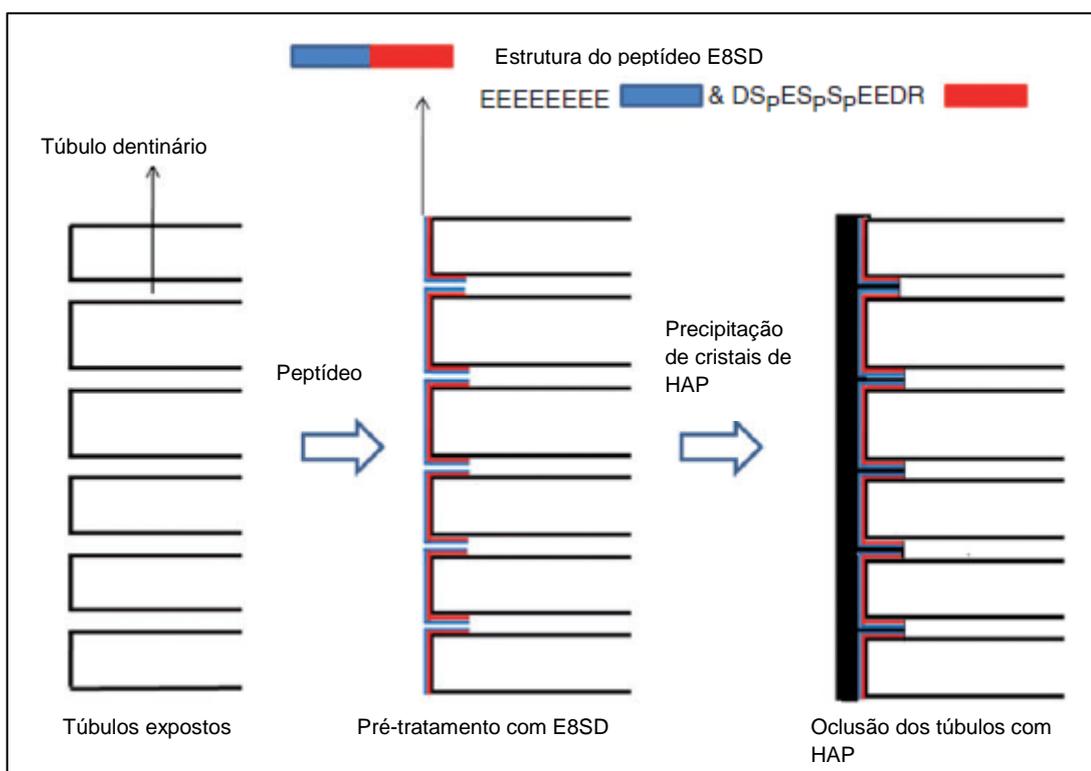


Figura 4 - Diagrama esquemático dos estágios envolvidos na reparação da dentina na presença do peptídeo E8SD

Catequinas

Como o complexo CPP-ACP atua na remineralização estabilizando apenas a parte inorgânica da dentina, alguns autores sugerem a utilização de um agente anticolagenolítico para a estabilização do componente orgânico. Assim, tem sido também sugerido o tratamento de dentina afetada com extrato de chá branco e chá verde, uma vez que ambos apresentam catequinas, moléculas que agem como inibidoras das enzimas colagenase e elastase, as quais podem promover a degradação da matriz orgânica (29). Em testes com ambos os extratos incluindo o preparo de lesões de cárie artificiais, ambos os agentes aumentaram a propriedade de microdureza e favoreceram a estabilização após a técnica remineralizadora (40), sendo que os melhores resultados foram observados no grupo tratado com o extrato do chá branco, efeito atribuído à sua maior ação anti-colagenolítica (41)

Clorexidina

A clorexidina é uma substância de ampla utilização na Odontologia, em virtude de suas propriedades antibacterianas. A clorexidina em si não promove diretamente a remineralização da dentina, outrossim, ela atua na inibição do processo de degradação das fibras de colágenos, através da inibição da liberação das MMPs após o tratamento ácido no substrato dentinário durante os procedimentos adesivos (60)

Tem sido sugerido o uso coadjuvante da clorexidina com o protocolo da técnica úmida do etanol (EWB). Este protocolo preconiza a saturação da matriz dentinária desmineralizada por etanol ao invés de água, o qual favoreceria a união dos monômeros hidrófobos à dentina. Em um trabalho realizado por Ekambaram *et al* (61) foram utilizados 48 molares com cárie coronária extraídos por indicação terapêutica, os quais foram submetidos a aplicação adjuvante de clorexidina e do protocolo EWB e sua performance foi analisada através de testes de microtração após 24h e 12 meses. Um ponto importante a ser ressaltado é que a utilização do conceito EWB com sua série de concentrações crescentes de etanol requer um

tempo considerado relativamente longo para a rotina clínica. No entanto, protocolos alternativos poderiam superar este aspecto negativo. Neste mesmo contexto, a utilização simultânea do uso da CHX e do protocolo EWB em uma única etapa elimina uma etapa extra que seria necessária para o pré-tratamento da dentina.

Quando em comparação a outros agentes do tipo *cross-linkers*, em um estudo desenvolvido por Islam *et al*,(62) repararam-se superfícies planas de dentina, as quais foram tratadas com os seguintes primers experimentais: hesperidina a 0,5% (HPN), 0,5% de clorexidina (CHX) e 0,5% de extrato de sementes de uva (GSE) , incorporados no primer do Clearfill SE (Kuraray), o qual foi usado como controle. Os espécimes foram restaurados com resina composta, armazenados em água destilada, seccionados e submetidos a testes mecânicos. Os resultados mostraram que a incorporação de HPN aumentou de forma imediata a RU, enquanto a GSE reduziu significativamente a RU. A incorporação de CHX não afetou a RU. Os resultados se encontram na Figura 5. Este mecanismo da HPN ainda não está completamente elucidado, mas sabe-se que sua unidade estrutural fundamental é similar àquela presente no GSE. Ambos são agentes fenólicos, com um anel cromano em sua estrutura, de modo que pode-se supor que a ação química da HPN no colágeno ocorre pelo mesmo mecanismo observado no GSE. Um fato observado neste estudo foi a oclusão dos túbulos dentinários por partículas da smear layer gerado após o condicionamento da dentina com GSE. Esta camada mal dissolvida poderia ser a razão dos baixos valores de resistência de união observados neste grupo. Este efeito adverso pode ser atribuído ao tamanho molecular do GSE, uma vez que o tamanho molecular aparente parece ser múltiplo. A performance do GSE e da HPN requerem mais estudos a longo prazo.

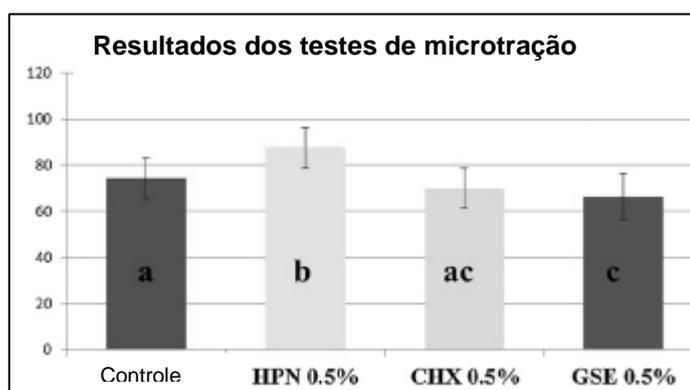


Figura 5 - Comparação dos valores de resistência de união grupos testados, em megapascal (Mpa), após 24h de armazenamento.

No entanto, vale ressaltar que as concentrações deste agente devem ser observadas quando da sua utilização. Um estudo realizado por Kim *et al* forneceu evidência micromorfológica da capacidade de CHX para promover remineralização da dentina desmineralizadas. Blocos de dentina foram tratados por 30 minutos com diferentes concentrações de clorexidina entre 0,02 e 2% e armazenados em soro fetal bovino (SBF) para posterior análise do módulo de elasticidade. Um primeiro questionamento seria em relação a este tempo de 30 minutos, o que clinicamente não parece ser viável, todavia, a escolha deste tempo objetivou uma melhor avaliação dos efeitos. A CHX é capaz de favorecer a remineralização, no entanto, sua substantividade efetiva está atrelada à concentração utilizada. Inclusive, a alta concentração de CHX já apresentaria risco de toxicidade à mucosa oral, sendo descartada a sua aplicação clínica. A remineralização observada neste trabalho parece ter ocorrido tanto no compartimento intrafibrilar como no extrafibrilar.

2.3.3. Glutaraldeído

O glutaraldeído é um agente do tipo cross-linker amplamente utilizado na Biomedicina em função de sua capacidade em melhorar funções teciduais ligadas à integridade estrutural e bioestabilidade do colágeno. Também é sabido que este composto apresenta afinidade com íons cálcio. A utilização do glutaraldeído para induzir a remineralização tem apresentado resultados satisfatórios, uma vez que os achados indicaram que o glutaraldeído poderia promover remineralização biomimética da dentina, resultando em propriedades mecânicas melhoradas e conferindo bioestabilidade(63). O estudo desenvolvido por Chen *et al* (64) utilizou o glutaraldeído (GA) como indutor de um processo de remineralização biomimética com o intuito de reconstruir as propriedades mecânicas do colágeno desmineralizado, devolvendo sua bioestabilidade. Este trabalhou também preconizou o uso de discos de dentina desmineralizados, os quais foram tratados com GA 5% pelo tempo de 3 minutos. As análises foram feitas através de espectroscopia de Raman, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura e testes de nanoindentação. A bioestabilidade foi examinada por experiências de degradação enzimática. A remineralização ocorreu principalmente nas fibras inter-tubulares, o que pode ser um indício que

futuramente esta técnica será capaz de promover a remineralização mesmo em um condições menos úmidas. O grupo aldeído parece exercer uma função dupla: a de se ligar com os resíduos de amina e a de prover sítios de nucleação para os cristais de cálcio e fosfato. O processo de remineralização parece ser regulado de forma equilibrada pela ação conjunta do grupo carbonila adicional, dos grupos funcionais intrínsecos das fibrilas de colágeno e das partículas de ACP. Outros aspectos importantes a serem citados referem-se ao mecanismo de ação do GA. À medida que a água é substituída durante a formação do ACP, os aldeídos não-reagidos atraíram íons cálcio e aceleração esta formação de ACP. O GA também é capaz de inativar proteases endógenas que promovem a degradação do colágeno presente na dentina.

2.3.4. Outros agentes remineralizadores

Agregado de Trióxido Mineral (MTA) e cimento Portland

O agregado de trióxido mineral (MTA) e o cimento Portland são materiais denominados bioativos, em virtude de sua capacidade de produzir apatita carbonatada, sendo capazes de promover a biomineralização da dentina por ambos os materiais (48). A interação entre estes materiais e a dentina, em solução salina fosfato-tamponada, (PBS) promove um processo de biomineralização que levou a uma maior união da interface adesiva(49).

