

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

LIDIANE DE PAULA MOURA CABRAL

**O PAPEL DA CLOREXIDINA NA INIBIÇÃO DAS
METALOPROTEINASES – REVISÃO DE
LITERATURA**

BAURU

2013

LIDIANE DE PAULA MOURA CABRAL

**O PAPEL DA CLOREXIDINA NA INIBIÇÃO DAS
METALOPROTEINASES – REVISÃO DE
LITERATURA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção para o título de Cirurgião Dentista, sob a orientação da Prof. Ms. Débora Barrozo Legramandi Milreu.

BAURU

2013

C1172p Cabral, Lidiane de Paula Moura

O papel da clorexidina na inibição das metaloproteinases: revisão de literatura / Lidiane de Paula Moura Cabral -- 2013.
31f.

Orientadora: Profa. Me. Débora Barrozo L. Milreu.
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Cecília V. Daher.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Clorexidina. 2. Adesão. 3. Metaloproteinase. 4. Erosão. I. Milreu, Débora Barrozo Legramandi. II. Daher, Maria Cecília Veronezi. III. Título.

LIDIANE DE PAULA MOURA CABRAL

**O PAPEL DA CLOREXIDINA NA INIBIÇÃO DAS
METALOPROTEINASES – REVISÃO DE LITERATURA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao centro de ciências da saúde, como partes dos pré-requisitos para a obtenção do título de Cirurgião Dentista, sob a orientação da Profa. Ms. Débora Barrozo Legramandi Milreu.

Banca Examinadora:

Profa. Ms. Débora Barrozo Legramandi Milreu
Universidade Sagrado Coração

Profa. Dra. Carolina Nunes Pegoraro
Universidade Sagrado Coração

Profa. Dra. Maria Cecília Veronezi Daher
Universidade Sagrado Coração

Bauru, 10 de Dezembro de 2013.

“Tu és o meu Deus, graças te darei!
Ó meu Deus, eu te exaltarei!
Dêem graças ao Senhor, porque Ele é bom;
o seu amor dura para sempre.”
Salmos 118:28-29

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que um dia colocou o sonho de cursar Odontologia em meu coração, pois sei que é a vontade dEle, e me abençoou abundantemente durante toda essa jornada, assim como fez durante toda a minha vida. Só cheguei até aqui pela sua misericórdia e infinita graça. Toda honra e toda glória sejam dadas a Ele.

Agradeço aos meus pais, Mário e Lindalva, por terem acreditado em mim, sempre me incentivando e dando força em todos os momentos e por sacrificarem suas vidas para a realização do meu sonho. Parabéns, esta vitória também é de vocês!

Agradeço ao meu namorado, fiel companheiro, Filippe, por estar sempre ao meu lado, se esforçando a cada dia para me fazer feliz e foi essencial na conclusão deste trabalho.

Agradeço a minha orientadora, professora Débora, pelos ensinamentos durante todo o curso e por dedicar tempo, paciência e compreensão durante este trabalho. Muito obrigada por me ajudar a concluir mais esta etapa!

Agradeço aos meus professores, em especial orientadora e todos os outros orientadores que tive ao longo do curso. Com vocês aprendi não só matérias mas aprendi lições de vida, de moral. Vocês foram meus exemplos, pessoas dedicadas, competentes e únicas, que jamais esquecerei. Tenho orgulho de dizer que tive aula com cada um de vocês. Muito obrigada por dar o máximo de vocês e me fazer amar cada vez mais a odontologia.

RESUMO

As metaloproteinases (MMPs), constituem-se de um grupo de enzimas que podem quebrar as proteínas componentes da matriz extracelular (MEC), como o colágeno por exemplo. Possuem um importante papel na remodelação tecidual, cicatrização de feridas e formação do esmalte. Estão atualmente classificadas em 24 tipos, sendo sugeridos que, cada um é capaz de degradar um determinado tipo de substrato. Sabe-se que alguns inibidores endógenos específicos (TIMPs) são responsáveis pela inibição dessas enzimas, porém algumas soluções estão sendo indicadas para esta finalidade, a clorexidina é uma delas. Assim, este estudo, através de uma revisão de literatura busca avaliar o papel desta substância antimicrobiana na inibição das MMPs.

Palavras chave: Clorexidina, MMP, adesão, erosão.

ABSTRACT

The role of chlorhexidine in inhibiting metalloproteinases - LITERATURE REVIEW

Metalloproteinases (MMPs) constitute a group of enzymes that can break down protein components of the extracellular matrix (ECM) such as collagen for example. They play an important role in tissue remodeling, wound healing and formation of the enamel. They are currently classified into 24 kinds, and suggested that each is able to degrade a particular substrate type. It is known that some specific endogenous inhibitors (TIMPs) are responsible for the inhibition of these enzymes, but some solutions are suitable for this purpose, chlorhexidine is one. Thus, this study, through a literature review aims to assess the role of this antimicrobial substance in the inhibition of MMPs.

Key words: Chlorhexidine, MMP, adhesion, erosion.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	09
2 OBJETIVO.....	11
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
4 DISCUSSÃO.....	25
5 CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS.....	28

1 INTRODUÇÃO

As metaloproteinases (MMPs), constituem-se de um grupo de enzimas (endopeptidases) que podem quebrar as proteínas componentes da matriz extracelular (MEC), como o colágeno por exemplo. A descoberta das MMPs ocorreu por volta do ano de 1962, quando estudiosos encontraram uma enzima ativa na cultura de fragmentos da pele de ratos, a qual degradou a tripla hélice do colágeno tipo I maduro. Atualmente, inúmeros trabalhos vem se desenvolvendo a fim de elucidar e aprimorar o conhecimento sobre as MMPs, já que possuem um papel importante na remodelação tecidual (normal ou patológica), migração celular (normais ou malignas), cicatrização de feridas e formação do esmalte dental (HANNAS et al, 2007). Elas necessitam de ativação para causar degradação, podendo ser ativadas por diversos fatores, como fatores de crescimento, agentes químicos, forças mecânicas e inclusive baixo pH, mas necessitando da neutralização deste ambiente para exercer degradação (TJÄDERHANE et al, 2013). Atualmente são descritos 24 tipos de MMPs, sendo que 23 deles foram identificados em humanos. Foi sugerido que cada uma é capaz de degradar um determinado tipo de substrato e assim surgiram nomenclaturas específicas baseadas no tipo de substrato de ação, como as collagenases, que têm a capacidade de degradar fibrilas intactas de colágeno, as gelatinases, que têm a capacidade de degradar colágeno desnaturado (gelatina) e as enamelinas, que atuam na matriz do esmalte dental. (HANNAS et al., 2007).

