

TATIANA DEGANI PAES LEME AZEVEDO

AVALIAÇÃO DA CLOREXIDINA NA
QUALIDADE DA CAMADA HÍBRIDA DE
DENTES DECÍDUOS.

BRASÍLIA-DF
2006

TATIANA DEGANI PAES LEME AZEVEDO

AVALIAÇÃO DA CLOREXIDINA NA
QUALIDADE DA CAMADA HÍBRIDA DE
DENTES DECÍDUOS.

Tese apresentada à Faculdade de Ciências de Saúde da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR em Ciências da Saúde.

Orientador: Professor Doutor Orlando Ayrton de Toledo.

Co-orientadora: Professora Doutora Ana Cristina Barreto Bezerra.

BRASÍLIA-DF

2006

Dedico este trabalho:

A DEUS, por sua tamanha bondade e constante proteção.

A meus pais, Zaia e Wagner, por estarem sempre presentes em minha vida.

Ao Georges, meu marido, companheiro de uma longa caminhada, que está sempre presente em todos os momentos de minha vida com gestos de amor e incentivo.

À Carolina e ao bebê que está chegando, responsáveis por infinitos momentos de alegria.

Agradecimento muito especial ao meu orientador, Prof. Dr.
Orlando Ayrton de Toledo, por ter sempre acreditado em
mim, pelos inúmeros conselhos, pela segura orientação e,
principalmente, por seu constante carinho.

Agradecimento especial à minha co-orientadora, Prof. Dra.

Ana Cristina Barreto Bezerra, pela grande amizade,

inteligentes sugestões e pela excelente companhia.

AGRADECIMENTOS:

A todas as crianças e pais que, se colocando disponíveis, viabilizaram esta pesquisa.

À EMBRAPA-CENARGEN, na pessoa de Rosana Falcão, que forneceu ajuda fundamental na análise dos dentes no Microscópio Eletrônico de Varredura.

Ao Prof. Gustavo Mendonça, por sua preciosa ajuda na análise estatística dos dados.

À Terezinha por fornecer contribuições inestimáveis à execução desta tese.

À Juliana, Rafael, Luciano, Guliver, Adriana, Giordano, Geonices, Vivyany, Rogério e Suely por estarem sempre torcendo por mim.

À Val, pela grande ajuda nos momentos de estudo.

E a todos que, de uma forma ou de outra, deram sua parcela de contribuição nesta pesquisa.

RESUMO:

Recentemente, tem sido observado que a clorexidina apresenta capacidade inibidora das metaloproteinases da matriz dentinária. Estas enzimas são responsáveis pela degradação das fibras colágenas. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o uso da clorexidina na qualidade da camada híbrida de dentes decíduos hígidos. A superfície dentinária média de dentes decíduos foi preparada com auxílio de broca carbide no. 330 e alta rotação. No grupo teste, os dentes sofreram condicionamento ácido, aplicação de clorexidina, inserção de adesivo Single Bond e restauração com resina composta Z250. O grupo controle sofreu os mesmos procedimentos com exceção da aplicação do agente antimicrobiano. Vinte e cinco regiões, em cada grupo, foram examinadas por meio de microscopia eletrônica de varredura por examinadores cegos. Foram avaliadas a profundidade das fendas, a condição dos túbulos dentinários, bem como a espessura da camada híbrida. Os dados foram analisados estatisticamente por meio do teste qui-quadrado e t-student a um nível de significância de 5%. Os dois grupos avaliados apresentaram poucas fendas interfaciais sem diferença estatisticamente significativa. O grupo teste apresentou um número maior de áreas com camada híbrida visível (68%) quando comparado ao controle (52%). A espessura desta camada foi de 3,28 micrômetros para o grupo controle e 3,33 micrômetros para o grupo teste ($p=0,94$). Os resultados demonstraram que o uso do protocolo clínico-restaurador com aplicação da clorexidina não interfere na qualidade da camada híbrida, podendo ser indicado para aumentar a sobrevivência das restaurações por meio da inibição das metaloproteinases da matriz pela clorexidina.

PALAVRAS-CHAVES: camada híbrida, metaloproteinases da matriz, adesão dentinária, dentes decíduos.

ABSTRACT:

It has recently been observed that chlorhexidine presents the capacity to inhibit the matrix metalloproteinase. They were responsible for the collagen fibrils degradation. Therefore, the object of this study was to assess the use of chlorhexidine on the quality of the hybrid layer of healthy primary teeth. The mean dentinal surface of primary teeth was prepared with the aid of a carbide burr No. 330 and high speed. In the test group, the teeth were subjected to acid etching, chlorhexidine application; Single Bond adhesive insertion and restoration with resin composite Z250. The control group underwent the same procedures, except for the application of the antimicrobial agent. Twenty-five regions were examined by scanning electronic microscopy by blind examiners. Measures of gap and hybrid layer were taken and the dentin tubules conditions were analyzed. The data obtained were statistically analyzed by the chi-square and t-student tests at a 5% level of significance. The groups assessed presented few interfacial gaps without statistically significant difference. The test group presented a larger number of areas with visible hybrid layer (68%) when compared with the control group (52%). The thickness of this layer was 3.28 micrometers for the control group and 3.33 micrometers for the test group ($p=0,4$). In this study, the results demonstrated that the use of the clinical-restorative protocol with the application of chlorhexidine does not interfere significantly in the morphological characteristics of the hybrid layer, and it should be indicated to increase the survival of restorations, by means of inhibiting the matrix metalloproteinase by chlorhexidine.

KEY WORDS: hybrid layer, matrix metalloproteinase, dentin adhesion, deciduous teeth.

SUMÁRIO:

1- Introdução.....	09
2- Revisão da Literatura.....	11
3- Objetivo.....	28
4- Materiais e Métodos.....	29
5- Resultados.....	38
6- Discussão.....	52
7- Conclusões.....	61
8- Referências Bibliográficas.....	62
ANEXOS.....	66
ANEXO A: Ofício CEP-UCB.....	66
ANEXO B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	67
ANEXO C: Ficha para avaliação das amostras.....	68

1- INTRODUÇÃO:

A cárie dental ainda se apresenta como grave problema para as crianças brasileiras. Apesar de todos os avanços preventivos, a frequência dessa patologia continua alta, concentrando-se, principalmente, na população de baixa renda (BRASIL, 2004).

A filosofia comumente empregada para o tratamento desta doença, baseia-se na Odontologia de Mínima Intervenção, em que os cuidados odontológicos iniciam-se com as primeiras ocorrências, detecção precoce e tratamento pronto e imediato da doença cárie. A intervenção é a menor possível com técnicas que preservam ao máximo a integridade do paciente (MICKENAUTSCH, 2005).

Dentro deste contexto, as restaurações adesivas são freqüentemente realizadas, pois requerem pouco preparo da cavidade, contribuindo com a preservação da estrutura dental. No entanto, clinicamente, tem-se observado que, apesar dos avanços na qualidade dos adesivos dentinários e da aplicação adequada da técnica restauradora, é comum a presença de infiltração marginal nas restaurações obtidas com resina composta fotopolimerizável (HASHIMOTO et al, 2000). Este fato pode levar a inconvenientes como: a necessidade da troca de restauração, com novo desgaste da estrutura dentária e, ainda, um desconforto adicional ao paciente.

A adesão entre resina e tecido dentinário é constituída pela união mecânica entre monômeros hidrofóbicos, hidrofílicos e fibras colágenas, formando a denominada “camada híbrida” (NAKABAYASHI, 1982). A força de adesão dos sistemas adesivos à dentina pode estar sujeita a microinfiltração ou nanoinfiltração.

A microinfiltração é resultado da falha na adaptação entre o sistema adesivo e as paredes da cavidade, formando fendas microscópicas, que permitem a recorrência de cárie (PASHLEY, 1990).

Já a nanoinfiltração pode ocorrer mesmo na ausência da microinfiltração. Este defeito ocorre entre a camada híbrida e a dentina mineralizada e é responsável pela degradação da interface dentina-resina com o decorrer do tempo (HASHIMOTO et al, 2000).

A busca por um agente de união, capaz de promover um selamento eficaz e duradouro ao substrato dentinário, tem sido um difícil desafio (HASHIMOTO et al, 2000). Recentemente, tem-se observado que as metaloproteinases da matriz, ou as enzimas capazes de degradar o colágeno da dentina, estão presentes naturalmente na estrutura do complexo dentino pulpar. Essas enzimas podem ser ativadas pela queda do pH conseqüente ao tratamento da superfície com primer e adesivo ou a bioquímica do processo carioso, levando a uma maior degradação das fibrilas colágenas e a um maior risco de nanoinfiltração (PASHLEY et al, 2004).

Com esta descoberta, observa-se um esforço redobrado no sentido de se encontrar uma substância que inative a ação dessas proteinases. A substância que vem apresentando propriedades antiproteolíticas desejáveis é a clorexidina (GENDRON et al, 1999).

As pesquisas nessa área são escassas, principalmente na dentição decídua. Daí a necessidade de uma investigação mais profunda, objetivando prover-se de dados clínicos referentes à adesão resina/dentina e, conseqüentemente, buscar um melhoramento na durabilidade dessas restaurações.

Com o desenvolvimento dessa pesquisa, espera-se obter um melhor conhecimento do processo de adesão dentinária aos dentes decíduos.

2-REVISÃO DA LITERATURA:

Vários fatores estão envolvidos no processo de adesão dentinária. De acordo com as referências bibliográficas pesquisadas, os tópicos de maior relevância para o estudo do tema proposto podem ser agrupados em:

- Aspectos micromorfológicos da dentina;
- Metaloproteinases da matriz;
- Formação e degradação da camada híbrida;
- Clorexidina e camada híbrida, e;
- Adesão em dentes decíduos.

Objetivando-se uma apresentação didática do tema, a revisão de literatura foi norteadada por estes tópicos na forma de capítulos.

-Aspectos micromorfológicos da dentina:

Conforme conhecimentos correntes, as características da dentina, como substrato para os compósitos resinosos, apresentam uma importante influência na morfologia da interface resina/dentina. Uma adesão forte e durável entre o material restaurador e o substrato dentário é essencial tanto do ponto de vista mecânico, quanto do ponto de vista biológico e estético.

A coroa dental é coberta pelo esmalte dental, uma estrutura altamente mineralizada, dinâmica e acelular. É composta por aproximadamente 96% de material inorgânico (cristais de hidroxiapatita) e um material orgânico envolvendo os cristais. É considerada uma estrutura não vital, desprovida de sensibilidade, devido à perda das células formadoras (ameloblastos) logo após erupção do dente. Entretanto, é altamente dinâmica devido à permeabilidade, que permite a troca iônica entre o esmalte e o ambiente da cavidade bucal (EISENMANN, 1985).

Abaixo do esmalte, encontra-se a dentina, tecido resiliente, duro, elástico e avascular. É produzida pelos odontoblastos, que primeiramente secretam a matriz orgânica, composta principalmente por fibras colágenas. Em seguida, os cristais de apatita são depositados entre e sobre as fibrilas de colágeno da matriz, num processo denominado mineralização dentinária. A dentina madura é composta quimicamente por aproximadamente 70% de material inorgânico (hidroxiapatita), 20% de material orgânico (colágeno tipo I) e 10% de água. Anatomicamente, a dentina apresenta túbulos dentinários, canais ocupados pelos processos odontoblásticos e com uma curvatura em S mais pronunciada na parte coronária (TEN CATE, 1985).

Os túbulos dentinários contêm um fluido, derivado do fluido pulpar extracelular conferindo característica de umidade à dentina (ANGKER et al, 2003). Estes túbulos são

separados pela dentina intertubular e sua parede é formada pela dentina intratubular. A primeira apresenta, em sua maioria, colágeno tipo I reforçada por cristais de apatita, já a dentina intratubular apresenta muitos cristais de apatita e pouca matriz orgânica (MARSHAL JR et al, 1997).

A permeabilidade da dentina é um fator que deve ser observado no processo de adesão, já que esta característica proporcionará a infiltração dos monômeros resinosos na matriz dentinária desmineralizada. Entende-se por permeabilidade a característica de um substrato permitir a passagem ou a movimentação de uma substância (PASHLEY et al, 1993). Esta propriedade está relacionada com o número e diâmetro dos túbulos dentinários (ORCHARDSON e CADDEN, 2001). A permeabilidade da dentina intertubular é a característica mais importante no processo da adesão dentinária (PASHLEY et al, 1993).

A dureza é a medida da resistência do material à deformação. Esta propriedade, na dentina intratubular, se mantém igual em qualquer profundidade da dentina. Já na dentina intertubular, ela vai diminuindo, gradativamente, da junção amelo-dentinária (JAD) até a câmara pulpar. A resistência ao cisalhamento está fortemente associada a esta propriedade (MARSHAL JR, 1997)

Na área adjacente à polpa há numerosos túbulos com diâmetro aumentado e, conseqüentemente, menor espessura da dentina intratubular (ANGKER et al, 2003). A área de dentina intertubular varia de 12% dentina para 96% próximo à JAD, enquanto a intratubular varia de 3 para 60% na JAD (MARSHALL JR et al, 1997). Estas características comprovam o fato da redução da força da adesão dentinária com a aproximação da polpa.

Com relação aos dentes decíduos, pouco se sabe a respeito da composição e micromorfologia da dentina, mas há indicações da presença de diferenças, quando comparados aos dentes permanentes. As pesquisas relacionadas ao conteúdo de cálcio e

fósforo demonstram uma concentração menor desses íons, tanto na dentina intratubular quanto na intertubular em dentes decíduos, quando comparado aos permanentes (HIRAYAMA, 1990; KOUTSI et al, 1994). A concentração de magnésio e potássio também é maior na dentina de dentes decíduos (LAKOMAA e RYTOMAA, 1977). Os dentes permanentes apresentam uma dureza maior, ou maior mineralização, quando comparados aos dentes decíduos. Além disso, a dentina destes dentes apresenta túbulos dentinários em menor quantidade e em menor diâmetro quando comparada aos permanentes (SCHMITT e LEE, 2002). HIRAYAMA et al (1990) encontraram uma quantidade maior de dentina intratubular em dentes decíduos e, portanto, menor permeabilidade dentinária.

As propriedades mecânicas também apresentam diferenças entre as duas dentições: a dureza em dentes decíduos é mais baixa que nos permanentes, já a elasticidade é a mesma para os dois grupos (HOSOYA, 2006).

- **Metaloproteinases da Matriz:**

Na dentina, no fluido dentinário e na saliva total também se encontram as metaloproteinases da matriz (MMPs). Estas metaloproteinases são da família das enzimas proteolíticas, dependentes de zinco, responsáveis pela degradação da matriz extracelular de proteínas (SULKALA et al, 2001). Atualmente, tem-se observado a ampliação do estudo destas enzimas nas estruturas dentárias.

Para uma melhor compreensão da origem das metaloproteinases da matriz, a terminologia proposta pelo Descritor de Ciências da Saúde (DeCs-MeSH) considera que são originadas das seguintes classes e subclasses (BVS: Biblioteca Virtual em Saúde):

ENZIMAS (Moléculas de origem biológica que apresentam atividade catalítica.

Podem ocorrer naturalmente ou ser criadas sinteticamente. Geralmente são proteínas).

HIDROLASES (Qualquer membro da classe de enzimas que catalisam a clivagem de

uma ligação química com adição de água).

PEPTÍDEOHIDROLASES (Subclasse de enzimas da classe de hidrolases que

catalisam a hidrólise de ligações peptídicas).

ENDOPEPTIDASE (Subclasse de peptídeohidrolases, que são classificados

primariamente pelo seu mecanismo catalítico. A especificidade é usada apenas para identificação de enzimas individuais).

METALOENDOPEPTIDASE (Endopeptidases que usam um metal,

normalmente o zinco, no mecanismo catalítico. São inativadas por quelantes de metal).

METALOPROTEINASES DA MATRIZ (Dependentes de zinco que estão

envolvidas na degradação de componentes da matriz extracelular).

De acordo com este mesmo descritor, as metaloproteinasas da matriz podem se dividir em: gelatinase A, gelatinase B, colagenase intersticial, matrilisina, colagenase de neutrófilo e estromelisina 1.