Zinco (Zn)

A incorporação de partículas de zinco também é apontada como uma técnica capaz de promover a reparação da dentina desmineralizada. Foi verificada a remineralização em dentina armazenada em solução remineralizante à base de cloreto de zinco e óxido de zinco (45). A incorporação de zinco em alguns cimentos de resina contendo agentes de preenchimento bioativos induziram a inibição das metaloendoproteinases (MMPs) de dentina, modulando a degradação de colágeno e influenciando a remineralização dentinária indiretamente (46).

No estudo de Toledano *et al* (47), foram avaliadas as propriedades nanomecânicas da dentina tratada com adesivo Adper TM Singlebond (3M ESPE) no qual foram incorporadas nanopartículas de zinco. Os períodos avaliados foram de 24h, 1 mês e 3 meses e a análise ultra-morfológica foi realizada por microscopia laser confocal. Os autores concluíram que a adição destas partículas é capaz de induzir a precipitação mineral, mesmo nas áreas incompletamente infiltradas. Ademais, esta técnica condiz com a atual filosofia de mínima intervenção na Odontologia, na qual os passos operatórios como a remoção da cárie são sucedidos por materiais terapêuticos capazes de estimular a remineralização do tecido afetado

Vidros Bioativos

Devido à sua bioatividade, diversos estudos apontam que a Biodentine®, um composto à base de silicato de cálcio utilizado para tratamentos endodônticos, pode ser considerado como um material adequado para o mecanismo de regeneração do complexo dentina-polpa, observado no procedimento de capeamento pulpar direto (53). Outro estudo revelou que a aplicação de esferas de células pulpares no complexo dentina-polpa afetado possui potencial de replicação de estruturas tubulares radiculares e de regeneração da polpa dentária humana, influenciando também, indiretamente, na remineralização dentinária (54).

Sais de cálcio, fosfato de cálcio e silicato de cálcio

Assim como o cálcio, o silicato é um composto de papel extremamente relevante no processo de mineralização. A bioossificação intrafibrilar no arcabouço de colágeno, quando utilizada como técnica de regeneração tecidual, apresenta grande benefício no que tange ao potencial osteocondutivo (55). O arcabouço de colágeno infiltrado por sílica intrafibrilar é biodegradável e altamente biocompatível, com propriedades biomecânicas e osteocondutividade otimizadas (9). Os biomateriais à base de sílica têm apresentado propriedades desejáveis e resultados satisfatórios para a regeneração de tecidos duros *in situ* (21).

Profeta *et al* (56) avaliaram a performance do fosfosilicato de cálcio e sódio através de sua aplicação na interface dentina-resina em 3 protocolos de união distintos. Os períodos de armazenamento foram de 24 h e 6 meses em PBS. O adesivo contendo BAG pode ser uma alternativa terapêutica para aumento da longevidade de união através dos mecanismos de deposição de cálcio e de interferência na ação de enzimas collagenolíticas. Dentre as possíveis causas atribuídas a este efeito positivo, estão: a) a presença do composto na interface dentina-resina pode ter induzido a liberação de um ácido silícico, que interfere na ação das MMPs; b) a precipitação de ACP; c) a liberação de íons Na^+ e Ca^{2+} , juntamente com a incorporação de prótons H_3O^+ , cria um meio alcalino que interfere na ação das MMPs. Este trabalho forneceu evidência de que o uso de agentes como o Bioglass 45S5 pode favorecer a durabilidade da união resina-dentina.

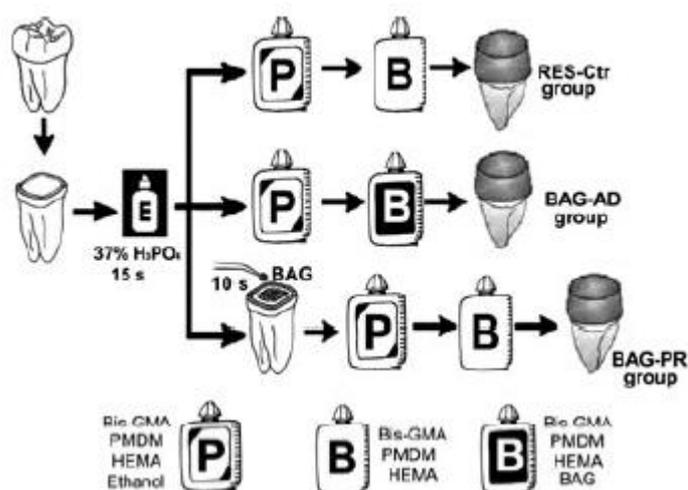


Figura 6 - Design do estudo: padronização do preparo das superfícies dentinárias para aplicação de 3 protocolos distintos de adesão.

Polidopamina

A polidopamina, um polímero que contém silicato de cálcio e fosfato, tem sido testada para tratamento de sensibilidade dentária em função de sua ação direta na oclusão dos túbulos. Em um estudo de Zhou *et al* (57), superfícies de esmalte e dentina desmineralizadas foram revestidas por polidopamina para avaliar o efeito na remineralização dentária (58). Não foi observada diferença significativa na remineralização do esmalte revestido com polidopamina ou não. No entanto, uma

diferença significativa foi encontrada na remineralização da dentina, visto que o revestimento de polidopamina promoveu notável remineralização da dentina desmineralizada, promovendo uma oclusão dos túbulos dentinários por cristais de hidroxiapatita.

Gel de agarose

A utilização do gel de agarose como indutor da mineralização biomimética apresenta uma perspectiva positiva tanto no processo de remineralização, mas também como um possível coadjuvante no tratamento de hipersensibilidade dentinária, uma vez que possui uma boa capacidade de oclusão dos túbulos dentinários (59). Uma camada de gel de agarose a 0,5% contendo 0.26m de Na_2HPO_4 , que foi utilizado para cobrir fatias de dentina tratada com ácido, seguida pela aplicação de uma camada de gel de agarose, sem íons de fosfato. Foi observado que as moléculas de agarose se ligam às moléculas de colágeno derivadas da dentina desmineralizada e a solução formulada a partir do gel de agarose serve como um meio que permite a difusão de íons cálcio e fosfato, de modo a induzir a nucleação e o crescimento dos cristais de hidroxiapatita.

Ácido metafosfórico

Sugere-se ainda que o condicionamento prévio da dentina pode ser realizado através do uso do ácido metafosfórico e do ácido ortofosfórico. No trabalho de Feitosa *et al* (28), espécimes da dentina foram condicionados usando 37% OPA por 15 segundos e 40% MPA por 60 segundos e depois submetidos a espectroscopia de infravermelho (FTIR) e ultra-morfologia assistida por microscopia confocal (Ca-CLSM). Um adesivo de 3 passos foi aplicado na dentina e os espécimes foram seccionados em feixes de 1mm. Metade destes foram imediatamente submetidos ao teste de microtração e a outra metade foi armazenada por 6 meses para conseguinte preparo e avaliação de nanoinfiltração. A primeira hipótese nula, que não haveria diferença entre os grupos tratados com OPA e MPA deve ser rejeitada devido às diferenças encontradas durante o FTIR e avaliação CLSM-Ca. A segunda hipótese nula de que não haveria diferença na resistência à tração (MTBS) após 6 meses de armazenamento em água para a interface resina-dentina tratadas com OPA ou MPA

também deve ser rejeitada, uma vez que os espécimes no grupo OPA apresentaram diferenças significativas quando comparadas com as espécimes do grupo tratado com MPA, o qual pode ser considerado como um agente capaz de induzir a precipitação mineral. Em relação à metodologia, os pontos a serem considerados são: a) a presença de hexafluorofosfato de difeniliodônio no adesivo utilizado aumenta o grau de conversão e a capacidade de reticulação dos monômeros hidrofílicos, no entanto, esta contribuição parece ocorrer apenas de colágeno desmineralizado; b) a baixa solubilidade do cristal criado após o tratamento com o MPA contribui para a infiltração de cristais dentro da dentina desmineralizada e c) apesar da eficácia que o MPA pode proporcionar, é possível que o ânion metafosfato derivado da dissociação do MPA quando aplicado na dentina possa permanecer quimicamente ligado às fibrilas quando do uso do trimefosfato de sódio como análogo biomimético, o que favoreceria a remineralização em soluções supersaturadas contendo íons específicos. O OPA apresentou redução dos valores de resistência de união após o período de 6 meses, ao passo que o MPA não apresentou diferenças significantes após 6 meses. Ainda há necessidade de mais estudos para que estas suposições sejam confirmadas.

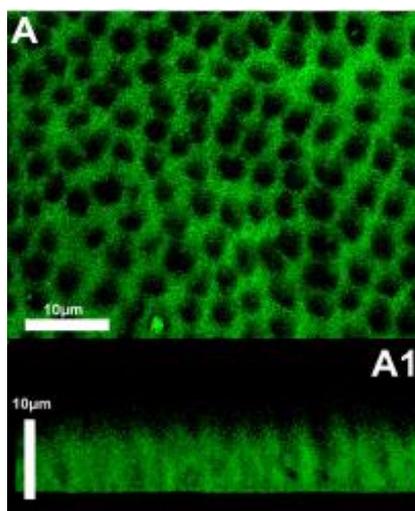


Figura 7 - Microscopia da dentina após tratamento com os ácidos OPA e MPA. A: presença de minerais de cálcio ao longo do substrato desmineralizado, cujas projeções podem ser observadas em A1.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PROTOCOLO E REGISTRO

A revisão sistemática apresentada nesta dissertação foi desenvolvida de acordo com os critérios estabelecidos pelo protocolo PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Review). O registro foi feito no sistema PROSPERO sob o número CRD42016049821.

3.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

O planejamento para a elaboração desta revisão iniciou-se com a definição da pergunta que nortearia a busca na literatura, a qual intitula esta revisão, e com a calibração dos examinadores. Em caso de discordância entre os dois revisores, um terceiro revisor decidiria pela inclusão ou não do artigo. A partir de então, dois investigadores (SS e FS) revisaram as publicações com base em seus títulos e resumo.

Foram selecionados somente estudos que avaliaram técnicas de remineralização da dentina mimetizando processos biológicos naturais do organismo ou que estimulassem a remineralização natural, excluindo aqueles artigos que tratam sobre a presença de fluoreto nos dentífricos ou sobre a remineralização induzida pela liberação de flúor pelo cimento de ionômero de vidro. Artigos que conseguiram resultados relevantes apenas para a remineralização do esmalte, sem abordar resultados em dentina, ou artigos que compararam materiais estimulantes à regeneração meramente pulpar também não foram incluídos. Inicialmente, foram definidos possíveis termos de busca, utilizando várias palavras-chaves relacionadas ao tema. Estes termos de busca foram submetidos a uma comparação para averiguar quais palavras-chaves gerariam os melhores resultados de pesquisa.

