

BIOMODIFICAÇÃO DAS MATRIZES DENTINÁRIAS E TERAPIA DE REPARO APÓS  
USO DE AGENTES RETICULADORES DE COLÁGENO NA ADESÃO À DENTINA  
CARIADA

Ana Claudia Tanús Marques de Mendonça

2020

ANA CLAUDIA TANÚS MARQUES DE MENDONÇA<sup>^</sup>

BIOMODIFICAÇÃO DAS MATRIZES DENTINÁRIAS E TERAPIA DE REPARO APÓS  
USO DE AGENTES RETICULADORES DE COLÁGENO NA ADESÃO À DENTINA  
CARIADA

Trabalho de dissertação apresentado  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Odontologia da Universidade CEUMA  
como pré-requisito para obtenção do  
título de Mestre em Odontologia.  
Área de concentração: Odontologia  
Integrada

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ceci Nunes  
Carvalho  
Co-orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Viviane  
Hass

Nome: Ana Claudia Tanús Marques de Mendonça

Título: Biomodificação das matrizes dentinárias e terapia de reparo após uso de agentes reticuladores de colágeno na adesão à dentina cariada.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade CEUMA como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ceci Nunes Carvalho

Instituição: Universidade Ceuma

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr Andre Guaraci De Vito Moraes

Instituição: Universidade 9 de Julho Uninove

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Meire Coelho Ferreira

Instituição: Universidade Ceuma

Assinatura: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, por me permitir superar cada dificuldade e me conceder a graça de alcançar essa conquista.

Aos meus pais, Acyr e Ana Tereza, por sempre acreditarem em mim, me incentivarem, e acima de tudo, por me amarem incondicionalmente.

Aos meus filhos Mateus e Maria Fernanda, e ao meu marido André, pois vocês são sem dúvidas o motivo de me fazer sempre estudar mais e querer o melhor da vida para nossa família. Todo meu amor e gratidão.

Aos meus amigos e companheiros de Mestrado, a nossa união, o apoio e o ombro amigo de cada um de vocês tornaram essa jornada menos árdua e mais alegre. Terão sempre a minha amizade.

A minha orientadora, Professora Doutora Ceci Nunes Carvalho, pelos ensinamentos, por ser exemplo de ética e competência, por sua capacidade de ensinar, ressaltar, orientar e compreender cada circunstância vivida ao longo desses dois anos de curso.

À Professora Viviane que sempre me contagiou com a sua dedicação e inteligência, sempre disposta a contribuir mesmo à distância.

À Luana e Rossana, amigas de anos, que mais uma vez foram parceiras incríveis em mais uma árdua jornada, me ajudando e sendo essenciais no meu desenvolvimento. Minha eterna amizade e gratidão.

À Universidade Ceuma, bem como a direção, administração, à Erymonica e principalmente aos docentes que permitiram a realização de um sonho. Meu muito obrigada.

*“A única revolução possível é dentro de nós.” (Mahatama Gandhi)*

MENDONCA, ACTM. Biomodificação das matrizes dentinárias e terapia de reparo após uso de agentes reticuladores de colágeno na adesão à dentina cariada: [dissertação]. São Luís. Universidade CEUMA; 2020.

## RESUMO

**Introdução:** O tecido dental cariado apresenta severas modificações como a perda do conteúdo mineral e atividade enzimática acentuada por metaloproteinases, levando à desnaturação e degradação das fibrilas colágenas (que são o principal componente orgânico da dentina). Essas alterações levam à uma diminuição da efetividade da adesão nesse substrato, o que dificulta a reabilitação do elemento dental perdido. Assim, o uso de agentes reticuladores de colágeno é uma alternativa interessante na terapia de reparo durante o procedimento restaurador. **Objetivo:** Avaliar o efeito do uso de agentes reticuladores de colágeno (proantocianidina 6,5% (PA), riboflavina 0,1% (RB), curcumina 200  $\mu$ M (CURC) e água destilada como controle (CT) na forma de primers dentinários, na resistência de união imediata e após 24 meses de armazenamento à dentina afetada por cárie (CAD) com um sistema adesivo convencional simplificado e análise da atividade de metaloproteinases (MMPs) e morfológica dentro da camada híbrida. **Materiais e métodos:** As superfícies dentinárias de quarenta molares humanos cariados (ICDAS 5) e 10 molares hígidos foram condicionadas com ácido fosfórico 37% por 15 s e lavadas pelo mesmo tempo em água corrente e tratadas com os primers contendo agentes reticuladores PA, RB, CURC e CT por 1 min. O grupo CT foi avaliado tanto em CAD quanto em dentina saudável [SD]. Na sequência, foi aplicado o Adper Single Bond Plus sobre a dentina, seguido de restauração com resina composta. As amostras foram seccionadas em espécimes e testadas imediatamente e após 24 meses de armazenamento quanto à resistência de união por microtração ( $\mu$ TBS) e análise da atividade de metaloproteinases (MMPs) e morfológica dentro da camada híbrida. **Resultados:** Quando comparado em tempo imediato, os agentes de tratamento PA e CURC proporcionaram na CAD valores estatisticamente similares ao grupo CT-SD, ( $p > 0,05$ ), e menores valores foram detectados para CT-CAD ( $p < 0,001$ ). O grupo CAD-RB

apresentou valores intermediários, mas estatisticamente menores em relação ao CT-SD ( $p < 0,05$ ). Após 2 anos, apenas os grupos controles sofreram redução estatisticamente significantes em relação ao tempo imediato ( $p < 0,001$ ). Já para todos os agentes de tratamento, mesmo havendo uma degradação dos valores, essa não foi estatisticamente significativa, proporcionando assim médias estatisticamente similares ao tempo imediato ( $p > 0,05$ ). Maior atividade de MMPs foi detectada para CT-CAD em comparação aos demais grupos ( $p < 0,001$ ). Menor atividade foi detectada para os grupos CT-SD, CAD-RB e CAD-PA, enquanto o grupo CAD-CURC demonstrou valores intermediários, ( $p < 0,001$ ). O grupo CT-CAD demonstrou uma camada híbrida pobremente formada, com ausência de *tags* resinosos e falta de hibridização. Ao contrário, os grupos CAD após tratamento com agentes reticuladores aumentaram a hibridização pelo sistema adesivo, demonstrando numerosos *tags* resinosos, da mesma maneira que para dentina sadia (CT-SD). **Conclusão:** O uso de agentes reticuladores, especialmente a PA e a CURC promoveram aumento da resistência de união à dentina afetada por cárie quando comparados ao CT e RB e demonstraram maior habilidade de hibridização do sistema adesivo de acordo com a análise morfológica da camada híbrida.

Palavras-chave: Cárie dental. Colágeno. Proantocianidina. Agentes reticuladores.

MENDONCA, ACTM. Biomodification of dentin matrices and repair therapy after use of collagen crosslinking agents in adhesion to carious dentin: [dissertation]. São Luís. CEUMA University; 2020.

## **ABSTRACT**

**Introduction:** Decayed dental tissue showed severe changes such as loss of mineral content and marked enzymatic activity by metalloproteinases, leading to the denaturation and degradation of collagen fibrils (which are the main organic component of dentin). These changes lead to a decrease in the effectiveness of adhesion on this substrate, which makes it difficult to rehabilitate the lost dental element. Thus, the use of collagen crosslinking agents is an interesting alternative in repair therapy during the restorative procedure. **Objective:** To evaluate the effect of the use of collagen crosslinking agents (proanthocyanidin 6.5% (PA), riboflavin 0.1% (RB), 200  $\mu$ M curcumin (CURC) and distilled water as a control (CT) in the form of dentine primers, in immediate bond strength and after 24 months of storage to dentine affected by caries (CAD) with a simplified conventional adhesive system and analysis of metalloproteinase (MMPs) and morphological activity within the hybrid layer. **Materials and methods:** The dentin surfaces of forty decayed human molars (ICDAS 5) and 10 healthy molars were conditioned with 37% phosphoric acid for 15 s and washed for the same time in running water and treated with primers containing PA, RB, CURC and CT cross-linking agents for 1 min. The CT group was evaluated for both CAD and healthy dentin [SD]. Then, Adper Single Bond Plus was applied to the dentin, followed by restoration with composite resin. The samples were sectioned in specimens and tested immediately and after 24 months

of storage for microtensile bond strength ( $\mu$ TBS) and analysis of metalloproteinase (MMPs) and morphological activity within the hybrid layer. **Results:** When compared immediately, the treatment agents PA and CURC provided values in CAD statistically similar to the group CT-SD, ( $p > 0.05$ ), and lower values were detected for CT-CAD ( $p < 0.001$ ). The CAD-RB group presented intermediate values, but statistically lower than the CT-SD ( $p < 0.05$ ). After 2 years, only the control groups suffered a statistically significant reduction in relation to the immediate time ( $p < 0.001$ ). For all treatment agents, even with a degradation of the values, this was not statistically significant, thus providing averages statistically similar to the immediate time ( $p > 0.05$ ). Higher activity of MMPs was detected for CT-CAD compared to the other groups ( $p < 0.001$ ). Less activity was detected for the CT-SD, CAD-RB and CAD-PA groups, while the CAD-CURC group showed intermediate values, ( $p < 0.001$ ). The CT-CAD group demonstrated a poorly formed hybrid layer, with the absence of resinous tags and lack of hybridization. On the contrary, the CAD groups after treatment with crosslinking agents increased hybridization by the adhesive system, demonstrating numerous resin tags, in the same way as for healthy dentin (CT-SD). **Conclusion:** The use of crosslinking agents, especially PA and CURC promoted increased bond strength to dentin affected by caries when compared to CT and RB and demonstrated greater ability to hybridize the adhesive system according to the morphological analysis of the hybrid layer.

Key words: Tooth decay. Collagen. Proanthocyanidin. Cross-linking agents.

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

<b>Tabela 1:</b> Médias e desvios-padrões da resistência de união à dentina, para todos os grupos experimentais.....	24
<b>Figura 1:</b> Fotomicrografias representativas da análise da atividade de MMPs 2 e 9 na camada híbrida por microscopia confocal a laser.....	25
<b>Figura 2 :</b> Dados da porcentagem de área fluorescente em camada híbrida demonstrando porcentagem de atividade de MMPs 2 e 9 para todos os grupos experimentais.....	25
<b>Figura 3:</b> Fotomicrografias obtidas da análise da morfologia da camada híbrida formada, por microscopia eletrônica de varredura (3000 X acima, e 5000 X abaixo)	26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
S	Segundos
°C	Grau Celsius
Mpa	Mega Pascal
<	Menor que
>	Maior que
P	Probabilidade
N	Número amostral
Mw/cm <sup>2</sup>	MiliWatt por centímetro quadrado
h	Hora
mm <sup>2</sup>	Milímetro quadrado( unidade de área)
Min	Minuto
Mm/min	Milímetro por minuto
Nm	Nanometro
X	Número de vezes
F/l	Flúor por litro
ml	Mililitro
M	Molar
Mg	Miligrama
Ph	Potencial hidrogeniônico
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO</b> .....	14
<b>RESUMO</b> .....	15
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2- METODOLOGIA</b> .....	19
2.1- Aspectos éticos.....	19
2.2- Agentes reticuladores .....	23
2.3- Preparo dos dentes.....	19
2.4- Procedimento adesivo e restaurador.....	21
2.5- Resistência de união a dentina.....	22
2.6- Análise da morfologia da camada híbrida.....	23
2.7- Análise estatística.....	24
<b>3- RESULTADOS</b> .....	25
3.1 Resistência de união.....	26
3.2 Atividade das MMPs na camada híbrida.....	27
3.3 Morfologia da camada híbrida.....	28
<b>4- DISCUSSÃO</b> .....	28
<b>5- CONCLUSÃO</b> .....	33
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	34
<b>ANEXO</b> .....	37

# ***CAPÍTULO 1***

MENDONCA, ACTM. Biomodificação das matrizes dentinárias e terapia de reparo após uso de agentes reticuladores de colágeno na adesão à dentina cariada: [dissertação]. São Luís. Universidade CEUMA; 2020.