Na literatura, existe outra classificação atual que vem sendo encontrada com maior frequência nos estudos sobre o assunto: colagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13 e MMP-18), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), estromelisinases (MMP-3, MMP-10 e MMP-11), tipo membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25), de domínio mínimo (MMP-7 e MMP-26) e outros (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-27 e MMP-28) (Sterlicht e Werb, 2001 apud PALOSAARI et al, 2003). Esta classificação é recente, e a definição de cada termo não foi encontrada na literatura.

As enzimas MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-14 e MMP-20 já foram isoladas nas estruturas dentárias (HEIKINHEMO e SALO, 1995; MARTIN DE LAS HERAS et al 2000, SULKALA et al 2002). Recentemente, foi reportada pela primeira vez a expressão de outras metaloproteinases: 1, 7, 10, 11, 13, 15, 16, 17, 19, 23,24 e 25 em odontoblastos e no tecido pulpar. A maioria destas enzimas foi encontrada com maior frequência nos odontoblastos (PALOSAARI et al, 2003).

A função da maioria dessas enzimas ainda permanece desconhecida, mas há sugestão de que participem da regulação de respostas de defesa contra irritantes externos no complexo dentina-polpa ou como mecanismo de regulação e manutenção fisiológica das estruturas (MARTIN DE LAS HERAS et al, 2000; PALOSAARI et al, 2003).

No tecido dentinário, alvo de nossa investigação, já foram detectadas as MMPs 2, 8, 9 e 20. A metodologia que proporcionou esta descoberta envolveu testes enzimáticos, PCR e testes de imunoelctroforese (MARTIN DE LAS HERAS, 2000; TJADERHANE et al, 1998; SULKALA et al, 2002).

As MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinase B) são capazes de degradar o colágeno tipo IV, V, VII e X, além de elastina, fibronectina e gelatina. Especula-se que estas duas

enzimas possam ser importantes na manutenção do equilíbrio entre a síntese e degradação da membrana basal durante o período embrionário, já que o colágeno tipo IV é o principal componente estrutural desta membrana. São importantes também na amelogênese. Quando a atividade secretória dos odontoblastos se inicia, a membrana basal do órgão da papila dental é gradualmente removida, permitindo que os pré-ameloblastos interajam diretamente com os odontoblastos. Assim, quando a fase de secreção de esmalte começa, a membrana basal está completamente removida. Já houve comprovação científica de que para esta remodelação e degradação, a enzima envolvida é a metaloproteinase 2. Já a MMP-9 foi expressa em quantidades muito baixas durante as fases iniciais da odontogênese (HEIKINHEIMO e SALO, 1995).

A MMP-2 pode ser incorporada dentro da matriz mineralizada da dentina durante ou após a fase de mineralização. A presença desta enzima na dentina tem o potencial de contribuir com a degradação da matriz orgânica mineralizada (MARTIN DE LAS HERAS et al, 2000).

A presença e atividade enzimática da MMP-2 são diferentes, quando se compara dentina mineralizada e não-mineralizada. No primeiro grupo estas enzimas estão presentes em maior quantidade e, em sua maioria, estão na forma ativa. (MARTIN DE LAS HERAS, 2000). A MMP-9 também já foi detectada tanto na dentina mineralizada quanto na desmineralizada (VAN STRIJP et al, 2003).

A MMP-8 juntamente com a MMP-9 são sintetizadas pelos odontoblastos. Suas funções no complexo dentina/polpa não são conhecidas, mas suspeita-se de que podem participar da organização da matriz de dentina orgânica antes da mineralização (SULKALA et al, 2002). Estas duas metaloproteinases da matriz já foram identificadas nas lesões cariosas dentinárias (TJADERHANE et al, 1998).

A MMP-20 (enamelin) também é capaz de degradar o colágeno tipo IV e a amelogenina, que é o maior componente da matriz de esmalte. Apresenta ainda uma importante função durante o estágio inicial de desenvolvimento do esmalte. Esta enzima é primeiramente expressa em odontoblastos funcionais na secreção da predentina, continuando na fase de mineralização. É ainda encontrada no fluido dentinário, mas a maior fonte desta enzima no complexo dentina-polpa continua sendo nos odontoblastos. Ela já foi encontrada tanto em dentina mineralizada quanto na desmineralizada. Pode estar envolvida na organização da matriz orgânica, durante a formação da dentina, contribuindo com alterações nesta matriz durante o progresso da lesão cariiosa na estrutura dentinária (SULKALA et al, 2002).

A maioria das MMPs são expressas por indução, enquanto um número reduzido é em nível constante. A atividade biológica das MMPs pode ser regulada por pós-transcrição ou por interação com inibidores teciduais específicos para MMPs (TIMPs) (PALOSAARI et al, 2003).

Estes inibidores são sintetizados por odontoblastos e tecido pulpar, e podem ser secretados junto com a pré-dentina. Os TIMPs possuem habilidade em inibir as MMPs: collagenase intersticial, gelatinase tipo A e B e estromelin. Podem ter função importante na regulação da atividade das metaloproteinases da matriz, controlando efetivamente a quantidade de quebra dos tecidos (ISHIGURO et al, 1994).

A distribuição do TIMP-1 no cimento e dentina humanos é diferente. No cimento a concentração é maior na zona superficial, decrescendo em direção à junção cimento-dentina. Já na dentina há um aumento deste inibidor da junção cimento-dentina em direção à pré-dentina, sendo que a concentração na dentina é significativamente maior que no cimento (ISHIGURO et al, 1994).

Recentemente, foi reportada a presença de TIMP-2 e TIMP-3 em odontoblastos e tecido pulpar (PALOSAARI et al, 2003). Os efeitos do TGF-beta e da BMP-2 na expressão das MMPs nos odontoblastos e no tecido pulpar indicam que os fatores de crescimento também podem apresentar uma função específica na regulação da expressão da MMP e até mesmo no processo de formação da dentina reparadora. (ISHIGURO et al, 1994; PALOSAARI et al. 2003).

As metaloproteinases da matriz participam da formação e modelagem da matriz extracelular durante as condições fisiológicas e patológicas (PALOSAARI et al, 2003; SULKALA et al, 2002).

- Formação e degradação da camada híbrida.

A adesão entre resina e dentina é constituída pela união mecânica entre monômeros hidrofóbicos, hidrofílicos e fibrilas colágenas, formando a denominada “camada híbrida” (NAKABAYASHI et al, 1982). A força de adesão dos sistemas adesivos à dentina pode estar sujeita a microinfiltração devido a alguns fatores como: contração de polimerização do material, estresse ocorrido pela diferença de coeficientes de expansão e condutibilidade térmica do dente, dos sistemas adesivos e materiais restauradores, além da oclusão funcional (PASHLEY et al, 1996). Essa microinfiltração é resultado da falha na adaptação entre o sistema adesivo e as paredes da cavidade, que formam fendas microscópicas, porém, com tamanho suficiente para permitir a passagem de fluidos bucais e bactérias, que podem resultar na diminuição da vida clínica da restauração devido à recorrência de cárie (PASHLEY,1990).

Além disso, a polimerização imperfeita dos adesivos pode criar defeitos de adesão. Essas áreas são criadas pela discrepância entre a profundidade da desmineralização dentinária e a profundidade da infiltração do adesivo. Teoricamente, estão localizadas entre a

camada híbrida e a dentina mineralizada. Morfologicamente, consistem em fibrilas colágenas expostas, circundadas por espaços interfibrilares, preenchidos por água de tamanho nanométrico, processo denominado de nanoinfiltração. Este defeito ocorre mesmo na ausência de microinfiltração (TAY et al, 2002). É reportado ainda que a nanoinfiltração pode representar áreas em que a água foi incompletamente removida da interface dentina-resina. A presença de água residual no adesivo pode induzir a uma polimerização incompleta ou seqüestro de polímeros hidrofílicos nestas regiões. Este exemplo de nanoinfiltração irregular, em que os depósitos de prata estão orientados perpendicularmente à superfície da camada híbrida, é a manifestação morfológica arborescente, que é pré-determinada pela orientação dos espaços interfibrilares com a matriz de fibrilas colágenas desmineralizadas. Esta absorção de água pelos monômeros hidrofílicos contribui para a degradação da interface dentina-resina com o decorrer do tempo (HASHIMOTO et al, 2000).

Nos adesivos dentinários contemporâneos há presença de monômeros hidrofílicos (metilmetacrilato-HEMA), misturados com polímeros hidrofóbicos (polimetilmetacrilato-BisGMA) para facilitar a adesão à um substrato intrinsecamente úmido (YIU et al, 2004). A parte hidrofílica é responsável por penetrar na superfície úmida desmineralizada. Em contato com a água, estes solventes elevam sua pressão de vapor e a concentração de monômero aumenta, à medida que a água evapora, ou seja, a função destes componentes é substituir a água pelo monômero hidrofílico (KANCA, 1992).

Entretanto, a camada híbrida, formada com adesivos que apresentam estes componentes, é permeável, altamente suscetível à hidrólise lenta pela água, e dissolve o componente resinoso ou degrada as fibrilas colágenas (HASHIMOTO et al, 2003; YIU et al, 2004). Esta barreira permeável permite o movimento da água da dentina para a interface do adesivo, promovendo a absorção deste elemento. Esta absorção de água pela trama do

polímero está relacionada com a polarização da resina, já que, quanto maior a polarização, maior a atração entre os polímeros e as moléculas de água. Em outras palavras, a hidrofilicidade da resina determina a extensão da absorção de água (YIU et al, 2004).

Esta reação deve-se à presença de grupos de carboxila e fosfato na matriz de resina polimerizada e que, na presença de íon hidrogênio disponível, dissolvem a porção da resina (TAY et al, 2002; TAY et al, 2004).

Por meio de técnicas de micro-análise molecular, já foi possível detectar que o adesivo não penetra entre as fibras colágenas em toda profundidade da dentina desmineralizada. No primeiro micrômetro da interface adesivo-dentina, somente 68% do componente Bis-GMA do adesivo penetra na dentina desmineralizada. Contudo, outros componentes, como HEMA, difundem-se mais rapidamente na zona dentinária desmineralizada. A interface dentina-adesivo é uma região porosa, com composição predominante de colágeno e HEMA e pouca contribuição do componente Bis-GMA, que é um dos principais componentes na ligação cruzada dos adesivos poliméricos (WANG e SPENCER, 2003).

De acordo com NAKABAYASHI (1992) há um decréscimo gradual na adesão resina-dentina com o decorrer do tempo, como resultado da hidrólise do colágeno exposto na dentina desmineralizada. O autor complementa ainda, que se fosse possível eliminar a interface dentina-resina pela impregnação de polímeros no substrato, a nanoinfiltração seria eliminada.

A composição da camada híbrida é de aproximadamente 70 a 80% de fibras colágenas e somente 20 a 25% de adesivos nos espaços interfibrilares (TAY et al, 1996). Cerca de 50% da dentina desmineralizada pelo condicionamento com ácido fosfórico a 37%, encontra-se em estado desnaturado. Esta é uma condição instável, sensível à hidrólise e degradação enzimática, o que pode afetar a longevidade da interface resina-dentina. Com o

tratamento do substrato por meio do primer, a maioria das fibrilas colágenas retorna ao normal, mas 5% permanecem desnaturadas (ELIADES et al, 1999).

Do exposto, pode-se inferir que a degradação da interface dentina-adesivo deve-se, primeiramente, à remoção incompleta da água na dentina, pelos solventes presentes nos adesivos. Este fato leva a uma polimerização incompleta, gerando áreas instáveis passíveis de sofrer hidrólise. Além disso, já foi comprovado que nem toda dentina desmineralizada é coberta pelo adesivo, gerando áreas de fibrilas colágenas expostas. Estas áreas podem ser degradadas pelas metaloproteinases da matriz, que são ativadas pelo processo de tratamento dentinário com primer e adesivo, conforme demonstrado por PASHLEY et al (2004) e NISHITANI et al (2006).

Desta forma, a ativação das MMPs e a degradação do colágeno, importantes para a formação da camada híbrida, comprometem a qualidade da adesão do material restaurador à dentina, aumentando a ocorrência da nanoinfiltração.

Os estudos recentes demonstram que a liberação e ativação destas enzimas endógenas, ou das metaloproteinases da matriz, durante a adesão dentinária, podem ser responsáveis pela manifestação *in vitro* do desaparecimento das fibrilas colágenas da camada híbrida com o passar do tempo (MAZZONI et al, 2006).

PASHLEY et al (2004) comprovaram que a degradação das fibrilas colágenas de zonas dentinárias incompletamente infiltradas por adesivos, acontece pelas metaloproteinases, mesmo na ausência de enzimas bacterianas. Nessa pesquisa, o pó de dentina mineralizada apresentou atividade colagenolítica baixa: redução em 73% na presença de inibidores de MMPs e inibição, próxima a zero, com a aplicação de clorexidina a 0,2% por sessenta segundos. O condicionamento com ácido fosfórico a 37% por 15 segundos também reduziu esta atividade em 65%.

Resultados semelhantes foram observados por MAZZONI et al (2006) em que a dentina mineralizada apresentou atividade enzimática e o ácido fosfórico inativou quase completamente a atividade proteolítica da dentina (98,1%). Além disso, o tratamento do pó dentinário com adesivos de 2 passos resultou em reativação da atividade proteolítica. Estes adesivos apresentam pH entre 2,68 e 4,6 e como já foi demonstrado, o pH entre 2 e 3,5 é efetivo na ativação das gelatinases salivares em processo descrito por TJADERHANE et al (1998) como “ativação ácida”. Portanto, os dados deste estudo permitem concluir que os adesivos de dois passos podem reativar a enzima endógena, presente na dentina que foi previamente inativada pelo ácido fosfórico, contribuindo para a degradação das fibras colágenas.

Achados semelhantes são reportados para os adesivos de passo único, que apresentam pH entre 1,5 e 2,7, podendo ativar a MMP da dentina sem desnaturá-la (NISHITANI et al, 2006).

Além destas importantes informações sobre a desnaturação das enzimas após condicionamento com ácido fosfórico e a reativação das enzimas com adesivos de dois passos, outra observação importante é que o baixo nível de atividade gelatinolítica de pó de dentina mineralizada aumenta lentamente após alguns meses. Isto indica que a enzima é capaz de auto-ativação, o que pode ser parcialmente causado pela perda progressiva de inibidores teciduais de MMP-s (TIMPs) (NISHITANI et al, 2006).

Do ponto de vista clínico, seria vantajoso incluir, como passo da técnica adesiva, a aplicação de inibidores de MMPs, como a clorexidina, objetivando inibir a ação destas enzimas.

- **Clorexidina e camada híbrida:**

A clorexidina é uma solução biocompatível, antibacteriana de amplo espectro, de baixa toxicidade, alta substantividade e catiônica.

Para SAY et al (2004) este agente antimicrobiano apresenta alta afinidade com estruturas dentárias e que é aumentada pelo condicionamento ácido, o que, teoricamente, pode aumentar a força de adesão à dentina.

GENDRON et al (1999) avaliaram o efeito inibitório de várias concentrações de clorexidina na atividade da MMP 2, 8 e 9. As células, contendo cada tipo de MMP, foram tratadas com várias concentrações de clorexidina e incubadas. Em uma concentração de 0,03% a clorexidina produziu uma completa inibição da MMP 2 e 9. A MMP 8 foi inibida a uma concentração de 0,02%. Com as propriedades antiproteolíticas dessa substância, a sua utilização, como agente de cavidade, aplicado após o condicionamento ácido da dentina, pode limitar a degradação das fibrilas colágenas. Estes autores sugerem que a clorexidina pode interagir com os grupos sulfidril e cisteína presentes nos sítios ativos das MMPs, provocando a inibição da enzima.

Estudos *in vitro* com pó de dentina humana mineralizada, incubado com clorexidina a 0,2% por sessenta segundos, demonstram uma inibição completa da atividade colagenolítica das metaloproteinases da matriz (PASHLEY et al, 2004).

Os estudos *in vivo* apresentam resultados promissores: a camada híbrida dos dentes tratados com clorexidina exibiu trama colágena com integridade normal, quando observado em microscopia eletrônica de transmissão. Foi, porém, observada uma camada híbrida anormal, com progressiva desintegração da trama de fibrilas colágenas observada no grupo controle. Os autores concluíram que a clorexidina pode ser um efetivo inibidor das MMPs (HEBLING et al, 2005).