Em seguida, os artigos foram selecionados pelo título para posterior leitura dos respectivos resumos. A partir da leitura dos resumos dos artigos, foram selecionados os artigos cujo resumo se adequou à proposta de pesquisa. Na segunda etapa de leitura, os artigos anteriormente selecionados foram lidos na íntegra pelos

examinadores. Após isto, foram selecionados os artigos que seriam utilizados na revisão, de acordo com os critérios de inclusão, e, por fim, os artigos selecionados foram submetidos à avaliação de risco de viés para análise de qualidade.

3.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os estudos foram excluídos nos casos de i) não abordarem uma técnica de remineralização baseada em mimetizar processos naturais da biomineralização dentária ou de não trazerem informações referentes aos efeitos na união entre resina e dentina; ii) fuga ao tema e à pergunta proposta para direcionar esta revisão; iii) serem anteriores ao ano de 2002; iv) relato de caso, revisões, opiniões pessoais, patentes, citações e capítulos de livro v) artigo completo inacessível; vi) artigo escrito em idioma cujo alfabeto seja distinto do alfabeto latino (romano).

3.4. FONTES DE INFORMAÇÃO E ESTRATÉGIAS DE BUSCA

As buscas foram realizadas nas bases de dados eletrônicas PubMed, LILACS, Cochrane, Web of Science, Scopus e também procedeu-se à busca na literatura cinzenta através de pesquisa no Google Scholar. Foram realizadas três buscas em cada uma das bases de dados eletrônicas, utilizando termos de busca iguais para todas as bases (Apêndice 1)

3.5. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE DADOS

A catalogação dos estudos selecionados foi realizada através da ferramenta EndNote 6.0 e as duplicatas foram removidas. Para a extração de dados e avaliação da qualidade dos estudos, as metodologias dos artigos foram analisadas de modo a aferir a validade dos resultados dos estudos incluídos. Os revisores realizaram a extração de dados de maneira independente

A análise dos dados foi realizada com a seleção das informações originais de cada um dos artigos. A leitura dos resumos foi organizada a partir da base de dados em

que foram pesquisados, evitando a leitura duplicada de um mesmo trabalho. Todas as análises foram realizadas a partir dos critérios de inclusão utilizados

3.6. ANÁLISE DE QUALIDADE E RISCO DE VIÉS

Para cálculo do risco de viés, a ferramenta GRADE foi adaptada para estudos *in vitro*, de acordo com Pavan et al (73), devido a não existência de métodos específicos voltados para este tipo de estudo. A partir desta ferramenta, os estudos foram classificados em quatro níveis: qualidade de evidência alta, moderada, baixa ou muito baixa (74). Este método considera os seguintes fatores: limitações do estudo, inconsistência dos resultados, imprecisão dos resultados, evidência indireta, magnitude do efeito e viés de publicação.

Para análise do risco de viés, foi utilizado o CRIS Guideline, o qual é uma adaptação da ferramenta CONSORT Guideline.(75)

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADO DA BUSCA

A busca resultou em um total de 1837 artigos (Pubmed-360, Cochrane-348, Lilacs-30, Web of Science-925 e Scopus-174). No total, 230 artigos foram removidos por aparecerem em duplicata, aparecendo em mais de uma dessas bases de dados. Os 1607 artigos restantes foram filtrados por seleção dos títulos. Destes, 99 foram selecionados para leitura do resumo, os quais foram adicionados aos 7 resumos selecionados pela literatura cinzenta e outras fontes adicionais, como por exemplo, artigos que já haviam sido estudados em outras ocasiões e que apresentavam correlação com o tema desta pesquisa. Então, mais um total de 90 artigos foram excluídos por incompatibilidade com os critérios de inclusão.

No que tange à literatura cinzenta, foi utilizado o Google Scholar como fonte de informação e utilizaram-se as mesmas palavras-chave para a busca, sendo que a seleção foi feita através da ferramenta de busca avançada, a qual exigia que o estudo apresentasse as palavras chaves em uma mesma frase, com o intuito de filtrar os resultados. Ao final, 106 artigos foram lidos na íntegra e, destes, 16 foram selecionados para análise de qualidade. Os trabalhos foram organizados de acordo com a técnica utilizada pelos autores para melhor elucidação pontual de cada uma delas no tópico de discussão do artigo. Os resultados da busca encontram-se esquematizados no fluxograma de busca (figura 8). As principais conclusões obtidas a partir de cada estudo selecionado foram organizadas na tabela de artigos selecionados (figura 9).

Figura 8 – Fluxograma de Busca

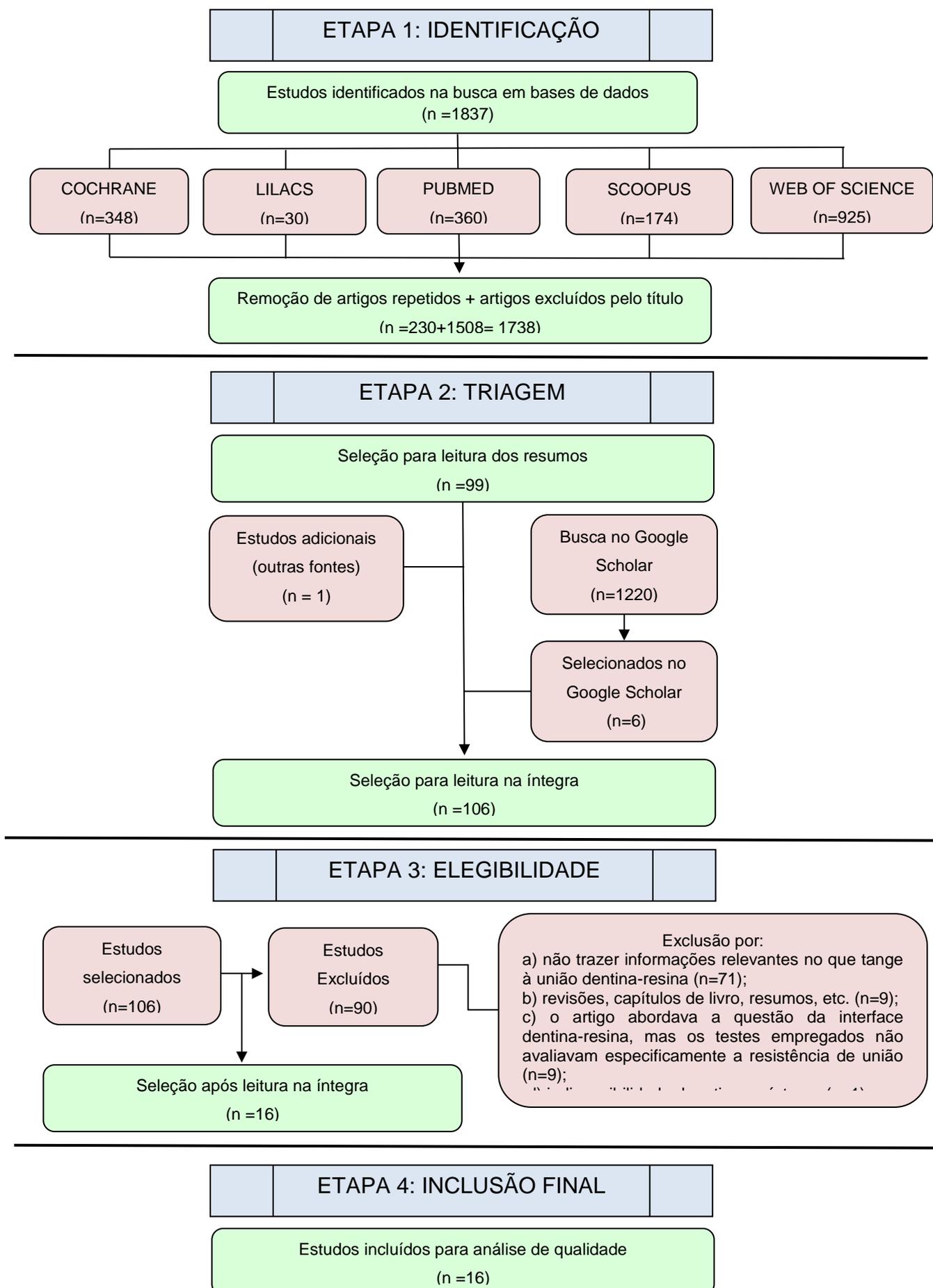


Figura 9: tabela-resumo dos artigos selecionados

<i>Abuna et al</i>	2016	Pubmed	Adesivo experimental à base de fosfato de cálcio	1) O tratamento prévio da dentina ácido-gravadas usando primers biomiméticos contendo ácido poliaspártico (PAA) e/ou trimetafosfato de sódio (STMP) foi capaz de reestabelcer as propriedades mecânicas e aumentar a longevidade da interface dentina-resina; 2) tanto o PAA como o STMP induziram a remineralização do colágeno, em patamar intra e extrafibrilar
<i>Toledano et al</i>	2014	Pubmed	Adição de partículas de zinco a um adesivo	1) A mais baixa degradação de colágeno foi observada no adesivo contendo zinco; 2) a sua resistência à micro-tração se manteve pelos períodos avaliados de 24h e 3 meses
<i>Wang et al</i>	2014	Pubmed	Utilização do peptídeo E8DS associado a nano-hidroxiapatita em discos de dentina	1) A técnica foi eficaz em promover o selamento dos túbulos dentinários, o que contribui para o aumento da durabilidade de união
<i>Islam et al</i>	2012	Pubmed	Incorporação de agentes cross-linkers no primer de adesivo autocondicionante	1) O estabelecimento de ligações cruzadas torna os componentes da matriz mais resistentes à degradação; 2) a influência desses agentes na resistência de união foi positiva e ocorreu de forma imediata quando os espécimes foram submetidos à testes mecânicos
<i>Profeta et al</i>	2012	Pubmed	Aplicação do fosfosilicato de cálcio e sódio (BAG) na interface dentina-resina em 3 protocolos de união distintos	1) A amostra BAG contendo adesivo apresentou alta resistência união após 24h e não apresentou redução significativa após 6 meses; 2) efeito atribuído a mecanismos envolvidos na deposição de cálcio e a uma provável influência na ação da enzima colagenolítica
<i>Sauro et al</i>	2015	Pubmed	Pré-tratamento da dentina com iniciadores biomiméticos análogos de fosfoproteínas	1) Constatou-se favorecimento da união em virtude da captação de fosfato; 2) a redução da permeabilidade ao longo da interface pode ser atribuída à precipitação mineral gerada pela técnica
<i>Ryou et al</i>	2011	Pubmed	Uso do ácido poliacrílico e do tripolifosfato de sódio para avaliar a diferença do comportamento nanomecânico	Mecanismo de ação da técnica: através da deposição de apatita intrafibrilar; 2) na ausência de remineralização biomimética: ausência de mineralização da camada híbrida e degradação das fibrilas de colágeno
<i>Kim et al</i>	2010	Pubmed	Uso de moléculas polianiónicas, associadas ao cimento Portland como fonte de cálcio, como mecanismo de desidratação da água presente nas juntas adesivas	1) A desidratação se expressou através da remineralização intrafibrilar das fibrilas de colágeno; 2) constatação da desidratação pela observação do marcador prata na interface resina-dentina; 3) aumento da resistência da união adesiva à degradação ao longo de um período de 12 meses, respaldado pela conservação de suas forças de ligação à tração
<i>Gu et al</i>	2010	Pubmed	Utilização de meio de remineralização biomimética contendo análogos biomiméticos (PAA e PAPV)	1) A técnica influenciou o módulo de elasticidade, na densidade mineral e na ultra-estrutura da interface dentina-resina; 2) ressalva que há fatores a serem elucidados ainda para qualificar a influência desta técnica
<i>Epasinghe et al</i>	2012	Cochrane	Incorporação de proantocianidinas em adesivo experimental	1) A técnica não apresentou efeito adverso sobre a força de união resina - dentina quando a concentração foi menor ou igual a 2%/ 2) observou-se uma redução na resistência de união na concentração de 3%;