A atividade das MMPs são controladas por meio dos inibidores específicos, conhecidos como inibidores teciduais de MMPs (TIMPs). As TIMPs são proteínas pequenas e multifuncionais que regulam ambas as funções das MMPs, o nível de sua ativação e sua habilidade de hidrolisar um determinado substrato.

O equilíbrio entre a produção de MMPs e a de TIMPs representa um ponto principal para manter a homeostase da matriz extracelular. É conhecido que um processo patológico da matriz extracelular pode se instalar quando houver excesso de atividade das MMPs nos tecidos. Certos TIMPs e MMPs são identificados em estruturas dentárias e saliva humana e têm diferentes papéis na formação e manutenção do complexo dentino pulpar (BUZALAF et al, 2012; NIU et al, 2011; TJÄDERHANE et al, 2013). Também é descrito que as MMPs têm papel fundamental na progressão de cárie (TJÄDERHANE et al, 2013) e erosão dentinária

(BUZALAF et al, 2012) devido à degradação do colágeno da dentina desmineralizada (MMP-2, -8, -9). Estão envolvidas ainda na formação do esmalte e na fluorose (MMP-2, -20), na remodelação da matriz orgânica dentinária (MMP-2, -8, -9), têm sido identificadas tanto em processos inflamatórios na região pulpar e periapical, em doenças periodontais (HANNAS et al, 2007; MARTIN-DE LAS HERAS et al, 2000; TJÄDERHANE et al, 2013) e na degradação da matriz de colágeno em regiões de restaurações que não foram completamente infiltradas. Muitos trabalhos vem sendo realizados a respeito de inibidores de proteases sintéticos das MMPs, que possam ser usados em terapias médicas e odontológicas. Uma substância que vem apresentando propriedades antiproteolíticas desejáveis é a clorexidina (CHX) (GENDRON et al, 1999).

A CHX é classicamente utilizada como agente antimicrobiano, mas também tem sido empregada mais recentemente como inibidor sintético de MMPs.

Com isso, o presente trabalho, por meio de revisão de literatura visa avaliar o papel da clorexidina na inibição das MMPs em diferentes situações dentro da Odontologia.

2 OBJETIVO

GERAIS: Avaliar o papel da clorexidina na inibição das metaloproteinases (MMPs).

ESPECÍFICOS: Através de uma revisão de literatura, com publicações coletadas das bases Scielo, Pubmed, Lilacs e Bireme a partir de 1999 até 2013, verificar as hipóteses se realmente existe ou não a influência da clorexidina na inibição das metaloproteinases.

3 REVISÃO DE LITERATURA

GENDRON et al, em 1999, avaliaram o efeito inibitório da clorexidina (CHX) na atividade das Metaloproteinases (MMP)-2 (gelatinase A), MMP-9 (gelatinase B), e MMP-8 (colagenase 2). Foi avaliado colágeno tipo I desidratado, o qual foi incubado com MMP-2 ou -9, humano puro ativado com p-aminofenilmercúricoetilo (APMA), e a degradação proteolítica de gelatina foi monitorizado pela electroforese de gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio e coloração com azul de Coomassie. O efeito da CHX na atividade do MMP-8 também foi estudada com um modelo celular abordando a capacidade de neutrófilos do sangue humano periférico, ativado por acetato de forbol miristato (PMA), desencadeada por neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares [PMN]) para degradar colágeno tipo I nativo. Foi observado que a CHX inibiu as atividades de ambas as gelatinases (A e B), mas a MMP-2 pareceu ser mais sensível do que a MMP-9 e a adição de cloreto de cálcio às misturas de ensaio, preveniu quase completamente, impedido a inibição da atividade de MMP-9 pela CHX, enquanto que a inibição de MMP-2, a atividade pôde ser revertida apenas quando CHX foi utilizada a uma baixa concentração. Esta observação sugere que a CHX pode atuar através de um mecanismo de catião-quelante. Também foi observado que dependendo da dose, a CHX inibiu a atividade colagenolítica da MMP-8 liberado por PMN ativados por PMA, e a MMP-8 sem, a ativação por APMA, foi inibida claramente mais eficaz do que a MMP-8 ativado por APMA. O estudo sugeriu que a inibição direta das atividades das MMPs por CHX pode representar um novo efeito valioso deste agente antimicrobiano e explicou, pelo menos em parte, os efeitos benéficos da CHX no tratamento de periodontite.

HEBLING et al, em 2006, testaram a hipótese nula de que não existe diferença entre a aplicação de adesivo com e sem um tratamento prévio, que consiste de lavagem com ácido fosfórico e uso de Clorexidina como inibidor de MMP. Foram utilizados pares contralaterais de primeiros molares decíduos que poderiam ser restaurados com preparação de cavidades Classe I, os quais foram obtidos de 11 indivíduos selecionados entre 137 crianças de 8 a 12 anos. Após um período de seis meses de funcionamento intra-oral, apenas 3 indivíduos continuavam com ambos os molares restaurados intactos, os quais foram analisados por sua integridade marginal de acordo com o critério USPHS. Todas as restaurações

estavam intactas, sem nenhum sintoma clínico associado à elas, sem trincas dos compostos e sem cárie recorrente. Todas as amostras tiveram sua integridade marginal classificada como 'alfa'. Os dentes foram então extraídos, armazenados em solução de Sódio Azida 0,2% em recipientes numerados, para que o processamento posterior fosse feito cegamente em relação aos grupos experimentais e de controle. Foi observado que as camadas híbridas dos dentes tratados com clorexidina exibiram integridade estrutural normal da rede de colágeno. Por outro lado, as camadas híbridas anormais foram observadas nos dentes de controle, com a desintegração progressiva da rede fibrilar, na medida em que foi além da detecção por coloração de colágeno. Conclui-se que a auto-destruição de matrizes de colágeno ocorre rapidamente na dentina com infiltração de resina in vivo e pode ser evitada com o uso de clorexidina como um inibidor de MMP.