Na literatura poucos são os artigos que reportam a utilização da clorexidina como um passo clínico da técnica restauradora de compostos resinosos. TULUNOGLU et al (1998) testaram o efeito da clorexidina a 2% na microinfiltração, quando este agente foi aplicado após o condicionamento ácido. Foi observado um aumento na microinfiltração, sugerindo haver uma interação negativa entre os desinfetantes cavitários e os agentes adesivos. VIEIRA et al (2003) objetivaram determinar o efeito da força de adesão por meio de testes de resistência ao cisalhamento, da clorexidina a 2% em dentina de dentes decíduos. Em um grupo foi aplicado clorexidina antes do condicionamento ácido da dentina, procedimento que proporcionou uma menor força de adesão ao substrato dentinário.

Os artigos que estudam o efeito da clorexidina na adesão dentinária são realizados, em sua maioria, em dentes permanentes. PILO et al (2001) reportaram uma resistência ao cisalhamento maior para o grupo que foi tratado com este agente antimicrobiano, após o condicionamento ácido seguido da aplicação de adesivo de 2 passos. Para CASTRO et al (2003), SAY et al (2004) e KOMORI et al (2006) não houve diferença entre os dois grupos testados quando esse teste foi aplicado. Quanto à infiltração, o grupo tratado com clorexidina apresentou menor grau (OWENS et al, 2003).

- Adesão em dentes decíduos:

Os adesivos dentinários possuem diferentes apresentações e passos clínicos. Atualmente, a classificação mais utilizada refere-se à quantidade de passos clínicos: sistemas adesivos de 3 passos compostos de ácido+primer+adesivo; sistemas adesivos de 2 passos, que são subdivididos em ácido+primer e adesivo e ácido e primer+adesivo; e, finalmente, sistemas adesivos de 1 passo contendo, no mesmo frasco ácido, primer e adesivo (INOUE et al, 2000 apud TAY et al, 2002).

Os artigos encontrados, que estudam o processo de adesão em dentes decíduos e permanentes, mostram resultados controversos. NOR et al (1996) avaliaram a espessura da camada híbrida em dentes decíduos e dentes permanentes, utilizando sistemas adesivos de 3 passos. Nos dentes decíduos foi encontrada uma camada híbrida significativamente mais espessa. Quando o ácido é aplicado à dentina, os componentes minerais da estrutura são parcialmente removidos, expondo a trama colágena. Se ácidos fortes são utilizados por períodos prolongados, a *smear layer* e os *smear plugs* são completamente removidos e é observada uma excessiva desmineralização na dentina intra e intertubular. Essa excessiva desmineralização pode causar colapso severo da trama colágena. Nesses casos, a ação dos primers hidrofílicos pode não conseguir reconstituir a trama colágena e, conseqüentemente, a habilidade adesiva é comprometida. Isto também pode levar à microinfiltração, já que o adesivo não consegue penetrar em toda a dentina desmineralizada (NOR et al, 1996). Resultados semelhantes foram reportados por OLMEZ et al (1998) com adesivos de 2 passos.

BORDIN-AYKROYD et al (1992) avaliaram a resistência ao cisalhamento em dentes decíduos e permanentes. Estes últimos apresentaram uma força de adesão maior com adesivos de 3 passos. KALLA e GARCIA-GODOY (1998) descreveram resultados semelhantes com adesivos de 2 e 3 passos.

Estudos recentes, utilizando adesivos de novas gerações, não reportam diferença entre a adesão em dentes decíduos e permanentes. TELLES et al (2001), por meio de restaurações com adesivos de 2 passos e de 1 passo, observaram que as restaurações realizadas com o último apresentaram fendas (gaps) mais freqüentes que aquelas restauradas com o outro sistema adesivo. Não houve diferença entre dentes decíduos e permanentes. SCHIMITT e LEE (2002) também não relataram diferença na microinfiltração marginal presente entre

esses dentes, quando utilizados adesivos de 2 e 3 passos. Da mesma forma, BURROW et al (2002), SOARES et al (2005) e GERMAN et al (2005) utilizando testes de resistência ao cisalhamento, não observaram diferença na força de adesão de adesivos de passo único entre dentes decíduos e permanentes.

A explicação pela inexistência de diferença na adesão entre decíduos e permanentes com adesivos de novas gerações, pode ser creditada à mistura de um primer hidrofóbico com um adesivo hidrofílico em uma única solução, o que pode atenuar o efeito do tipo de dentina na espessura da camada híbrida (TELLES et al, 2001).

Partindo do pressuposto de que a clorexidina pode ser uma inibidora das MMPs e, portanto, melhorar a qualidade da camada híbrida, este trabalho investiga a qualidade da camada híbrida formada sobre a dentina normal na interface dentina/resina em dentes decíduos, incluindo a aplicação da clorexidina no protocolo clínico.

3-OBJETIVO:

- Avaliar *in vitro* o efeito da clorexidina na qualidade da camada híbrida, formada sobre a dentina normal de dentes decíduos, por meio de microscopia eletrônica de varredura.

4-MATERIAIS E MÉTODOS:

A presente pesquisa é uma investigação experimental em laboratório. Esta opção metodológica foi escolhida por ser a que tem condições de oferecer resultados mais fíéis quando se objetiva o estudo entre diferentes técnicas.

Os critérios estabelecidos para a execução deste estudo estão de acordo com as normas da resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e com o Código de Ética Profissional Odontológico, segundo resolução CFO 179/91. Antes da coleta de dados, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Católica de Brasília, obtendo-se, aí, parecer favorável para sua execução: Ofício CEP-UCB no. 027-2004. (ANEXO A).

Os pais ou responsáveis pelos pacientes foram informados da natureza e dos objetivos do estudo. Após a leitura cuidadosa do termo de consentimento e estando de acordo com a doação dos dentes, assinaram termo de permissão e compromisso para a realização da pesquisa (ANEXO B).

Foram coletados 10 dentes decíduos hígidos (1os. ou 2os. Molares), extraídos e em fase final de rizólise.

Os dentes foram limpos imediatamente após a extração e armazenados em solução de timol 0,2% , 4° C, por no máximo 30 dias. A porção coronária foi separada da porção radicular remanescente por meio de broca carbide no. 330 (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil) e alta rotação- 350.000 rpm (Turbina Extra Torque 605- Kavo do Brasil SA, Joinville, SC, Brasil), na junção cimento-esmalte. O tecido pulpar foi removido com explorador dental.

Todos os dentes receberam preparos em Classe I, com broca carbide número 330 (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), operadas em alta rotação- 350.000 rpm- sob constante irrigação com spray de água (Turbina Extra Torque 605- Kavo do Brasil SA, Joinville, SC, Brasil). Para realização do preparo e do procedimento restaurador, os dentes foram imobilizados em cera utilidade.

O preparo obteve profundidade média em todas as amostras. Para tanto, os dentes sofreram tomadas radiográficas padronizadas e, em seguida, realizadas medidas da espessura dentinária total (da junção amelo-dentinária até o corno pulpar), com auxílio de um paquímetro. A metade desta medida foi transferida para a broca de preparo obtendo-se uma exposição dentinária da área média de cada dente (figuras 1-4). A largura do preparo foi de dois terços da largura total do dente.

Em seguida os espécimes foram divididos aleatoriamente em 2 grupos (grupo 1 e grupo 2) com 5 dentes em cada. As amostras foram distribuídas por meio de sorteio aleatório, caracterizando um experimento inteiramente casualizado.

Todos os materiais foram utilizados conforme a recomendação do fabricante. O tipo de material, a composição, o número do lote e o fabricante estão apresentados no quadro 1.

Quadro 1: Matérias, composição, no. do lote e fabricante dos materiais utilizados.

Material	Composição	No. do Lote	Fabricante
Ácido Fosfórico	Ácido fosfórico a 35%,	3LM	3M-ESPE, Minnesota, EUA
Adper Single Bond 2	HEMA, Bis-GMA, etanol, silano tratado com filler de sílica glicerol 1,3 dimetacrilato, copolímero de ácido acrílico e ácido itacônico e diuretano dimetacrilato.	5EC	3M-ESPE, Minnesota, EUA
Filtek Z250-cor B1	Filler de zircônia e sílica, carga inorgânica com 60% em volume com tamanho médio de partículas entre 0,19-0,33 Micra Bis-GMA, UDMA, Bis-EMA.	4LM	3M-ESPE, Minnesota, EUA
Cav Clean	solução aquosa de Clorexidina a 2%	172928	Dentsply, NY, EUA

Siglas: HEMA: 2-hidroxietil metacrilato, Bis-GMA: bisfenol A-glicidil metacrilato.
UDMA: dimetacrilato de uretano, Bis-EMA: bisfenol etilmetacrilato.

O seguinte protocolo foi utilizado para os grupos 1 e 2:

Grupo 1: A superfície dentinária de cada dente foi condicionada com ácido fosfórico a 35% (3M ESPE, Minnesota, EUA), por 15 segundos; lavagem da cavidade com água por 15 segundos, aplicação de clorexidina a 2% em solução aquosa (Cav Clean, Dentsply, New York, EUA), deixando agir por 30 segundos (HEBLING et al, 2005), leve secagem com papel absorvente objetivando manter a superfície dentinária visivelmente úmida. Aplicação de uma camada do adesivo Adper Single Bond 2 (3M ESPE, Minnesota, EUA) na cavidade, com auxílio de microbrush; aplicação de outra camada, e, leve secagem por 5 segundos. Realização da polimerização, por 20 segundos. Aplicação de Filtek Z250, cor B1 (3M ESPE, Minnesota, EUA) por incrementos de 2X2mm e polimerização por 20 segundos, até o completo preenchimento da cavidade. Após este procedimento, a polimerização final foi de 40

segundos. Esta técnica de polimerização gradual foi utilizada visando reduzir a contração de polimerização. A polimerização foi realizada com aparelho fotopolimerizador do tipo LED segunda geração (DMC, Brasil) com intensidade de luz de 600 mW/cm², confirmada por medição em radiômetro (Demetron Research Corporation- Model 100- Curing Radiometer P/N 10503- EUA) antes da polimerização de cada amostra.

Grupo 2: Cada dente foi submetido aos mesmos procedimentos descritos para o grupo 1, com exceção da aplicação da clorexidina. Desta forma, após o condicionamento ácido e lavagem da cavidade, o dente foi levemente seco com papel absorvente e, em seguida, foram executados os procedimentos adesivos (Figuras 5-13) .

As amostras foram preparadas em uma única etapa e em seqüência aleatória. Em seguida, foram armazenadas em água e temperatura ambiente até o momento da fratura e metalização.

Após esta fase, os dentes foram fraturados longitudinalmente, no sentido mésio-distal, originando daí uma metade vestibular e outra lingual; procedimento que objetivou expor a interface dentina-resina. Para direcionar a linha de fratura, foi realizado um sulco, iniciado no centro da superfície oclusal em direção à superfície proximal, ao redor de todo o dente, utilizando-se broca carbide esférica no. 1 (KG Sorensen, Barueri, SP, Brasil), operada em alta rotação sob constante irrigação com spray de água (Turbina Extra Torque 605- Kavo do Brasil SA, Joinville, SC, Brasil). Obteve-se a fratura com auxílio de um bisturi posicionado na dentina em direção à resina composta (figura 14). Esta técnica de fratura é a sugerida pela literatura quando se deseja examinar a condição da camada híbrida (TELLES et al, 2001). Em seguida cada espécime foi seca em temperatura ambiente por 7 dias.



Figura 1: Dente decíduo hígido antes do preparo.



Figura 2: Raio-X inicial do dente hígido antes do preparo.

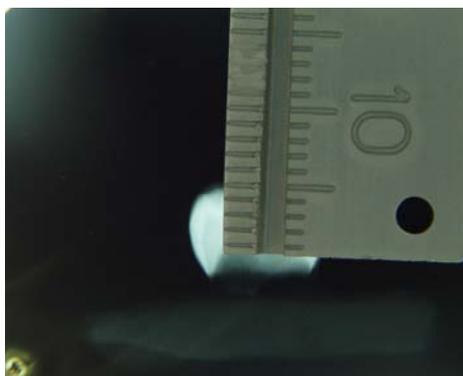


Figura 3: Medição da espessura dentinária total (JAD-corno pulpar) com auxílio de um paquímetro.

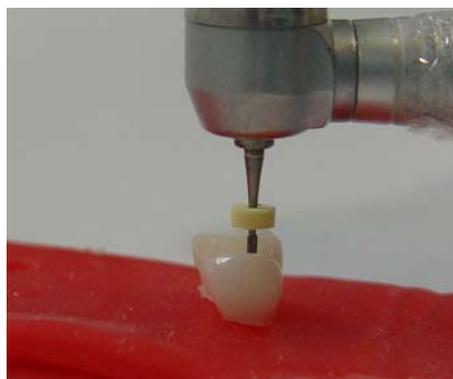


Figura 4: Transferência da metade da medida encontrada para a broca e, preparo da cavidade.



Figura 5: Preparo final da cavidade.



Figura 6: Condicionamento com ácido fosfórico a 35% , por 15 segundos.

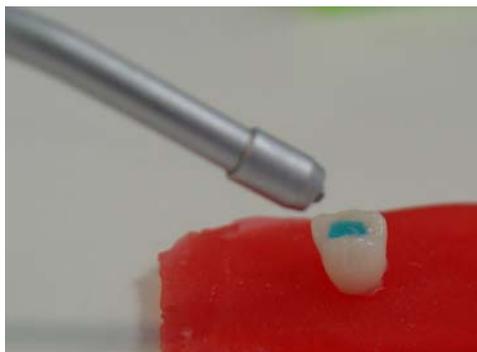


Figura 7: Lavagem da superfície com água por 15 segundos.



Figura 8: Aplicação da solução de clorexidina a 2%, deixando agir por 30 segundos.



Figura 9: Após leve secagem da cavidade com papel absorvente, foi aplicada duas camadas de adesivo Single Bond, com auxílio de um microbrush.



Figura 10: Após leve secagem da cavidade por 5 segundos, o adesivo foi polimerizado por 20 segundos.



Figura 11: Aplicação da resina Filtek Z-250 por incrementos 2X2.



Figura 12: Fotopolimerização dos incrementos.



Figura 13: Aspecto da restauração final.



Figura 14: Amostra fraturada.



Figura 15: Amostra após procedimento de metalização.

Uma metade de cada dente foi fixada em stubs com fita adesiva de carbono dupla face e então levados ao aparelho de metalização EMITECH K550, para cobertura com ouro-paládio por 120 segundos e 40Ma (figura 15).

Os stubs foram armazenados em caixas contendo sílica gel para controle da umidade e mantidos em ambiente com temperatura controlada de 22° C e umidade relativa do ar de 60%, até o momento da análise.

A análise dos espécimes ocorreu por meio de microscópio eletrônico de varredura (modelo DSM 962, marca ZEISS), com uma aceleração de voltagem de 15Kv.

A espessura da camada híbrida, assim como a espessura das fendas foram medidas em 5 diferentes sítios de cada dente. Para a obtenção destes sítios, a parede pulpar sofreu medição

ponto a ponto em aumento de 20 vezes. Esta medição total foi dividida em 5, obtendo-se as áreas específicas para as análises (figuras 16 e 17).