<i>Epasinghe et al</i>	2014	Web of Science	Uso de flavonóides para remineralização de dentina desmineralizada, comparando à outras técnicas	1) A melhora nas propriedades mecânicas foi maior nas proantocianidinas, na ordem: proantocianidina> quercetina> naringina
<i>Ekambaram et al</i>	2014	Web of Science	Incorporação de clorexidina associada ao uso do etanol	1) A técnica favoreceu a preservação da união; 2) o uso da clorexidina parece aumentar a taxa de sucesso de restaurações adesivas
<i>Feitosa et al</i>	2013	Web of Science	Uso do ácido metafosfórico como agente condicionante da dentina	1) Este método pode funcionar como uma estratégia alternativa para condicionamento da dentina; 2) apresentou melhores resultados quando comparado ao ácido ortofosfórico; 3) favorece a durabilidade da união
<i>Kim et al</i>	2012	Web of Science	Utilização de clorexidina em dentina desmineralizada	1) Os espécimes de dentina com a CHX 0,2% e 2% apresentaram uma maior deposição de minerais granulares ao longo das fibrilas de colágeno
<i>Chen et al</i>	2016	Scopus	Utilização do glutaraldeído (GA) como indutor da remineralização	1) A técnica provou ser capaz de devolver a bioestabilidade; 2) as fibrilas de colágena induzidas pelo GA apresentaram alta encapsulação por nanocristais; 3) melhora no módulo de elasticidade e na microdureza
<i>Wagner et al</i>	2013	Scopus	Nanopartículas de hidroxiapatita incorporadas a um adesivo comercial preparadas por diferentes processos (biomimético e hidrotermal)	1) Foi verificado um aumento significativo na resistência de união em ambos os processos; 2) todavia, na concentração de 10%, para todos os tipos de partícula, observou-se um efeito negativo sobre a RU

Continuação da Figura 9: tabela-resumo dos artigos selecionados

4.2. RISCO DE VIÉS E ANÁLISE DE QUALIDADE

Na Odontologia, sabe-se que os estudos *in vitro* constituem importante evidência para a compreensão das propriedades biológicas, físicas e mecânicas dos materiais odontológicos. Dentre as vantagens dos estudos *in vitro* estão a facilidade de performance e de controle do meio. No entanto, este tipo de estudo apresenta a dificuldade de tradução para a situação clínica. Assim, a ferramenta CRIS Guideline apresenta uma análise satisfatória de todos os fatores relevantes para a análise da validade interna de um estudo. Os fatores avaliados, conforme ilustrados na figura 10, são: tamanho da amostra; significância das diferenças entre amostras; preparo e manejo das amostras; sequência de alocação, randomização e verificação de estudo-cego. Nesta revisão, todos os artigos incluídos apresentaram baixo risco de viés. A partir do método GRADE, os estudos foram submetidos à análise de qualidade. Dos 16 artigos incluídos, 3 foram considerados de qualidade moderada e 13 como de alta qualidade. Nenhum estudo foi considerado de baixa qualidade ou inconclusivo. (Figura 11).

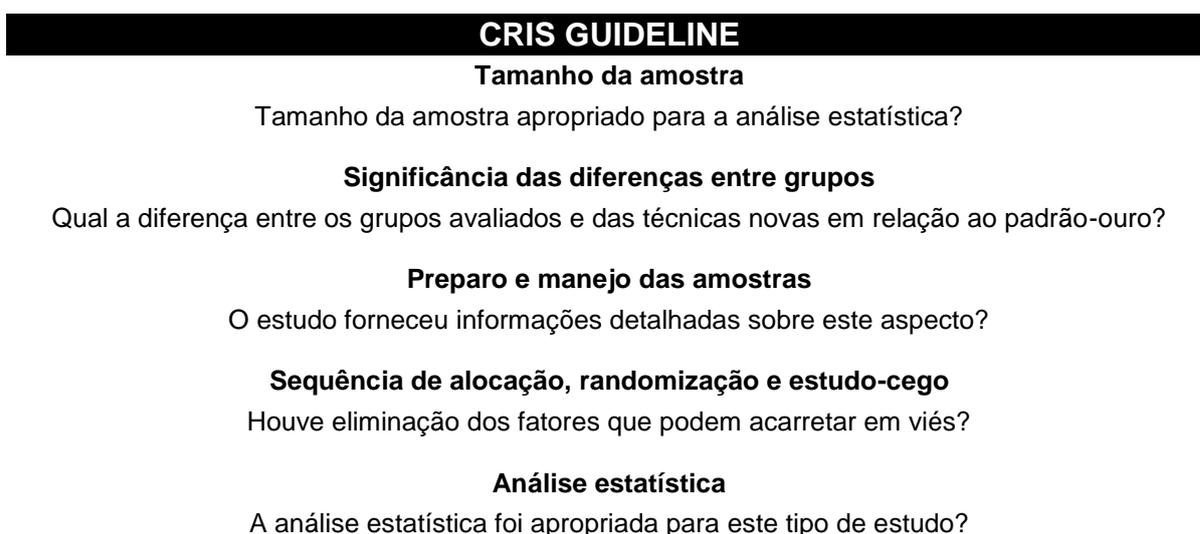


Figura 10: Fatores avaliados pelo CRIS GUIDELINE

Autores	Delimitação do estudo	Limitações	Inconsistência	Evidência indireta	Imprecisão	Viés de publicação	Magnitude do efeito	Qualidade geral
<i>Abuna et al</i> [Com base comparável	√	√	√	√	√	√	++++
<i>Toledano et al</i>	Com base comparável	√	√	√	X ₁	√	√	+++
<i>Wang et al</i>	Com base comparável	√	√	√	√	√	√	++++
<i>Islam et al</i>	Com base comparável	√	√	√	√	√	√	++++
<i>Profeta et al</i>	Com base comparável	√	√	√	√	√	√	++++
<i>Sauro et al</i>	Com base comparável	√	√	√	√	√	√	++++
<i>Ryou et al</i>	Com base comparável	√	√	√	√	√	√	++++
<i>Kim et al</i>	Com base comparável	√	√	√	X ₂	√	√	+++
<i>Gu et al</i>	Com base comparável	√	√	√	X ₃	√	√	+++
<i>Epasinghe et al</i>	Com base comparável	√	√	√	√	√	√	++++
<i>Epasinghe et al</i>	Com base comparável	√	√	√	√	√	√	++++
<i>Ekambaram et al</i>	Com base comparável	√	√	√	√	√	√	++++
<i>Feitosa et al</i>	Com base comparável	√	√	√	√	√	√	++++
<i>Kim et al</i>	Com base comparável	√	√	√	√	√	√	++++
<i>Chen et al</i>	Com base comparável	√	√	√	√	√	√	++++
<i>Wagner et al</i>	Com base comparável	√	√	√	√	√	√	++++

Figura 11: tabela de análise de qualidade dos estudos selecionados pelo método GRADE. X₁: apenas 3 meses de avaliação após a técnica; X₂: necessita de estudos isolados para melhor elucidação do mecanismo envolvido na desidratação; X₃: avaliação de apenas 3 pontos de flexão.

4.3. CARACTERÍSTICAS DOS ESTUDOS

Muitas técnicas diferentes foram abordadas nos estudos selecionados. Sete trabalhos (47, 52, 54, 56, 59, 60 e 61) foram mais semelhantes entre si, uma vez que relataram o uso de análogos biomiméticos e / ou moléculas polianiónicas como fonte de cálcio e como um caminho para favorecer a remineralização. Seis estudos descreveram métodos que utilizam agentes do tipo cross-linkers, tais como proantocianidina e clorexidina (41, 48, 49, 50, 53 e 55). Três estudos descreveram, quando comparados com outros artigos, técnicas não amplamente disseminadas, tais como a utilização do peptídeo E8DS (58), a utilização de ácido meta-fosfórico (51) e a incorporação de partículas de zinco (57). No entanto, os métodos de estudo para a análise da durabilidade da união na interface dentina-resina foram homogêneos, conquanto as técnicas em si tenham sido considerada heterogêneas, pois vários agentes distintos foram abordados e por não ter sido ainda constatado um padrão nos métodos utilizados, fato que pode ser atribuído pelo tema ser ainda recente e inovador. Outro aspecto comum observado em vários estudos foi o uso de um adesivo experimental, ou iniciador, contendo o agente biomimético, o que pode confirmar que o sistema de adesão provavelmente será o veículo escolhido para a incorporação desses agentes na prática restauradora.

4.4. RESULTADOS INDIVIDUAIS DOS ESTUDOS

Embora nem todos os estudos usassem os mesmos agentes para a remineralização da dentina, os métodos de avaliação mecânica foram semelhantes e todos os resultados foram positivos em relação ao aumento da durabilidade da união entre dentina e resina, conforme demonstrado na Tabela 1, que descreve os principais achados de cada estudo selecionado. Três estudos (49, 55 e 59) não só avaliaram a eficácia do agente para favorecer a durabilidade da união dentina-resina, mas também compararam o efeito do método quando o agente foi utilizado em diferentes concentrações. Três artigos (52, 54 e 57) levantaram a existência de alguns aspectos que ainda precisam de maior elucidação. Todos os artigos podem nos levar a concluir que a remineralização biomimética da dentina é um método promissor, desde que surjam estudos mais detalhados e resultados verificados a longo prazo.