CHAUSSAIN-MILLER; FIORETTI; GOLDBERG, em 2006, fizeram uma revisão para resumir o papel das MMPs no processo de cárie e discutir novos caminhos terapêuticos. MMPs hidrolisam os componentes da matriz extracelular e desempenham um papel central em muitos processos biológicos e patológicos. Elas têm sido sugeridas para desempenhar um papel importante na destruição da matriz de dentina orgânica após desmineralização por ácidos bacterianos e, por conseguinte, no controle ou na progressão da deterioração de cárie. MMPs derivadas podem se originar tanto a partir da saliva como da dentina. Elas podem ser ativadas por um pH ácido provocado pela libertação de lactato a partir de bactérias cariogênicas. Uma vez ativadas, elas são capazes de digerir a matriz de dentina desmineralizada e depois neutralizar o Ph por tampões salivares. Além disso, a degradação das glicoproteínas n-ligadas de pequenas uniões integrinas ligantes, pelo processo de cárie, pode potencialmente aumentar a liberação de MMPs e sua ativação. Foi sugerido que a inibição de MMP por vários inibidores, particularmente por meio de substâncias naturais, podem proporcionar uma via terapêutica potencial para limitar a progressão da cárie na dentina.

AZEVEDO em 2006, avaliou o uso da clorexidina na qualidade da camada híbrida de dentes decíduos hígidos. Foram coletados 10 dentes decíduos hígidos, 1os e 2os molares, extraídos e em fase final de rizólise. A superfície dentinária média do 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 de 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 de clorexidina não interfere na qualidade da camada híbrida, podendo ser indicado para aumentar a sobrevivência das restaurações por meio da inibição da matriz de metaloproteinases pela clorexidina.

CARRILHO et al, em 2007, avaliaram a hipótese de que a clorexidina desacelera a perda da união entre resina e dentina. Foram feitos preparos de Classe I em 7 terceiros molares extraídos, livres de cárie e seccionados em duas metades. Uma metade foi habitualmente restaurada (condicionamento ácido, lavagem, aplicação de adesivo e resina composta), e a outra foi tratada com 2% de clorexidina depois de ter sido lavado com ácido antes da restauração. As amostras foram armazenadas em saliva artificial com/sem inibidores de protease. A resistência adesiva e modo na distribuição de falha sob SEM foram analisadas imediatamente após o preparo das amostras e 6 meses depois. Com clorexidina, foi observado após 6 meses, significativamente melhor preservação da união, já os inibidores de protease em meio de armazenagem não tiveram efeito. Análise de falhas mostraram significativamente menos falhas na camada híbrida com clorexidina, em comparação com os controles após 6 meses. Em conclusão, este estudo in vitro sugere que a clorexidina pode ser útil para a preservação de resistência da união da dentina.

CARRILHO et al, em 2007, testaram a hipótese de que a degradação

interfacial da união entre resina e dentina pode ser evitada ou retardada pela aplicação de CHX. Foram usados doze indivíduos com um par de terceiros molares não cariados, em oclusão no mínimo parcial, e agendados para extração futura, com restaurações Classe I usando resina foram mantidos sob função intra-oral por 14 meses. Foram feitas nos indivíduos cavidades medindo 3x3x4mm enquanto eles estavam sobre efeito de anestesia local. As cavidades de controle foram lavadas com ácido fosfórico 35% por 15 segundos e restauradas com uma camada de 1,5mm composto de micropartículas seguidos de duas camadas de um composto híbrido. As cavidades experimentais receberam um tratamento similar, exceto pelo fato de a dentina ter sido tratada com digluconato de CHX 2% após a lavagem com ácido. A preservação da ligação entre resina e dentina foi avaliada por meio de testes de microtração e análise de microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Foi observado que, in vivo, a força da ligação manteve-se estável nos espécimes tratados com CHX, enquanto a força de ligação diminuiu significativamente nos dentes controle e que os espécimes de dentina com resina infiltrada, tratados com CHX, exibiram integridade estrutural normal da rede de colágeno, porém a desintegração progressiva da rede fibrilar foi identificada em amostras de controle. Concluiu-se que a auto-degradação das matrizes de colágeno pode ocorrer em dentina com resina infiltrada, mas pode ser evitada pela aplicação de um inibidor de protease sintético, como a clorexidina.

HANNAS et al, 2007, fizeram uma revisão sobre a matriz de MMPs e seu papel nos processos de degradação e remodelagem da matriz extracelular (MEC) fisiológica e patológica no ambiente oral. As MMPs, são um grupo de enzimas capazes de degradar quase todas as proteínas da MEC e contribuem para a remodelagem de tecido tanto normal como patológico. A expressão de diferentes MMPs pode ser regulada em condições patológicas tais como inflamação e invasão tumoral. O equilíbrio entre as MMPs ativadas e os inibidores de tecidos de metaloproteinases (TIMPs) controla o grau de remodelação da MEC. Antes da mineralização, as MMPs podem participar na organização do esmalte e da matriz de dentina orgânica, ou eles podem regular a mineralização, controlando a mudança de proteoglicanos. Existe evidência indicando que as MMPs podem estar envolvidas na etiologia de fluorose no esmalte e amelogênese imperfeita. Concluiu-se que elas desempenham um papel na progressão da cárie de dentina, uma vez que têm um

papel crucial na degradação do colágeno da dentina em lesões de cárie. Elas também foram identificadas na inflamação pulpar e periapical e estão fortemente correlacionadas com doenças periodontais, já que eles são os principais responsáveis na degradação do colágeno durante a destruição do tecido periodontal. Portanto, o uso de inibidores de MMPs pode ajudar na prevenção e tratamento de várias doenças orais relacionadas com as MMPs.

