

## Redução da atividade proteolítica da dentina após curtos períodos de aplicação de proantocianidina

*Reduction of the dentin proteolytic activity after short periods of application of proanthocyanidin*

Cláudia Cristina DELGADO<sup>a</sup>, Débora Lopes Salles SCHEFFEL<sup>a</sup>, Régis Henke SCHEFFEL<sup>b</sup>,  
David PASHLEY<sup>b</sup>, Josimeri HEBLING<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Faculdade de Odontologia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil

<sup>b</sup>College of Dental Medicine, GRU - Georgia Regents University, Augusta, Georgia, Estados Unidos

### Resumo

**Introdução:** Agentes promotores de ligações cruzadas têm sido investigados como inibidores da atividade enzimática da dentina, o que favoreceria a longevidade das restaurações adesivas. **Objetivo:** Avaliar o efeito do tratamento da dentina com proantocianidina (PA), em curtos períodos de tempo, na inibição da atividade de MMPs *in situ*. **Material e método:** Quarenta espécimes de dentina (1×1×6 mm) foram obtidos de molares hígidos e divididos em quatro grupos (n=10). Os espécimes foram condicionados com ácido fosfórico por 15 s, seguido de lavagem em água deionizada. A dentina condicionada foi tratada com: água, 5% PA por 5 s, 15 s ou 30 s. A atividade de MMP foi analisada colorimetricamente (SensoLyte®) e os dados de absorbância (412 nm) foram submetidos aos testes de ANOVA e Tukey ( $\alpha=0,05$ ). **Resultado:** Todos os períodos de tratamento foram capazes de reduzir a atividade de MMPs, sendo que os melhores resultados foram observados para a dentina tratada com PA por 15 s (63,1% redução) e 30 s (70,2%). O tratamento por 5 s foi capaz de inibir 39,9% das MMPs. **Conclusão:** A aplicação de PA sobre a dentina condicionada foi capaz de reduzir a atividade de MMPs mesmo em períodos de tempo extremamente curtos, como 5 s. No entanto, melhores resultados foram obtidos com os maiores períodos de tratamento.

**Descritores:** Dentina; colágeno; metaloproteinase da matriz; proantocianidina.

### Abstract

**Introduction:** Collagen cross-linkers have been investigated as inhibitors of the enzymatic activity of dentin, therefore improving the longevity of adhesive restorations. **Purpose:** To evaluate the effect of etched dentin treatment with proanthocyanidin (PA) in short periods of time on the inhibition of dentin metalloproteinases (MMP) activity *in situ*. **Material and method:** Forty dentin specimens (1x1x6mm) were obtained from sound third molars and divided into 4 groups (n=10). The specimens were etched with 37% phosphoric acid for 15s and rinsed in deionized water. Then they were treated with the following solutions: water, 5% PA for 5s, 15s or 30s. The total MMP activity was analyzed by a colorimetric test (SensoLyte®). Absorbance data (412nm) were submitted to ANOVA and Tukey tests ( $\alpha=0.05$ ). **Result:** All treatment periods were able to reduce the total activity of MMPs. The best results were observed for dentine treated with PA for 15s (63.1% reduction) and 30s (70.2%). Treatment for 5s was capable of inhibiting only 39.9% of the total MMP activity. **Conclusion:** Application of PA on the etched dentin in extremely short periods of time reduced the MMPs activity of dentin, even after 5s. However, the best results were obtained for the longer periods.

**Descriptors:** Dentin; collagen; matrix-metalloproteinases; proanthocyanidin.

## INTRODUÇÃO

A busca pelo aumento da durabilidade e da estabilidade da união resina-dentina tem levado ao desenvolvimento de diferentes técnicas e materiais. A aplicação de agentes inibidores de proteases, como a clorexidina<sup>1</sup>, a redução do tempo de condicionamento ácido<sup>2</sup> e a tentativa de melhor infiltrar ou até mesmo remineralizar<sup>3,4</sup> o colágeno exposto na base da camada híbrida ainda apresentam

limitações e não atingiram completamente o objetivo de promover o estabelecimento de camadas híbridas mais homogêneas, confiáveis e estáveis em longo prazo<sup>5,6</sup>.

