**A inovadora estratégia de remoção magnética de metaloproteinases na adesão e degradação dentinária**

Adyson Herbert Alves1, Walter Zenobi2, Karen Evelyn Moura Cordeiro3,Davino Machado Andrade Neto 4 , Pierre Basilio Almeida Fechine 5 , Victor Pinheiro Feitosa 6

1 Faculdade Paulo Picanço-FACPP- adyson.herbert@facpp.edu.br

2 Universidade Federal do Ceará-UFCE

3 Faculdade Paulo Picanço- FACPP

4 Universidade Federal do Ceará-UFCE

5 Universidade Federal do Ceará-UFCE

6 Faculdade Paulo Picanço-FACPP

Avaliar um novo coletor magnético (MAG) de metaloproteinases (MMPs) na remoção das MMPs, durabilidade da adesão e degradação do colágeno dentinário. O MAG constituído de nanoferrita ligada ao batimastat foi incorporado em água a 2% (MAG-2%) ou 20% (MAG-20%). Água destilada e digluconato de clorexidina 2% (CHX) foram usados como controle negativo e positivo respectivamente. Molares extraídos (n=6) foram cortados e restaurados com adesivo Prime&Bond 2.1 (Dentsply) após aplicação de ácido fosfórico 37%. Em MAG-2% e MAG-20%, a suspensão foi aplicada na dentina condicionada e as MMPs removidas com imã. Os espécimes foram cortados em palitos resina-dentina avaliados por teste de resistência de união à microtração (µTBS) e nanoinfiltração após 24h ou 1 ano em água destilada. Fatias de dentina foram aplicadas com MAG e avaliadas quanto à presença de MMPs por MEV/EDS e Microscopia Confocal (zimografia *in situ*). O ensaio de hidroxiprolina foi realizado nas soluções de armazenagem de 1 ano em espectroscopia UV-Vis. Os dados foram avaliados estatisticamente por ANOVA e teste de Tukey (p<0,05). MAG-2% foi o único tratamento com adesão estável após 1 ano e revelou degradação de colágeno estatisticamente menor que o Controle negativo (p=0,002) e MAG-20% (p=0,005). As MMPs na dentina foram removidas com MAG-2% e MAG-20%, confirmado por EDS e Confocal.A nova estratégia de remoção magnética de MMPs na concentração de 2% tem ação efetiva na remoção de MMPs, melhorando a durabilidade da adesão e diminuindo degradação de colágeno.

**Palavras-chave:** Metaloproteinases. Dentina. Adesão

**Área temática:** Inovações em clínica e em cirurgia

1. **Introdução**

O sistema adesivo dentário convencional utiliza 30 a 40% de ácido fosfórico para desmineralizar a dentina (5 a 8 µm), expondo uma malha de colágeno para a infiltração de monômeros hidrofílicos que serão polimerizados a fim de garantir a adesão de restaurações de compósitos, através da formação de uma camada híbrida (BRACKET et al., 2009). Essa matriz de dentina exposta é composta por colágeno tipo I (90%) e proteínas não colagenosas circundando a estrutura tridimensional do colágeno.  Dentre essas, destacam-se as metaloproteinases da matriz (MMPs) (MAZZONI et al., 2015) que são enzimas produzidas pelos odontoblastos e incorporadas à matriz dentinária mineralizada durante o desenvolvimento do dente onde permanecem em sua forma inativa após a calcificação da dentina (ZHOU et al., 2011).

Entretanto, essas enzimas podem ser ativadas durante o processo carioso e pela técnica de condicionamento ácido. Elas conseguem degradar hidroliticamente, o colágeno desprotegido (presente pela discrepância entre a profundidade da desmineralização causada pelo ácido fosfórico e a infiltração deficiente da resina adesiva) (TJÄDERHANE et al., 1998), mas também o infiltrado pelos monômeros resinosos na camada híbrida, agindo coletivamente com outras endopeptidades, catepsinas de cisteína (NASCIMENTO et al., 2011).

Mesmo que cada estratégia tenha seus méritos, ainda existem muitas limitações e, até hoje, não existe nada que tenha sido relatado tentando remover (extrair) in situ essas enzimas da matriz orgânica da dentina, o que provavelmente poderia deter definitivamente a questão da degradação enzimática do colágeno das ligações dentinárias.