BENGTSON et al, em 2008, avaliaram, in vitro, a influência da solução de digluconato de clorexidina 2% na adesão de dois sistemas adesivos (um sistema adesivo convencional e um sistema adesivo autocondicionante) à dentina de molares humanos. Foram utilizados 40 terceiros molares humanos hígidos, com a face oclusal desgastada até a exposição de uma superfície plana de dentina. Os dentes foram divididos aleatoriamente em 4 grupos (n=10) de acordo com o sistema adesivo utilizado e tratamento superficial realizado: G1 – Controle Single Bond 2; G2 – Controle Clearfil SE Bond; G3 – Desinfecção com clorexidina + Single Bond 2; G4 – Desinfecção com clorexidina + Clearfil SE Bond. Corpos de prova em resina composta foram confeccionados nas superfícies tratadas e os dentes foram armazenados em água destilada à 37°C por 24 horas. As amostras foram seccionadas verticalmente obtendo-se espécimes com área de secção transversal de aproximadamente 0,8mm², que foram tracionados em máquina de ensaios universal. Os resultados de resistência de união foram analisados usando os testes estatísticos ANOVA e Tukey (p<0,05). Discos de dentina foram obtidos de 3 dentes adicionais, para observação em MEV das superfícies submetidas aos mesmos tratamentos realizados para o teste de microtração. Como resultado, não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos controles (G1 = 31,52 ± 6,24 e G2 = 42,88 ± 2,31) e os grupos tratados com clorexidina (G3 = 34,41 ± 6,92 e G4 = 40,14 ± 2,91). O sistema adesivo Clearfil SE Bond apresentou valores de resistência de união significativamente maiores que o sistema adesivo Single Bond. Concluiu-se que a solução de digluconato de clorexidina 2% não interferiu na resistência de união dos sistemas adesivos utilizados.

CARRILHO et al, em 2010, investigaram a substantividade da clorexidina sobre a dentina humana. Discos de dentina (n = 45) foram obtidas a partir da porção central coronal de terceiros molares humanos. Um terço dos discos de dentina foram

mantidos mineralizados (MD), enquanto os outros dois terços tinham uma das superfícies parcialmente desmineralizada com 37% de ácido fosfórico durante 15 s (TID) ou totalmente desmineralizada com 10% de ácido fosfórico (TDD). Os discos de hidroxiapatita (HA), foram também preparados. As amostras foram tratadas com: (1) 10 microL. de água destilada (controles), (2) 10 microL de 0,2% de diacetato de clorexidina (0,2% CHX), ou (3) 10 microL. de 2% de diacetato de clorexidina (2% de CHX). Em seguida, elas foram incubadas em 1 ml de PBS (pH 7,4, 37° C). A substantividade foi avaliada como uma função da CHX aplicada após porções: 0,5h, 1h, 3h, 6h, 24h, 168h (1 semana), 672horas (4 semanas) e de 1.344 horas (8 semanas) de incubação. Os resultados foram que quantidades significativas de CHX permanecia retida em substratos de dentina (MD, PPD ou TDD), independente da dose aplicada de CHX ou tempo de incubação ($p < 0,05$). Foram observadas quantidades elevadas de HA na CHX retida apenas para amostras tratadas com a maior concentração de CHX (2%) ($p < 0,05$). Concluiu-se que a substantividade notável de CHX na dentina e avaliado o seu efeito sobre a inibição de proteases de dentina pode explicar porque CHX pode prolongar a durabilidade das ligações de resina-dentina.

KATO et al, em 2010, testaram a hipótese de que os géis contendo inibidores de MMPs (galato de epigallocatequina-EGCG e clorexidina) pode prevenir a erosão dental. Os voluntários ($n = 10$) utilizaram dispositivos palatinos contendo blocos de dentina bovina ($n = 10$ /grupo) tratados durante 1 min com EGCG em 10 (EGCG10) ou 400 microM (EGCG400), clorexidina em 0,012 % , F em 1,23 % (NaF), e nenhum veículo (placebo). A erosão foi realizada com Coca-Cola (5 min) 4X/dia durante 5 dias. O desgaste, avaliado por perfilometria (média +/- SD, microM), foi significativamente reduzido pelos géis contendo inibidores de MMP (0,05 +/- 0,02^a, 0,04 +/- 0,02^a, e 0,05 +/- 0,02^a para EGCG10, EGCG400, e clorexidina, respectivamente) quando comparado com o NaF (0,79 +/- 0,35^b) e géis de placebo (1,77 +/- 0,35^b) (teste de Friedman e Dunn $p < 0,01$). O resultado obtido foi que o uso de géis contendo inibidores de MMP preveniu a erosão e abriu uma nova perspectiva para a proteção contra a erosão dental.

NIU et al, em 2011, testaram a hipótese de que a distribuição e concentração de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 são diferentes em diferentes profundidades de

dentina coronal humana, incluindo odontoblastos. A partir de setenta terceiros molares coletados, a localização das proteínas foi realizada usando imunohistoquímica. A co-localização das MMPs e seus inibidores foi realizada utilizando a imunofluorescência dupla marcação. Concentrações de proteína foram medidas por ELISA e potencial gelatinolítico foi avaliado com zimografia de gelatina. O resultado obtido foi que a MMP-2 foi a principal gelatinase em dentina e concentrou-se nos odontoblastos, dentina profunda e a junção amelodentinária. A TIMP-2 foi co-localizada com a MMP-2, principalmente nos odontoblastos mas a sua concentração era baixa. Tanto a MMP-9 como a TIMP-1 mostrou uma distribuição decrescente a partir do fundo para as camadas superficiais da dentina, no entanto, a concentração de TIMP-1, foi muito superior à da MMP-9. O potencial gelatinolítico de extratos protéicos de dentina diminuiu gradualmente do fundo para dentina superficial. Concluiu-se que as concentrações e os padrões de distribuição de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2, bem como o potencial gelatinolítico da matriz de dentina são variáveis ao longo de diferentes profundidades de dentina. Assim, os potenciais de degradação do colagénio diferencial podem ser esperados, dependendo da profundidade em que a dentina é exposta.