Descrita pela primeira vez por Nakabayashi et al.<sup>7</sup>, a camada híbrida é formada pela interpenetração dos monômeros que compõem os adesivos e as fibrilas de colágeno desmineralizadas

pelo condicionamento ácido. Assim, há a formação de uma estrutura mista, composta por colágeno encapsulado por material polimérico. Esta estrutura é responsável pela retenção micromecânica das restaurações resinosas e sua funcionalidade depende diretamente da integridade das fibrilas de colágeno e da qualidade da matriz polimérica que a compõe<sup>8</sup>, tanto para sistemas adesivos convencionais como para sistemas autocondicionantes<sup>6</sup>.

Durante o estabelecimento da camada híbrida, a remoção do conteúdo mineral superficial da dentina, além de expor fibrilas de colágeno, também libera proteases aprisionadas no processo de mineralização do tecido dentinário, como as metaloproteínas da matriz (MMPs)<sup>9</sup>. Estas enzimas hidrolisam o colágeno não protegido pelo sistema adesivo no interior da camada híbrida<sup>1</sup>, levando à redução da resistência de união entre restauração e dentina<sup>10</sup>.

Aumentar a resistência do colágeno à hidrólise, por meio da biomodificação desta proteína, pode ser uma alternativa eficaz para melhorar a estabilidade da interface adesiva. Substâncias naturais e sintéticas capazes de aumentar o número de ligações peptídicas intra e intermolecular, e microfibrilar de colágeno podem ser empregadas para este fim<sup>11</sup>. Estes formadores de ligações cruzadas exógenas também podem ser capazes de, simultaneamente, inibir MMPs e aumentar as propriedades mecânicas da matriz de colágeno desmineralizada<sup>12,13</sup>.

Os formadores de ligações cruzadas mais utilizados na Odontologia são o glutaraldeído (GD), a carbodi-imida [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) hidroclorito de carbodi-imida ou EDC] e as proantocianidinas (PAs)<sup>11</sup>. As proantocianidinas são metabólitos naturais provenientes de plantas, largamente encontrados em frutas, vegetais, nozes, sementes, flores e caules, sendo prevalentes em extratos de casca de pinheiros, ulmeiros e sementes de uva. A proantocianidina é considerada um formador de ligação cruzada natural de baixa citotoxicidade, capaz de interagir com proteínas ricas em prolina, como o colágeno<sup>11</sup>. A prolina aumenta a especificidade da interação com as PAs, favorecendo a formação de ligações de hidrogênio entre a carbonila da amida proteica com a hidroxila fenólica<sup>14</sup>. Além disso, tem sido demonstrado que as PAs também desempenham um papel importante tanto na inibição da produção das MMPs -1, -3, -7, -8, -9 e -13 liberadas pelos macrófagos quanto na atividade catalítica das MMPs -1 e -9<sup>15,16</sup>.

Estudos anteriores têm relatado que a aplicação de PA (extraída de semente de uva) na dentina desmineralizada apresenta resultados significativos tanto nas propriedades mecânicas como na resistência de união da interface adesiva após 10 e 60 minutos de tratamento. Entretanto, esses estudos apresentam como limitação comum o tempo de aplicação clinicamente inviável<sup>17,18</sup>. Já Liu et al.<sup>19</sup> demonstraram, indiretamente, que a biomodificação da dentina desmineralizada com PA por períodos de tempo clinicamente relevantes (10 segundos e 1 minuto) pode aumentar a resistência à degradação enzimática; porém, mais estudos ainda são necessários para confirmar diretamente o efeito antiproteolítico desse agente sobre a matriz dentinária desmineralizada por períodos de tempo clinicamente viáveis.

Dessa maneira, levando-se em consideração o pré-tratamento da dentina com PA após o condicionamento ácido e considerando-

se tempos de tratamento clinicamente relevantes, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da aplicação da PA extraída de sementes de uva em curtos períodos de tempo (5 s, 10 s e 30 s) sobre a inativação de MMPs *in situ*. A hipótese nula testada foi que o tratamento da dentina com PA em curtos períodos não é capaz de inibir MMPs.