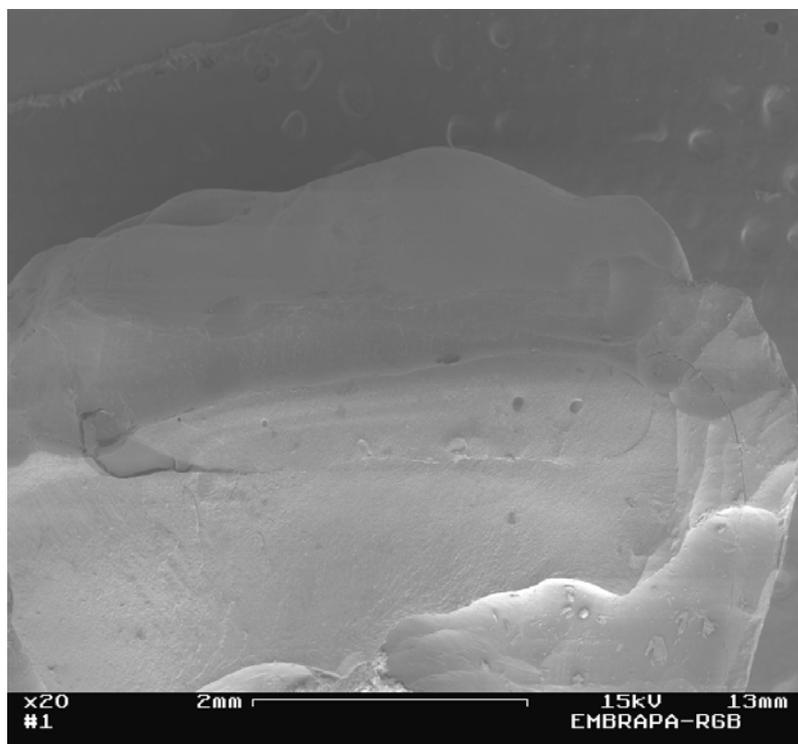


Figura 16: Micrografia Eletrônica de Varredura da amostra em aumento de 20 vezes.

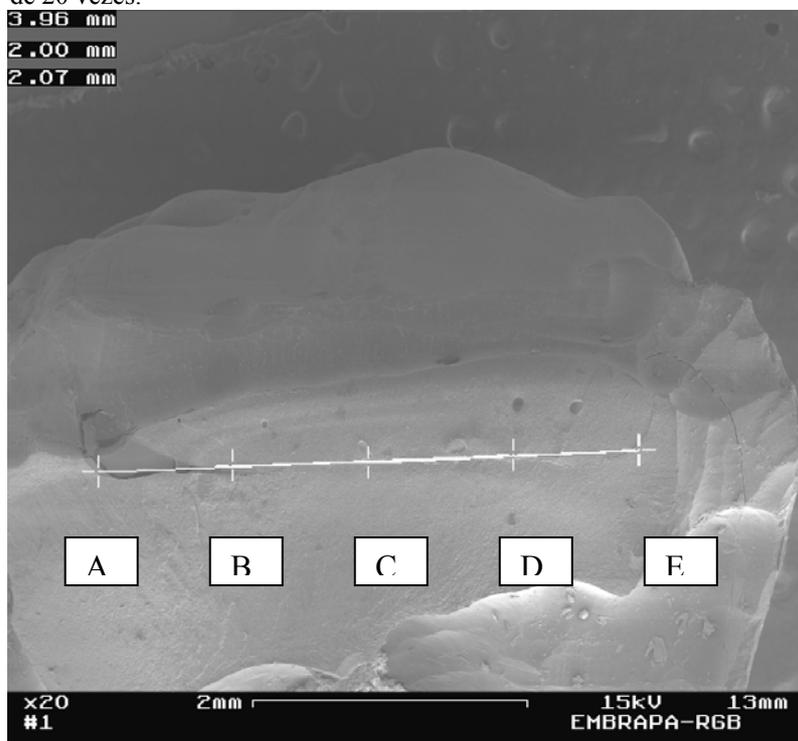


Figura 17: Micrografia Eletrônica de Varredura da amostra da figura 16 após medição ponto a ponto, determinando os 5 sítios: A, B, C, D, E.

As profundidades das fendas foram medidas em aumento de 1500 vezes. Neste mesmo aumento foi avaliada a condição dos túbulos dentinários e, em seguida classificados em parcialmente preenchidos e vazios. A espessura da camada híbrida foi avaliada em aumento de 4000 vezes. Somente áreas de camada híbrida visível foram consideradas.

Cada sítio foi analisado por 2 examinadores (ACBB e OAT) calibrados e cegos com relação ao grupo examinado. As medições propostas foram realizadas após consenso entre os dois examinadores, por meio da análise da projeção de cada região. Os dados obtidos foram anotados em ficha própria (ANEXO C). Todas as amostras foram analisadas em um único dia.

A avaliação qualitativa da interface dente/restauração foi feita nos mesmos sítios em que foram realizadas as medidas. Para esta análise os dentes foram classificados de acordo com a metodologia proposta por TELLES et al (2001): selados (completo selamento do dente com a restauração), parcialmente selados (áreas com presença de fendas intercaladas com áreas de selamento dente-restauração) e, abertos (fendas presentes em toda a superfície de adesão).

Os resultados foram analisados estatisticamente por meio dos testes qui-quadrado e t-student a um nível de significância de 5%, buscando-se testar a hipótese de que não há diferença na qualidade da camada híbrida com a utilização da clorexidina no protocolo clínico-restaurador, quando comparado ao grupo que não utilizou esta solução.

5-RESULTADOS:

A profundidade das fendas, em cada ponto das amostras dos dois grupos avaliados, está demonstrada nas tabelas 1 e 2:

Tabela 1: Distribuição dos valores (em micrômetros) das fendas por ponto em cada amostra, do grupo sem clorexidina.

Amostra	Ponto A	Ponto B	Ponto C	Ponto D	Ponto E
1	SF	SF	2,7	8,2	SF
2	SF	SF	SF	SF	SF
3	SF	SF	SF	SF	SF
4	SF	SF	SF	1,25	SF
5	SF	SF	SF	SF	SF

SF: ponto sem fenda.

Tabela 2: Distribuição dos valores (em micrômetros) das fendas por ponto em cada amostra, do grupo com clorexidina.

Amostra	Ponto A	Ponto B	Ponto C	Ponto D	Ponto E
1	SF	SF	SF	SF	SF
2	SF	8	4	SF	5
3	SF	SF	SF	SF	2,7
4	SF	SF	SF	2,3	1,2
5	SF	SF	SF	SF	SF

SF: ponto sem fenda.

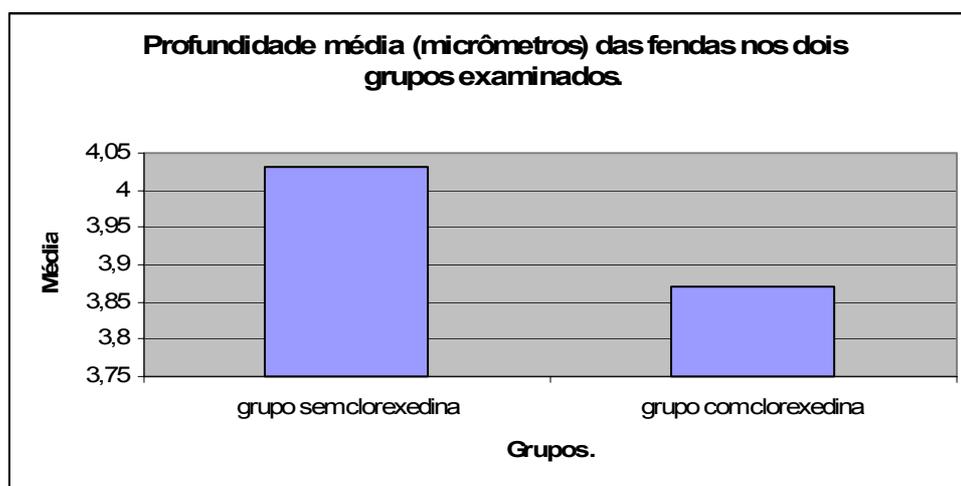
Dos 25 pontos analisados no grupo sem clorexidina, 3 (12%) apresentaram fendas, enquanto naquele com clorexidina, 6 (24%) áreas apresentaram este defeito ($p=0,46$).

Para avaliar a possibilidade da presença de viés, como resultado da diferença de localização dos pontos (pontos em região de ângulo do preparo e pontos no centro da parede pulpar), foi feita a análise em separado. No grupo controle, todas as fendas (100%) foram localizadas no centro da parede pulpar, enquanto no grupo teste, 3 delas (50%) estavam nesta região e outras 3 (50%), nos pontos de ângulo do preparo ($p= 1,0$).

Como a diferença não foi significativa, todos os pontos foram considerados em conjunto.

O valor médio da profundidade das fendas, observados no grupo sem clorexidina, foi $4,03(\pm 3,68)$ e, para o outro grupo, $3,87(\pm 2,42)$ ($p=0,93$) (figura 18).

Figura 18:



A maioria das fendas foi localizada na interface dentina-adesivo, conforme pode ser observado nas tabelas 3 e 4, e nas figuras 19- 22:

Tabela 3: Localização das fendas no grupo sem clorexidina.

Amostra	Ponto A	Ponto B	Ponto C	Ponto D	Ponto E
1	SF	SF	dentina-adesivo	dentina-adesivo	SF
2	SF	SF	SF	SF	SF
3	SF	SF	SF	SF	SF
4	SF	SF	SF	dentina-adesivo	SF
5	SF	SF	SF	SF	SF

SF: ponto sem fenda.

Tabela 4: Localização das fendas no grupo com clorexidina.

Amostra	Ponto A	Ponto B	Ponto C	Ponto D	Ponto E
1	SF	SF	SF	SF	SF
2	SF	dentina-adesivo	dentina-adesivo	SF	dentina-adesivo
3	SF	SF	SF	SF	dentina-adesivo
4	SF	SF	SF	Dentina-adesivo	adesivo-compósito
5	SF	SF	SF	SF	SF

SF: ponto sem fenda.

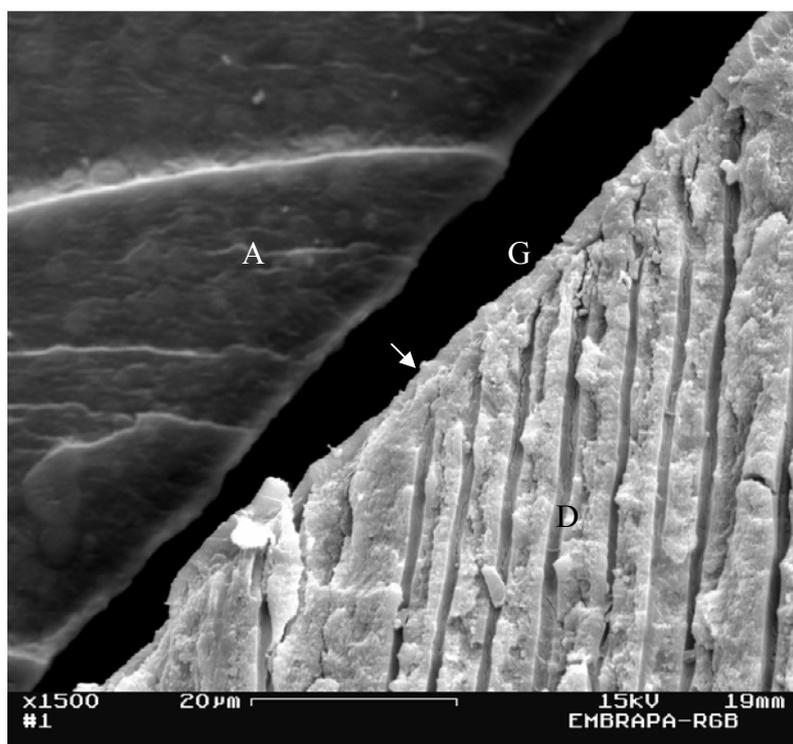


Figura 19: Camada híbrida (seta), túbulos dentinários vazios, fenda (G) entre o adesivo e a dentina, em amostra do grupo sem clorexidina, sítio E. A- adesivo, D-dentina.

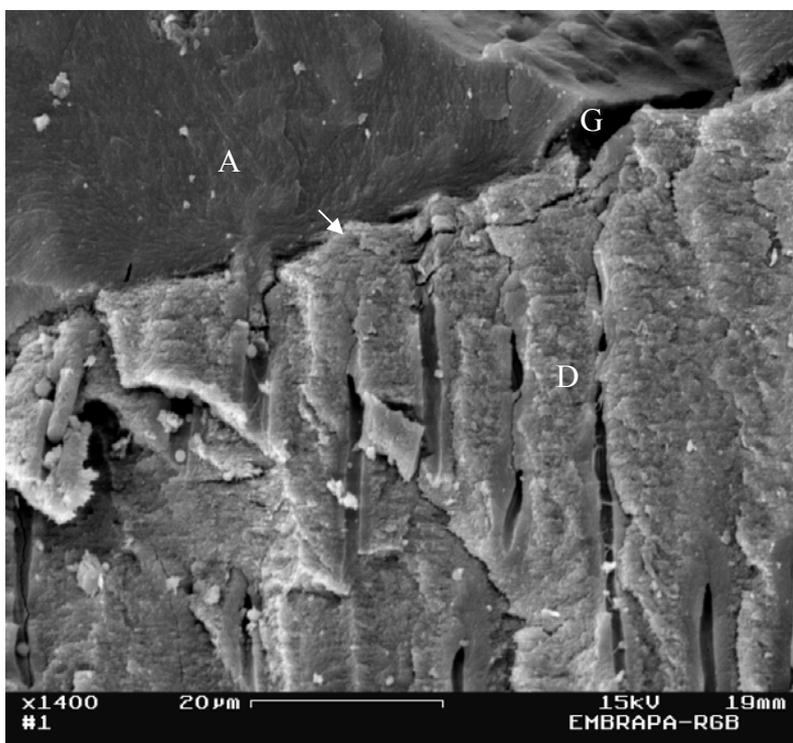


Figura 20: Fenda (G) entre o adesivo e a dentina, camada híbrida (seta) e túbulos dentinários parcialmente preenchidos, em amostra do grupo sem clorexidina, sítio D. A- adesivo, D-dentina.

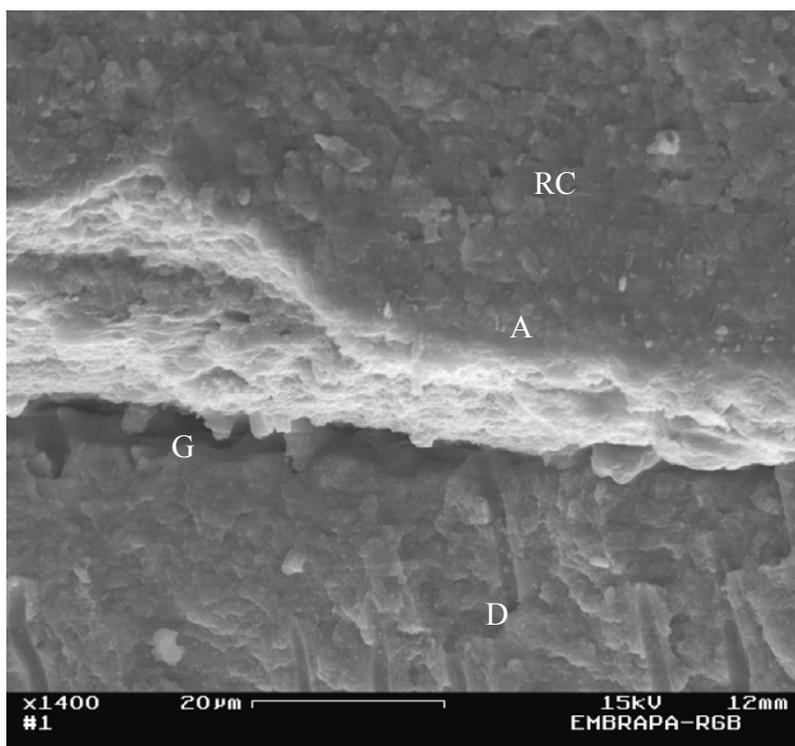


Figura 21: Fenda (G), túbulos dentinários vazios, em amostra do grupo com clorexidina, sítio C. A- adesivo, D-dentina, RC- resina composta.