STANISLAWCZUK; REIS; LOGUERCIO; em 2011, avaliaram o efeito de 2% de ácido contendo clorexidina (Ac/CHX) e solução de digluconato de clorexidina a 2% (CHX) no imediato (IM) e 2 anos (2A), na força de união resina-dentina (BS) e absorção de nitrato de prata (SNU) para dois adesivos simplificados convencionais e autocondicionantes. Foram utilizados quarenta e dois molares extraídos livres de cárie que tinham uma superfície plana de dentina exposta. Nos grupos de controle (grupo 1), as superfícies foram condicionadas com ácido fosfórico convencional e o adesivo Prime & Bond NT (PB) ou Adper Single Bond 2 (SB) foi aplicado após a lavagem, secagem e reidratação com água. Nos grupos 2, grupos de AC/CHX, os adesivos foram aplicados de uma maneira semelhante, mas com 2% de ácido contendo CHX foi aplicada anteriormente. Nos grupos 3, os adesivos foram aplicados de acordo com o grupo de controle, no entanto, o procedimento de reumedecimento foi realizada com uma solução aquosa de 2% de CHX por 60s. Compostos acumulados foram construídos de forma incremental e espécimes de microtração (0,8mm) (2) foram preparados para o teste de microtração no IM ou períodos 2A em 0,5mm por minuto. Para SNU, duas barras coladas de cada dente

foram revestidas com verniz, colocado no nitrato de prata, polida para baixo com papéis de SiC e analisados por EDX- SEM. Os dados de cada adesivo foram submetidos a análise de variância ANOVA e teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Os resultados obtidos depois de 2 anos foram reduções significativas de BS para ambos os adesivos no grupo controle ($p < 0,05$); em grupos AC / CHX ou CHX a BS manteve-se estável para ambos os sistemas; SNU foi mais evidente no controle do que nos grupos experimentais ($p < 0,05$) em ambos os períodos de IM e 2A. O uso de CHX em uma solução aquosa ou associado com o condicionador de ácido foi eficaz para reduzir a degradação de uniões de dentina ao longo de um período de 2 anos. Significando, que a adição de digluconato de clorexidina no condicionador de ácido pode ser uma excelente ferramenta para aumentar a estabilidade a longo prazo das fibrilas de colagénos dentro da camada híbrida contra metaloproteinases hospedeiras-derivadas sem a necessidade de passos adicionais para o protocolo de união.

LIU et al, em 2011, analisaram os dados gerados ao longo dos últimos três anos em cinco estratégias experimentais desenvolvidos por diferentes grupos de pesquisa para estender a longevidade da união resina-dentina. Eles incluem: (1) aumentar o grau de conversão e resistência esterase de adesivos hidrofílicos, (2) o uso de inibidores de largo espectro das enzimas colagenolíticas, incluindo novos inibidores de grupos funcionais enxertados, monómeros de metacrilato de resinas para produzir adesivos anti-MMP, (3) o uso de agentes de reticulação para silenciar as atividades de MMP e catepsinas que irreversivelmente alteram as estruturas 3-D dos seus domínios catalíticos/alostérico, (4) adesão úmida de etanol com resinas hidrofóbicas para substituir completamente a água dos compartimentos de colágeno extrafibrilar e intrafibrillar e imobilizar as enzimas colagenolíticas, e (5) de remineralização biomimética da matriz de colágeno ricas em água, utilizando os análogos da matriz de proteínas para substituir progressivamente com água e apatitas intrafibrillar e extrafibrillar para excluir enzimas colagenolíticas exógenas e fossilizar enzimas colagenolíticas endógenas. Uma combinação de várias destas estratégias deve resultar em superar as barreiras cruciais para o progresso atualmente encontrado na dentina.

OSORIO et al, em 2011, avaliaram se a degradação do colágeno pode ser evitada através de digluconato de CHX, após diferentes procedimentos na dentina. A desmineralização da dentina humana foi realizada com ácido fosfórico (PA), EDTA ou monómeros ácidos (Clearfil SE Bond, Xeno V). As amostras foram armazenadas (por 24 h, ou de 1 ou 3 semanas), na presença ou ausência de CHX. Em metade dos grupos, ativos de MMP-2 foi incorporado na solução de armazenamento. No final de cada período de armazenamento, o telopéptido (ICTP) concentração de C-terminal (o que indica a quantidade de degradação do colagénio) foi medido em solução de armazenamento. A degradação do colágeno foi maior no PA e EDTA da dentina desmineralizada. O digluconato de clorexidina reduziu a degradação do colágeno nestes grupos apenas para 24h. Quando a dentina foi desmineralizado com SE Bond ou Xeno V, a degradação de colagénio foi reduzida em até 30%, mas a adição de MMP-2 aumentaram significativamente a degradação do colágeno exógeno. Em dentina, no sistema adesivo autocondicionante, o efeito inibitório de CHX em MMPs durou até 3 semanas. Tratar dentina com EDTA, PA ou agentes autocondicionantes de desmineralização produz o suficiente para permitir a clivagem do colagénio exposto. Monómero de infiltração pode exercer proteção em colágeno desmineralizado, provavelmente através de imobilização das MMPs. A ação inibitória parcial da CHX sobre a atividade MMP, produzido por adesivos autocondicionantes, foi prolongada em comparação com a de curta duração PA ou EDTA.

SOUZA et al, em 2012, investigaram a substantividade da solução e gel de CHX dentro de um sistema de canais radiculares por 24 horas, 30 dias e 90 dias. Foram usados para este estudo quarenta e cinco dentes anteriores humanos extraídos, onde as amostras foram divididas em três grupos de acordo com a substância química auxiliar utilizada para realizar o preparo do canal radicular: grupo 1, 2% CHX líquida; grupo 2, 2% CHX gel e grupo 3, água destilada (grupo controle). O comprimento de trabalho foi determinado através da inserção de uma lima k10 dentro do canal até o momento em que a ponta foi vista no vértice do forame e em seguida retirando 1 mm. As raízes foram preparadas até o instrumento k45. Os sulcos longitudinais foram esculpados nas superfícies livres das raízes, proporcionando duas metades de cada raiz, resultando em 30 amostras por grupo. Cada grupo foi dividido aleatoriamente em três subgrupos (n = 10), e a

substantividade foi avaliada após 24 horas, 30 dias e 90 dias de incubação. A quantidade de CHX (em micrómetros) foi medida por meio de cromatografia líquida de alta eficiência de inversão de fases. Análise estatística foi realizada por análise de variância e teste de Tukey para comparações post hoc ($\alpha = 0,05$). Como resultado o grupo controle não mostrou substantividade, quantidades significativas da solução e gel de clorexidina permaneceram retidas nos substratos de dentina independente do tempo de incubação ($p < 0,05$). A solução de CHX mostrou uma substantividade maior que CHX gel, com a exceção dos grupos incubados durante 90 dias. Os valores decrescentes de CHX retidos no lado do canal foram por 24 horas > 30 dias > 90 dias para solução de CHX e 24 horas > 90 dias para CHX gel. Portanto, que os resultados deste estudo indicam que a solução de clorexidina e gel ficam retidos na dentina radicular por até 90 dias.