## MATERIAL E MÉTODO

Quinze terceiros molares hígidos foram utilizados para este estudo, após a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Georgia Regents University- GRU, Augusta - GA, EUA. Os dentes foram mantidos em solução de timol 0,2% em temperatura de 4°C até o momento de sua utilização. Um disco de dentina de 1 mm de espessura foi obtido do terço médio da coroa de cada dente selecionado, utilizando-se uma cortadeira metalográfica (BuehlerLtd, Lake Bluff, IL, USA) sob constante irrigação.

Em seguida, estes discos foram seccionados em 40 espécimes em forma de palitos com dimensões de 1×1×6 mm (aproximadamente três espécimes por disco). Os espécimes foram divididos em quatro grupos (n=10), de acordo com as seguintes soluções e tempos de tratamento: água deionizada (controle positivo) (pH=6,7); PA 5% em água deionizada (Polyphenolics Inc, Madera, CA, EUA) (pH=5,2) por 5 s; PA 5% em água deionizada por 15 s ou PA 5% em água deionizada por 30 s. Cada palito foi condicionado com 300 µL de ácido fosfórico 37% por 15 s, lavado em água deionizada por 10 s e imerso pelo período determinado em 300 µL da solução de tratamento. Em seguida, os espécimes tratados foram lavados com água deionizada por 10 s e, individualmente, colocados em poços de uma placa de cultura de 96 poços, contendo 200 µL do substrato para determinação da atividade total de MMP (Kit Sensolyte, catalog N.º 72095, Ana Spec Inc, Fremont, CA, EUA). Após 60 minutos de incubação à temperatura ambiente, os palitos foram removidos e a placa de 96 poços foi levada para leitura da absorbância em espectrofotômetro (Synergy H1 Hybrid Reader, BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA) com comprimento de onda de 412 nm<sup>12,13</sup>. O substrato degradado pelas MMPs libera um grupo sulfidril que reage com o Reagente de Ellman, tendo como produto final o ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), um composto de cor amarelada. Quanto maior os valores de absorbância, maior a atividade destas proteases. Dessa forma, a atividade total de MMP foi determinada por meio dos valores de absorbância obtidos para cada poço subtraído do valor do *blank*, correspondente apenas ao valor de absorbância do substrato. A porcentagem de inibição de MMPs foi calculada utilizando o grupo controle (água deionizada) como 100% de atividade.

### Análise Estatística

Os dados de absorbância, representativos da atividade total de MMPs, foram inicialmente analisados quanto à sua aderência à curva normal (Shapiro-Wilks) e à homocedasticidade (Levene). Uma vez respeitados os requisitos de normalidade e homocedasticidade (p>0,05), os dados foram submetidos ao teste de ANOVA a um critério fixo ("tratamento da dentina condicionada"), complementado por testes de Tukey para comparações múltiplas dos grupos. Em seguida,

foram transformados em porcentagem de inibição da atividade de MMPs considerando-se o grupo controle (água deionizada) como 100% de atividade.

## RESULTADO

Os valores de absorvância e porcentagem de inibição da atividade total de MMPs na dentina condicionada tratada com PA estão apresentados na Tabela 1. Independentemente do tempo de aplicação, a PA foi capaz de significativamente reduzir a atividade total de MMPs da dentina condicionada, em comparação ao controle ( $p < 0,05$ ). Entretanto, o tratamento da dentina condicionada com PA 5% por 15 s e 30 s resultou nas maiores porcentagens de inibição da atividade de MMPs, com 63,1% e 70,2%, respectivamente. Não foi observada diferença estatística entre estes dois grupos ( $p = 0,575$ ). Embora a PA 5% aplicada na dentina por apenas 5 s também tenha sido capaz de inibir MMPs quando comparada à aplicação de água (controle,  $p < 0,0001$ ), a porcentagem de inibição foi significativamente menor (39,9%) à observada para os demais tempos de tratamento realizados, de 15 s e 30 s ( $p < 0,0001$ ).