## RESUMO

**Introdução:** O tecido dental cariado apresenta severas modificações como a perda do conteúdo mineral e atividade enzimática acentuada por metaloproteinases, levando à desnaturação e degradação das fibrilas colágenas (que são o principal componente orgânico da dentina). Essas alterações levam à uma diminuição da efetividade da adesão nesse substrato, o que dificulta a reabilitação do elemento dental perdido. Assim, o uso de agentes reticuladores de colágeno é uma alternativa interessante na terapia de reparo durante o procedimento restaurador. **Objetivo:** Avaliar o efeito do uso de agentes reticuladores de colágeno (proantocianidina 6,5% (PA), riboflavina 0,1% (RB), curcumina 200  $\mu$ M (CURC) e água destilada como controle (CT) na forma de primers dentinários, na resistência de união imediata e após 24 meses de armazenamento à dentina afetada por cárie (CAD) com um sistema adesivo convencional simplificado e análise da atividade de metaloproteinases (MMPs) e morfológica dentro da camada híbrida. **Materiais e métodos:** As superfícies dentinárias de quarenta molares humanos cariados (ICDAS 5) e 10 molares hígidos foram condicionadas com ácido fosfórico 37% por 15 s e lavadas pelo mesmo tempo em água corrente e tratadas com os primers contendo agentes reticuladores PA, RB, CURC e CT por 1 min. O grupo CT foi avaliado tanto em CAD quanto em dentina saudável [SD]. Na sequência, foi aplicado o Adper Single Bond Plus sobre a dentina, seguido de restauração com resina composta. As amostras foram seccionadas em espécimes e testadas imediatamente e após 24 meses de armazenamento quanto à resistência de união por microtração ( $\mu$ TBS) e análise da atividade de metaloproteinases (MMPs) e morfológica dentro da camada híbrida. **Resultados:** Quando comparado em tempo imediato, os agentes de tratamento PA e CURC proporcionaram na CAD valores estatisticamente similares ao grupo CT-SD, ( $p > 0,05$ ), e menores valores foram detectados para CT-CAD ( $p < 0,001$ ). O grupo CAD-RB

apresentou valores intermediários, mas estatisticamente menores em relação ao CT-SD ( $p < 0,05$ ). Após 2 anos, apenas os grupos controles sofreram redução estatisticamente significantes em relação ao tempo imediato ( $p < 0,001$ ). Já para todos os agentes de tratamento, mesmo havendo uma degradação dos valores, essa não foi estatisticamente significativa, proporcionando assim médias estatisticamente similares ao tempo imediato ( $p > 0,05$ ). Maior atividade de MMPs foi detectada para CT-CAD em comparação aos demais grupos ( $p < 0,001$ ). Menor atividade foi detectada para os grupos CT-SD, CAD-RB e CAD-PA, enquanto o grupo CAD-CURC demonstrou valores intermediários, ( $p < 0,001$ ). O grupo CT-CAD demonstrou uma camada híbrida pobremente formada, com ausência de *tags* resinosos e falta de hibridização. Ao contrário, os grupos CAD após tratamento com agentes reticuladores aumentaram a hibridização pelo sistema adesivo, demonstrando numerosos *tags* resinosos, da mesma maneira que para dentina sadia (CT-SD). **Conclusão:** O uso de agentes reticuladores, especialmente a PA e a CURC promoveram aumento da resistência de união à dentina afetada por cárie quando comparados ao CT e RB e demonstraram maior habilidade de hibridização do sistema adesivo de acordo com a análise morfológica da camada híbrida.

Palavras-chave: Cárie dental. Colágeno. Proantocianidina. Agentes reticuladores

## 1. INTRODUÇÃO

A doença cárie ainda é considerada uma endemia mundial, principalmente entre crianças e adolescentes e embora políticas de saúde progrediram em relação ao declínio dessa doença, pode-se constatar ainda uma alta prevalência principalmente nas regiões nordeste e norte do Brasil<sup>1</sup>, dessa forma, a cárie dental ainda representa um grande desafio nos aspectos de controle e prevenção da doença, bem como no tratamento reabilitador <sup>2</sup>.

A cárie dentária é definida como uma doença multifatorial que resulta de um desequilíbrio do processo dinâmico de des-remineralização no meio bucal, tendo como consequência a perda de minerais. Essa desmineralização é causada por ácidos produzidos pela fermentação bacteriana de carboidratos da dieta, especialmente a sacarose <sup>3</sup>.

Para que ocorra a progressão da cárie em dentina, é necessário que haja uma invasão bacteriana ao longo da junção dentina-esmalte. A dentina, por sua vez é um tecido mineralizado sustentado por fibras colágenas e preenchido na região inter e intra-fibrilar por cristais inorgânicos de hidroxiapatita embutidos em uma matriz extracelular. O colágeno tipo I é o principal componente não-mineral, representando até 90% do material orgânico e desempenha um papel importante em relação às propriedades biomecânicas da dentina. <sup>4,5</sup>.

Sabe-se que além da perda mineral, o processo de formação da cárie dental envolve a destruição gradual das fibrilas colágenas <sup>3,6</sup> Isso ocorre pela presença de

enzimas endógenas presentes na dentina, as matrizes de metaloproteinases (MMPs) derivadas do hospedeiro. Dentre as diversas MMPs que compõem o complexo endógeno, as MMPs 2, 8 e 9 apresentam significativa importância nos processos restauradores, pois são enzimas colagenolíticas e gelatinolíticas responsáveis pela degradação do colágeno dental e pela degradação da interface de união à dentina.<sup>7 8-</sup>

Devido às diversas alterações no tecido dental afetado por cárie o potencial adesivo ao substrato dental é dificultado, resultando em baixas propriedades adesivas à dentina em relação ao substrato dentinário sadio. Considerando que o elemento dental afetado por cárie depois de controlada a doença, necessitará de procedimento restaurador para reabilitação, existe necessidade de alternativas para melhorar o potencial de adesão neste substrato.<sup>2,9,10</sup>

O uso de agentes reticuladores de colágeno parece uma alternativa interessante, pois esses agentes são capazes de induzir ligações cruzadas inter e intrafibras colágenas<sup>11,12,13</sup>. Esses agentes aumentam as propriedades mecânicas do colágeno, reduzem a atividade enzimática, aumentam as propriedades adesivas da dentina e ainda reduzem a degradação da interface de união dentina-resina<sup>14</sup>. Dentre os agentes mais investigados estão a proantocianidina do extrato de semente de uva, a riboflavina e recentemente a curcumina<sup>15</sup>. Contudo esses agentes foram investigados somente em dentina sadia, e não em dentina afetada por cárie.

Assim, esse estudo avaliou o uso de agentes reticuladores de colágeno, especificamente a proantocianidina, riboflavina e curcumina, na adesão à dentina afetada por cárie (DAC), com um sistema adesivo convencional simplificado através do teste de microtração imediato e após 24 meses de armazenamento e análise da atividade de

metaloproteinases (MMPs) e morfológica dentro da camada híbrida. A hipótese nula testada foi de que o uso de agentes reticuladores de colágeno não afetam as propriedades adesivas testadas.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 ASPECTOS ÉTICOS**

Este estudo foi aprovado previamente pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Parecer: 314.563).

### **2.2 AGENTES RETICULADORES**

Os primers contendo os agentes reticuladores foram preparados em água destilada e a concentração foi em peso para cada agente. A proantocianidina foi preparada a 6,5%, a riboflavina a 0,1% e a curcumina a 200  $\mu$ M. Como grupo controle foi utilizada apenas água destilada.

### **2.3 PREPARO DOS DENTES**

Quarenta molares humanos cariados ICDAS 5 <sup>16</sup> e dez molares humanos hígidos foram utilizados para os testes de resistência de união à dentina (n=5). Esses dentes foram extraídos por indicação e necessidade odontológica, após doação com termo de consentimento livre e esclarecido de acordo com o processo de aprovação previsto pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade. O esmalte da superfície oclusal e das bordas periféricas foram removidos com lixas de carbetto de silício (SiC) e granulação

#180 e pontas diamantadas cilíndricas em alta rotação (KG SORENSEN, Cotia, SP, Brasil). A superfície oclusal de dentina infectada foi removida com curetas dentinárias, pelo método de escavação manual seletiva<sup>17</sup> e a dentina afetada foi preservada. Onde a dentina infectada foi considerada a zona mais superficial, necrótica e desmineralizada apresentando-se clinicamente como uma massa amarelada e amolecida. Já a dentina afetada, foi considerada a zona mais profunda, apresentando pequenas alterações de suas fibras colágenas, é passível de remineralização e clinicamente é vista com uma coloração castanha e consistência endurecida<sup>18</sup>. O esmalte periférico foi removido e após isso, essa superfície foi lixada em lixa de SiC #600 por 60 s para padronização da smear layer. Nesta etapa, os dentes foram aleatoriamente divididos em 8 grupos (n=5) de acordo com os agentes reticuladores de colágeno utilizados e o tempo imediato ou 24 horas de armazenamento: proantocianidina 6,5%, riboflavina 0,1%, curcumina 200  $\mu$ M e água destilada como grupo controle.

Adicionalmente o CT foi realizado também em dentina sadia (SD) nos tempos imediato ou 24 horas de armazenamento.

#### 2.4 PROCEDIMENTO ADESIVO E RESTAURADOR

A dentina de todos os dentes foi condicionada com ácido fosfórico à 37% (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) por 15 s e lavada pelo mesmo tempo em água corrente. Em seguida, os agentes reticuladores: proantocianidina, curcumina e a riboflavina que previamente foram ativados com luz ultravioleta (UVA) durante 2 minutos, foram aplicados por 60s na dentina desmineralizada. Logo após a aplicação dos agentes, o sistema adesivo Adper Single Bond 2 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foi aplicado e fotoativado de acordo com as

instruções do fabricante. Na sequência, os dentes foram restaurados com resina composta (RC) (Filtek Supreme Ultra, 3M Oral Care, St. Paul, MN, EUA) em 2 incrementos de 2 mm cada. Cada incremento foi fotoativado (Radii Cal, SDI, Bayswater, Victoria, Australia; 1200 mW/cm<sup>2</sup>) por 40s. Então, os dentes restaurados foram armazenados em água destilada a 37° C por 24h (tempo imediato) ou por 24 meses, para depois serem submetidos ao seccionamento para confecção de espécimes para os testes desse estudo.