KATO; LEITE; HANNAS et al, em 2012, avaliaram se a redução da degradação da matriz orgânica desmineralizada (DOM) pelo pré-tratamento com inibidores de protease (PI), é eficaz contra a perda de matriz de dentina. Foram utilizadas fatias de dentina bovina que foram desmineralizadas com 0,87 M de ácido cítrico, pH 2,3, por 36 horas. Em sequência, as amostras foram tratadas ou não (UT, não tratado), durante 1 min com géis contendo epigallocatequina galato-3 (EGCG, 400 μ M), a clorexidina (CHX, 0,012 %), FeSO_4 (1 mM), o NaF (1,23 %), ou nenhum composto ativo (P, placebo). As amostras foram então armazenadas em saliva artificial (5 dias, 37°C) com a adição de colagenase (*Clostridium histolyticum*, com 100 U/mL). Analisou-se a degradação do colagénio por análise de hidroxiprolina (HYP) nas soluções de incubação ($n = 5$) e avaliou a perda de matriz de dentina por perfilometria ($n = 12$). Os dados foram analisados por análise de variância e teste de Tukey ($p < 0,05$). Foi observado que o tratamento com gel contendo EGCG, CHX ou FeSO_4 conduziu a concentrações de HYP significativamente mais baixas em solução e perda de matriz de dentina, quando comparada com os outros tratamentos. Estes resultados sugerem fortemente que os efeitos preventivos do PI testado contra a erosão da dentina é devido à sua capacidade para reduzir a degradação do DOM.

FRANCISCONI em 2012, avaliou o efeito da aplicação de soluções de CHX em diferentes concentrações na resistência de união (RU) de uma resina composta (RC) à dentina normal (parâmetro para comparações) e à dentina erodida, ao longo

do tempo. Terceiros molares humanos hígidos extraídos (n=48) tiveram seu terço oclusal seccionado e as superfícies dentinárias expostas foram somente submetidas à ação de uma lixa de carbeto de silício de granulação 600/1 min (dentina normal-N, n=24), ou subseqüentemente erodidas por um refrigerante a base de cola (imersões de 5 min, 3x/dia, 5 dias; dentina erodida-E, n=24). Foram, então, condicionadas (H_3PO_4 a 37%, 15 s), lavadas, secas e reidratadas com 1,5 μ L, respectivamente, de água deionizada (controle-NC, n=8 / EC, n=8), de CHX a 0,004% (N0,004%, n=8 / E0,004%, n=8) ou de CHX a 2% (N2%, n=8 / E2%, n=8). O sistema adesivo AdperTMSingle Bond 2® foi aplicado em todos os espécimes e a porção coronária foi incrementalmente reconstruída com a RC FiltekTMZ350®. Depois de armazenados em água deionizada (24 h, 37°C), os espécimes foram seccionados em palitos (secção transversal $\approx 0,81$ mm²), que foram testados, sob força de tração (EMIC; célula de carga de 50 kgf; 0,5 mm/minuto), imediatamente ou depois de 6 meses ou 1 ano de envelhecimento. As falhas foram analisadas e classificadas em adesivas, mistas, coesivas em dentina ou em resina. Paralelamente, avaliou-se a qualidade da hibridização para cada grupo experimental, por meio da obtenção de imagens em microscopia confocal de varredura a laser de um espécime por grupo, hibridizado pelo mesmo adesivo, mas marcado pela adição de rodamina B, e seccionado apenas no sentido mésio-distal. Os dados obtidos da microtração foram analisados por meio dos testes de ANOVA a três critérios e de Tukey ($p < 0,05$). Os valores médios de RU (MPa \pm dp; imediatamente / 6 meses / 1 ano) foram: NC (34,74 \pm 9,79 / 20,77 \pm 14,35 / 7,58 \pm 4,94); N0,004% (35,69 \pm 9,85 / 23,10 \pm 8,13 / 13,82 \pm 10,12); N2% (41,22 \pm 5,38 / 34,64 \pm 6,62 / 13,25 \pm 4,83); EC (20,94 \pm 5,37 / 7,87 \pm 8,81 / 5,43 \pm 4,99); E0,004% (22,12 \pm 7,44 / 3,47 \pm 6,25 / 4,97 \pm 3,11); E2% (15,97 \pm 5,17 / 22,23 \pm 9,12 / 5,41 \pm 5,47). Os resultados obtidos foram que as falhas adesivas e/ou mistas consistiram-se nas observadas. Os valores de RU da RC à dentina erodida foram sempre inferiores àqueles da RC à dentina normal. Tais valores, para ambas as condições de dentina, experimentaram redução significativa com o passar do tempo, mas a aplicação da solução de CHX a 2% foi capaz de mantê-los estáveis até os 6 meses de envelhecimento dos espécimes. Foi concluído que a aplicação de soluções de CHX, a 2%, apresenta-se como uma estratégia promissora para conservar a RU de resinas compostas tanto à dentina normal quanto à dentina erodida. Com o tempo, no entanto, seu efeito pode tornar-se reduzido ou irrelevante.

TJÄDERHANE et al, em 2013, através de uma revisão, examinaram a presença, a identidade e a função das enzimas proteolíticas que degradam o colágeno na dentina. Avaliaram que a dentina contém enzimas colagenolíticas, as MMPs e de catepsinas de cisteína, que são responsáveis pela degradação da matriz de colágeno hidrolítico na interface de união. Os resultados obtidos foram que as identidades, papéis e funções das enzimas colagenolíticas em dentina mineralizada foram só reunidas dentro dos últimos 15 anos, mas elas já foram demonstradas a ter um papel importante nas patologias dentais de tecidos duros, incluindo a degradação da camada híbrida. A identificação de enzimas responsáveis facilita o desenvolvimento de novos métodos mais eficientes para melhorar a estabilidade da união dentina-adesivo e durabilidade da resistência de união. Concluiu-se que entender a natureza e o papel da degradação proteolítica de interfaces dentina-adesivo tem melhorado muito e cresceu praticamente para um campo científico dela mesma, dentro de apenas 10 anos, mantendo excelente promessa dos laços estáveis entre resina-dentina e estarão rotineiramente disponíveis no dia a dia clínico já em um futuro próximo.