## DISCUSSÃO

A utilização de PAs visando à inibição de proteases tem sido investigada não somente buscando a estabilidade da união resina-dentina, mas também para a prevenção e a redução de câncer<sup>20</sup>, e controle da progressão de doenças periodontais<sup>15,21</sup>. As MMPs são proteases zinco/cálcio dependentes que necessitam de íons cálcio para manter sua estrutura terciária, bem como de íons zinco para catalisar o processo de hidrólise. Estas enzimas degradam as proteínas da matriz extracelular e regulam o metabolismo fisiológico e patológico de tecidos à base de colágeno<sup>22</sup>.

As MMPs são secretadas como proenzimas na matriz dentinária e participam do processo de mineralização deste tecido<sup>9</sup>. Quando o conteúdo mineral da dentina é removido, seja por um processo de cárie ou pelo condicionamento com ácido fosfórico, as MMPs são liberadas e ativadas, podendo degradar as fibrilas de colágeno expostas na base da camada híbrida<sup>1,5</sup>. Embora existam 26 MMPs identificadas, as MMP-2, MMP-9<sup>23</sup>, MMP-3<sup>24</sup>, MMP-8<sup>25</sup> e MMP-20<sup>26</sup> têm sido relacionadas ao processo de degradação da interface adesiva. Estas proteases se ligam às moléculas de colágeno clivando-as

nos fragmentos 'um quarto' e 'três quartos' da ligação peptídica Glicina/Isoleucina; a estrutura peptídica do colágeno determina a especificidade da clivagem e o sítio de ligação para as MMPs<sup>27</sup>.

A literatura tem demonstrado que o uso de agentes formadores de ligações cruzadas na matriz de colágeno desmineralizada promove a estabilidade dos polipeptídios e a inativação do sítio catalítico das proteases, por meio da formação de novas ligações covalentes entre os peptídeos adjacentes<sup>6</sup>. Vários agentes formadores de ligações cruzadas têm sido aplicados na Odontologia, como o glutaraldeído (GD), a carbodi-imida [1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) hidroclorito de carbodi-imida ou EDC] e as proantocianidinas (PAs). Dentre estes, as proantocianidinas (ou taninos condensados) são os únicos agentes naturais. Estas são compostas por subunidades de flavan-3-ol unidas por ligações de C4-C8<sup>11</sup>, que têm o potencial de inibir a produção e a ativação das MMPs<sup>15</sup>, além de apresentarem propriedades antimicrobianas, baixa toxicidade, baixo custo e fácil obtenção, uma vez que são provenientes de sementes ou frutas encontradas abundantemente na natureza<sup>11</sup>. O mecanismo de ação por trás da capacidade das proantocianidinas em inibir proteases ainda não está bem definido; ou seja: seu efeito é inespecífico, podendo envolver diversos mecanismos diferentes<sup>11</sup>.

A metodologia utilizada neste estudo é uma avaliação colorimétrica da atividade total de MMPs ligadas à matriz de colágeno; este é um método *in vitro* que não representa com acurácia a condição clínica. Além disso, só foi avaliada a atividade de MMPs logo após o tratamento, não sendo possível constatar o efeito da PA em longo prazo. Apesar de suas limitações, o presente estudo demonstrou que a PA 5% aplicada por períodos de tempo entre 5 s e 30 s foi capaz de reduzir significativamente a atividade de MMPs na dentina condicionada, em comparação ao grupo controle, sendo que os melhores resultados foram observados para os períodos mais longos (15 s e 30 s). Essas verificações sugerem, dessa forma, que sua ação é tempo-dependente, ou seja, quanto maior o período de contato entre a PA e o colágeno desmineralizado, maior a quantidade de MMPs que interage com a solução e, conseqüentemente, maior a inibição de MMPs.