## 2.5 RESISTÊNCIA DE UNIÃO À DENTINA

Os dentes foram fixados com cera pegajosa num dispositivo e adaptado em uma máquina de corte (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA). Os dentes foram seccionados nas direções “x” e “y” através da interface de união para obtenção de espécimes na forma de “palitos” com aproximadamente 0,8 mm<sup>2</sup> de área de secção transversal.

Depois, cada espécime teve sua área de secção transversal mensurada com paquímetro digital (Mitutuyo, Tóquio, Japão) e foi fixado com cola de cianoacrilato em gel (Cola 454, Loctite, São Paulo, Brasil) em um dispositivo de microtração submetidos à uma máquina de ensaios universal (EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brasil) numa velocidade de 0,5 mm/min. A análise do modo de fratura dos espécimes foi realizada com o auxílio de uma lupa (40X) e classificada nos seguintes padrões: 1- adesiva/mista na interface; 2- coesiva de dentina ou resina; 3- perda prematura.

## 2.5 ATIVIDADE DAS MMPs NA CAMADA HÍBRIDA

Outros três terceiros molares cariados selecionados e com tecido dentinário infectado foram utilizados para zimografia *in situ* para análise da atividade de MMPs 2 e

9. Para isso, cada dente foi seccionado em 4 partes e cada uma dessas partes foi distribuída entre os grupos experimentais CAD, de modo a obter espécimes do mesmo dente para cada grupo. Essas partes foram então tratadas e restauradas da mesma maneira que para os outros experimentos, e seccionadas perpendicularmente à interface de união, de modo a obter 2 fatias de 50 µm de espessura. Essas fatias foram fixadas em lamínulas de vidro para microscopia, e então receberam gelatina conjugada de fluoresceína como substrato para MMPs 2 e 9 (E-12055, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Uma mesma quantidade de conjugado foi utilizada para cada fatia (5 µl) depositada sobre a interface de união. Então, as fatias foram armazenadas por 24 h em ambiente escuro, hidratado a 37° C. Após incubação, cada fatia foi analisada em microscópio confocal a laser (excitação a 488 nm, emissão a 530 nm, 63x/1.4 NA, Leica SP5 CLSM, Heidelberg, Alemanha). As imagens foram obtidas partindo de 5 µm abaixo da superfície, em escaneamentos de 0.5 µm cada até 10 µm e então foram compiladas em projeções únicas. Após isso, as imagens representativas de cada grupo tiveram a porcentagem de área fluorescente dentro da camada híbrida quantificada pela densidade integrada de sinal fluorescente usando um software específico (Image J, Instituto Nacional de Saúde, Bethesda, MD, EUA).

## 2.6 ANÁLISE DA MORFOLOGIA DA CAMADA HÍBRIDA

Dois espécimes de cada dente, obtidos durante seccionamento para os testes de resistência de união foram utilizados para essa etapa. Esses espécimes foram fixados em stubs de alumínio com cola de cianoacrilato e previamente foram desmineralizados com ácido clorídrico a 6 N por 30 s e desproteinizados em hipoclorito de sódio a 1% por 10 min

para eliminar o conteúdo orgânico. Então, os espécimes foram desidratados em sequência ascendente de alcóois a 25% (20 min), 50% (20 min), 75% (20 min), 95% (30 min) e 100% (60 min) (Kenshima et al., 2006). Depois disso, os espécimes foram cobertos com carbono em um evaporador a vácuo (SCD 050, Balzers, Liechtenstein). Então, toda a superfície da camada híbrida foi escaneada em um microscópio eletrônico de varredura (Vega, Tescan, Warrendale, PA, EUA). Três fotomicrografias numa magnificação de 3000 X e 10 kV, foram obtidas para cada espécime, totalizando assim 10 fotomicrografias para cada grupo experimental.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após verificado distribuição normal (Kolmogorov-Smirnov), foi empregado para igualdade das variâncias (Barlett). Depois foi usado Análise de Variância (ANOVA) 1 fator e *Tukey* para comparação das médias ( $\alpha=0,05$ ).

## 3.RESULTADOS

### 3.1 RESISTÊNCIA DE UNIÃO

Os dados de resistência de união à dentina estão apresentados na Tabela 1. A Análise de variância detectou que os fatores Tratamento e Tempo foram significantes ( $p < 0,001$ ), e houve uma interação significativa entre os fatores ( $p < 0,05$ ).

Quando comparado em tempo imediato, os agentes de tratamento PA e CURC proporcionaram na dentina afetada por cárie (CAD) valores estatisticamente similares ao grupo dentina sadia (CT-SD), ( $p > 0,05$ ), e menores valores foram detectados para CT-CAD ( $p < 0,001$ ).

O grupo CAD-RB apresentou valores intermediários, mas estatisticamente menores em relação ao CT-SD ( $p < 0,05$ ).

Após 2 anos de longevidade, apenas os grupos controles sofreram redução estatisticamente significantes em relação ao tempo imediato ( $p < 0,001$ ). Já para todos os agentes de tratamento, mesmo havendo uma degradação dos valores, essa não foi estatisticamente significativa, proporcionando assim médias estatisticamente similares ao tempo imediato ( $p > 0,05$ ).

Houve um predomínio de falhas Adesivas/mistas (Tabela 2).

### 3.2 ATIVIDADE DE MMPS NA CAMADA HÍBRIDA

As imagens obtidas da atividade de MMPs na camada híbrida por microscopia confocal a laser estão demonstradas na Figura 1 e os resultados numéricos da porcentagem de área com fluorescência estão apresentados na Figura 2. A análise de variância detectou que houve uma diferença significativa entre os grupos experimentais ( $p < 0,001$ ). Uma maior atividade de MMPs foi detectada para O CT-CAD em comparação aos demais grupos ( $p < 0,001$ ). Menor atividade foi detectada para os grupos CT-SD, CAD-RB e CAD-PA, enquanto o grupo CAD-CURC demonstrou valores intermediários, ( $p < 0,001$ ).

### 3.3 MORFOLOGIA DA CAMADA HÍBRIDA FORMADA

As fotomicrografias obtidas da análise da morfologia da camada híbrida por microscopia eletrônica de varredura estão apresentadas na Figura 3. O grupo CT-CAD demonstrou uma camada híbrida pobremente formada, com ausência de *tags* resinosos

e falta de hibridização. Ao contrário, os grupos dentina afetada por cárie após tratamento com agentes reticuladores aumentaram a hibridização pelo sistema adesivo, demonstrando numerosos *tags* resinosos, da mesma maneira que para dentina sadia (CT-SD).

Tabela 1. Médias e desvios-padrões da resistência de união à dentina, para todos os grupos experimentais.\*

	CT-SD	CT-CAD	CAD-PA	CAD-RB	CAD-CURC
<b>Imediato</b>	35,85 ± 6,55 A	19,2 ± 1 D	28,94 ± 5,52 ABC	24,21 ± 2,19 BCD	30,27 ± 5,66 AB
<b>2 anos</b>	19,73 ± 3,81 D	10,11 ± 2,97 E	20,43 ± 3,61 CD	20,32 ± 5,11 CD	22,28 ± 3,38 BCD

\*Letras maiúsculas diferentes demonstram diferença estatisticamente significativa, Teste de Tukey ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 2.** Número de espécimes e sua distribuição de acordo com o modo de falha para todos os grupos experimentais.

		<b>A/M</b>	<b>CR</b>	<b>CD</b>
<b>Imediato</b>	CT-SD	24	6	0
	CT-CAD	18	0	4
	CAD-PA	21	1	0
	CAD-RB	24	1	1
	CAD-CURC	22	2	1
<b>2 anos</b>	CT-SD	19	0	0
	CT-CAD	20	0	6
	CAD-PA	22	3	2
	CAD-RB	26	3	0
	CAD-CURC	23	2	1

*Abreviações:* A/M modo de falha adesiva e mista; CR modo de falha coesiva em resina composta e CD modo de falha coesiva em dentina.

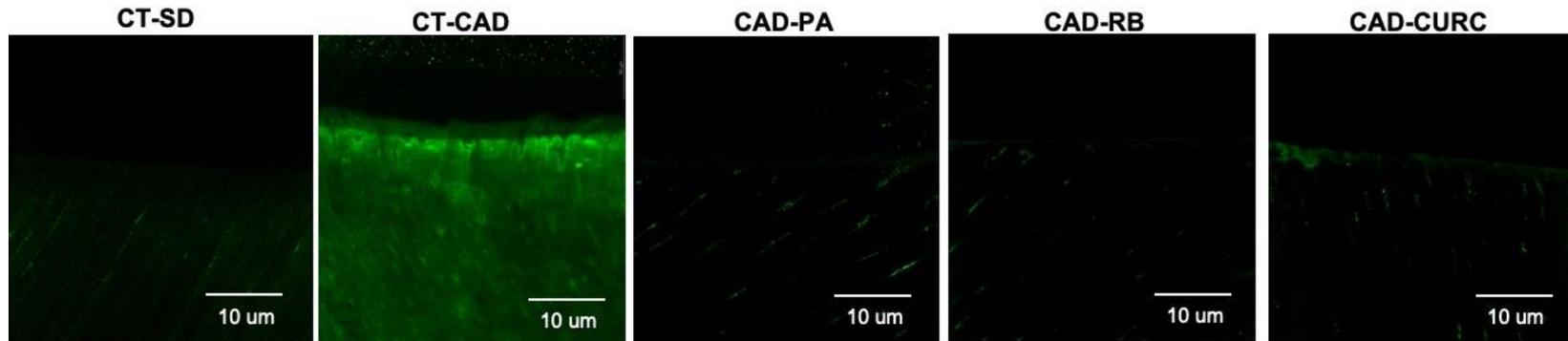
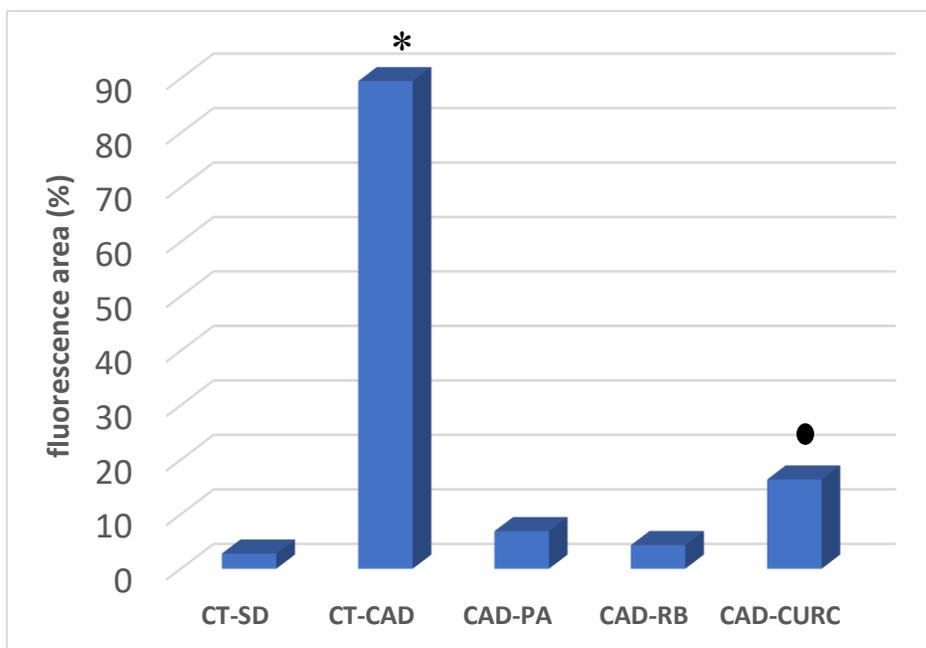


Figura 1. Fotomicrografias representativas da análise da atividade de MMPs 2 e 9 na camada híbrida por microscopia confocal a laser (64 X). Observe em CT-CAD a intensa atividade de MMPs (caracterizado por fluorescência verde) na região de camada híbrida bem como distribuída na dentina adjacente e ao redor de túbulos dentinários em toda a dentina. Enquanto os grupos CT-SD, CAD-PA e CAD-RB pequena área fluorescente na região de camada híbrida (praticamente ausente), concentrando-se mais em regiões ao redor de túbulos dentinários. Observe também para CAD-CURC onde é possível identificar uma porcentagem intermediária de fluorescência na camada híbrida, bem como ao redor dos túbulos dentinários.