APAYCO em 2013, avaliou a resistência de união (RU) em dentina erodida tratada com solução de clorexidina a 2%. Sessenta terceiros molares tiveram a superfície dentinária do terço oclusal exposta e foram distribuídos em 3 grupos, de acordo com o protocolo erosivo: controle, sem desafio (C), desafio erosivo com Coca-Cola (CC) e desafio erosivo com Coca-Cola Light (CL). As ciclagens erosivas foram por ciclos de 5 min. de imersão 3x/dia durante 5 dias. Em seguida, metade dos dentes foram tratados com solução de clorexidina a 2% (1,5ul) e o restante com água deionizada (1,5ul) e o processo adesivo realizado com Adper Single Bond 2® e resina composta Filtek Z350®. Os espécimes foram mantidos em estufa a 37°C por 24 horas. Após esse período, todos os espécimes foram seccionados em palitos (0,80mm₂ a 1mm₂). Um terço dos palitos obtidos de cada grupo foi testado imediatamente (I-24 h) pelo teste de microtração. Os espécimes remanescentes foram envelhecidos em saliva artificial por 6 meses (6m) e 1 ano (1a) antes do teste. Os dados obtidos da microtração foram analisados por meio dos testes de ANOVA a três critérios e Tukey (p<0,05). O modo de fratura foi analisado e classificado em adesivo, misto e coesivo em dentina ou resina composta. Simultaneamente, uma fatia (mesiodistal) de cada espécime foi analisado por microscopia confocal para

análise da interface resina/dentina e formação de *tag* nos tempos de envelhecimento. Os valores médios de resistência adesiva (MPa \pm dp; 24 horas/ 6 meses/ 1 ano) foram: C (38,57 \pm 15,36/26,67 \pm 19,37/12,21 \pm 11,24); C-Chx2% (41,93 \pm 9,97/31,12 \pm 17,02/11,86 \pm 10,4); CC (21,80 \pm 7,09/8,33 \pm 10,71/4,70 \pm 9,04); CCChx2% (19,85 \pm 7,87/24,32 \pm 11,7/6,19 \pm 12,37); CL (22,70 \pm 9,63/10,25 \pm 15,6/4,93 \pm 5,54); CL-Chx 2% (22,40 \pm 7,34/20,94 \pm 14,68/16,05 \pm 13,91). Como resultados, obtiveram que a resistência de união à dentina erodida foi significativamente inferior ao do grupo controle, independentemente do tempo de armazenagem das espécimes. Tanto a dentina normal e erodida, apresentaram redução dos valores de resistência de união ao longo do tempo. Apesar de as espécimes tratadas com solução de clorexidina a 2% manterem os valores de resistência de união por 6 meses, elas reduziram após 1 ano. De acordo com as imagens por microscopia confocal, não houve diferenças observadas na qualidade geral da camada híbrida e formação de *tags* entre os grupos. Concluiu-se que a solução de digluconato de clorexidina a 2% pode ser uma alternativa para manter a estabilidade da interface de união adesiva até os 6 meses e que a resistência de união mais estável à dentina erodida por Coca-Cola Light comparada à dentina erodida por Coca-Cola ao longo do tempo, sugere a implicação de suas propriedades na adesão.

4 DISCUSSÃO

A Clorexidina antigamente era apenas reconhecida como uma substância com capacidade antimicrobiana. Assim, seu uso em cavidades tinha a função de desinfecção do local. Atualmente, já se sabe que a CHX, além de ser um potente agente antimicrobiano, tem também grande poder antiproteolítico (GENDRON et al, 1999). É uma solução biocompatível, antibacteriana de amplo espectro, de baixa toxicidade, alta substantividade e catiônica.

Após a revisão de literatura realizada neste trabalho, tornou-se evidente a importância do papel da clorexidina para diferentes ocorrências no dia a dia da prática odontológica. Para as restaurações com resinas compostas, que vem sofrendo desde seu aparecimento, um enorme desenvolvimento mas que, ainda apresentam deficiências, como o caso da fragilidade da estabilidade da camada híbrida, afetando diretamente a durabilidade da restauração. Nesta região, podemos encontrar dois grandes problemas: a degradação da resina infiltrada e/ou a degradação do colágeno (CARRILHO et al, 2007; PASHLEY et al, 2004). Estes problemas vêm sendo solucionados com o emprego da CHX, tanto aplicada topicamente, quanto incorporada aos sistemas restauradores, o que tem demonstrado aumentar a longevidade da adesão (CARRILHO et al, 2007; CARRILHO et al, 2010). 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, indo de encontro aos resultados obtidos por diversos estudos aqui revisados (HEBLING et al, 2006; AZEVEDO, 2006; CARRILHO et al, 2007; BENGTON et al, 2008; CARRILHO et al, 2010; STANISLAWCZUK; REIS; LOGUERCIO, 2011; LIU et al, 2011; FRANCISCONI, 2012; TJÄDERHANE et al, 2013; APAYCO, 2013).

Passando para outra situação na prática odontológica, GENDRON et al, 1999, em sua avaliação do efeito inibitório da clorexidina (CHX) na atividade das Metaloproteinases (MMP)-2 (gelatinase A), MMP-9 (gelatinase B), e MMP-8 (colagenase 2), sugeriu que a inibição direta das atividades das MMPs por CHX pode representar um novo efeito valioso deste agente antimicrobiano e explicou, pelo menos em parte, os efeitos benéficos da CHX no tratamento de periodontite. O que foi também observado por HANNAS et al, 2007, onde, após um minucioso estudo concluíram que estão fortemente correlacionadas com doenças periodontais,

já que elas são os principais responsáveis na degradação do colágeno durante a destruição do tecido periodontal. Portanto, o uso de inibidores de MMPs pode ajudar na prevenção e tratamento de várias doenças orais relacionadas com as MMPs.

Em relação à erosão dental, KATO et al, 2010, observaram que o uso de géis a base de clorexidina preveniu a erosão, abrindo uma nova perspectiva para a proteção contra a erosão dental.

Para a inibição da progressão do processo carioso, Chaussain-Miller; Fioretti; Goldberg, 2006, verificaram que este pode ser inibido com o uso de substâncias como a clorexidina, com isso proporcionando uma via terapêutica potencial para limitar a progressão de cárie. HANNAS et al, 2007, confirma o achado anterior, já que concluiu em seu trabalho que a CHX desempenha um importante papel na progressão da cárie de dentina, uma vez que têm um papel crucial na degradação do colágeno da dentina em lesões de cárie.