5. DISCUSSÃO

A crescente procura por estratégias que favoreçam o estabelecimento da mineralização dos tecidos dentários comprometidos, como dentina e esmalte, para tratamentos de recuperação por lesão de cárie, traumas e outros, bem como o interesse por métodos biomiméticos para resolução destas recorrências, atraíram a atenção de pesquisadores da Odontologia. Nas últimas décadas, grupos de pesquisa têm se movimentado para encontrar as técnicas que culminem em melhores resultados de indução de remineralização destes tecidos.

A remineralização da dentina desmineralizada é importante para o controle indireto de lesões de cárie primárias e secundárias (11), uma vez que a reposição mineral do tecido dentinário perdido favorece o equilíbrio dos processos de desmineralização e remineralização e atua a favor da paralisação da lesão cariosa. A remineralização biomimética visa, então, atingir a fibrilas de colágenos da dentina desmineralizada com partículas nanoprecursoras de fosfato de cálcio amorfo do tipo líquido que são estabilizados por análogos biomiméticos de proteínas não colagenosas (9). Esta remineralização biomimética é comprovadamente capaz de restaurar o comportamento nano-dinâmico e mecânico da dentina (10).

O potencial remineralizante das abordagens terapêuticas convencionais, como o uso do cimento de ionômero de vidro (CIV), é aumentado na presença de um agente sequestrante de cálcio, tais como o ácido poliacrílico, entretanto, estes materiais, bem como os cimentos de silicato de cálcio não são capazes de restabelecer as propriedades mecânicas da dentina (76). Assim, os sistemas adesivos experimentais contendo monômeros que liberaram agentes com propriedades remineralizantes avançadas e de inibição das MMPs foram desenvolvidos e utilizados em combinação com os iniciadores de resina contendo ácidos sequestrantes tais como poliácido aspártico (PASA), ácido poliacrílico (PAA) e análogos biomiméticos de fosfoproteínas do colágeno tais como o trimetafosfato de sódio. Esta abordagem biomimética é capaz de evocar uma remineralização "bottom-up" que restaura a resistência inicial de interfaces adesivas. Assim, a dentina pré-tratada com análogos biomiméticos, como o ácido poliaspártico e o trimetafosfato de sódio, proporciona um meio de ligação adequado para a remineralização da interface, uma vez que estes

análogos promovem a captação de íons fosfato. Foi verificado também que a precipitação mineral promovida por estes agentes acarretou em uma redução da micropermeabilidade ao longo da interface (77). No entanto, uma limitação atribuída ao trimetafosfato de sódio seria a sua incapacidade de induzir a mineralização intrafibrilar do colágeno tipo I, devido à sua inabilidade de realizar fosforilação química (78). Tem-se sugerido então que o uso deste composto requeira a utilização de análogos capazes de promover a estabilização do fosfato de cálcio amorfo (79). O ácido polivinilfosfônico (PVPA) é peça importante para o recrutamento do ácido poliacrílico durante a remineralização biomimética. Ademais, foi demonstrado que a utilização do sistema que utiliza primers biomiméticos contendo análogos de fosfoproteínas, tais como ácido aspártico ou trimetafosfato de sódio, permite uma remineralização biomimética de interfaces de resina-dentina (80). De acordo com este mesmo estudo, o desenvolvimento de adesivos experimentais à base de fosfato de cálcio utilizados com primers autocondicionantes contendo os análogos biomiméticos ácido poliacrílico e sódio trimetafosfato resultou em estabilização na resistência de união por 6 meses, sendo que após 1 ano, não foi possível manter a estabilidade dessa união (81). Um aspecto que deve ser considerado nos adesivos contendo agentes capazes de promover a remineralização biomimética da dentina é a de promover a deposição mineral na profundidade dos túbulos dentinários. O desenvolvimento destes sistemas adesivos é promissor, no entanto, faz-se necessário aferir a profundidade que a deposição mineral é capaz de alcançar, bem como são necessários estudos a longo prazo.

A estratégia de remineralização biomimética utilizando polímeros induzidos por precursores líquidos (PILP) demonstra potencial em camadas híbridas que apresentam porosidades ou em dentina afetada (82). O sistema PILP é um modelo *in vitro* utilizado para sinteticamente produzir o fosfato de cálcio amorfo, que atua como um precursor da formação dos biominerais, recriando assim, uma estrutura morfológica similar àquela presente nos minerais da dentina. Com base neste conceito, o desenvolvimento de uma estratégia incorporando fosfato de cálcio amorfo estabilizado pode proporcionar o aumento da durabilidade da união resina-dentina e remineralização da dentina afetada em lesões de cárie. A utilização do sistema PILP através do ácido poli-L-aspártico como agente de direcionamento do processo polimérico também foi considerada como técnica capaz de restaurar as

propriedades mecânicas da matriz desmineralizada em dentes com lesão cariosa (83). Além disso, sabe-se que a técnica pelo sistema PILP é capaz de promover a remineralização na matriz dentinária desmineralizada tanto na área interfibrilar como na região intrafibrilar (84).

A remineralização biomimética atua como um mecanismo de desidratação progressiva de matrizes de colágeno (11). No entanto, para esta técnica, cabe ressaltar que o tecido dentinário que sofreu ampla alteração estrutural não pode ser remineralizado na mesma hierarquia e dimensão que são observadas na remineralização da dentina intacta (12). A biomineralização por si só já é um processo de desidratação, em que a água dos compartimentos intrafibrilar de fibrilas de colágeno, é progressivamente substituída por cristais de apatita. Como a água pode ocasionar a hidrólise dos monômeros resinosos na camada híbrida, a utilização de uma estratégia de remineralização biomimética como um mecanismo de desidratação progressiva pode preservar a integridade da interface adesiva ao longo do tempo (11). No entanto, como é proável que os mecanismos que contribuem para estas alterações no teor de água sejam acoplados e interdependentes entre si, são necessários mais estudos para isolar os mecanismos responsáveis pela diminuição no módulo de elasticidade da dentina peritubular com o envelhecimento para melhor elucidação. Apesar das evidências sugerirem que a remineralização biomimética promova um aumento no módulo de elasticidade, cabe a ressalva de que, apesar da evidente contribuição da remineralização interfibrilar observada após a técnica, não há como afirmar que a remineralização intrafibrilar por si só é capaz de recuperar o módulo de elasticidade das fibras de colágeno.

Referente à utilização dos extratos naturais, os testes com a hesperidina e o extrato de semente da uva demonstraram que estes agentes favoreceram a preservação da matriz de colágeno. A associação da hesperidina com o adesivo autocondicionante Clearfill SE Bond (Kuraray, Japão) possibilitou uma remineralização rápida da dentina (56) De mesmo modo, quando utilizada em associação a um adesivo experimental, a proantocianidina não apresentou efeitos adversos relacionados à resistência de união, mas cabe a ressalva que, quando a concentração utilizada foi de 3%, observou-se uma redução na resistência de união (58). Ainda no contexto da utilização de agentes cross-linkers, os estudos indicam que a utilização do

glutaraldeído (GA) pode reestabelecer as propriedades mecânicas do colágeno. O uso de GA no pré-tratamento da dentina pode encurtar o tempo de remineralização notavelmente a partir de 7 dias a 2 dias. As fibrilas de colágeno remineralizada induzidas por GA apresentaram nanocristais minerais de hidroxiapatita recém-formados.

Outro estudo também demonstra que o uso de compostos bioativos contendo silicato de cálcio derivado do pó mineral do cimento de Portland pode ser um método inovador para a remineralização biomimética de superfícies de dentina com baixa concentração de apatita, bem como para evitar a desmineralização da dentina hipomineralizada e/ou cariada, com potencial vantagem em aplicações clínicas (60). Para o condicionamento da dentina, há evidências que o uso do MPA (ácido metafosfórico) por 60 segundos como um agente alternativo de condicionamento também pode ser uma estratégia adequada para criar laços de resina-dentina mais duráveis (61). Este efeito é atribuído à ação das metafosfatases presentes neste ácido, as quais estabelecem uma ligação do tipo cross-link com as fibrilas colágenas da dentina. A adição de partículas de zinco, por sua vez, parece interferir no processo de degradação da matriz (62), o que é considerado um dos maiores fatores que afetam a durabilidade da resistência de união.

Uma estratégia com potencial para uso clínico seria a utilização de materiais resinosos e sistemas adesivos "inteligentes" contendo reagentes biomiméticos com capacidade de remineralizar e prevenir a degradação da interface de união resina-dentina, culminando em uma maior longevidade clínica (49). Os efeitos bioativos do fosfosilicato cálcio/sódio como potencial para manter a estabilidade de união, baseiam-se na deposição de cálcio na interface adesiva, bem como por uma possível inibição da ação da enzima colagenolítica, a qual é a maior responsável pela degradação da matriz, como citado anteriormente. (51)

Os achados neste trabalho direcionam para a perspectiva de incorporação destes agentes de remineralização biomimética no sistema adesivo. Apesar de ter sido observada uma heterogeneidade nos estudos incluídos, pode-se observar que há uma tendência em incorporação do agente em um adesivo contendo Bis-GMA, TEGDMA, UDMA e HEMA, como os componentes mais recorrentes nas formulações

observadas. A tabela presente na figura 12 compara as diferentes formulações químicas empregadas nos estudos incluídos, no que tange ao agente e à técnica utilizada. Neste contexto, cabe a ressalva da necessidade de padronização dos testes e dos métodos empregados, para que se possa estabelecer uma linha de comparação entre os agentes e técnicas, de modo a padronizar o preparo das soluções, o tempo utilizado no tratamento dos espécimes e a concentração dos compostos utilizados, bem como também a escolha destes compostos. Alguns aspectos que, por sua vez, apresentaram pouca variação nos estudos foram: a formulação do PBS; o pH da solução remineralizadora estabilizado em 7,4; e a utilização do etanol em 50% de seu peso na formulação do adesivo experimental.

Outro aspecto já citado anteriormente de suma importância refere-se à aplicabilidade clínica destas técnicas. Sabe-se que no cotidiano clínico, o tempo da consulta é de aproximadamente 60 minutos, logo, técnicas que requeiram utilizar boa parte deste tempo apenas para o preparo do agente remineralizador decerto não teria uma boa aceitação na rotina odontológica. De mesmo modo, o ideal é que a técnica para utilização destes agentes seja de execução simples e rápida. Outro ponto que cabe ressaltar é dos possíveis efeitos adversos da incorporação destes agentes no sistema adesivo, como por exemplo um possível manchamento da restauração. A possibilidade deste manchamento já foi levantada quando do uso do extrato da semente da uva e poderia também ser verificada na utilização de outras técnicas. Diante do atual panorama de alta demanda estética por parte dos pacientes, um efeito adverso deste gênero seria crucial para a não-aceitação da técnica e do material. Logo, ainda há muitos fatores a serem avaliados no que concerne à aplicabilidade destas técnicas, para que o potencial observado nos seus resultados referentes à resistência de união possa se converter em realidade na prática clínica cotidiana.