**Figura 2.** Dados da porcentagem de área fluorescente em camada híbrida demonstrando porcentagem de atividade de MMPs 2 e 9 para todos os grupos experimentais.

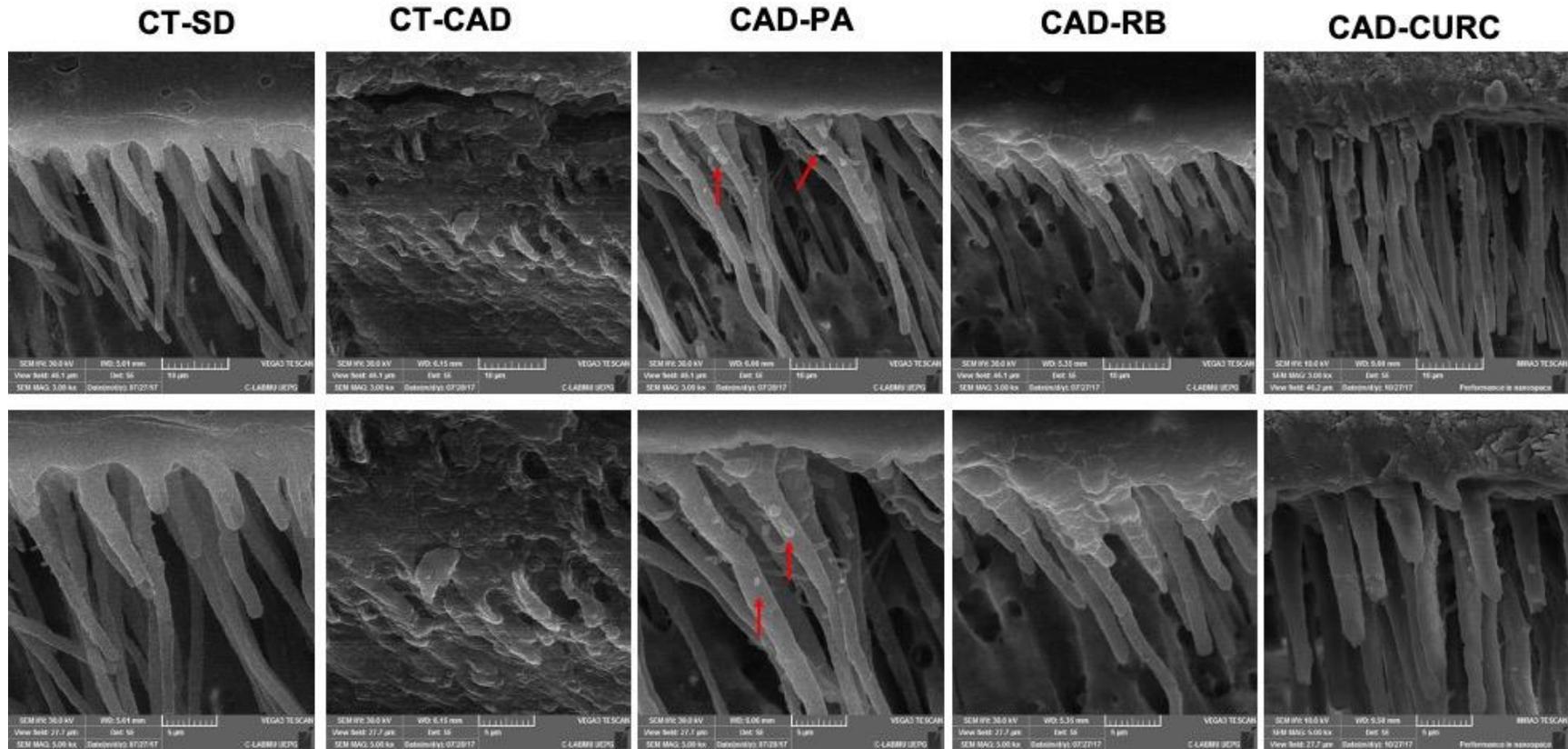


Figura 3. Fotomicrografias obtidas da análise da morfologia da camada híbrida formada, por microscopia eletrônica de varredura (3000 X acima, e 5000 X abaixo). Observe a falta de hibridização presente em CT-CAD e ausência de *tags* resinosos. Nos grupos CAD tratados com agentes reticuladores é possível observar um aumento da penetração do sistema adesivo com melhora evidente da hibridização, com morfologia praticamente semelhante ao CT-SD. Para o grupo CAD-PA é possível observar algumas zonas com sinais de porosidades, sendo que para CAD-CURC pode ser observado em menor intensidade. Enquanto os grupos CAD-RB e CT-SD isso não foi observado.

#### 4. DISCUSSÃO

Baseado na metodologia aplicada neste estudo, afirma-se que a hipótese nula testada foi parcialmente rejeitada na medida em que o grupo da riboflavina não mostrou diferença estatística quando comparada ao grupo controle, enquanto que a curcumina e a proantocianidina apresentaram valores de resistência de união maiores que os primeiros expostos, porém sem diferenças estatísticas entre si.

A dentina afetada por cárie passa por diversas modificações químicas, biológicas e histológicas. O processo natural da cárie envolve a desmineralização pela ação de ácidos bacterianos, a desnaturação gradual das fibrilas colágenas <sup>5</sup> e a degradação da matriz orgânica pela ação de enzimas colagenolíticas (metaloproteinases 2, 8 e 9, e cisteíno-catepsinas) que são ativadas devido às trocas de pH no substrato cariado <sup>3,18</sup>. Essas alterações que ocorrem no colágeno dental estão associadas à redução das propriedades mecânicas bem como das propriedades adesivas, como a resistência de união quando se faz referência à interface adesiva existente entre dente/material restaurador. Isso explicaria o motivo pelo qual o grupo controle deste estudo apresentou, mesmo que apenas numericamente, os menores valores de resistência de união e a falta de hibridização.

O uso de agentes reticuladores de colágeno têm apresentado ótimos resultados nas propriedades adesivas e redução da atividade enzimática <sup>14,17</sup>. A inibição ou inativação das enzimas proteolíticas

bem como o aumento da resistência biomecânica da estrutura do colágeno são as principais estratégias para prevenir a degradação. O uso de reticuladores naturais podem melhorar as propriedades mecânicas da matriz colágena através dessa inibição o que pode resultar em propriedades de união mais estáveis <sup>15</sup>. Apesar desta constatação, esses agentes têm sido testados somente em dentina sadia. No entanto, existe uma grande importância quanto à avaliação desses agentes em dentina cariada, como neste estudo, já que no tecido cariado (DAC), o colágeno dental apresenta-se severamente modificado com perda de diversas propriedades <sup>5,19</sup>.

A riboflavina é uma agente reticulador muito utilizado na medicina na área oftalmológica, recentemente foi utilizado em pesquisa realizadas em dentina sadia e apresentou ótimos resultados<sup>14,17</sup>. Quando a mesma é submetida a luz ultravioleta (UVA) é capaz de quebrar as ligações frágeis que ocorrem entre as fibras colágenas e formam radicais livres. Esses por sua vez, induzem a formação de novas ligações cruzadas covalentes dentro do colágeno. Essas ligações ocorrem entre os grupos hidroxila funcionais da riboflavina e prolina e lisina do colágeno <sup>14,20,21</sup>. Quando ocorrem as ligações cruzadas há uma estabilização da degradação da matriz dentinária provocando assim durabilidade da camada híbrida<sup>17</sup>. Nesse estudo infelizmente, esse agente não foi capaz de melhorar os baixos valores de resistência de união da dentina cariada o que pode ser justificado pelo fato de o tecido cariado estar com a estrutura colágena afetada, onde os aminoácidos prolina e lisina são os únicos

sítios para estabelecer ligações covalentes, sendo assim, houve menos disponibilidade para interação entre colágeno e riboflavina. Isso explicaria a razão desse agente não ter sido capaz de proporcionar aumento dos valores de resistência de união e não ter sido hábil na formação de tags resinosos satisfatórios quando comparado aos outros grupos.

A curcumina é um polifenol, antioxidante, amplamente usado na medicina principalmente na área alimentícia e oncologia. Esse agente está apto a formar e promover estabilização de formas fibrilares de colágeno, por meio de ligações covalentes e por pontes de hidrogênio<sup>22</sup>. Em um estudo, por meio de análise diferencial calorimétrica, a curcumina foi capaz de restabelecer a estrutura da tripla hélice da molécula de colágeno dental<sup>22</sup>. A curcumina possui propriedades antioxidantes, além disso reduz a liberação de enzimas proteolíticas, como colagenase, elastase e hialuronidase de macrófagos ativados. Sabendo que intensidade da degradação enzimática da matriz colágena é um fator que determina a estabilidade da ligação resina/dentina a inibição ou inativação das proteases dentinárias e o aumento da resistência biomecânica da fibra colágena tem sido apontada como as principais estratégias para prevenir a degradação da matriz dentinária resultando em uma ligação mais estável<sup>23</sup>. Talvez por a mesma possuir alta afinidade por esse substrato e estabelecer diferentes tipos de ligação com o colágeno dental, apesar das ligações covalentes não acontecerem em meio ácido ela tem a alternativa de se ligar as fibras através da ponte

de hidrogênio, sendo assim capaz de melhorar as propriedades dentinárias e isto condiz com os resultados desta pesquisa onde esse agente promoveu aumento dos valores de resistência de união, assim como microscopia eletrônica de varredura (Fig. 3) mostra a presença de tags resinosos longos e robustos o que demonstra maior habilidade de hibridização do sistema adesivo.