Após o exposto, fica claro o bom desempenho da CHX como inibidora de enzimas proteolíticas da dentina (MMPs), porém, novos estudos ainda são necessários para que se estabeleça um protocolo clínico para a sua utilização na prática odontológica.

5 CONCLUSÕES

- Houve influência da Clorexidina sobre valores de resistência de união das resinas compostas.
- A Clorexidina exerceu efeitos benéficos no tratamento de periodontite.
- Em relação a erosão dental, o uso de géis contendo inibidores de MMPs preveniu a erosão e abriu uma nova perspectiva para a proteção contra a erosão dental.
- A clorexidina participa na inibição do processo cariioso, uma vez que inibe a degradação do colágeno da dentina.
- Com base nos resultados obtidos nesta revisão de literatura, pode-se concluir que a aplicação de clorexidina, apresenta-se como uma estratégia promissora à prevenção da degradação das Metaloproteinases para diferentes situações dentro da Odontologia, porém, ainda não existe nenhum protocolo clínico para a sua utilização nos diferentes tratamentos clínicos odontológicos.

REFERÊNCIAS

1. APAYCO, L.C.C. Efeito da solução de clorexidina a 2% na adesão de um sistema restaurador adesivo à dentina previamente erodida com refrigerante tipo cola regular e light. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia de Bauru. Bauru, 2013.
2. AZEVEDO, T.D.P.L. Avaliação da clorexidina na qualidade da camada híbrida de dentes decíduos. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciência de Saúde da Universidade de Brasília. Brasília, 2006.
3. BENGTON, C.R.G., BENGTON, A.L., BENGTON, N.G., TURBINO, M.L. Efeito da Clorexidina a 2% na Resistência de União de Dois Sistemas Adesivos à Dentina Humana. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**, João Pessoa, 8(1):51-56, jan./abr. 2008.
4. BUZALAF, M.A., KATO, M.T., HANNAS, A.R. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. **Adv Dent Res** 2012;24(2):72-6.
5. CARRILHO, M.R., CARVALHO, R.M., SOUSA, E.N., NICOLAU, J., BRESCHI, L., MAZZONI, A., et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. **Dent Mater** 2010;26(8):779-85.
6. CARRILHO, M.R.O., GERALDELI, S., TAY, F., DE GOES, M.F., CARVALHO, R.M., TJÄDERHANE L., et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. **J Dent Res** 2007b;86(6):529- 33.
7. CARRILHO, M.R.O., CARVALHO, R.M., DE GOES, M.F., DI HIPOLITO, V., GERALDELI, S., TAY, F., et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. **J Dent Res** 2007a;86(90-94).

8. CHAUSSAIN-MILLER, C., FIORETTI, F., GOLDBERG, M., MENASHI, S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. **J Dent Res** 2006;85(1):22-32.
9. FRANCISCONI, L.F. Resistência de união de uma resina composta à dentina normal e erodida: o papel da aplicação de soluções de clorexidina em diferentes concentrações após seis meses e um ano de envelhecimento. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia de Bauru. Bauru, 2012.
10. GENDRON, R., GRENIER, D., SORSA, T., MAYRAND, D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. **Clin Diagn Lab Immunol** 1999;6(3):437-9.
11. HANNAS, A.R., PEREIRA, J.C., GRANJEIRO, J.M., TJÄDERHANE, L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. **Acta Odontol Scand** 2007;65(1):1-13.
12. HEBLING, J., PASHLEY, D.H., TJÄDERHANE, L., TAY, F.R. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. **J Dent Res** 2005;84(8):741-6.
13. KATO, M.T., LEITE, A.L., HANNAS, A.R., BUZALAF, M.A. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. **J Dent Res** 2010;89(5):468-72.
14. KATO, M.T., LEITE, A.L., HANNAS, A.R., CALABRIA, M.P., MAGALHÃES, A.C., PEREIRA J.C., BUZALAF M.A. Impact of protease inhibitors on dentin matrix degradation by collagenase. **J Dent Res**. 2012 Dec;91(12):1119-23.
15. LIU, Y.; TJÄDERHANE, L.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; LI, N.; MAO, J.; PASHLEY, D.H.; TAY, F.R. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. **J Dent Res** 90(8) 2011.

16. MANSO, A.P. Efeito de resinas experimentais contendo inibidores de proteases da matriz sobre gelatinases e colagenases. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.
17. NIU, L.N., ZHANG, L., JIAO, K., LI, F., DING, Y.X., WANG, D.Y., et al. Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. **J Dent** 2011;39(8):536-42.
18. OSORIO, R., YAMAUTI, M., OSORIO, E., RUIZ-REQUENA, M.E., PASHLEY, D., TAY, F., TOLEDANO, M. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. **Eur J Oral Sci.** 2011 Feb;119(1):79-85
19. PASHLEY, D.H., TAY, F.R., YIU, C., HASHIMOTO, M., BRESCHI, L., CARVALHO, R.M., et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. **J Dent Res** 2004; 83(3):216-21.
20. SOUZA, M., CECCHIN, D., FARINA, A.P., LEITE, C.E., CRUZ, F.F., PEREIRA, C.A.C., FERRAZ, C.C., FIGUEIREDO, J.A. Evaluation of chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. **J Endod.** 2012 Sep;38(9):1249-52.
21. STANISLAWCZUK, R.; REIS, A.; LOGUERCIO, A.D. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin-dentin interfaces. **J. Dentistry** 39 (2011) 40-47
22. TJÄDERHANE, L., NASCIMENTO, F.D., BRESCHI, L., MAZZONI, A., TERSARIOL, I.L., GERALDELI, S., TEZVERGIL-MUTLUAY, A., CARRILHO, M.R., CARVALHO, R.M., TAY, F.R., PASHLEY, D.H. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. **Dent Mater.** 2013 Jan;29(1):116-35.
23. ZARELA, B. A. Efeito de resinas experimentais contendo inibidores de proteases da matriz sobre gelatinases e colagenases. Dissertação

(Mestrado). Universidade de São Paulo. Faculdade de Odontologia de Bauru.
Bauru. 2013.