Dessa maneira, estes resultados levam à rejeição da hipótese nula de que o tratamento da dentina com PA em curtos períodos de tempo não é capaz de inibir MMPs *in situ*. Além disso, pode-se sugerir que a aplicação de PA previamente ao sistema adesivo pode aumentar a durabilidade e a estabilidade da interface adesiva por

**Tabela 1.** Atividade de metaloproteinases (MMPs) na dentina condicionada e tratada com Proantocianidina 5% por diferentes tempos de aplicação, expressa como absorvância a 412 nm, e porcentagem de inibição

	TRATAMENTO DA DENTINA CONDICIONADA			
	Água (controle)	PA 5% 5 s	PA 5% 15 s	PA 5% 30 s
Absorvância	0,32±0,05 <sup>c</sup>	0,20±0,05 <sup>b</sup>	0,12±0,03 <sup>a</sup>	0,10±0,02 <sup>a</sup>
% inibição	0 <sup>c</sup>	39,9±15,7 <sup>B</sup>	63,1±9,8 <sup>A</sup>	70,2±6,8 <sup>A</sup>

PA=Proantocianidina. Números são média±desvio padrão, n=10. Médias indicadas por letras iguais nas linhas não diferem estatisticamente (Tukey,  $p > 0,05$ ). s=segundos.

meio da redução da atividade de MMPs; porém, mais estudos são necessários para investigar os efeitos em longo prazo da aplicação desse agente *cross-linker* tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

5 s. No entanto, os melhores resultados foram obtidos quando os períodos mais longos, 15 s ou 30 s, foram utilizados.

## CONCLUSÃO

Com base na metodologia desenvolvida e nos resultados obtidos, pôde ser concluído que a PA foi capaz de inativar a atividade de MMPs mesmo em períodos de tempo extremamente curtos, como

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às agências brasileiras de fomento à pesquisa, CAPES (Proc. n.º 693711-0), CNPq (Proc. n.º 305204/2010-6) e FAPESP (Proc. n.º 2012/08866-4 e 2013/20585-3), pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

1. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers *in vivo*. *J Dent Res*. 2005 Aug;84(8):741-6. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910508400811>. PMID:16040733.
2. Scheffel DL, Ricci HA, Costa CAS, Pashley DH, Hebling J. Effect of reducing acid etching time on bond strength to noncarious and caries-affected primary and permanent dentin. *Pediatr Dent*. 2013 Nov-Dec;35(7):199-204. PMID:24553267.
3. Talungchit S, Jessop JL, Cobb DS, Qian F, Geraldini S, Pashley DH, et al. Ethanol-wet bonding and chlorhexidine improve resin-dentin bond durability: quantitative analysis using raman spectroscopy. *J Adhes Dent*. 2014 Oct;16(5):441-50. <http://dx.doi.org/10.3290/j.jad.a32695>. PMID:25202747.
4. Tay FR, Pashley DH. Biomimetic remineralization of resin-bonded acid-etched dentin. *J Dent Res*. 2009 Aug;88(8):719-24. <http://dx.doi.org/10.1177/0022034509341826>. PMID:19734458.
5. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater*. 2011 Jan;27(1):1-16. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.016>. PMID:21112620.
6. Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, et al. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res*. 2011 Aug;90(8):953-68. <http://dx.doi.org/10.1177/0022034510391799>. PMID: 21220360.
7. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res*. 1982 May;16(3):265-73. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.820160307>. PMID:7085687.
8. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res*. 2004 Mar;83(3):216-21. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910408300306>. PMID:14981122.
9. Fanchon S, Bourd K, Septier D, Everts V, Beertsen W, Menashi S, et al. Involvement of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. *Eur J Oral Sci*. 2004 Apr;112(2):171-6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0722.2004.00120.x>. PMID:15056115.
10. Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res*. 2003 Feb;82(2):136-40. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910308200212>. PMID:12562888.
11. Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, et al. Dentin biomodification: strategies, renewable resources and clinical applications. *Dent Mater*. 2014 Jan;30(1):62-76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2013.10.012>. PMID:24309436.
12. Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee KA, Cadenaro M, Turco G, et al. Stabilization of dentin matrix after cross-linking treatments, *in vitro*. *Dent Mater*. 2014 Feb;30(2):227-33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2013.11.007>. PMID:24332989.
13. Scheffel DL, Hebling J, Scheffel RH, Agee K, Turco G, Costa CAS, et al. Inactivation of matrix-bound matrix metalloproteinases by cross-linking agents in acid-etched dentin. *Oper Dent*. 2014 Mar-Apr;39(2):152-8.; <http://dx.doi.org/10.2341/12-425-L>. PMID:23786610.
14. Hagerman AE, Butler LG. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J Biol Chem*. 1981 May;256(9):4494-7. PMID:7217094.
15. La VD, Howell AB, Grenier D. Cranberry proanthocyanidins inhibit MMP production and activity. *J Dent Res*. 2009 Jul;88(7):627-32. <http://dx.doi.org/10.1177/0022034509339487>. PMID:19641150.
16. La VD, Bergeron C, Gafner S, Grenier D. Grape seed extract suppresses lipopolysaccharide-induced matrix metalloproteinase (MMP) secretion by macrophages and inhibits human MMP-1 and -9 activities. *J Periodontol*. 2009 Nov;80(11):1875-82. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2009.090251>. PMID:19905958.
17. Al-Amr A, Drummond JL, Bedran-Russo AK. The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2009 Oct;91B(1):419-24. <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.31417>. PMID:19507140.
18. Santos PH, Karol S, Bedran-Russo AK. Long-term nano-mechanical properties of biomodified dentin-resin interface components. *J Biomech*. 2011 Jun;44(9):1691-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2011.03.030>. PMID:21530969.
19. Liu Y, Chen M, Yao X, Xu C, Zhang Y, Wang Y. Enhancement in dentin collagen's biological stability after proanthocyanidins treatment in clinically relevant time periods. *Dent Mater*. 2013 Apr;29(4):485-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2013.01.013>. PMID:23434233.
20. Katiyar SK. Matrix metalloproteinases in cancer metastasis: molecular targets for prostate cancer prevention by green tea polyphenols and grape seed proanthocyanidins. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2006 Mar;6(1):17-24. <http://dx.doi.org/10.2174/187153006776056648>. PMID:16611161.
21. Tipton DA, Babu JP, Dabbous MK. Effects of cranberry components on human aggressive periodontitis gingival fibroblasts. *J Periodontol Res*. 2013 Aug;48(4):433-42. <http://dx.doi.org/10.1111/jre.12023>. PMID:23106206.



22. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006 Feb;69(3):562-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.12.002>. PMID:16405877.
23. Mazzoni A, Mannello F, Tay FR, Tonti GA, Papa S, Mazzotti G, et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and -9 forms in human sound dentin. *J Dent Res.* 2007 May;86(5):436-40. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910708600509>. PMID:17452564.
24. Boukpepsi T, Menashi S, Camoin L, Tencate JM, Goldberg M, Chaussain-Miller C. The effect of stromelysin-1 (MMP-3) on non-collagenous extracellular matrix proteins of demineralized dentin and the adhesive properties of restorative resins. *Biomaterials.* 2008 Nov;29(33):4367-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.07.035>. PMID:18760468.
25. Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol.* 2007 Feb;52(2):121-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.08.009>. PMID:17045563.
26. Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase-20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res.* 2002 Sep;81(9):603-7. <http://dx.doi.org/10.1177/154405910208100905>. PMID:12202640.
27. Perumal S, Antipova O, Orgel JPRO. Collagen fibril architecture, domain organization, and triple-helical confirmation govern its proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008 Feb;105(8):2824-9. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0710588105>. PMID:18287018.

## CONFLITOS DE INTERESSE

---

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## \*AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

---

Josimeri Hebling, Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Rua Humaitá, 1680, 14801-903 Araraquara - SP, Brasil, e-mail: [jhebling@foar.unesp.br](mailto:jhebling@foar.unesp.br)

Recebido: Fevereiro 12, 2015  
Aprovado: Julho 30, 2015