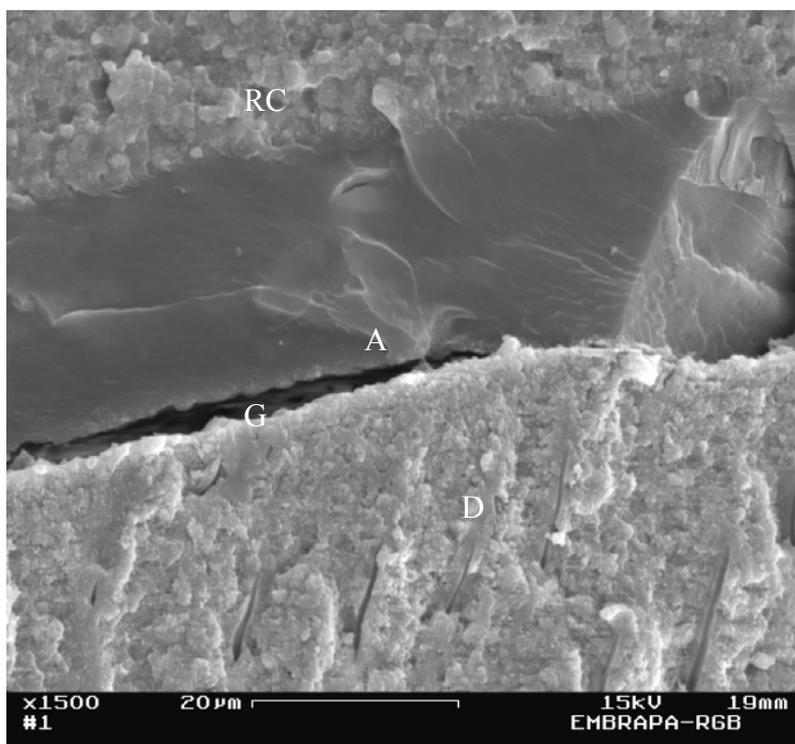


Figura 22: Fenda (G), túbulos dentinários parcialmente preenchidos, em amostra do grupo com clorexidina, sítio D. A- adesivo, D-dentina, RC- resina composta.

A condição dos túbulos dentinários também foi examinada em aumento de 1500x. Esta análise, porém, não foi possível ser realizada em 3 pontos do grupo sem clorexidina, e em 2 do grupo com este agente antimicrobiano. Isto ocorreu devido ao tipo de corte que deu origem à fratura o que impossibilitou a análise do conteúdo dos túbulos (tabela 5) (figuras 23- 28).

Tabela 5: Análise dos túbulos dentinários

	grupo sem clorexidina		Grupo com clorexidina	
	Freq.	%	Freq.	%
Vazios	2	9,1	3	13
Parcialmente preenchidos	20	90,9	20	87
Total	22	100	23	100

A condição dos túbulos não demonstrou ser significativa para os dois grupos examinados: $p=0,56$.

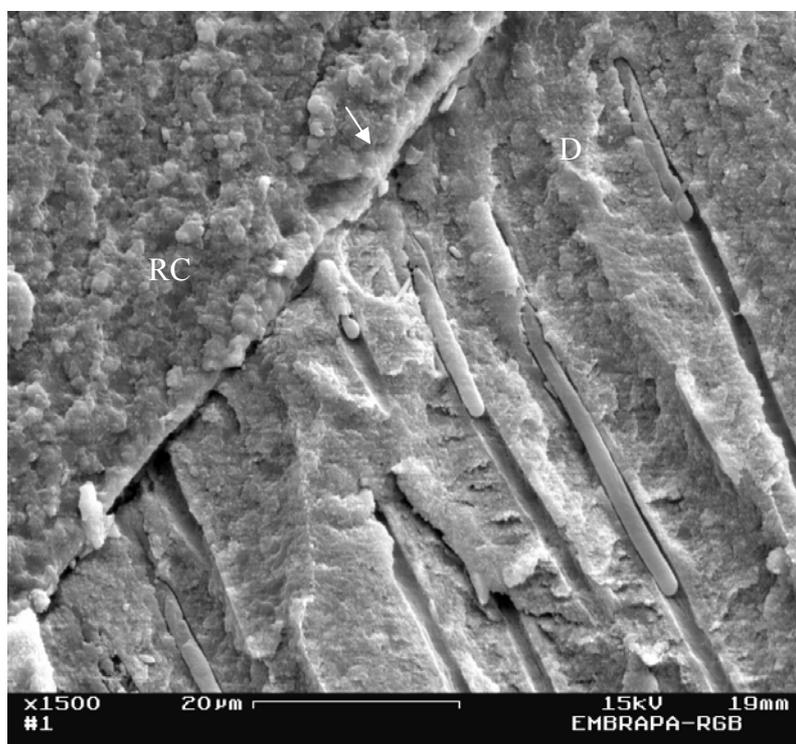


Figura 23: Túbulos dentinários parcialmente preenchidos, camada híbrida (seta) em amostra do grupo sem clorexidina, sitio C. D-dentina, RC- resina composta.

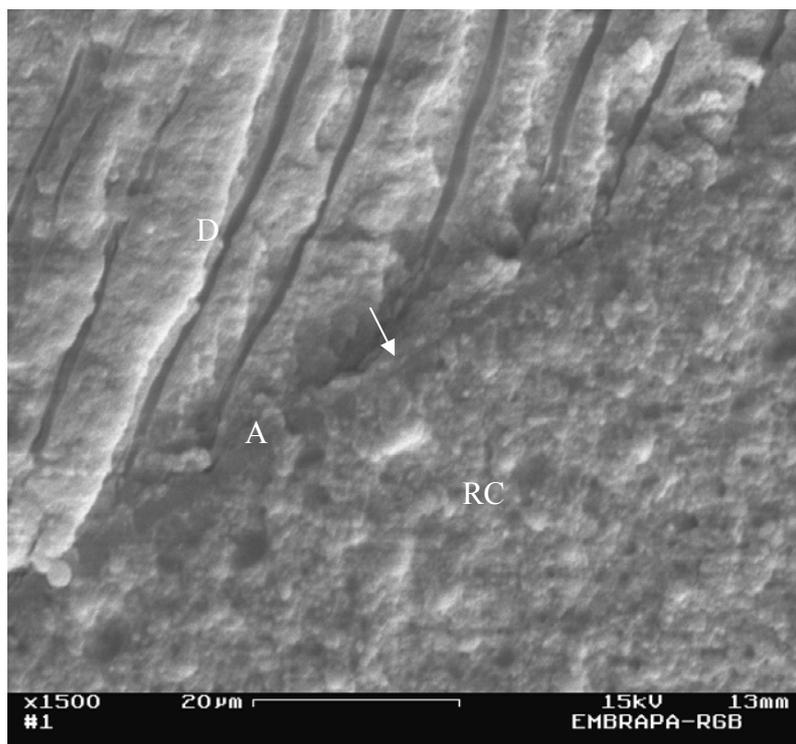


Figura 24: Túbulos dentinários vazios, camada híbrida (seta) em amostra do grupo com clorexidina, sítio A. D-dentina, RC- resina composta, A-adesivo.

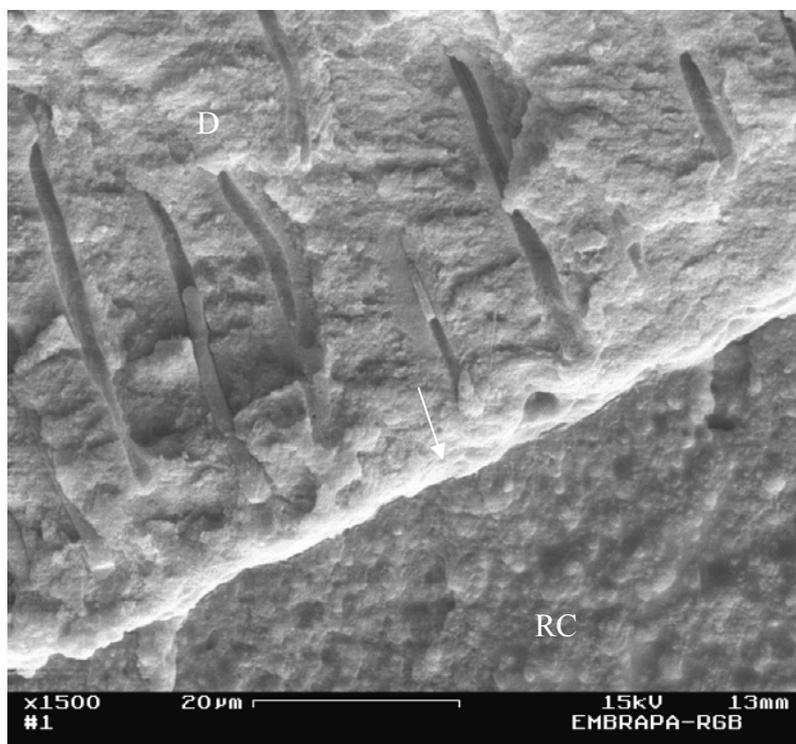


Figura 25: Túbulos dentinários parcialmente preenchidos, camada híbrida (seta) em amostra do grupo com clorexidina sítio D. D-dentina, RC- resina composta.

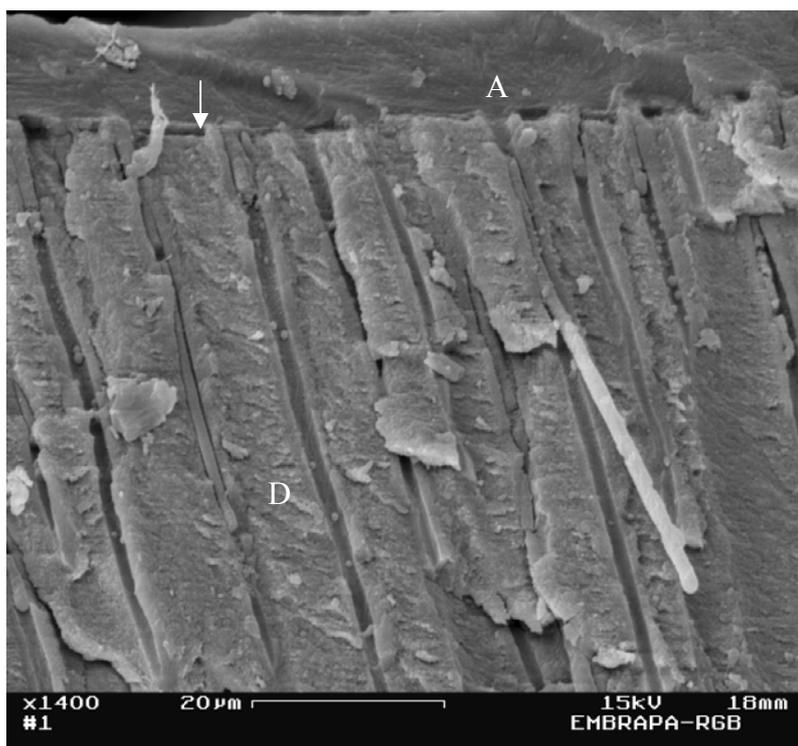


Figura 26: Túbulos dentinários parcialmente preenchidos, camada híbrida (seta) em amostra do grupo sem clorexidina, sítio C. D-dentina, A-adesivo.

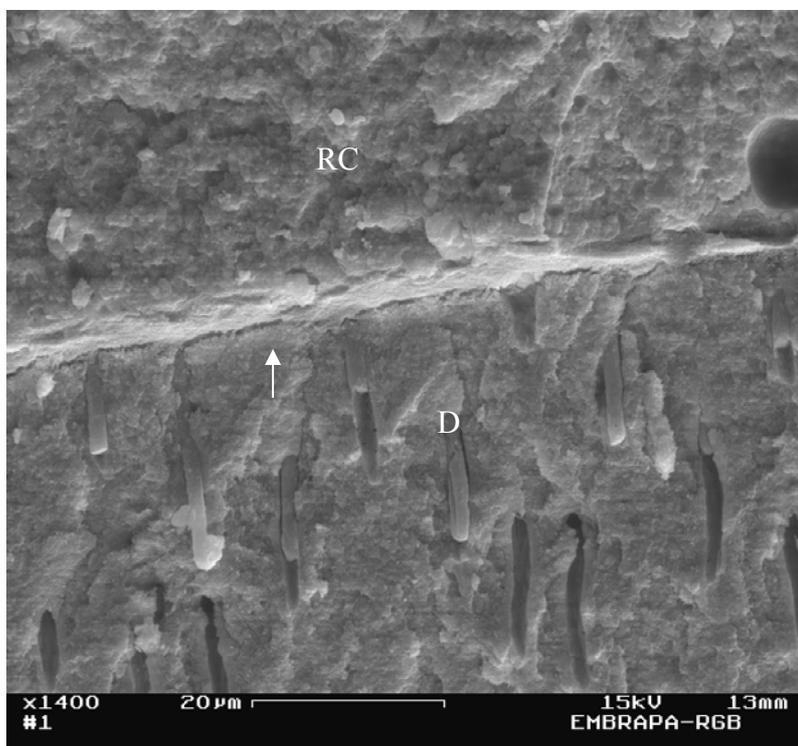


Figura 27: Túbulos dentinários parcialmente preenchidos, camada híbrida (seta) em amostra do grupo com clorexidina, sítio C. D- dentina, RC- resina composta.

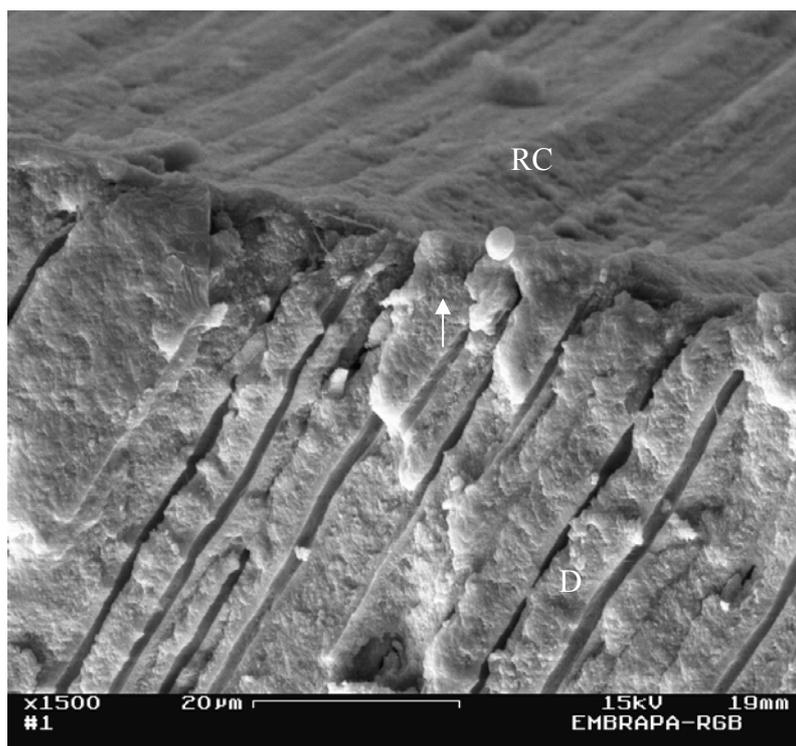


Figura 28: Túbulos dentinários vazios, camada híbrida (seta) em amostra do grupo sem clorexidina, sítio E. D- dentina, RC- resina composta.

A camada híbrida foi visível em 13 (52%) dos 25 pontos examinados no grupo sem clorexidina e em 17 (68%), do grupo teste. Todos os dentes apresentaram pelo menos 1 região com visível formação da camada híbrida. Os pontos em que a camada híbrida não foi visível assim como os valores de sua espessura, estão apresentados nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6: Distribuição dos valores (em micrômetros) da camada híbrida, por ponto em cada amostra, grupo sem clorexidina.

Amostra	Ponto A	Ponto B	Ponto C	Ponto D	Ponto E
1	SCH	6,3	2,7	2	2,7
2	SCH	SCH	0,5	SCH	SCH
3	SCH	SCH	SCH	8,6	SCH
4	0,9	4,5	1,8	3,6	SCH
5	2,7	SCH	SCH	2,3	4,1

* SCH significa áreas sem camada híbrida visível.

Tabela 7: Distribuição dos valores (em micrômetros) da camada híbrida, por ponto em cada amostra, grupo com clorexidina.

Amostra	Ponto A	Ponto B	Ponto C	Ponto D	Ponto E
1	SCH	SCH	1,8	0,7	2,3
2	2,7	SCH	SCH	2,3	SCH
3	1,8	5	3,6	2,3	7,3
4	5	4,1	2,3	7,3	1,4
5	SCH	3,6	SCH	SCH	3,2

* SCH significa áreas sem camada híbrida visível.