Já a proantocianidina é um composto polifenólico natural, amplamente utilizado na medicina, e que apresenta alto potencial de reparo e indução de formação de colágeno<sup>11</sup>. Devido a capacidade de eliminação de radicais livres, alta afinidade ao potencial protéico e antioxidante, os agentes naturais de reticulação de colágeno têm sido extensivamente estudados para melhorar as propriedades mecânicas da dentina desmineralizada e as ligações cruzadas de colágeno aumentando a durabilidade das interfaces de união resina-dentina<sup>14,15</sup>. Proteínas ricas em prolina, como o colágeno, têm uma afinidade extremamente alta com a proantocianidina produzindo fortes ligações. A proantocianidina interage com o colágeno por 4 diferentes vias: as ligações covalentes, pontes de hidrogênio, interação hidrofóbica e interação iônica, sendo esta última, a mais importante por ser irreversível, além disso a biodegradação por proteases endógenas<sup>11,14</sup>. Assim, talvez pelo fato de estar mais disponível para interagir com o colágeno dental, a proantocianidina foi hábil para promover maiores valores de resistência de união e um maior número de tags resinosos em comparação à riboflavina, que liga-se somente por ligações covalentes.

Todos os agentes reticuladores, após 2 anos de longevidade, mesmo havendo uma degradação dos valores, proporcionaram médias estatisticamente similares ao tempo imediato. Possivelmente, esses agentes foram capazes de melhorar as propriedades das fibras colágenas, reestruturando a sua forma de tripla hélice fazendo com que houvesse uma melhor penetração do adesivo, aumentando assim a hibridização do sistema adesivo que é um dos pontos responsáveis pelos baixos valores de adesão na dentina afetada por cárie.

## **5. CONCLUSÃO**

O uso de agentes reticuladores, especialmente a proantocianidina e a curcumina promoveram aumento da resistência de união imediata à dentina afetada por cárie quando comparados ao grupo controle e riboflavina. Todos os agentes reticuladores, após 2 anos de longevidade mostraram resistência de união similares ao tempo imediato e demonstraram maior habilidade de hibridização do sistema adesivo de acordo com análise morfológica da camada híbrida.

## REFERÊNCIAS

1. Frias, A. C., Antunes, J. L., Junqueira, S. R., Narvai, P. C., 2007. Individual and contextual determinants of the prevalence of untreated caries in Brazil. *Rev. Panam. Salud. Publica.* **22**, 279-285.
2. Scheffel, D. L., Ricci, H. A., Souza Costa, C. A., Pashley, D. H., Hebling, J., 2013. Effect of reducing acid etching time on bond strength to noncarious and caries-affected primary and permanent dentin. *Pediatr. Dent.* **35**, 199-204.
3. Bjorndal, L., 2002. Buonocore Memorial Lecture. Dentin caries: progression and clinical management. *Oper. Dent.* **27**, 211-217.
4. Mazzoni, A., Tjaderhane, L., Checchi, V., Di Lenarda, R., Salo, T., Tay, F. R., 2015. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J. Dent. Res.* **94**, 241-251.
5. Marshall, G. W., Habelitz, S., Gallagher, R., Balooch, M., Balooch, G., Marshall, S. J., 2001. Nanomechanical properties of hydrated carious human dentin. *J. Dent. Res.* **80**, 1768-1771.
6. Wang, Y., Spencer, P., Walker, M. P., 2007. Chemical profile of adhesive/caries-affected dentin interfaces using Raman microspectroscopy. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **81**, 279-286.
7. Tjaderhane, L., Larjava, H., Sorsa, T., Uitto, V. J., Larmas, M., Salo, T., 1998. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J. Dent. Res.* **77**, 1622-1629
8. Pashley, D. H., Tay, F. R., Yiu, C., Hashimoto, M., Breschi, L., Carvalho, R. M., 2004. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J. Dent. Res.* **83**, 216-221.
9. Yoshiyama, M., Tay, F. R., Doi, J., Nishitani, Y., Yamada, T., Itou, K., 2002. Bonding of self-etch and total-etch adhesives to carious dentin. *J. Dent. Res.* **81**, 556-560.
10. Alves, F. B., Lenzi, T. L., Reis, A., Loguercio, A. D., Carvalho, T. S., Raggio, D. P., 2013. Bonding of simplified adhesive systems to caries-affected dentin of primary teeth. *J. Adhes. Dent.* **15**, 439-445.
11. Han, B., Jaurequi, J., Tang, B. W., Nimni, M. E., 2003. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **65**, 118-124.
12. Bedran-Russo, A. K., Pereira, P. N., Duarte, W. R., Drummond, J. L., Yamauchi, M., 2007. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **80**, 268-272.

13. Bedran-Russo, A. K., Pashley, D. H., Agee, K., Drummond, J. L., Miescke, K. J., 2008. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* **86**, 330-334.
14. Hass, V., Luque-Martinez, I. V., Gutierrez, M. F., Moreira, C. G., Gotti, V. B., Feitosa, V. P., 2016. Collagen cross-linkers on dentin bonding: Stability of the adhesive interfaces, degree of conversion of the adhesive, cytotoxicity and in situ MMP inhibition. *Dent. Mater.* **32**, 732-410.
15. Seseogullari-Dirihan, R., Mutluay, M. M., Vallittu, P., Pashley, D. H., Tezvergil-Mutluay, A., 2015. Effect of pretreatment with collagen crosslinkers on dentin protease activity. *Dent. Mater.* **31**, 941-947.
16. Swift EJ, Jr., Perdigao J & Heymann HO (1995) Bonding to enamel and dentin: a brief history and state of the art, 1995 *Quintessence Int* **26(2)** 95-110.
17. Cova, A., Breschi, L., Nato, F., Ruggeri Júnior, A., Carrilho, M., Tjaderhane, L., 2011. Effect of UVA-activated riboflavin on dentin bonding. *J. Dent. Res.* **90**, 1439-1445.
18. Mazzoni, A., Tjaderhane, L., Checchi, V., Di Lenarda, R., Salo, T., Tay, F. R., 2015. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J. Dent. Res.* **94**, 241-251.
19. Nakajima, M., Sano, H., Burrow, M. F., Tagami, J., Yoshiyama, M., Ebisu S., 1995. Tensile bond strength and SEM evaluation of caries-affected dentin using dentin adhesives. *J. Dent. Res.* **74**, 1679-1688.
20. Wollensak, G., Aurich, H., Pham, D. T., Wirbelauer, C., 2007. Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A. *J. Cataract. Refract. Surg.* **33**, 516-521
21. Sionkowska, A., 2006. Flash photolysis and pulse radiolysis studies on collagen Type I in acetic acid solution. *J. Photochem. Photobiol. B.* **84**, 38-45.
22. Srivatsan, K. V., Duraipandy, N., Begum, S., Lakra, R., Ramamurthy, U., Korrapati, P. S., 2015. Effect of curcumin caged silver nanoparticle on collagen stabilization for biomedical applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **75**, 306-315.
23. Joe, B., Vijaykumar, M., Lokesh, B. R., 2004. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanisms of action: *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* **44**, 97-111.
24. Mutluay, A., 2015. Effect of pretreatment with collagen crosslinkers on dentin protease activity. *Dent. Mater.* **31**, 941-947.
25. Kenshima, S., Francci, C., Reis, A., Loguercio, A. D., Filho, L. E., 2006. Conditioning effect on dentin, resin tags and hybrid layer of different acidity self-etch adhesives applied to thick and thin smear layer. *J. Dent.* **34**, 775-783.

26. Ismail, A. I., Sohn, W., Tellez, M., Amaya, A., Sen, A., Hasson, H., 2007. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community. Dent. Oral. Epidemiol.* **35**, 170-178.
27. Innes, N. P., Frencken, J. E., Bjorndal, L., Maltz, M., Manton, D. J., Ricketts, D., 2016. Managing carious lesions: consensus recommendations on terminology. *Adv. Dent. Res.* **28**, 49-57.
28. Costa, A. R., Garcia-Godoy, F., Correr-Sobrinho, L., Naves, L. Z., Raposo, L. H. A., Carvalho, F. G., Sinhoreti, M. A. C., Puppim-Rontan, R. M. 2017. Influence of Different Dentin Substrate (Caries-Affected, Caries-Infected, Sound) on Long-Term  $\mu$ TBS. *Braz. Dent. J.* **28**, 16-23.
29. Marshall Júnior, G. W., Marshall, S. J., Kinney, J. H., Balooch, M., 1997. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J. Dent.* **25**, 441-458.

# ***ANEXO***



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE  
PONTA GROSSA - UEPG

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Efeito de agentes reticuladores de colágeno na adesão à dentina com sistemas adesivos convencionais simplificados

**Pesquisador:** Alessandra Reis

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 15478113.0.0000.0105

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual de Ponta Grossa

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 314.563

**Data da Relatoria:** 27/06/2013

**Apresentação do Projeto:**

Efeito de agentes reticuladores de colágeno na adesão à dentina com sistemas adesivos convencionais simplificados

**Objetivo da Pesquisa:**

Avaliar a longevidade da adesão à dentina, o potencial citotóxico, as interações químicas com o colágeno e o potencial inibitório de proteases endógenas ao associar o uso de agentes reticuladores de colágeno na adesão à dentina.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Como potencial risco desta pesquisa pode citar:- Possível desmineralização dos dentes pela aplicação de solução de sacarose (Os voluntários serão

instruídos e monitorados durante toda a pesquisa. Procederão à sua higienização de maneira habitual e este procedimento da pesquisa durará no

máximo quatorze dias e após este período os voluntários não utilizarão mais o dispositivo intra-oral);-

Dispositivo intra-oral causar incômodo ao

voluntário (Todos os voluntários da pesquisa receberão instruções de como proceder com sua utilização;

caso o desconforto persista, os voluntários

**Telefone:** (42-)3220-3108

**Fax:** (42-)3220-3102

**E-mail:** [seccoep@uepg.br](mailto:seccoep@uepg.br)

Página 01 de 03

Continuação do Parecer: 314.563

poderão suspender o seu uso e estarão cientes que poderão abandonar a pesquisa a qualquer momento, sem que isto cause danos ou prejuízos ao voluntário).- Há riscos para os pesquisadores de contaminação, ferimento com instrumentos cortantes e alergia a materiais utilizados, que devem ser minimizado com a utilização de equipamento de proteção individual (EPI).

**Benefícios:**

A pesquisa contribuirá para um melhor entendimento sobre o efeito dos agentes reticuladores de colágeno sobre a degradação da interface de união dente/restauração, conseqüentemente, preservação de estrutura dental em detrimento da necessidade de troca de restaurações. Os benefícios para os voluntários pesquisados são:- Os voluntários serão acompanhados e receberão esclarecimentos do pesquisador responsável sobre eventuais dúvidas durante toda a pesquisa;- Receberão uma profilaxia prévia a colocação do dispositivo intra-oral e outra profilaxia após a retirada deste dispositivo (este procedimento será realizado pelos demais pesquisadores juntamente com o pesquisador responsável);- Os voluntários receberão tratamento odontológico quando necessário durante todo o período da pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto bem desenhado com diferentes grupos de estudo bem demonstrados. Avaliação de vários fatores com justificativa embasada na literatura.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Termos corretos.

**Recomendações:**

Aprovado.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Endereço:** Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 bl M sala 12

**Bairro:** **CEP:** 84.030-900

**UF:** PR **Município:** PONTA GROSSA

**Telefone:** (42-)3220-3108 **Fax:** (42-)3220-3102 **E-mail:** seccoep@uepg.br

Continuação do Parecer: 314.563

PONTA GROSSA, 25 de Junho de 2013

---

**Assinador por:**  
**ULISSES COELHO**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748 bl M sala 12

**Bairro:** **CEP:** 84.030-900

**UF:** PR **Município:** PONTA GROSSA

**Telefone:** (42-)3220-3108 **Fax:** (42-)3220-3102 **E-mail:** seccoep@uepg.br

## **2. METODOLOGIA DETALHADA**

### **2.1 ASPECTOS ÉTICOS**

Este estudo foi aprovado previamente pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ponta Grossa (Parecer: 314.563).