Assim, ainda que verifique-se que muitos aspectos precisam ser melhor elucidados, é possível afirmar que os resultados observados na técnica de remineralização biomimética fornecem uma base para a adoção da nanotecnologia como uma alternativa para estender a longevidade da união resina-dentina (13).

TÍTULO DO ARTIGO	AUTOR	METODOLOGIA DO ESTUDO: PREPARO DOS AGENTES REMINERALIZANTES
Bonding performance of experimental bioactive/biomimetic self-etch adhesives doped with calcium-phosphate fillers and biomimetic analogs of phosphoproteins	Abuna <i>et al</i> , 2016	Formulação de 3 primers experimentais com análogos biomiméticos: ácido poliacrílico a 10%, trimetafosfato de sódio a 10% e o último primer contendo 5% de cada um dos análogos. O meio foi uma solução à base de resina contendo GDMA-P (20%), UDMA (15%), HEMA (10%) e TEGDMA (5%)
Glutaraldehyde-induced remineralization improves the mechanical properties and biostability of dentin collagen	Chen <i>et al</i> , 2016	Tratamento da superfície de dentina com GA 5% durante 3 minutos. A solução de GA foi preparada por diluição de uma solução aquosa a 25% em volume de GA com água desionizada 5%. A solução remineralizadora foi feita por mistura de cálcio e fosfato, com pH estabilizado na faixa de 7,4. Cada disco de dentina ficou imerso em 50ml desta solução. A solução de fosfato (12,0 mM) foi obtida utilizando Na ₂ HPO ₄ . A solução contendo cálcio foi preparada por dissolução de uma quantidade calculada de NaCl em solução aquosa de 20,0 mM de CaCl ₂ .2 H ₂ O. Uma quantidade calculada de PAA foi adicionado ao cálcio como estabilizador do ACP. Depois de misturar 25 ml da solução de cálcio com 25 ml da solução de fosfato, a concentração resultante foi: 10,0 mM de cálcio, 6,0 mM fosfato, 90 mM NaCl e 350 µg / ml de PAA. Finalmente, 0,02% (p / v) de azida de sódio foi adicionada à solução de mineralização.
Adjunctive application of chlorhexidine and ethanol-wet bonding on durability of bonds to sound and caries-affected dentine	Ekambaram <i>et al</i> , 2014	Adesivo experimental: mistura consistindo em 70% em peso Bis-GMA, 28,75% em peso de TEGDMA, 0,25% em peso de canforquinona e 1% em peso de N, N-dimetil-4-aminobenzoato de etilo. O primer foi formulado com 50% desta mistura e 50% com etanol.
Effect of proanthocyanidin incorporation into dental adhesive resin on resin–dentine bond strength	Epansighe <i>et al</i> , 2012	Formulação do adesivo experimental à base de resina de metacrilato: 40% em peso de Bis-GMA, 30% em peso de Bis- MP, 28,80% em peso de HEMA , 0,26 em peso de canforquinona e 1% em peso de N, N-dimetil-4-aminobenzoato. Os adesivos experimentais foram preparados por combinação de 50% em peso de misturas de resina e 50% em peso de etanol com diferentes concentrações de PA, de 0, 1, 2 e 3% respectivamente.
Effect of flavonoids on the mechanical properties of demineralised dentine	Epansighe <i>et al</i> , 2014	Superfície de dentina tratada com: 6,5% de proantocianidina, 6,5% de quercetina e 6,5% de naringina, todos em solução de PBS a pH 7,4. Os espécimes foram mantidos nas suas respectivas soluções e

		testados nos períodos de 5min, 10 min, 30 min, 1 h e 4h.
Dicalcium phosphate (CaHPO ₄ 2H ₂ O) precipitation through ortho- or meta-phosphoric acid-etching: Effects on the durability and nanoleakage/ ultra-morphology of resin–dentine interfaces	Feitosa <i>et al</i> , 2013	Os espécimes de dentina foram previamente tratados com 37% OPA por 15 segundos e 40% MPA por 60 segundos. O adesivo experimental utilizado foi formulado com: 30% em peso de HEMA, 30% de peso em TEGDMA, 40% em peso de E-BisADM, com adição de 0,5% de canforoquinona, 0,5% em peso de etil-4-dimetilaminobenzoato e 0,5% em peso de difeniliodónio-hexafluorofosfato. O primer foi formulado com 50% desta mistura e 50% de etanol.
Changes in stiffness of resin-infiltrated demineralized dentin after remineralization by a bottom-up biomimetic approach	Gu <i>et al</i> , 2010	Preparo do meio remineralizador: cimento Portland branco foi misturado com água desionizada numa proporção de água para pó de 0,35: 1. Foram colocados em moldes flexíveis de silicone e incubados a 100% de umidade. Para a remineralização biomimética, utilizou-se 500 Igml-1 de ácido poliacrílico e 200 Igml-1 de ácidopolivinilfosfónico, os quais foram adicionados ao SBF como análogos biomiméticos duais. Os adesivos utilizados foram: Clearfil Tri-S Bond, One-Step e Prime&Bond.
Effect of natural cross-linkers incorporation in a self-etching primer on dentine bond strength	Islam <i>et al</i> , 2012	Incorporação de hesperidina a 0,5% (HPN), 0,5% de clorexidina CHX) ou 0,5% de extracto de sementes de uva (GSE) no primer Clearfil SE
Biomimetic remineralization as a progressive dehydration mechanism of collagen matrices – implications in the aging of resin-dentin bonds	Kim <i>et al</i> , 2010	Utilização do cimento de Portland branco como fonte de íons minerais, o qual foi misturado com água desionizada n proporção de água para pó de 0,35: 1. Preparou-se o SBF por dissolução de NaCl 136,8 mM, NaHCO ₃ 4,2 mM, KCl 3,0 mM, K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O 1,0 mM, MgCl ₂ .6H ₂ O 1,5 mM, CaCl ₂ 2,5 mM e Na ₂ SO ₄ 0,5 mM em água desionizada, com adição de 3,08 mM de sódio azida para prevenir o crescimento bacteriano. A SBF foi tamponada a pH 7,4 . Os análogos utilizados foram os ácidos policarboxílico C21e polifosfónico.
Mechanical and Micromorphological Evaluation of Chlorhexidine-Mediated Dentin Remineralization	Kim <i>et al</i> , 2011	Adição de 1 ml de CHX a 0,02, 0,2 ou 2% a cada espécime de dentina.A SBF foi preparada por dissolução de 136,8 mM NaCl, 4,2 mM NaHCO ₃ , 3,0 mM KCl, 1,0 mM K ₂ HPO ₄ ,3H ₂ O, 1,5 mM MgCl ₂ (6H ₂ O), 2,5 mM,CaCl ₂ , e Na ₂ SO ₄ 0,5 mM e SO ₄ em água desionizada. O pH do SBF foi estabilizado em 7,4.
Bioactive effects of a calcium/sodium phosphosilicate on the resin–dentine interface: a microtensile bond	Profeta <i>et al</i> , 2012	Formulação do adesivo experimental: Bis-GMA (20%), PMDM (15%), HEMA (14%) e etanol a 50%. O Bioglass foi aplicado de duas formas: 1) 30% em peso de Bioglass incorporado no adesivo e 2) Bioglass aplicado diretamente no espécime de dentina tratada previamente com H ₃ PO ₄ .

<p>strength, scanning electron microscopy, and confocal microscopy study</p>		
<p>Influence of phosphoproteins' biomimetic analogues on remineralization of mineraldepleted resin-dentin interfaces created with ion-releasing resin-based systems</p>	<p>Sauro <i>et al</i>, 2015</p>	<p>Adesivo experimental: Bis-GMA (5%), TEGDMA (25%), HEMA (18%), EDAN (1%), etanol (50%) e canforoquinona. A primeira solução biomimética foi criada por dissolução de 150 µg / mL de ácido poli-L-aspártico (PLA) com um peso molecular de 27 Kda. A segunda solução foi criada por dissolução de trimetafosfato de sódio a 10% em peso e 150 µg / ml de PLA em água desionizada. O pH de ambas as soluções foi ajustado para 7,1. Já a saliva artificial foi formulada com: 0,7 mM / L de CaCl₂, 0,2 mM / L de MgCl₂, 4,0 mM / L de KH₂PO₄, 30,0 mM / L de KCl, 20,0 mM / L de Hepes.</p>
<p>Effect of Biomimetic Remineralization on the Dynamic Nanomechanical Properties of Dentin Hybrid Layers</p>	<p>Ryou <i>et al</i>, 2011</p>	<p>Imersão dos espécimes em fluido corporal simulado a 37 ° C., o qual continha (em mM) 205,2 NaCl, 6,3 NaHCO₃, 4,5 KCl, 1,5 K₂HPO₄ · 3H₂O, 2,25 MgCl₂·6H₂O, 3,75 CaCl₂ e 0,75 Na₂SO₄, com 3,08 NaN₃. A estabilização do ACP foi feita pelo PLA (500 µg/mL). Foi formulada uma resina com pó de cimento Portland, sílica fumada e uma mistura de resina hidrofílica de BisGMA e metacrilato de HEMA.</p>
<p>A Zn-doped etch-and-rinse adhesive may improve the mechanical properties and the integrity at the bonded-dentin interface</p>	<p>Toledano <i>et al</i>, 2013</p>	<p>Espécimes receberam a aplicação do adesivo Adper Single Bond, ao qual foram incorporadas partículas de zinco (10% em peso). O SBFS foi preparado dissolvendo o reagente NaCl (16,070 g), NaHCO₃ (0,710 g), KCl (0,450 g), K₂HPO₄ · 3H₂O (0,462 g), MgCl₂·6H₂O (0,622 g), CaCl₂ (0,584 g) e Na₂SO₄ (0,144 g) em água duplamente destilada e tamponado a pH 7,4.</p>
<p>Enhancement of nano-hydroxyapatite bonding to dentin through a collagen/calcium dual-affinitive peptide for dentinal tubule occlusion</p>	<p>Wang <i>et al</i>, 2014</p>	<p>O peptídeo foi obtido e sintetizado através de encomenda. A fonte de hidroxiapatita foi formulada com pó de hidroxiapatita (0,25 g, peso molecular) adquirido por encomenda a Sinopharm Chemical Reagent, Co. Ltd, China. Procedeu-se à dissolução em 10 mL de HCl solução de 0,5 mol / L de concentração. Em seguida, a solução de hidróxido de sódio (0,5 mol / L) foi adicionada a solução de HAp-HCl para desencadear a deposição de HAp até o pH da solução atingir 8.5.</p>

6. CONCLUSÃO

Diversos estudos envolvendo técnicas *in vitro* de remineralização da dentina têm mostrado resultados positivos. As estratégias de remineralização biomimética com base no processo de polímeros induzidos por precursores líquidos (PILP) têm demonstrado efeito potencial. O uso da hesperidina, um composto encontrado na fruta da uva, favoreceu a remineralização, mesmo em ambientes ausentes de flúor. Extratos naturais, além da uva, também tem sido fonte de testes e, entre estes, os extratos de chá verde e chá branco. Porém, são necessários mais estudos que avaliem os efeitos a longo prazo, os mecanismos individuais envolvidos em cada técnica de remineralização biomimética, bem como o seu potencial para uso clínico e sua aplicabilidade. Por fim, pode-se concluir que é cada vez mais crescente a procura de terapias inovadoras com inspiração na natureza, sendo que estas perspectivas, no campo da Odontologia Restauradora, são decerto promissoras.