Para a avaliação da camada híbrida, também foram analisados os pontos em ângulo do preparo e aqueles localizados no centro da parede pulpar, em separado, buscando-se detectar a presença de viés. Desta forma, no grupo controle, a maioria dos pontos com camada híbrida visível localizou-se no centro da parede pulpar (69,2%), quando comparado às regiões de ângulo do preparo (30,8%). O mesmo foi observado no grupo teste: a maioria dos pontos no centro da parede pulpar (58,8%), quando comparado a 41,2% nos pontos de ângulo de preparo ($p=0,70$). A diferença não mostrou ser significativa, possibilitando a apresentação dos dados agrupados.

A média e o desvio padrão da espessura da camada híbrida estão representados na tabela 8.

Tabela 8: Média e desvio padrão da espessura da camada híbrida (micrômetros).

	Média (+dp)
grupo sem clorexidina	3,28 (+2,22)
grupo com clorexidina	3,33 (+1,90)
$p=0,94$	

As figuras 29- 36 apresentam os locais com camada híbrida nos dois grupos examinados.

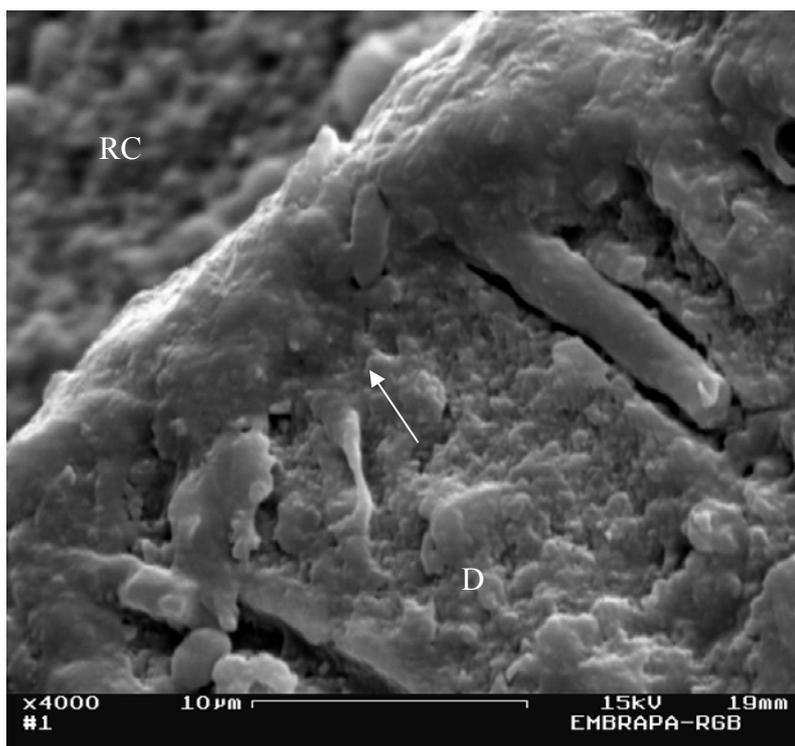


Figura 29: Camada híbrida visível (seta) em amostra do grupo sem clorexidina, sítio B. Túbulos dentinários parcialmente preenchidos. D- dentina, RC- resina composta.

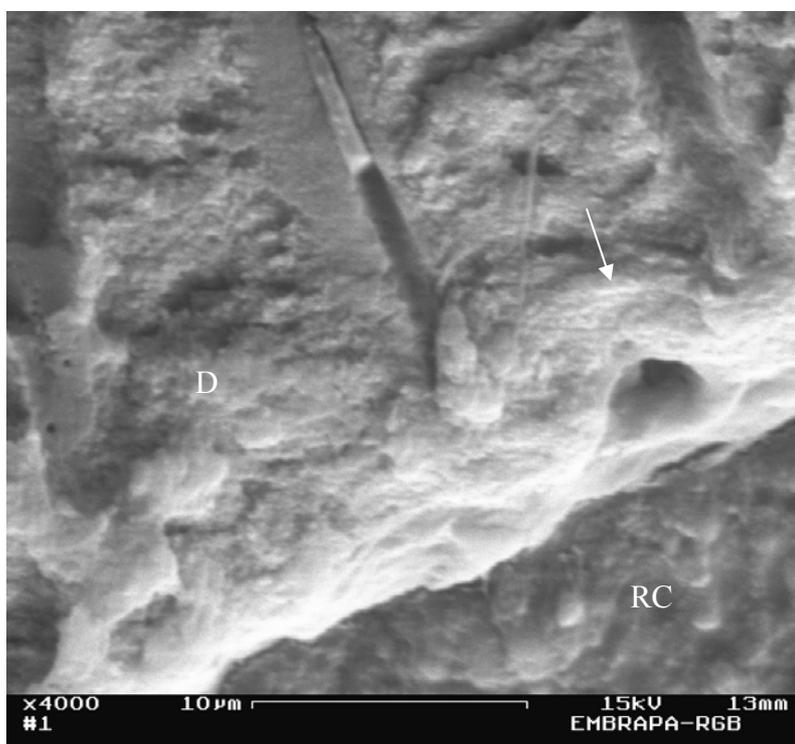


Figura 30: Camada híbrida visível (seta) em amostra do grupo com clorexidina, sítio D. Túbulos dentinários parcialmente preenchidos. D- dentina, RC- resina composta.

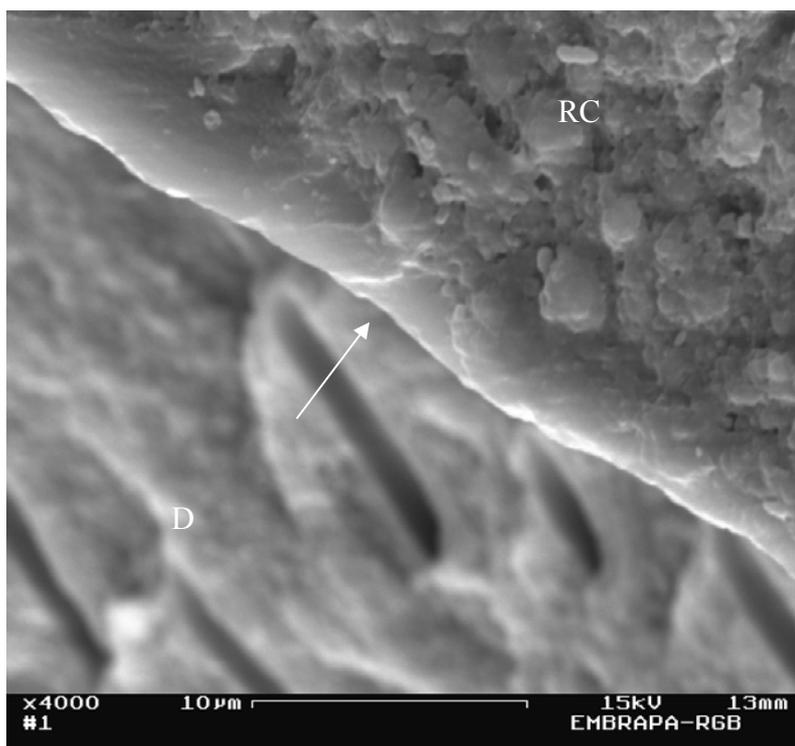


Figura 31: Camada híbrida visível (seta) em amostra do grupo com clorexidina, sítio A. Túbulos dentinários vazios. D- dentina, RC- resina composta.

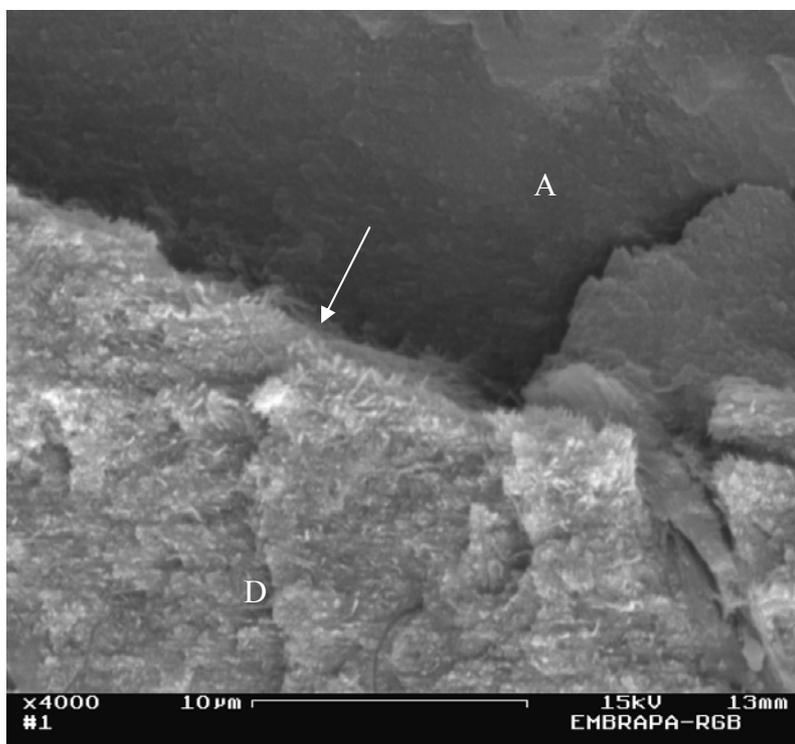


Figura 32: Camada híbrida visível (seta) em amostra do grupo com clorexidina, sítio A. Túbulos dentinários vazios. D- dentina, A- adesivo.

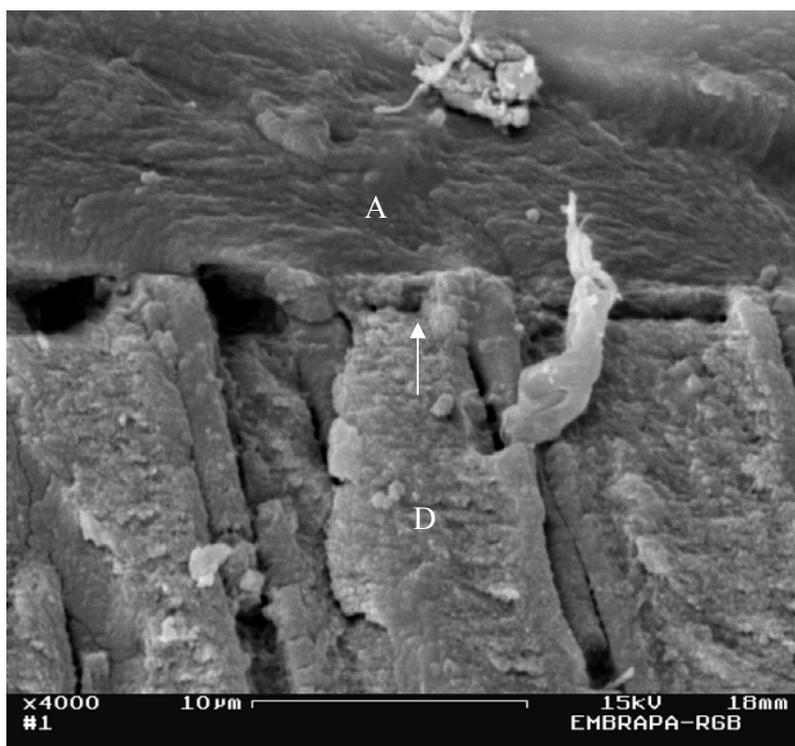


Figura 33: Camada híbrida visível (seta), com tags em resina, em amostra do grupo sem clorexidina, sítio C. Túbulos dentinários parcialmente preenchidos. D- dentina, A- adesivo.

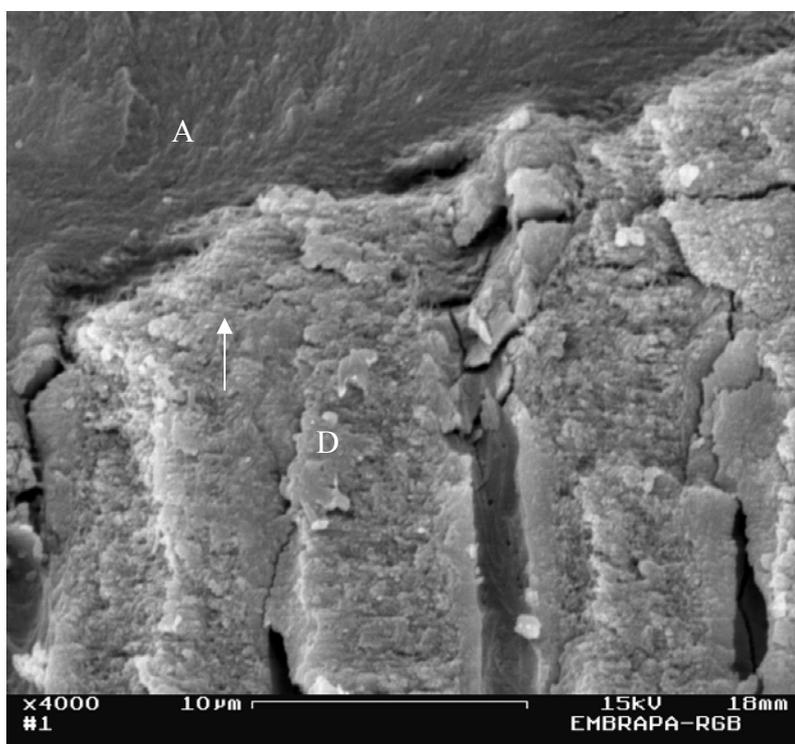


Figura 34: Camada híbrida visível (seta), em amostra do grupo sem clorexidina, sítio D. Túbulos dentinários vazios. D- dentina, A- adesivo.

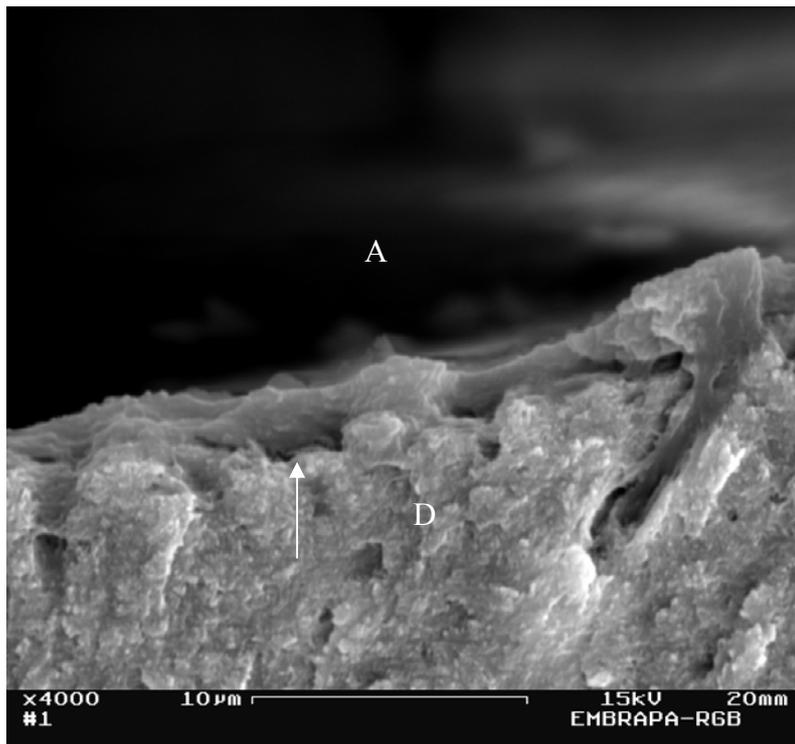


Figura 35: Camada híbrida visível (seta), em amostra do grupo com clorexidina, sítio E. D- dentina, A- adesivo.