### **2.2 AGENTES RETICULADORES**

Os primers contendo os agentes reticuladores foram preparados em água destilada e a concentração foi em peso para cada agente. A proantocianidina foi preparada a 6,5%, a riboflavina a 0,1% e a curcumina a 200  $\mu$ M. Como grupo controle foi utilizada apenas água destilada.

### **2.3 PREPARO DOS DENTES**

Quarenta molares humanos cariados ICDAS 5<sup>16</sup> e dez molares humanos hígidos foram utilizados nesse estudo (n=5). Esses dentes foram extraídos por indicação e necessidade odontológica, após doação com termo de consentimento livre e esclarecido de acordo com o processo de aprovação previsto pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade. O esmalte da superfície oclusal e das bordas periféricas foram removidos com lixas de carbetto de silício (SiC) e granulação #180 e pontas diamantadas cilíndricas em alta rotação (KG SORENSEN, Cotia, SP, Brasil) (Figura 1A). A superfície oclusal de dentina infectada foi removida com curetas dentinárias,

pelo método de escavação manual seletiva <sup>17</sup> e a dentina afetada fora preservada (Figura 1B). Onde a dentina infectada foi considerada a zona mais superficial, necrótica e desmineralizada apresentando-se clinicamente como uma massa amarelada e amolecida. Já a dentina afetada, foi considerada a zona mais profunda, apresentando pequenas alterações de suas fibras colágenas, é passível de remineralização e clinicamente é vista com uma coloração castanha e consistência endurecida<sup>18</sup>. O esmalte periférico foi removido (Figura 1C) e após isso, essa superfície foi lixada em lixa de SiC #600 por 60 s para padronização da smear layer (Figura 1D).

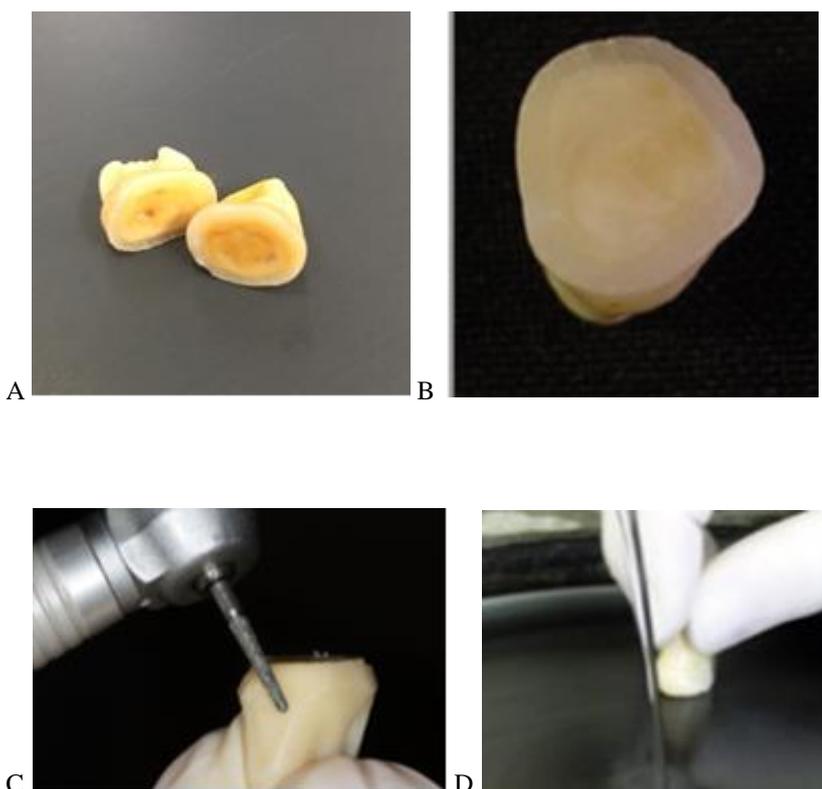


Figura 1 - (A) Elemento dental após remoção do esmalte oclusal; (B) Superfície oclusal escavada após remoção de dentina infectada com curetas dentinária; (C) Remoção de esmalte periférico com brocas de alta rotação; (D) Padronização da smear layer com o uso de lixas de SiC #600.

## 2.4 PROCEDIMENTO ADESIVO E RESTAURADOR

A dentina de todos os dentes foi condicionada com ácido fosfórico à 37% (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) por 15 s e lavada pelo mesmo tempo em água corrente (Figura 2A). Em seguida, os agentes reticuladores: proantocianidina, curcumina e a riboflavina que previamente foram ativados com luz ultravioleta (UVA) durante 2 minutos, foram aplicados por 60s na dentina desmineralizada (Figura 2B). Logo após a aplicação dos agentes, o sistema adesivo Adper Single Bond 2 (3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) foi aplicado e fotoativado de acordo com as instruções do fabricante (Figura 2C e 2D). Na sequência, os dentes foram restaurados com resina composta (RC) (Filtek Supreme Ultra, 3M Oral Care, St. Paul, MN, EUA) em 2 incrementos de 2 mm cada. Cada incremento foi fotoativado (Radii Cal, SDI, Bayswater, Victoria, Australia; 1200 mW/cm<sup>2</sup>) por 40s (Figura 2E). Então, os dentes restaurados foram armazenados em água destilada a 37° C por 24h ou 24 meses de armazenamento para depois serem submetidos ao seccionamento para confecção de espécimes para os testes desse estudo.

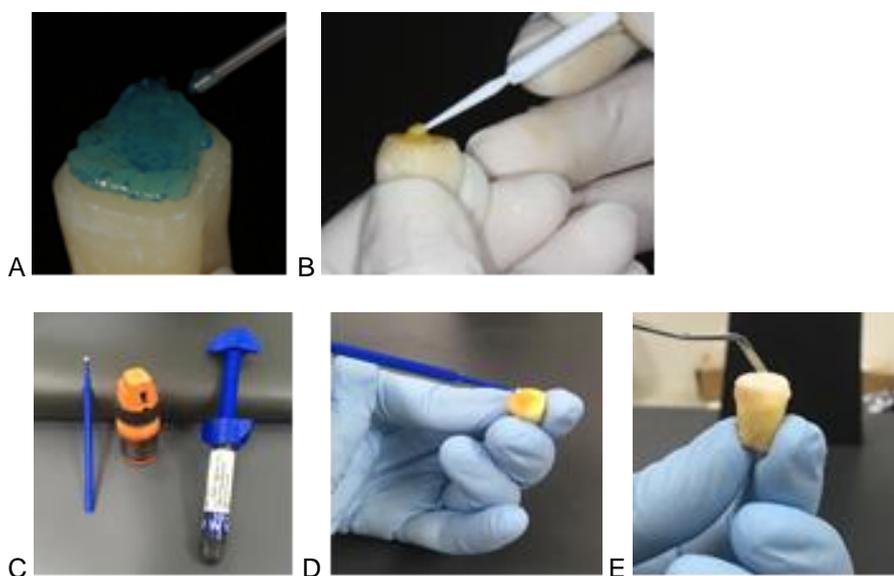


Figura 2 – (A) Condicionamento com ácido fosfórico à 37%; (B) Aplicação dos agentes reticuladores; (C) Sistema adesivo Adper Single Bond 2; (D) Aplicação do adesivo Adper Single Bond 2; (E) Restauração do elemento dental.

## 2.5 RESISTÊNCIA DE UNIÃO À DENTINA

Os dentes foram fixados com cera pegajosa num dispositivo (Figura 3A) e adaptado em uma máquina de corte (Buehler, Lake Bluff, IL, EUA) (Figura 3B). Os dentes foram seccionados nas direções “x” e “y” (Figura 3C) através da interface de união para obtenção de espécimes na forma de “palitos” com aproximadamente 0,8 mm<sup>2</sup> de área de secção transversal (Figura 3D).

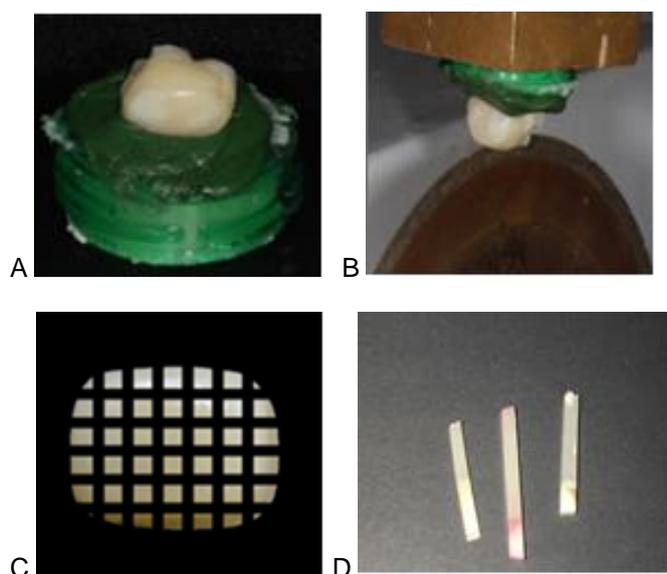


Figura 3 – (A) Dente fixado com cera pegajosa; (B) Dente submetido à máquina de corte; (C) Dente seccionado; (D) Palitos com aproximadamente 0,8 mm<sup>2</sup> de área de secção transversal.

Depois, cada espécime teve sua área de secção transversal mensurada com paquímetro digital (Mitutuyo, Tóquio, Japão) (Figura 4A) e foi fixado com cola de cianoacrilato em gel (Cola 454, Loctite, São Paulo, Brasil) em um dispositivo de microtração (Figura 4B)

submetidos à uma máquina de ensaios universal (EMIC, São José dos Pinhais, PR, Brasil) (Figura 4C) numa velocidade de 0,5 mm/min. A análise do modo de fratura dos espécimes foi realizada com o auxílio de uma lupa (40X) e classificada nos seguintes padrões: 1- adesiva/mista na interface; 2- coesiva de dentina ou resina; 3- perda prematura.