7. REFERÊNCIAS

1. Zurick KM, Qin C, Bernardis MT. Mineralization induction effects of osteopontin, bone sialoprotein, and dentin phosphoprotein on a biomimetic collagen substrate. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101:1571–1581.
2. Veis A, Dorvee JR. Biomineralization mechanisms: a new paradigm for crystal nucleation in organic matrices. *Calcif Tissue Int*. 2013 Oct;93(4):307-15.
3. Qi YP, Li N, Niu LN, Primus CM, Ling JQ, Pashley DH, Tay FR. Remineralization of artificial dentinal caries lesions by biomimetically modified mineral trioxide aggregate. *Acta Biomater*. 2012 Feb;8(2):836-42.
4. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol IL, Geraldini S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho M, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-A review. *Dent Mater*. 2013 Oct; 29(10):999-1011.
5. Zhang L, Wang DY, Fan J, Li F, Chen YJ, Chen JH. Stability of bonds made to superficial vs. deep dentin, before and after thermocycling. *Dent Mater*. 2014 Nov;30(11):1245-51.
6. Tay FR, Pashley DH. Biomimetic remineralization of resin-bonded acid-etched dentin. *J Dent Res*. 2009 Aug; 88(8):719-24.
7. Wu Xu et al Biomimetic mineralization. *J Mater Chem* 2007. 17, 415-449.
8. Pashley et al. Biomimetic remineralization of dentin *Dental Materials* 30 (2014) 77-96.
9. Hajir et al. Stable amorphous calcium oxalate: synthesis and potential intermediate in biomineralization. Hajir et al. *Royal Society of Chemistry*. 2014.
10. Ehlich et al. *Biologically-inspired systems* Springer. Vol 1. 2010. P 51-91.
11. Niu et al. Intrafibrillar-silicified collagen scaffolds for SDF-1 mediated stem cell homing in hard tissue regeneration. Niu et al. 2014.
12. Imbeni V, Kruzic JJ, Marshall GW, Marshall SJ, Ritchie RO. The dentin-enamel junction and the fracture of human teeth. *Nat Mater*. 2005;4:229–232.

13. Dentin caries zones: mineral, structure, and properties. Pugach MK, Strother J, Darling CL, Fried D, Gansky SA, Marshall SJ, Marshall GW. *J Dent Res*. 2009 Jan; 88(1):71-6.
14. Featherstone JD. An updated understanding of the mechanism of dental decay and its prevention. *Nutr Q*. 1990;14:5-11.
15. Kim J, Arola DD, Gu L, Kim YK, Mai S, Liu Y, Pashley DH, Tay FR. Functional biomimetic analogs help remineralize apatite-depleted demineralized resin-infiltrated dentin via a bottom-up approach. *Acta Biomater*. 2010 Jul;6(7):2740-50.
16. Rao A, Malhotra N. The role of remineralizing agents in dentistry: a review. *Compend Contin Educ Dent*. 2011 Jul-Aug;32(6):26-33; quiz 34, 36.
17. Hajir M, Graf R, Tremel W. Stable amorphous calcium oxalate: synthesis and potential intermediate in biomineralization. *Chem Commun (Camb)*. 2014 Jun 21;50(49):6534-6.
18. Simeone Giordano S. Usos y efectos del fosfato de calcio amorfo (FCA) en la odontología restauradora y preventiva / Uses and effects of amorphous calcium phosphate (FCA) in preventive and restorative dentistry. *Acta Odontol Venez*. 2010. 48(3).
19. Jose P, Sanjeev K, Sekar M. Effect of Green and White Tea Pretreatment on Remineralization of Demineralized Dentin by CPP-ACFP-An Invitro Microhardness Analysis. *J Clin Diagn Res*. 2016 Apr;10(4):ZC85-9.
20. Park SY, Lee YH, Choi KC, Seong AR, Choi HK, Lee OH, Hwang HJ, Yoon HJ. Grape seed extract regulates androgen receptor-mediated transcription in prostate cancer cells through potent anti-histone acetyltransferase activity. *J Med Food* 2011; 14 (1-2): 9-16.
21. Liu, R, Fang M, Xiao Y, Li F, Zhao S, Shen L, Chen J. The effect of transient proanthocyanidins preconditioning on the cross-linking and mechanical properties to demineralized dentin. *J Mater Sci Mater Med* 2011; 22 (11): 2403-11.
22. Liu RR, Fang M, Zhao SJ, Li F, Shen LJ, Chen JH. The potential effect of proanthocyanidins on the stability of resin-dentin bonds against thermal-cycling. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2012; 47(5): 268-72.

23. Islam SM, Hiraishi N, Nassar M, Sono R, Otsuki M, Takatsura T, Yiu C, Tagami J. In vitro effect of hesperidin on root dentin collagen and de/re-mineralization. *Dent Mater J.* 2012;31(3):362-7. Epub 2012 May 14.
24. Tian K, Peng M, Ren X, Liao C, Fei W. Regeneration of tooth-like hydroxyapatite depended on amelogenin functional section monolayer: a new approach for tooth repair. *Med Hypotheses.* 2012 Aug;79(2):143-6.
25. Sfeir C, Fang PA, Jayaraman T, Raman A, Xiaoyuan Z, Beniash E. Synthesis of bone-like nanocomposites using multiphosphorylated peptides. *Acta Biomater.* 2014 May;10(5):2241-9.
26. Xie F, Li Q, Wei X, Zhou T. Effect of Ca(OH)₂ pre-treated on remineralization of the demineralized dentin induced by polyamidoamine dendrime]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2015 Apr;50(4):244-7. Chinese.
27. Padovano JD, Ravindran S, Snee PT, Ramachandran A, Bedran-Russo AK, George A. DMP1-derived peptides promote remineralization of human dentin. *J Dent Res.* 2015 Apr;94(4):608-14.
28. Osorio R, Osorio E, Cabello I, Toledano M. Zinc induces apatite and scholzite formation during dentin remineralization. *Caries Res.* 2014;48(4):276-90.
29. Osorio R, Yamauti M, Sauro S, Watson TF, Toledano M. Zinc incorporation improves biological activity of beta-tricalcium silicate resin-based cement. *J Endod.* 2014 Nov;40(11):1840-5.
30. Vollenweider M, Brunner TJ, Knecht S, Grass RN, Zehnder M, Imfeld T, Stark WJ. Remineralization of human dentin using ultrafine bioactive glass particles. *Acta Biomater.* 2007 Nov;3(6):936-43.
31. Dreger LA, Felipe WT, Reyes-Carmona JF, Felipe GS, Bortoluzzi EA, Felipe MC. Mineral trioxide aggregate and Portland cement promote biomineralization in vivo. *J Endod.* 2012 Mar;38(3):324-9.
32. Reyes-Carmona JF, Felipe MS, Felipe WT. The biomineralization ability of mineral trioxide aggregate and Portland cement on dentin enhances the push-out strength. *J Endod.* 2010 Feb;36(2):286-91.
33. Liu Y, Li N, Qi Y, Niu LN, Elshafiy S, Mao J, Breschi L, Pashley DH, Tay FR. The use of sodium trimetaphosphate as a biomimetic analog of matrix phosphoproteins for remineralization of artificial caries-like dentin. *Dent Mater.* 2011 May;27(5):465-77.

34. Reyes-Carmona JF, Santos AS, Figueiredo CP, Baggio CH, Felipe MC, Felipe WT, Cordeiro MM. Host-mineral trioxide aggregate inflammatory molecular signaling and biomineralization ability. *J Endod*. 2010 Aug;36(8):1347-53.
35. Neunzehn J, Weber MT, Wittenburg G, Lauer G, Hannig C, Wiesmann HP. Dentin-like tissue formation and biomineralization by multicellular human pulp cell spheres in vitro. *Head Face Med*. 2014 Jun 20;10:25.
36. Niu LN, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen JH, Tay FR. Biomimetic remineralization of dentin. *Dent Mater*. 2014 Jan;30(1):77-96.
37. Zhou YZ, Cao Y, Liu W, Chu CH, Li QL. Polydopamine-induced tooth remineralization. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2012 Dec;4(12):6901-10.
38. Peters MC, Bresciani E, Barata TJ, Fagundes TC, Navarro RL, Navarro MF, Dickens SH. In vivo dentin remineralization by calcium-phosphate cement. *J Dent Res*. 2010 Mar;89(3):286-91.
39. Ning TY, Xu XH, Zhu LF, Zhu XP, Chu CH, Liu LK, Li QL. Biomimetic mineralization of dentin induced by agarose gel loaded with calcium phosphate.
40. Kim DS, Kwon JM, Park SH, Choi SC, Kim SY. Mechanical and micromorphological evaluation of chlorhexidine-mediated dentin remineralization. *Scanning*. 2012 May-Jun;34(3):151-8.
41. Chen C, Mao C, Sun J, Chen Y, Wang W, Pan H, Tang R, Gu X. Glutaraldehyde-induced remineralization improves the mechanical properties and biostability of dentin collagen. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 Oct 1;67:657-65.
42. Gage JP, Francis MJO, Triffit JT. *Collagen and Dental Matrices*. 1 ed. Butterworth & Co. Ltd, 1989.
43. Marshall GW Jr, Marshall SJ, Kinney JH, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent*. 1997;25(6):441-58.
44. Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater*. 2001;17(4):296-308.
45. Göpferich A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*. 1996 Jan;17(2):103-14.