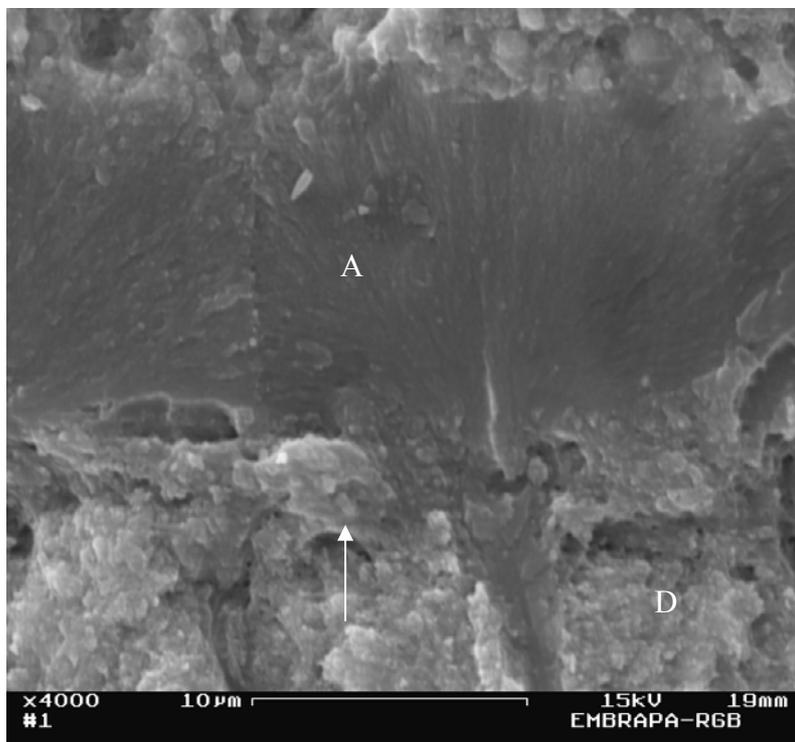


Figura 36: Camada híbrida visível (seta), com formação de tags em resina, em amostra do grupo com clorexidina, sítio B. D- dentina, A- adesivo.

A qualidade do selamento da interface dente-restauração, por dente, está apresentada na tabela 9.

Tabela 9: Qualidade da interface dente-restauração.

	grupo sem clorexidina		grupo com clorexidina	
	Freq	%	Freq	%
Selado	3	60	2	40
Parcialmente selado	2	40	3	60
Aberto	0	0	0	0
Total	5	100	5	100

6-DISCUSSÃO:

Dentre os problemas que afetam a cavidade bucal, a doença cárie ocupa, na escala de atenção da OMS, o primeiro lugar (PINTO, 2000). No seu tratamento, uma ótima alternativa tem sido as restaurações adesivas que, contemplando a filosofia da Odontologia de Mínima Intervenção, colaboram para a preservação da estrutura dental.

Evidências consideráveis têm sido acumuladas na literatura, de que a adesão criada entre dentina-resina não é tão durável como a desejada (TAY et al, 2002; HASHIMOTO et al, 2000). O mecanismo em potencial desta degradação é a permeabilidade da camada híbrida, suscetível à hidrólise por meio da dissolução do componente resinoso pela degradação das fibrilas colágenas (HASHIMOTO et al, 2003). Nestes casos, a atividade colagenolítica das metaloproteinases da matriz tem ação importante na degradação destas fibrilas (PASHLEY et al, 2004). Assim, estratégias que inibam sua ação, como o uso da clorexidina, são fundamentais na prevenção da degradação da interface dentina-resina (GENDRON et al, 1999; PASHLEY et al, 2004).

Neste contexto, o presente trabalho, *in vitro*, objetivou avaliar o efeito da clorexidina na qualidade da camada híbrida em dentes decíduos.

Para tentar obter dados mais próximos da realidade clínica, alguns cuidados metodológicos foram tomados: primeiramente, foram coletados somente dentes em fase final de rizólise, objetivando alcançar certo padrão na idade dentária entre os dois grupos avaliados. Este é um importante passo já que com o aumento da idade, ocorre um decréscimo no número e diâmetro dos túbulos dentinários devido ao processo de

mineralização contínua da dentina intratubular, o que interfere no grau de permeabilidade dentinária (PASHLEY et al, 1993).

Em segundo lugar, todos os dentes receberam preparos em classe I, visando evitar variações da estrutura dentinária quando outras superfícies, como a vestibular ou a lingual, são expostas (SCHIMITT e LEE, 2002).

É sabido que os diferentes procedimentos, utilizados para a preparação da cavidade, produzem diferentes *smear layers*. Conseqüentemente, o uso de lixas d'água ou disco de diamante para cortar a dentina cria superfícies diferentes da obtida em clínica e pode produzir quantidade irreal de *smear layer*. Este substrato alterado pode afetar os dados, produzindo resultados não comparáveis com a situação clínica (NOR et al, 1996). Para eliminar este viés e melhor simular a condição *in vivo*, o preparo dos dentes foi realizado com broca carbide sob constante irrigação com água.

De acordo com ANGKER et al (2003) as propriedades mecânicas da dentina próxima à JAD são semelhantes e comparáveis àquelas encontradas na parte média da dentina. Contrariamente, a dentina próxima à polpa apresenta propriedades completamente diferentes (ORCHARDSON e CADDEN, 2001). Assim, a profundidade das cavidades preparadas na presente investigação foi padronizada, com exposição da área média dentinária, de maneira que todos os dentes apresentassem propriedades mecânicas semelhantes e, conseqüentemente, força de adesão semelhante, já que esta característica é afetada pela profundidade do preparo.

Por fim, o tamanho amostral foi compatível com o sugerido por NOR et al (1996), TELLES et al (2001) e SCHIMITT e LEE (2002) e, portanto, adequado para o objetivo proposto. É importante salientar que foram examinados 5 pontos por dente, o que resultou em 25 regiões examinadas por grupo.

O perfeito selamento da interface dentina-adesivo é conseguido principalmente pela ausência de fendas interfaciais, já que este é um processo irreversível que pode levar à microinfiltração.

A análise destes defeitos demonstrou fendas tanto no grupo teste quanto no controle, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,46$) (tabelas 1 e 2).

As 5 áreas específicas para análise se localizaram da seguinte forma: 2 em áreas de ângulo do preparo e 3, em regiões adjacentes ao ângulo. Em algumas amostras foi observada, no ângulo do preparo, uma quantidade maior de adesivo, provavelmente devido ao excesso escoado pelas paredes axiais (figura 19). Desta forma, duas hipóteses foram pensadas: a primeira, que nestas áreas a camada híbrida originada seria mais fraca e, portanto, suscetível à formação de fendas; e, a segunda, que esta camada espessa de adesivo, sob a camada híbrida, aliviaria o stress entre o composto restaurador e o substrato dentinário rígido, eliminando a formação de fenda. KAADEN et al (2003) explicam que o módulo de elasticidade do adesivo é menor e age como uma camada elástica que absorve a contração de polimerização da resina composta. Para tentar confirmar estas diferenças, estes pontos foram analisados separadamente (ângulo do preparo, centro da parede pulpar), resultando em diferença não significativa ($p=1,0$). Portanto, neste trabalho, a espessura do adesivo na camada híbrida não influenciou na formação de fendas e, por isso, as outras análises foram feitas considerando todos os pontos em conjunto.

A profundidade média destes defeitos foi ligeiramente maior no grupo sem clorexidina (4,03 micrômetros) quando comparado ao grupo teste (3,87 micrômetros) (gráfico 1), embora a diferença não tenha sido significativa ($p=0,93$) (figuras 19-22).

Estes valores foram bem menores que aqueles reportados por TELLES et al (2001): 9,9 micrômetros para dentes decíduos, tratados com adesivo de passo único. A explicação pode

ser creditada à diferença nos agentes adesivos empregados. HOSOYA (2006) também encontrou fendas freqüentes no grupo de dentes decíduos tratados com adesivo Single Bond. Sugere que isto pode refletir em uma menor adesão da resina à dentina, representada pela formação de fendas durante os procedimentos de fratura.

A localização das fendas ocorreu, em sua maioria, entre adesivo-dentina tanto no grupo teste quanto no controle (tabelas 3 e 4). Nestas regiões, os túbulos dentinários apresentaram-se vazios e, portanto, sem formação de *tags* em resina (figuras 19-22). Pode-se pensar que a hibridização nestas áreas não foi satisfatória, ou seja, o processo de condicionamento ácido provocou desmineralização da dentina e o adesivo não foi capaz de penetrar em toda a região atacada, incluindo aí os orifícios dos túbulos dentinários. Desta forma, a ligação foi fraca e suscetível à fratura por meio de qualquer mecanismo que provocasse stress na interface, como foi o caso dos procedimentos de fratura ou o vácuo do microscópio eletrônico de varredura.

Nestes casos, houve exposição de fibrilas colágenas suscetíveis à degradação pelas metaloproteinases da matriz, podendo levar à ocorrência da nanoinfiltração (TAY et al, 2002). Para o grupo teste, espera-se que este defeito não ocorra pela inativação destas enzimas pela clorexidina. Além disso, este agente antimicrobiano também seria eficaz na inibição da auto-ativação delas, que costuma ocorrer com o passar do tempo (NISHITANI et al, 2006).

Testes de microtração com este mesmo adesivo demonstraram fratura entre adesivo e dentina como o modo de falência mais freqüente em dentes decíduos (BURROW et al 2002).

A análise do conteúdo dos túbulos dentinários foi importante para acrescentar informações sobre as características morfológicas da interface dentina-resina,

proporcionando mais dados sobre a hibridização e a habilidade de penetração do sistema adesivo.

De acordo com TAY et al (2004), o perfeito selamento da interface dentina-resina pode ser estabelecido pelo completo preenchimento do adesivo nos túbulos dentinários e na matriz de colágeno desmineralizada.

A observação do conteúdo dos túbulos dentinários demonstrou que a maioria, 90,9%, dos pontos do grupo sem clorexidina apresentou-se parcialmente preenchida contra 87% do grupo teste (tabela 5) (figuras 23-28), mas a diferença não foi significativa ($p=0,56$).

Alguns autores sugerem que a clorexidina, quando utilizada após condicionamento ácido, pode deixar debris na superfície dentinária impedindo o escoamento do adesivo em toda a região dos túbulos desmineralizados (CASTRO et al, 2003). Este fato, porém, não foi comprovado pela presente pesquisa, já que o conteúdo dos túbulos não diferiu significativamente nos 2 grupos examinados. De modo semelhante, OWENS et al (2003) também não encontraram diferenças entre a superfície que foi condicionada por ácido e aquela que sofreu aplicação de clorexidina após este procedimento.

O outro critério utilizado para avaliar o selamento foi a condição da camada híbrida. Esta camada, representada por uma mistura de fibras colágenas e monômeros resinosos, é fator determinante para o sucesso da restauração. Por isto, sua presença foi avaliada. O grupo teste apresentou um número maior de áreas com camada híbrida visível (68%) quando comparado ao controle (52%).

Além disso, nas microscopias avaliadas, foi notado que o grupo teste apresentou camada híbrida com melhor definição (figuras 30, 31, 32 e 35) que os controles (figuras 33 e 34). Talvez a clorexidina possa ter sido um auxiliar na limpeza da cavidade, diminuindo a tensão superficial sobre a área, permitindo um melhor molhamento e, conseqüentemente,

contribuindo para a melhor integração do adesivo com as fibrilas colágenas o que, por sua vez, resultou em camada híbrida de melhor qualidade. PILO et al (2001) consideram este agente antimicrobiano como um agente de molhamento que diminui a sensibilidade da técnica restauradora. A clorexidina apresenta alta afinidade com estruturas dentárias que é aumentada pelo condicionamento ácido, o que, teoricamente, pode aumentar a força de adesão do adesivo na dentina (SAY et al 2004).

Semelhante às fendas, a camada híbrida foi observada separando-se os pontos de ângulo do preparo dos pontos adjacentes, pois como o adesivo fica mais espesso nas áreas de ângulo, especulou-se que a camada híbrida poderia estar alterada. Como a diferença não foi significativa, ($p=0,7$) os dados foram apresentados em conjunto (tabelas 6 e 7).

A espessura da camada híbrida demonstrou um grupo teste com valores ligeiramente maiores (3,33 micrômetros) que os controles (3,28 micrômetros), mas a diferença também não foi significativa ($p=0,94$) (tabela 8). A diferença nos números absolutos pode ter ocorrido porque no grupo teste as camadas híbridas foram melhor delimitadas, e, daí, facilitada a medição. Estes valores foram um pouco mais altos que os reportados por TELLES et al (2001) 2,5 micrômetros, com adesivo de 1 passo. OLMEZ et al (1998), entretanto, encontraram uma espessura média de 8,6 micrômetros com adesivo de 3 passos. A diferença pode ser creditada à composição diferente dos adesivos e à diferenças na metodologia de cada pesquisa.

Por fim, a análise qualitativa da interface dente-restauração (tabela 9), revelou uma proporção maior de perfeito selamento para o grupo controle (3 dentes selados contra 2 do grupo teste).

A comparação dos resultados com dados da literatura foi dificultada pela limitação de artigos sobre o assunto. Somente três trabalhos realizados com dentes decíduos foram

encontrados e, ainda assim, nenhum deles observou a qualidade da camada híbrida por meio de microscopia eletrônica de varredura: TULUNOGLU et al (1998) encontraram um maior grau de infiltração marginal, quando este agente antimicrobiano foi aplicado após o condicionamento ácido. Este trabalho, porém, utilizou adesivos dentinários de 3 passos, que possuem diferentes composições e, interferem na interação dentina-adesivo, por ser material específico. Para VIEIRA et al (2003) a força de adesão foi significativamente menor, quando a clorexidina foi utilizada antes do condicionamento ácido. Recentemente, HEBLING et al (2005), por meio de microscopia de transmissão, detectaram uma camada híbrida anormal, com progressiva desintegração da trama de fibrilas colágenas no grupo não tratado com clorexidina após o condicionamento ácido. Concluíram que o uso deste agente antimicrobiano como inibidor das MMPs pôde evitar a degradação *in vivo* da camada híbrida.

Apesar das diferenças encontradas nas concentrações de alguns íons, diferenças nas propriedades mecânicas e diferenças na anatomia dos túbulos dentinários entre dentes decíduos e permanentes, atualmente, a literatura confirma que não há diferença na adesão entre estas duas dentições quando adesivos de últimas gerações são utilizados (TELLES et al, 2001; SCHIMITT e LEE, 2002). Desta forma, trabalhos realizados com dentes permanentes também foram analisados: testes de microtração não demonstraram ser significantes quando a clorexidina foi aplicada após o condicionamento ácido (CASTRO et al, 2003, SAY et al, 2004, KOMORI et al, 2006). Contrariamente, PILO et al (2001) reportaram uma maior resistência ao cisalhamento para o grupo teste. Já para os testes de microinfiltração, o grupo com clorexidina apresentou melhores resultados (OWENS et al, 2003). Portanto, os resultados destas investigações reforçam o achado de que a clorexidina não interfere ou interfere positivamente no processo de adesão dentinária.

Conforme já discutido, as MMPs presentes na dentina mineralizada, podem ser desnaturadas pelo condicionamento ácido e reativadas pelo tratamento com adesivos dentinários. Para o adesivo utilizado na presente pesquisa, MAZZONI et al (2006) observaram uma reativação da atividade proteolítica em cerca de 126%, o que contribui significativamente com a degradação das fibrilas colágenas.

De acordo com a literatura, as metaloproteinases da matriz envolvidas neste processo, podem ser a MMP-2 e MMP-9, presentes tanto na dentina desmineralizada quanto na mineralizada com potencial de degradar a matriz orgânica. Na dentina mineralizada estão presentes em maior quantidade e, em sua maioria estão na forma ativa. Já na dentina desmineralizada encontram-se em menor quantidade e na forma inativa (MARTIN DE LAS HERAS et al, 2000; VAN STRIJP et al, 2003). Conforme exposto, porém, as enzimas desta dentina desmineralizada podem ser reativadas pelo adesivo (MAZZONI et al, 2006).

Os agentes de limpeza de cavidade baseados em clorexidina foram inicialmente desenvolvidos para desinfetar as paredes da cavidade preparada antes da colocação da restauração. Estes agentes foram formulados para reduzir e/ou eliminar as espécies bacterianas presentes na cavidade preparada (OWENS et al, 2003). Atualmente, tais agentes podem ser também utilizados como inibidores das metaloproteinases da matriz.

Com os efeitos antiproteolíticos já conhecidos da clorexidina e com a capacidade inibidora das MMPs já comprovada na literatura, a aplicação desta substância aumentaria a sobrevida da restauração. Baseados nos resultados deste estudo, não houve diferença na camada híbrida quando este agente foi aplicado. No grupo teste houve mais áreas de visível camada híbrida e as imagens demonstraram características micromorfológicas melhor definidas.

Portanto, conforme expõem PASHLEY et al (2004), a técnica com aplicação da clorexidina após condicionamento ácido pode ter méritos em potencial na prevenção da degradação das fibras colágenas na camada híbrida.