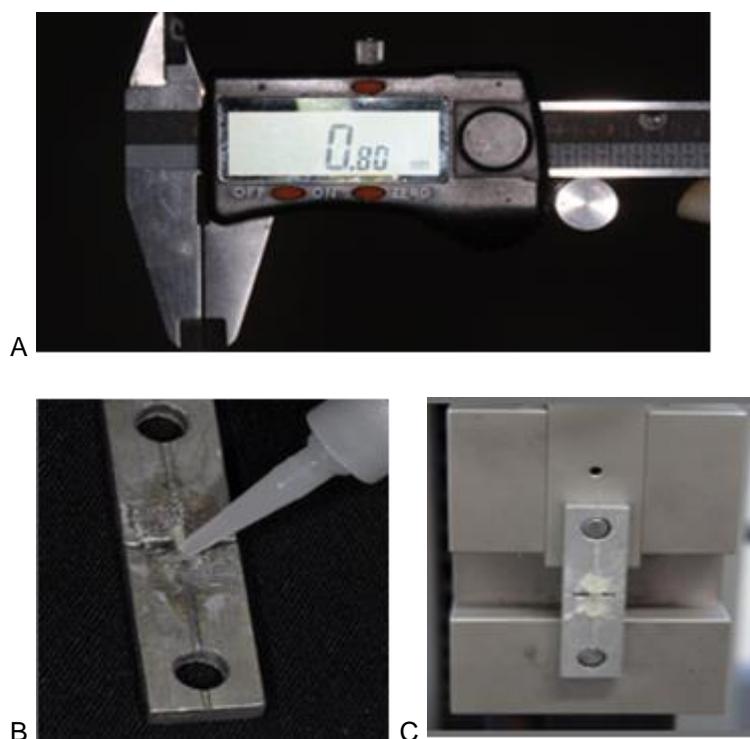


Figura 4 - (A) Mensuração dos espécimes com paquímetro digital; (B) Fixação dos espécimes com cola de cianoacrilato em gel no dispositivo; (C) Espécimes submetidos à máquina de ensaios universal.

## **ANEXO 2 – NORMAS DA REVISTA**

### **Manuscript Submission (Author Guidelines)**

General Requirements **Operative Dentistry** requires electronic submission of all manuscripts. All submissions must be sent to Operative Dentistry using the Allen Track upload site. A mandatory and nonrefundable \$50.00 fee is required at submission. Your manuscript will only be considered officially submitted after it has been approved through our initial quality control check, and any quality problems have been resolved. You will have 6 days from when you start the process to submit and approve the manuscript. After the 6 day limit, if you have not finished the submission, your submission may be removed from the server. You are still able to submit the manuscript, but you must start from the beginning. Be prepared to submit the following manuscript files in your upload: • A Laboratory or Clinical Research Manuscript file must include: o a title o a running (short) title o a clinical relevance statement o a concise summary (abstract) o introduction, methods & materials, results, discussion and conclusion o references (see Below)

- The manuscript body **MUST NOT** include any: o Author identifying information such as:

- ♣ Authors names or titles

- ♣ Acknowledgements

- ♣ Correspondence information

- ♣ Response to reviewer files should also **NOT** include any author identifying information, such as a signature at the end, etc. o Figures o Graphs o Tables

- An acknowledgement, disclaimer and/or recognition of support (if Current as of: 1-Oct-18 18 applicable) must be uploaded as a separate file and uploaded as miscellaneous material.

- Appendix material that you would like us to publish electronically with your article, but not as part of your printed manuscript (such as indices, supplemental tables, etc.), should be submitted as supplemental material. It will not be typeset, and will appear exactly as you provide

to Operative Dentistry. References submitted as part of supplemental material should appear in our preferred reference format. Supplemental material is viewable by the reviewers, and so SHOULD NOT contain any author identifiable information.

- All figures, illustrations, graphs and tables must also be provided as individual files. Figures should be submitted without figure letters or numbers within the image itself, these designations will be added by the journal staff as needed. All Figures should be high-resolution images, which are used by the editor in the actual typesetting of your manuscript. Please refer to the instructions below for acceptable formats and sizes.
- All other manuscript types use this template, with the appropriate changes as listed below.
- When figures of identifiable individuals are submitted, the author must verify that they have received releases from the individual or guardian to use said figure. Eye blocks are no longer sufficient to anonymize an individual. Eye blocks may still be used, but a release will still be required.
- ALL studies using human tissue must have an accompanying Institutional Review Board (IRB) statement – it must indicate that either the board has approved the study, or that the study is exempted from approval. There are no exceptions to this policy.
- All studies using animal tissue must have an accompanying approval from the appropriate ethics board.
- All manuscripts reporting on a Clinical Trial must indicate that the trial information was submitted to a public Clinical Trial Registry. A URL of where the trial appears in a registry is required to be submitted with the manuscript.

Complete the online form (which includes complete author information, copyright release and conflict of interest), and select the files you would like to send to Operative Dentistry. Manuscripts that do not meet our formatting and data requirements listed below will be sent back to the corresponding author for correction. Important Information

- All materials submitted for publication must be submitted exclusively to Operative Dentistry.
- The editor reserves the right to make literary corrections.
- Currently, color will be provided at no cost to the author if the editor deems it essential to the manuscript. However, we reserve the right to convert to gray scale if color does not contribute significantly to the quality and/or information content of the paper.
- The author(s) retain(s) the right to formally withdraw the paper from consideration and/or publication for any reason up to the submission of the final paper to our press vendor for publication.
- International authors whose native language is not English must have their work reviewed by a native English speaker prior to submission.
  - o Manuscripts that are rejected before peer-review for English correction should be entered as a new manuscript upon resubmission. In the manuscript comments box the comment, “this is a resubmission of manuscript number XX-XXX” should be noted.
  - o Manuscripts that are rejected after peer-review are not eligible for resubmission.
  - o Manuscripts that have major revisions requested (i.e. For English correction) are entered as a resubmission of the original article.
- Spelling must conform to the American Heritage Dictionary of the English Language, and SI units for scientific measurement are preferred.
  - While we do not currently have limitations on the length of manuscripts, we expect papers to be concise; authors are also encouraged to be selective in their use of figures and tables, using only those that contribute significantly to the understanding of the research.
- Acknowledgement of receipt is sent automatically upon acceptance through Current as this may take up to 7 days. If you do not receive such an acknowledgement, please check your author homepage at <http://jopdent.allentrack.net> if the paper does not appear there please resend your paper.

IMPORTANT: Please add our e-mail address to your address book on your server to prevent transmission problems from spam and other filters. Also make sure that your server will accept larger file sizes. This is particularly important since we send page-proofs for review and correction as .pdf and/or .doc(x) files.

**Manuscript Type Requirements:**

All Manuscripts CORRESPONDING AUTHOR must provide a WORKING / VALID e-mail address which will be used for all communication with the journal. \*NOTE: Corresponding authors MUST update their profile if their e-mail or postal address changes. If we cannot contact authors within seven days, their manuscript will be removed from our publication queue.

AUTHOR INFORMATION must include: • full name of all authors • complete mailing address for each author • valid email address for each author • degrees (e.g. DDS, DMD, PhD) • affiliation (e.g. Department of Dental Materials, School of Dentistry, University of Michigan)

MENTION OF COMMERCIAL PRODUCTS/EQUIPMENT must include:

- full name of product
  - full name of manufacturer
  - city, state and country of manufacturer
- MANUSCRIPTS must be provided as Word for Windows files. Files with the .doc and .docx extensions are accepted. TABLES may be submitted as either Word (.doc and .docx) or Excel (.xls and .xlsx) files. All tables must be legible, with fonts being no smaller than 7 Current as of:

Tables have the following size limitations: In profile view a table must be no larger than 7 x 9 inches; landscape tables should be no wider than 7 inches. It is the Editor's preference that tables not need to be rotated in order to be printed, as it interrupts the reader's flow.

ILLUSTRATIONS, GRAPHS AND FIGURES must be provided as TIFF or high resolution JPEG files with the following parameters: • line

art (and tables that are submitted as a graphic) must be sized with the short edge being no shorter than 5 inches. It should have a minimum resolution of 600 dpi and a maximum resolution of 1200 dpi. This means the shortest side should be no smaller than 3000 pixels. • gray scale/black & white figures must be sized with the short edge being no shorter than 5 inches. It should have a minimum resolution of 300 dpi and a maximum of 400 dpi.

This means the shortest side should be no smaller than 1500 pixels.

- color figures and photographs must be sized with the short edge being no shorter than 3.5 inches. It should have a minimum resolution of 300 dpi and a maximum of 400 dpi. This means that the shortest side should be no smaller than 1050 pixels.

Other Manuscript Type – Additional Requirements CLINICAL TECHNIQUE/CASE STUDY MANUSCRIPTS must include as part of the narrative:

- a running (short) title
- purpose
- description of technique
- list of materials used
- potential problems
- summary of advantages and disadvantages
- references (see below)

**LITERATURE AND BOOK REVIEW MANUSCRIPTS** must include as part of the narrative:

- a running (short) title
- a clinical relevance statement based on the conclusions of the review
- conclusions based on the literature review...without this, the review is just an exercise and will not be published
- references (see below) References REFERENCES must be numbered (superscripted numbers) consecutively as they appear in the text and, where applicable, they should appear after punctuation.

The reference list should be arranged in numeric sequence at the end of the manuscript and should include:

1. Author(s) last name(s) and initial (ALL AUTHORS must be listed) followed by the date of publication in parentheses.
2. Full article title.
3. Full journal name in italics (no abbreviations), volume and issue numbers and first and last page numbers complete (i.e. 163-168 NOT attenuated 163-68).
4. Abstracts should be avoided when possible but, if used, must include the above plus the abstract number and page number.
5. Book chapters must include chapter title, book title in italics, editors' names (if appropriate), name of publisher and publishing address.
6. Websites may be used as references, but must include the date (day, month and year) accessed for the information.
7. Papers in the course of publication should only be entered in the references if they have been accepted for publication by a journal and then given in the standard manner with "In press" following the journal name.
8. DO NOT include unpublished data or personal communications in the reference list. Cite such references parenthetically in the text and include a date.
9. References that contain Crossref.org's DOIs (Digital Object Identifiers) should always be displayed at the end of the reference as permanent. The prefix <http://dx.doi.org/> can be appended to the listed DOI to create this URL. i.e. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1995.0238>

#### **Reference Style Guide :**

- Journal article-two authors: Evans DB & Neme AM (1999) Shear bond strength of composite resin and amalgam adhesive systems to dentin American Journal of Dentistry 12(1) 19-25.

- Journal article-multiple authors: Eick JD, Gwinnett AJ, Pashley DH & Robinson SJ (1997) Current concepts on adhesion to dentin *Critical Review of Oral and Biological Medicine* 8(3) 306-335.
- Journal article: special issue/supplement: Van Meerbeek B, Vargas M, Inoue S, Yoshida Y, Peumans M, Lambrechts P & Vanherle G (2001) Adhesives and cements to promote preservation dentistry *Operative Dentistry (Supplement 6)* 119-144.
- Abstract: Yoshida Y, Van Meerbeek B, Okazaki M, Shintani H & Suzuki K (2003) Comparative study on adhesive performance of functional monomers *Journal of Dental Research* 82(Special Issue B) Abstract #0051 p B-19.
- Corporate publication: ISO-Standards (1997) ISO 4287 Geometrical Product Specifications Surface texture: Profile method – Terms, definitions and surface texture parameters Geneve: International Organization for Standardization 1st edition 1-25.
- Book-single author: Mount GJ (1990) *An Atlas of Glass-ionomer Cements* Martin Duntz Ltd, London.
- Book-two authors: Nakabayashi N & Pashley DH (1998) *Hybridization of Dental Hard Tissues* Quintessence Publishing, Tokyo.
- Book-chapter: Hilton TJ (1996) Direct posterior composite restorations In: Schwarts RS, Summitt JB, Robbins JW (eds) *Fundamentals of Operative Dentistry* Quintessence, Chicago 207-228.
- Website-single author: Carlson L (2003) Web site evolution; Retrieved online July 23, 2003 from: <http://www.d.umn.edu/~lcarlson/cms/evolution.html>
- Website-corporate publication: National Association of Social Workers (2000) NASW Practice research survey 2000. NASW Practice Research Current as of: 1-Oct-18 24 Network, 1. 3. Retrieved online September 8, 2003 from: <http://www.socialworkers.org/naswprn/default>
- Journal Article with DOI: SA Feierabend, J Matt & B Klaiber (2011) A Comparison of Conventional and New Rubber Dam Systems in Dental

Practice. Operative Dentistry 36(3) 243-250,  
<http://dx.doi.org/10.2341/09-283-C> Author Rights Authors of accepted manuscripts will be given access to a .pdf of their published version. Author acceptance letters give the right to the author to make unlimited prints of the manuscript. Authors may not share the electronic file. Those authors who are required to post a copy of their manuscript to a University, or Government repository due to professional or funding contract stipulations, may do so after receipt of the article as stated above; and after notifying Operative Dentistry, Inc. (at [editor@jopdent.org](mailto:editor@jopdent.org)) of their intent to post, and to what repository it will be posted, as well as the URL at which it will appear. Authors may post their articles to their own professional website as well. Any electronic postings should contain the appropriate copyright statements as listed in this manual (under "copyright").