46. Cao CY, Mei ML, Li QL, Lo ECM, Chu CH. Methods for Biomimetic Remineralization of Human Dentine: A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2015;16(3):4615–27.
47. Abuna G, Feitosa VP, Correr AB, Cama G, Giannini M, Sinhoreti MA, Pashley DH, Sauro S. Bonding performance of experimental bioactive/biomimetic self-etch adhesives doped with calcium-phosphate fillers and biomimetic analogs of phosphoproteins. *J Dent.* 2016 Sep;52:79-86. doi: 10.1016/j.jdent.2016.07.016.
48. Ekambaram M, Yiu CK, Matinlinna JP, King NM, Tay FR. Adjunctive application of chlorhexidine and ethanol-wet bonding on durability of bonds to sound and caries-affected dentine. *J Dent.* 2014; 42(6):709-19.
49. Epasinghe DJ1, Yiu CK, Burrow MF, Tay FR, King NM. Effect of proanthocyanidin incorporation into dental adhesive resin on resin-dentine bond strength. *J Dent.* 2012 Mar;40(3):173-80.
50. Epasinghe DJ, Yiu CK, Burrow MF, Tsoi JK, Tay FR. Effect of flavonoids on the mechanical properties of demineralised dentine. *J Dent.* 2014 Sep;42(9):1178-84.
51. Feitosa VP1, Bazzocchi MG, Putignano A, Orsini G, Luzi AL, Sinhoreti MA, Watson TF, Sauro S. Dicalcium phosphate (CaHPO₄•2H₂O) precipitation through ortho- or meta-phosphoric acid-etching: effects on the durability and nanoleakage/ultra-morphology of resin-dentine interfaces. *J Dent.* 2013 Nov;41(11):1068-80.
52. Gu LS, Huffman BP, Arola DD, Kim YK, Mai S, Elsalanty ME, Ling JQ, Pashley DH, Tay FR. Changes in stiffness of resin-infiltrated demineralized dentin after remineralization by a bottom-up biomimetic approach. *Acta Biomater.* 2010 Apr;6(4):1453-61. doi: 10.1016/j.actbio.2009.10.052. Epub 2009 Nov 1.
53. Islam S1, Hiraishi N, Nassar M, Yiu C, Otsuki M, Tagami J. Effect of natural cross-linkers incorporation in a self-etching primer on dentine bond strength. *J Dent.* 2012 Dec;40(12):1052-9.
54. Kim YK, Mai S, Mazzoni A, Liu Y, Tezvergil-Mutluay A, Takahashi K, Zhang K, Pashley DH, Tay FR. Biomimetic remineralization as a progressive dehydration mechanism of collagen matrices--implications in the aging of resin-dentin bonds. *Acta Biomater.* 2010 Sep;6(9):3729-39.

55. Kim DS, Kwon JM, Park SH, Choi SC, Kim SY. Mechanical and micromorphological evaluation of chlorhexidine-mediated dentin remineralization. *Scanning*. 2012 May-Jun;34(3):151-8.
56. Profeta AC1, Mannocci F, Foxton RM, Thompson I, Watson TF, Sauro S. Bioactive effects of a calcium/sodium phosphosilicate on the resin-dentine interface: a microtensile bond strength, scanning electron microscopy, and confocal microscopy study. *Eur J Oral Sci*. 2012 Aug;120(4):353-62.
57. Toledano M1, Sauro S, Cabello I, Watson T, Osorio R. A Zn-doped etch-and-rinse adhesive may improve the mechanical properties and the integrity at the bonded-dentin interface. *Dent Mater*. 2013 Aug;29(8):e142-52.
58. Wang R, Wang Q, Wang X, Tian L, Liu H, Zhao M, Peng C, Cai Q, Shi Y. Enhancement of nano-hydroxyapatite bonding to dentin through a collagen/calcium dual-affinitive peptide for dentinal tubule occlusion. *J Biomater Appl*. 2014 Feb 6;29(2):268-277.
59. Wagner, A., Belli, R., Stötzel, C., Hilpert, A., Müller, F.A., Lohbauer, U. Biomimetically- and hydrothermally-grown HAp nanoparticles as reinforcing fillers for dental adhesives. *J Adhes Dent*. 2013 Oct;15(5):413-22.
60. Sauro S, Osorio R, Watson TF, Toledano M. Influence of phosphoproteins' biomimetic analogs on remineralization of mineral-depleted resin-dentin interfaces created with ion-releasing resin-based systems. *Dent Mater*. 2015 Jul;31(7):759-77.
61. Ryou H, Niu LN, Dai L, Pucci CR, Arola DD, Pashley DH, Tay FR. Effect of biomimetic remineralization on the dynamic nanomechanical properties of dentin hybrid layers. *J Dent Res*. 2011 Sep;90(9):1122-8.
62. Pavan LM, Rêgo DF, Elias ST, De Luca Canto G, Guerra EN. In vitro Anti-Tumor Effects of Statins on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review. 2015 Jun 22;10(6):e0130476.
63. Pereira MG, Galvão TF. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. *Epidemiol Serv Saude*. 2014 jan-mar;23(1):183-4.
64. Krithikadatta J, Gopikrishna V Datta M. CRIS Guidelines (Checklist for Reporting In-vitro Studies): A concept note on the need for standardized guidelines for improving quality and transparency in reporting in-vitro studies in experimental dental research. *J Conserv Dent*. 17(4); Jul-Aug 2014.

65. Hernández M, Cobb D, Swift EJ Jr. Current strategies in dentin remineralization. *J Esthet Restor Dent*. 2014 Mar-Apr;26(2):139-45
66. Mai S, Kim YK, Kim J, Yiu CK, Ling J, Pashley DH, Tay FR. In vitro remineralization of severely compromised bonded dentin. *J Dent Res*. 2010 Apr;89(4):405-10.
67. Chen Z, Cao SS, Wang HR, et al. Biomimetic remineralization of demineralized dentine using scaffold of CMC/ACP nanocomplexes in an in vitro tooth model of deep caries. *PLoS One*. 2015;10(1):e0116553.
68. Garberoglio R, Brannstrom M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol*. 1976;21(6):355-62.
69. Zhou, Y.Z.; Cao, Y.; Liu, W.; Chu, C.H.; Li, Q.L. Polydopamine-induced tooth remineralization. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2012, 4, 6901–6910.
70. 18. Ning, T.Y.; Xu, X.H.; Zhu, L.F.; Zhu, X.P.; Chu, C.H.; Liu, L.K.; Li, Q.L. Biomimetic mineralization of dentin induced by agarose gel loaded with calcium phosphate. *J. Biomed. Mater. Res. B* 2012, 100, 138–144. 19.
71. Gu, L.S.; Kim, Y.K.; Liu, Y.; Takahashi, K.; Arun, S.; Wimmer, C.E.; Osorio, R.; Ling, J.Q.; Looney, S.W.; Pashley, D.H.; et al. Immobilization of a phosphonated analog of matrix phosphoproteins within cross-linked collagen as a templating mechanism for biomimetic mineralization. *Acta Biomater*. 2011, 7, 268–277. 20. Li, J.;
72. Yang, J.; Li, J.; Chen, L.; Liang, K.; Wu, W.; Chen, X.; Li, J. Bioinspired intrafibrillar mineralization of human dentine by PAMAM dendrimer. *Biomaterials* 2013, 34, 6738–6747. 21.
73. Zhou, Y.; Yang, J.; Lin, Z.; Li, J.; Liang, K.; Yuan, H.; Li, S.; Li, J. Triclosan-loaded poly(amido amine) dendrimer for simultaneous treatment and remineralization of human dentine. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2014, 115, 237–243. 22. Liu, Y.; Li, N.;
74. Qi, Y.P.; Niu, L.N.; Elshafiy, S.; Mao, J.; Breschi, L.; Pashley, D.H.; Tay, F.R. The use of sodium trimetaphosphate as a biomimetic analog of matrix phosphoproteins for remineralization of artificial caries-like dentin. *Dent. Mater*. 2011, 27, 465–477. 23.
75. Liu, Y.; Mai, S.; Li, N.; Yiu, C.K.Y.; Mao, J.; Pashley, D.H.; Tay, F.R. Differences between top-down and bottom-up approaches in mineralizing thick,

partially demineralized collagen scaffolds. *Acta Biomater.* 2011, 7, 1742–1751.
Int. J. Mol. Sci. 2015, 16 4626 24

76. . Qi, Y.P.; Li, N.; Niu, L.N.; Primus, C.M.; Ling, J.Q.; Pashley, D.H.; Tay, F.R. Remineralization of artificial dentinal caries lesions by biomimetically modified mineral trioxide aggregate. *Acta Biomater.* 2012, 8, 836–842. 25. Tay, F.R.; Pashley, D.H. Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine. *Biomaterials* 2008, 29, 1127–1137. .

77. Gu, L.; Kim, Y.K.; Liu, Y.; Ryou, H.; Wimmer, C.E.; Dai, L.; Arola, D.D.; Looney, S.W.; Pashley, D.H.; Tay, F.R. Biomimetic analogs for collagen biomineralization. *J. Dent. Res.* 2011, 90, 82–87. 27.

78. Xu, Z.; Neoh, K.G.; Lin, C.C.; Kishen, A. Biomimetic deposition of calcium phosphate minerals on the surface of partially demineralized dentine modified with phosphorylated chitosan. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2011, 98, 150–159.

79. Zhang, X.; Neoh, K.G.; Lin, C.C.; Kishen, A. Remineralization of partially demineralized dentine substrate based on a biomimetic strategy. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2012, 23, 733–742. 29.

80. Wang, J.M.; Chen, Y.; Li, L.; Sun, J.; Gu, X.H.; Xu, X.R.; Pan, H.H.; Tang, R.K. Remineralization of dentin collagen by meta-stabilized amorphous calcium phosphate. *Crystengcomm* 2013, 15, 6151–6158. 30. Sun, J.;

81. Chen, C.Q.; Pan, H.H.; Chen, Y.; Mao, C.Y.; Wang, W.; Tang, R.K.; Gu, X.H. Biomimetic promotion of dentin remineralization using L-glutamic acid: Inspiration from biomineralization proteins. *J. Mater. Chem. B* 2014, 2, 4544–4553.

82. . Cao, Y.; Mei, M.L.; Xu, J.; Lo, E.C.; Li, Q.; Chu, C.H. Biomimetic mineralisation of phosphorylated dentine by CPP-ACP. *J. Dent.* 2013, 41, 818–825. 32. Jia, R.; Lu, Y.; Yang, C.W.; Luo, X.; Han, Y. Effect of generation 4.0 polyamidoamine dendrimer on the mineralization of demineralized dentinal tubules in vitro. *Arch. Oral Biol.* 2014, 59, 1085–1093. 33.

83. Wang, Q.; Wang, X.M.; Tian, L.L.; Cheng, Z.J.; Cui, F.Z. In situ remineralization of partially demineralized human dentine mediated by a biomimetic non-collagen peptide. *Soft Matter* 2011, 7, 9673–9680. 34.

84. Gajjerman, S.; Narayanan, K.; Hao, J.; Qin, C.; George, A. Matrix macromolecules in hard tissues control the nucleation and hierarchical assembly of hydroxyapatite. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 1193–1204.