Para uma avaliação inicial da ação de determinada substância, dentes hígidos são modelos ideais, já que evitam a influência dos diferentes estágios de progressão da lesão cariada. No entanto, de posse destes resultados, é necessário testar a clorexidina em dentes cariados. Outro ponto interessante para novas pesquisas seria verificar as características da camada híbrida de dentes decíduos tratados ou não com clorexidina após algum período de armazenamento em água.

Por fim, os resultados demonstraram que o uso do protocolo clínico-restaurador com aplicação da clorexidina não interfere na qualidade da camada híbrida podendo ser indicado para aumentar a sobrevida das restaurações, evitar que a estrutura dentária sofra novos desgastes e preservar a integridade do paciente infantil.

Por fim, os resultados demonstraram que o uso do protocolo clínico-restaurador com aplicação da clorexidina não interfere na qualidade da camada híbrida. Espera-se que a sua indicação aumente a sobrevida das restaurações e evite que a estrutura dentária sofra novos desgastes, preservando a integridade do paciente infantil.

7-CONCLUSÃO:

Considerando-se as limitações deste estudo *in vitro*, pode-se concluir, por meio da microscopia eletrônica de varredura que, a solução de clorexidina a 2% aplicada após o condicionamento ácido na dentina normal de dentes decíduos, não influenciou a qualidade da camada híbrida.

8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ANGKER, L; SWAIN, M. V.; KILPATRICK N. Micro-mechanical characterization of the properties of primary tooth dentine. **Journal of Dentistry**, Inglaterra, v. 31, p. 261-267, maio. 2003.

BORDIN-AYKROYD, S.; SEFTON, J.; DAVIES, E. H. In vitro bond strengths of three current dentin adhesives to primary and permanent teeth. **Dental Materials**, Inglaterra, v. 8, n. 2, p. 74-78, fev. 1992.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais- Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

BURROW, M. F.; NOPNAKEEPOONG, U.; PHRUKKANON, S. A comparison of microtensile bond strengths of several dentin bonding systems to primary and permanent dentin. **Dental Materials**, Inglaterra, v. 18, n. 3, p. 239-245, maio. 2002.

CASTRO, F. L. A.; et al. Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. **The Journal of Adhesive Dentistry**, New Malden, v. 5, p. 129-138, verão. 2003.

EISENMANN, D. R. Enamel structure. In: TEN CATE, A. R. **Oral histology development, structure, and function**. Mosby, 2ND edition. 1985. P. 198-217

ELIADES, G.; VOUGIOUKLAKIS, G.; PALAGHIAS, G. Effect of dentin primers on the morphology, molecular composition and collagen conformation of acid-demineralized dentin in situ. **Dental Materials**, Inglaterra, v. 15, p. 310-317, set-out. 1999.

GENDRON, R. et al. In of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, Estados Unidos, v. 6, n. 3, p. 437-439, mar. 1999.

GERMAN, C. C. et al. Shear bond strength of a self-etching adhesive in primary and permanent dentition. **American Journal of Dentistry**, Estados Unidos, v. 18, n. 5, p. 331-334, set-out. 2005.

HASHIMOTO, M. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. **Journal of Dental Research**, Estados Unidos, v. 79, n. 6, p. 1385-1391, jun. 2000.

HASHIMOTO, M. et al. In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. **Biomaterials**, Inglaterra, v. 24, n. 21, p. 3795-3803, set. 2003.

- HEIKINHEIMO, K.; SALO, T. Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth. **Journal of Dental Research**, Estados Unidos, v. 74, n. 5, 1226-1234, mai. 1995.
- HEBLING, J. et al. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. **Journal of Dental Research**, v. 84, n. 8, p. 741-746, ago. 2005.
- HIRAYAMA, A. Experimental analytical electron microscopic studies on the quantitative analysis of elemental concentrations in biological thin specimens and its application to dental science. **Shikwa Gakuho**, Japão, v. 90, n. 8, p. 1019-1036, ago. 1990.
- HOSOYA, Y. Hardness and elasticity of bonded carious and sound primary tooth dentin. **Journal of Dentistry**, Inglaterra, v. 34, p. 164-171, fev. 2006.
- ISHIGURO, K. et al. Identification of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in human teeth and its distribution in cementum and dentine. **Archives of Oral Biology**, Inglaterra, v. 39, n. 4, p. 345-349, abr. 1994.
- INOUE, S. et al. Adhesion mechanism of self-etching adhesives. In: Proceedings of conference on Advanced Adhesive Dentistry. Third International Kuraray Symposium. December 3-4, 1999, Granada, Spain. Apud TAY FR, PASHLEY DH, YOSHIYAMA M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. **Journal of Dental Research**, Estados Unidos, v. 81, n. 7, p. 472-476, jul. 2002.
- KANCA, J. Resin Bonding to wet substrate. I. Bonding to dentin. **Quintessence International**, Alemanha, v. 23, n. 1, p. 39-41, jan. 1992.
- KALLA, I. H.; GARCIA-GODOY, F. Bond strength and interfacial micromorphology of four adhesive systems in primary and permanent molars. **ASDC Journal of Dentistry for Children**, Estados Unidos, v. 65, n. 3, p.169-176, mai-jun. 1998.
- KOMORI, P. C. P.; et al. **Brazilian Oral Research**, Brasil, v. 20, suppl. P. 292 (Pc 206). 2006.
- KOUTSI, V. et al. The effect of dentin depth on the permeability and ultrastructure of primary molars. **Pediatric Dentistry**, Estados Unidos, v. 16, n. 1, p, 29-35, jan-fev. 1994.
- LAKOMAA, E.; RYTOMAA, I. Mineral composition of enamel and dentin of primary and permanent teeth in Finland. **Scandinavian Journal of Dental Research**, Dinamarca, v. 85, n. 2, p. 89-95, mar-abr. 1977.
- MARTIN DE LAS HERAS, S.; VALENZUELA, A.; OVERALL, C. M. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. **Archives of Oral Biology**, Inglaterra, v. 45, n. 9, p. 757-765, set. 2000.
- MARSHAL JR, G. W.; et al. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. **Journal of Dentistry**, Inglaterra, v. 25, n. 6, p. 441-458, jun. 1997.

- MAZZONI, A. et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. **Biomaterials**, Inglaterra, v. 27, n. 25, p. 4470-4476, set. 2006.
- MICKENAUTSCH S. An introduction to minimum intervention dentistry. **Singapore Dental Journal**, Singapura, v. 27, n. 1, p. 1-6, jan. 2005.
- NAKABAYASHI, N.; SAIMI, Y. Bonding to intact dentin. **Journal of Dental Research**, Estados Unidos, v. 75, n. 9, p. 1706-1715, set. 1986.
- NAKABAYASHI, N.; KOJIMA, K.; MASUHARA, E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers tooth substrates. **Journal of Biomedical Materials Research**, Estados Unidos, v. 16, n. 3, p. 265-273, mai. 1982.
- NAKABAYASHI, N.; TAKARADA, K. Effect of HEMA on bonding to dentin. **Dental Materials**, Inglaterra, v. 8, n. 6, p. 125-130, mar-abr. 1992.
- NISHITANI, Y. et al. Activation of gelatinolytic-collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. **European Journal of Oral Science**, Dinamarca, v. 114, n. 2, p. 160-166, abr. 2006.
- NOR, J. E. et al. Dentin bonding: SEM comparison of the resin-dentin interface in primary and permanent teeth. **Journal of Dental Research**, Estados Unidos, v. 75, n. 6, p. 1396-1403, jun. 1996.
- OLMEZ, A. et al. Comparison of the resin-dentin interface in primary and permanent teeth. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, Estados Unidos, v. 22, n. 4, p.293-298, verão. 1998.
- ORCHARDSON, R.; CADDEN, S. W. An update on the physiology of the dentine-pulp complex. **Dental Update**, England, v. 28, p. 200-209, May. 2001.
- OWENS, B. M.; LIM, D. Y.; ARHEART, K. L. The effect of antimicrobial pre-treatments on the performance of resin composite restorations. **Operative Dentistry**, Estados Unidos, v. 28, n. 6, dez, p. 716-722. 2003.
- PALOSAARI, H. et al. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. **European Journal of Oral Science**, Dinamarca, v. 111, n. 2, p. 117-127, abr. 2003.
- PASHLEY, D. H. Clinical considerations of microleakage. **Journal of Endodontics**, Estados Unidos, v. 16, n. 2, p. 70-77, mar. 1990.
- PASHLEY, D. H. et al. Dentin, a dynamic bonding substrate: the effect of dentin variable on resin adhesion. **Quintessence International**, Alemanha, v. 12, n. 4, p. 24-43, abr. 1996.

PASHLEY, D. H. et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. **Journal of Dental Research**, Estados Unidos, v. 83, n. 3, p. 216-21, mar. 2004.

PASHLEY, D. H. et al. Permeability of dentin to adhesive agents. **Quintessence International**, Alemanha, v. 24, n. 9, p. 618-631, set. 1993.

PILO, R. et al. Effect of preliminary treatment of the dentin surface on the shear bond strength of resin composite to dentin. **Operative Dentistry**, Estados Unidos, v. 26, n. 6, p. 569-575, dez. 2001.

SAY, E. C. et al. In vitro effect of cavity disinfectants on the bond strength of dentin bonding systems. **Quintessence International**, Alemanha, v. 35, n. 1, p. 56-60, jan. 2004.

SCHMITT, D. C.; LEE, J. Microleakage of adhesive resin systems in the primary and permanent dentitions. **Pediatric Dentistry**, Estados Unidos, v. 24, p. 587-593. 2002.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17, p. 463-516. apud PALOSAARI, H. et al. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. **European Journal of Oral Science**, Dinamarca, v. 111, n. 2, p. 117-127, abr. 2003.

SOARES, F. Z. et al. Microtensile bond strength of different adhesive systems to primary and permanent dentin. **Pediatric Dentistry**, Estados Unidos, v. 27, n. 6, p. 457-462, nov-dez. 2005.

SULKALA, M. et al. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. **Journal of Dental Research**, Estados Unidos, v. 81, n. 9, p. 603-607, set. 2002.

SULKALA, M. et al. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. **Journal of Dental Research**, Estados Unidos, v. 80, n. 6, p. 1545-1549, jun. 2001.

TAY, F. R.; PASHLEY, D. H.; YOSHIYAMA, M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. **Journal of Dental Research**, Estados Unidos, v. 81, n. 7, p. 472-476, jul. 2002.

TAY, F. R. et al. Single-bottle adhesives behave as permeable membranes after polymerization. I. In vivo evidence. **Journal of Dentistry**, Inglaterra, v. 32, p. 611-621, ago. 2004.

TAY, F. R. et al. Resin permeation into acid-conditioned, moist, and dry dentin: a paradigm using water-free adhesive primers. **Journal of Dental Research**, Estados Unidos, v. 75, n. 4, p. 1034-1044, abr. 1996.

TELLES, P. D. S.; MACHADO, M. A. A. M.; NOR, J. E. SEM study of a self-etching primer adhesive system used for dentin bonding in primary and permanent teeth. **Pediatric Dentistry**, Estados Unidos, v. 23, n. 4, p. 315-320, jul-ago. 2001.

TEN CATE, A. R. Dentinogenesis. In: TEN CATE A R. **Oral histology development, structure, and function**. Mosby, 2ND edition. 1985. P. 129-145.

TJADERHANE, L. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. **Journal of Dental Research**, Estados Unidos, v. 77, n. 8, p. 1622-1629, ago. 1998.

TULUNOGLU, O. et al. The effect of cavity disinfectants on microleakage in dentin bonding systems. **The Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, Estados Unidos, v. 22, n. 4, p. 299-305, verão. 1998.

VIEIRA, R. S.; SILVA JUNIOR, I. A. Bond strength to primary tooth dentin following disinfection with a chlorexidine solution: an vitro study. **Pediatric Dentistry**, Estados Unidos, v. 25, n. 1, p. 49-52, jan-fev. 2003.

YIU, C. K. Y. et al. Effect of resin hydrophilicity and water storage on resin strength. **Biomaterials**, Inglaterra, v. 25, n. 26, p. 5789-5796, nov. 2004.

WANG, Y.; SPENCER, P. Hybridization efficiency of the adhesive-dentin interface with wet bonding. **Journal of Dental Research**, Estados Unidos, v. 82, n. 2, p. 141-145, fev. 2003.

ANEXOS:

ANEXO A: Ofício CEP-UCB



Universidade Católica de Brasília - UCB
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Brasília, 24 de junho de 2004

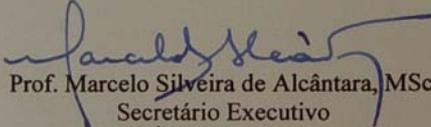
Ofício CEP/UCB N° 027/2004

Prezada senhora,

É com satisfação que informamos formalmente a V. Sa. que o projeto “Avaliação do comportamento da clorexedina na qualidade da camada híbrida em dentes decíduos” foi aprovado por este CEP em sua 28ª Reunião, realizada em 18 de junho do corrente ano, podendo, portanto, ter a sua fase de coleta de dados iniciada. Informamos ainda que no prazo máximo de 1 (um) ano a contar desta data deverá ser enviado a este CEP um relatório sucinto sobre o andamento da presente pesquisa.

Esperando poder servi-lo em outra ocasião, apresentamos nossos votos de estima e consideração.

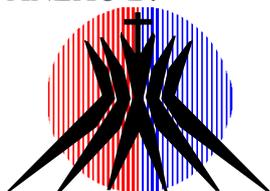
Atenciosamente,



Prof. Marcelo Silveira de Alcântara, MSc.
Secretário Executivo
Comitê de Ética em Pesquisa - UCB

Ilma Sra.
Tatiana Degani Paes Leme Azevedo
Brasília – DF
NESTA

ANEXO B:



Universidade Católica de Brasília
 Curso de Odontologia
 EPCT Q. S. 7, lote 1 – Águas Claras – CEP 72030-170
 Taguatinga - DF
 (0XX61) 356-9000 – FAX (0XX61) 356-1800

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: “**Avaliação do comportamento da clorexedina na qualidade da camada híbrida em dentes decíduos**”

Pesquisadora responsável: Tatiana Degani Paes Leme Azevedo

Eu, _____ portador do
 RG _____, responsável pelo menor _____

dão _____ dentes para a pesquisa “**Avaliação do comportamento da clorexedina na qualidade da camada híbrida em dentes decíduos**”. Estou ciente de que estes dentes serão utilizados para se aprofundar o conhecimento no mecanismo de adesão das restaurações nos dentes decíduos (de leite), objetivando-se obter restaurações mais duradouras.

 Data:/...../.....

Assinatura do paciente

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

 Data:/...../.....

Assinatura do responsável pelo estudo

ANEXO C:

FICHA PARA AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS.

Dente: _____

Ponto A:

Aumento de 1500:

Presença de fenda:

() sim () não

Se a resposta for afirmativa:

Profundidade da fenda: _____

Túbulos dentinários: _____

Aumento de 4000:

Camada híbrida visível:

() sim () não

Se a resposta for afirmativa:

Espessura medida: _____

Ponto B:

Aumento de 1500:

Presença de fenda:

() sim () não

Se a resposta for afirmativa:

Profundidade da fenda: _____

Túbulos dentinários: _____

Aumento de 4000:

Camada híbrida visível:

() sim () não

Se a resposta for afirmativa:

Espessura medida: _____

Ponto C:

Aumento de 1500:

Presença de fenda:

() sim () não

Se a resposta for afirmativa:

Profundidade da fenda: _____

Túbulos dentinários: _____

Aumento de 4000:

Camada híbrida visível:

() sim () não

Se a resposta for afirmativa:

Espessura medida: _____

Ponto D:**Aumento de 1500:**

Presença de fenda:

 sim não

Se a resposta for afirmativa:

Profundidade da fenda: _____

Túbulos dentinários: _____

Aumento de 4000:

Camada híbrida visível:

 sim não

Se a resposta for afirmativa:

Espessura medida: _____

Ponto E:**Aumento de 1500:**

Presença de fenda:

 sim não

Se a resposta for afirmativa:

Profundidade da fenda: _____

Túbulos dentinários: _____

Aumento de 4000:

Camada híbrida visível:

 sim não

Se a resposta for afirmativa:

Espessura medida: _____