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a efetividade de um coletor magnético de metaloproteinases que foi sintetizado com inibidorBB94ancorado em nanopartículas magnéticas de ferrita, tanto na adesão de um sistema adesivo convencional e degradação dentinária (*In vitro*), quanto também na remoção das MMPs no colágeno dentinário.

**2 Metodologia**

As nanopartículas magnéticas, foram ligadas ao BB94, através de uma funcionalização da superfície das nanopartículas. As suspensões com as nanopartículas utilizadas foram de 2 e 20%. Assim os grupos foram: Grupo controle negativo, sem nenhum pré-tratamento; grupo com pré-tratamento de clorexidina e grupos com pré-tratamento com o coletor magnético a 2 e a 20%. O sistema adesivo utilizado foi o Prime&Bond 2.1 da Dentsply que é um adesivo convencional de 2 passos e a resina composta utilizada foi a Opallis da FGM. Os dentes molares extraídos foram cortados, seccionados a 2 mm acima da junção amelocementária e 3 mm abaixo a fim de obter uma superfície plana dentinária coronal média de cada dente. As amostras foram submetidas à abrasão úmida usando um papel de carboneto de silício para criar uma camada de esfregaço padronizada e depois divididas aleatoriamente para os quatro grupos (n=6). Então, a dentina foi condicionada com ácido fosfórico a 37% por 15 segundos e, após a lavagem do ácido, por 30 segundos, foi realizado um pré-tratamento com o coletor magnético por 60 s, ou com a clorexidina, e nos grupos com esse coletor magnético, foi aplicado um íman a uma distância de 1 mm do dente, por 60s, para remover essas nanopartículas. Depois disso, foi feita a lavagem do coletor magnético por 30s e aplicado o adesivo convencional Prime Bond 2.1 de acordo com as orientações do fabricante que foi fotopolimerizado, com a unidade LED Valo da (Ultradent), por 40 s. Posteriormente construiu-se a restauração com 3 incrementos de 2 mm com resina composta Opallis da (FGM) que foi fotopolimerizada por 40s. Os dentes restaurados foram cortados em palitos de 1 mm2, armazenados em água destilada e levados com 24h (imediato) e 1 ano (envelhecido) para o teste de microtração, e após 1 ano para o de nanoinfiltração.  No teste de nanoinfiltração seis palitos dentina/resina de cada grupo foram levados para avaliação em Microscópio Eletrônico de Varredura. O teste da hidroxiprolina foi realizado com 1 ano e com o auxílio do espectrofotômetro UV-visível. As nanopartículas magnéticas foram levadas ao espectrofotômetro FTIR para avaliar a funcionalização do inibidor BB94 na superfície da nanopartícula. Realizou-se a espectroscopia EDS para detectar a quantidade de ferro da amostra e a zimografia in situ para analisar a remoção das MMPs da dentina. Foi realizada também a análise estatística e os resultados foram avaliados com Anova e teste de Tukey (p < 0,05).

**3 Resultados e Discussão**

Nos resultados foi observado que: Pelo FTIR foi comprovada a ligação do bb94 nas nanopartículas de ferrita; o teste de resistência de união por microtração demonstrou não haver queda na resistência de união (após o tratamento com MAG e íman) sendo que o grupo MAG 2% foi o único que apresentou adesão estável após 1 ano; as MMPs na dentina foram removidas com MAG 2% e MAG 20% sendo confirmado por EDS e zimografia in situ ou confocal; pelo EDS observou-se que nas amostras de dentina tratadas com MAG 20% a quantidade de ferro saiu de 0,2% (mostrando que tinha MMPs) e após o íman caiu para 0,0% mostrando que as MMPs foram removidas; a zimografia in situ mostrou a presença das MMPs no grupo controle negativo e também a ausência das MMPs nos grupos magnéticos; pelo teste da hidroxiprolina observou-se que o grupo MAG 2% apresentou uma degradação de colágeno estatisticamente menor que o controle negativo e MAG 20%; pelo teste da Nanoinfiltração após 1 ano observou-se que o grupo controle negativo apresentou maior infiltração de prata e GAP.

A inibição dessas enzimas colagenolíticas endógenas de dentina não demonstra resultados clínicos relevantes. Por exemplo, um estudo clínico de longo prazo (3 anos) mostrou que, o uso de digluconato de clorexidina a 2% à dentina condicionada com ácido fosfórico à 37%, não diminuiu a sensibilidade pós-operatória, descoloração marginal, integridade marginal e incidência de cárie secundária. Assim sendo, a adição desse passo operacional, prévio à aplicação do adesivo, não melhora a durabilidade clínica das restaurações adesivas (SARTORI et al., 2013).

 É essencial compreender os processos subjacentes à degradação da matriz dentinária, a fim de desenvolver protocolos clínicos ideais e garantir a longevidade das restaurações dentárias (MAZZONI et al., 2018). Assim, a inibição de enzimas colagenolíticas endógenas de dentina não demonstra resultados clínicos relevantes, já que as enzimas permanecem na área desprotegida e com a reativação, a degradação se inicia (COLLARES, 2013). Dessa forma, o tratamento com inibidores das MMPs (BRESCHI et al., 2010) e outras estratégias terapêuticas de reforço do colágeno são reversíveis (COLLARES et al., 2013; BETANCOURT; BALDION; CASTELLANOS, 2019), assim, apenas retardando o processo de degradação e permitindo que as MMPs atuem após alguns anos.

Embora haja muitos obstáculos a serem superados no campo da odontologia adesiva, progressos impressionantes foram alcançados até o momento, e a grande quantidade de pesquisas disponíveis sobre o tema é um indicador da importância desse assunto e dos grandes esforços dos pesquisadores e empresas de material dentário para alcançar um novo nível de qualidade e longevidade das ligações resina-dentina (BRESCHI, L. et al., 2018). Portanto, é necessário continuar com a procura de novas substâncias e técnicas que possam ser usadas em um protocolo clínico (BETANCOURT; BALDION; CASTELLANOS, 2019) como por exemplo, através da técnica inovadora de remoção magnética de metaloproteinases.

**4 Conclusão**

Diante disso, pode-se concluir que a nova estratégia de remoção magnética de MMPs na concentração de 2% tem ação efetiva na remoção das MMPs, melhorando a durabilidade da adesão e diminuindo degradação de colágeno.

**Referências**

BETANCOURT D. E.; BALDION P. A.; CASTELLANOS, J. E. Resin-Dentin Bonding Interface: Mechanisms of Degradation and Strategies for Stabilization of the Hybrid Layer. **International Journal of Biomaterials**, 2019 Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ijbm/2019/5268342/>. Acesso em 24 jul.2020.

BRESCHI, L.. et al. Use of a specific MMP inhibitor (Galardin) for preservation of hybrid layer. **Dental Mater**. v. 26, n. 6, p. 1–16, 2010.

BRESCHI, L. et al. Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications**. Dent Mater**. v. 34, n.1, p. 78-96, 2018.

BRACKETT M.G., TAY F.R., BRACKETT W.W., DIB A., DIPP F.A., MAI S., et al. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. **Oper Dent**. v. 34, n.4, p. 379-83, 2009.

COLLARES F.M., RODRIGUES S.B., LEITUNE V.C., CELESTE R.K., BORBA DE ARAÚJO F., SAMUEL S.M. Chlorhexidine application in adhesive procedures: a meta-regression analysis. **J Adhes Dent** v. 15, n. 1, p.11-8, 2013.

MAZZONI, A. et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability**.** [**J Dent Res.**](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25535202) v.94, n. 2, p. 241-51, 2015.

SARTORI, N. et al. Influence of chlorhexidine digluconate on the clinical performance of adhesive restorations: A 3-year follow-up. **Journal of Dentistry**. v. 41, p. 1188- 1195, 2013.

ZHOU J., TAN J., YANG X., XU X., LI D., CHEN L. MMP-inhibitory effect of chlorhexidine applied in a self-etching adhesive. **J Adhes Dent.** v. 13, n. 2, p. :111-5, 2011.

TJÄDERHANE L., LARJAVA H., SORSA T., UITTO V.J., LARMAS M., SALO T. The activation and function of host matrixmetalloproteinases in dentin matrix breakdown in carieslesions. **J Dent Res.** v. 77, n.8, p. 1622–9, 1998.

NASCIMENTO, F. D. et al. Cysteine Cathepsins in Human Carious Dentin. **Journal of Dental Research**. v. 90, n. 4, p. 506–511, 19, 2011.