Reviewers and the Reviewer Board  
The list of current Reviewer Board Members will be printed in issue 6 of each volume in a manner that will allow the reviewer to remove the pages for use in professional folders. Reviewer Board members serve as the primary source for peer review of submitted manuscripts, and are invaluable to us. In order to be as efficient as possible for everyone, Reviewers are required to update the online review system with current email address, areas of interest, and dates when unavailable for review. Every effort is made to limit review requests of new manuscripts. It will be assumed that members who repeatedly fail to respond with acceptance or regrets to requests for review will be removed from the Reviewer Board. Should a reviewer's circumstance change to where they are no longer able or willing to review, we request that a notice be sent to our offices at [editor@jopdent.org](mailto:editor@jopdent.org). Reviewer Board Members can expect to be asked to review to completion no more than 6 (original) manuscripts a year, and to participate in the annual Reviewer Board Meeting, whether in person, or by proxy.

The following items apply to all reviewers for Operative Dentistry:

- Jopdent must have a CV and current email address on file – the CV is due by the last day of September in the year in which the reviewer completed a review (in order to be recognized in issue 6). It should be updated by the reviewer upon any significant change.
- To be considered for the RB, a reviewer must have 3 or more published articles in internationally recognized journals in which the reviewer was either a corresponding author or 1st author on at least one article.
- A reviewer with “no response” for every request made in a calendar year will be released from the RB.
- A reviewer who completed 0 reviews in a calendar year citing, “time constraints” will be released from the Reviewer Board. Inopportune requests can be prevented by having reviewer availability dates current.
- A reviewer who cites, “conflict of interest” to either decline or withdraw from a review will not be charged for a declined review.

Reviewer Instructions Review Process The manuscript submission and peer review process is broken down into the following 5 steps:

1. The author submits a manuscript.
2. The editor/associate editor assigns reviewers to the manuscript.
3. The reviewers review the manuscript.
4. The editor makes the final decision.
5. The staff contacts the author with the decision.

As a reviewer, you are responsible for step #3. Review Manuscript After logging into the system and pressing on a manuscript link preceded by a red arrow, you will be presented with a "Manuscript" screen. At the bottom of this screen under "Manuscript Tasks" will be displayed a "Review Manuscript" link.

Clicking on this link will display the "Review Manuscript" Screen. This screen is broken into 4 parts as follows:

1. Manuscript background information.
2. A review drop-down selection.

3. Remarks to the author.
4. Remarks to the editor.

Once you have submitted your review, we will e-mail you an acknowledgment that we have received your review. This e-mail will contain a copy of your review that you can save for your records, if you wish.

When submitting a review, please evaluate the suitability of the manuscript you have reviewed for publication in *Operative Dentistry*. Rate the manuscript in one of the following four categories:

- ACCEPT (no corrections necessary)
- CONDITIONAL ACCEPT (minor corrections/revisions necessary)
- RECONSIDER AFTER MAJOR REVISIONS
- REJECT

Please provide as many specific comments and suggestions as possible. REMARKS TO THE AUTHOR ARE REQUIRED, and are extremely helpful to the editor in the final decision-making process and to the authors in possibly improving the quality of their paper.

The following should be considered in formulating your comments:

- interest to our readership
  - overall contribution to the knowledge base
  - validity of the clinical relevance statement
  - acceptability of research methods and design
  - appropriateness of sample selection and size
  - adequacy of figures, tables and references
  - accuracy of statistical treatment
  - consistency of conclusions with reported results
- You are not asked to make a thorough English edit of the manuscript. However, identifying English errors that make it difficult to understand the meaning of the writing is entirely appropriate. If significant English editing is required, please make that clear in your comments and a request will be made to the authors to obtain that editing. The journal

has the option of accepting a manuscript for e-publication only. This will allow publication without displacing other manuscripts that should go to press. A recommendation to "accept for e-publication only" or "conditional acceptance for e-publication only" or "reconsider after major revision for epublication only" are appropriate reviewer recommendations and are best placed in the confidential comments to the editor. When you first log into the system, you will be taken to your "Home" page. It will have different categories of tasks. If you are required to perform a pending action item, there will be a red arrow next to a manuscript link.

After clicking on this link, you will be presented with a "Manuscript" screen containing:

- Detailed information about a specific manuscript.
- A link to the merged PDF file containing the manuscript text, figures and tables.

- Links to the original manuscript file and associated figures/images and supplemental data, if any.

- A list of "Manuscript Tasks" or links allowing you to:
  - o Accept/Decline Reviewer Position.
  - o Check Status
  - o Review Manuscript (Not all links will be present all the time. Only the applicable links will be visible.)If there are no red arrows visible on the "Home" page, then you are finished. There is no pending work you need to worry about. Getting Help If you need additional help, you can click on the help signs spread throughout the system.

A help dialog will pop up with context sensitive help. Manuscript Status You can get the status of your assigned manuscript(s) by:

1. Logging into the system with your password.
2. Clicking on the link represented by the manuscript tracking number and abbreviated title.

3. Clicking on the "Check Status" link at the bottom of the displayed page. This procedure will display detailed tracking information about where the manuscript is in the submission/peer review process.

Conflicts of Interest OpDent believes in the free market and that it is in the best interest of the profession for the market to give back generously to those groups who promote continuing education of those professionals. There must be clear guidelines and expectations however, so that the goodwill and generosity of the Market do not taint the educational activities with bias, real or imagined. To this end we have adopted the following policies and guidelines. Commercialism To those who advertise in any medium at any activity where Operative Dentistry, Inc. is acting as the administrative authority for continuing education, whether as sole authority, or in joint sponsorship, the following guidelines must be observed:

1. Program topic selection will be based on perceived needs for professional information and not for the purpose of endorsing specific commercial drugs, materials, products, treatments, or services.
2. Funds received from commercial sources in support of any educational programs shall be unrestricted and the planning committee of said program shall retain exclusive rights regarding selection of presenters, instructional materials, program content and format, etc.
3. Promotional material or other sales activities are not allowed in the area of instruction, neither in the lecture hall/operatorory nor in close proximity to the doors of said areas.

Commercial Support To those who provide monetary support for any activity where Operative Dentistry, Inc. is acting as the administrative authority for continuing education, whether as sole authority, or in joint sponsorship, the following guidelines must be observed:

1. Program topic selection will be based on perceived needs for professional information and not for the purpose of endorsing specific commercial drugs, materials, products, treatments, or services.
2. Funds received from commercial sources in support of any educational programs shall be unrestricted and the planning committee of said program shall retain exclusive rights regarding

selection of presenters, instructional materials, program content and format, etc.

3. Any and all commercial support received shall be acknowledged in program announcements, brochures, and in the on-site program book. This announcement may not be located on any page, or facing page, of the book announcing program speakers, or program evaluations.

4. Commercial support shall be limited to: a. The payment of reasonable honoraria; b. Reimbursement of presenters' out-of-pocket expenses; and The payment of the cost of modest meals or social events held as part of an educational activity.

5. When the Provider supports presenters, support shall be limited to:

a. The payment of reasonable honoraria;

and b. Reimbursement of presenters' out-of-pocket expenses.

Full Disclosure To those who present at any activity where Operative Dentistry, Inc. is acting as the administrative authority for continuing education, whether as sole authority, or in joint sponsorship, the following guidelines must be observed:

1. All presentations should promote improvements in oral healthcare and not specific drugs, devices, services, or techniques.

2. Any media shown to the participants should be free from advertising, trade names, or product messages (except as applies in guideline #3).

3. Presenters shall avoid recommending or mentioning any specific product by its trade name, using generic terms whenever possible.

When reference is made to a specific product by its trade name, reference shall also be made to competitive products. Conflict of Interest A Conflict of interest may be considered to exist if a presenter, author or reviewer for an OpDent CDE activity is directly affiliated with or has a direct financial interest in any organization(s) that may be co-supporting a course/manuscript, or may have a direct interest in the subject matter of the presentation/manuscript. The intent of this policy is not to prevent a speaker with an affiliation or financial interest from

making a presentation, or submitting a manuscript. It is intended that any potential conflict be identified openly so that the participants in the CDE have the full disclosure of the facts so that they may form their own judgments about the presentation/manuscript.

Current as of: 1-Oct-18 31 To those who participate at any activity where Operative Dentistry, Inc. is acting as the administrative authority for continuing education, whether as sole authority, or in joint sponsorship, the following guidelines should be understood: Presenter Speakers/presenters at any CE activity will be required to disclose any potential bias towards commercial supporters, or any other commercial entity that will be mentioned in their presentation. Author Authors of every accepted manuscript will be required to disclose any potential bias towards commercial supporters, or any other commercial entity that will be mentioned in their manuscript. Reviewer Reviewers of manuscripts will be required to disclose any potential bias towards commercial supporters, or any other commercial entity that is mentioned in the manuscripts they are asked to review. Should a conflict arise, the reviewer is obligated to withdraw themselves as reviewers of the manuscript, and OpDent will select a new reviewer.

Faculty Posting: Faculty postings are available from OpDent for a \$175.00USD flat fee which covers up to 250 words and free logo placement if one is provided. Each additional 50 words is charged at \$50.00USD per unit, and each additional issue for which you would like the posting to run is charged at \$50.00USD as well. OpDent reserves the right to refuse any posting. Honoraria: ADA CERP STANDARDS require written policies and procedures governing honoraria and reimbursement of out-of-pocket expenses for all Continuing Education Events. Additionally, the provider, the joint provider, or designated educational partner must pay directly any instructor/presenter honoraria or reimbursement of out-of-pocket expenses in compliance with the provider's written policies and procedures. Joint providers have the option of using Operative

Dentistry, Inc's (OpDent) policy (outlined below) or another policy. If using another policy, a copy must be provided with the application for Joint-Sponsorship. As a subscription supported, non-profit organization, OpDent requests a speaker's expenses be covered by their own organization. If expenses are not covered by the speaker's organization, prior approval must be received by OpDent. If an activity receives commercial support, OpDent enforces the ADA CERP STANDARDS on commercial support to verify commercial support funds designated for honoraria and expenses, as outlined in the "Commercial Supporter Agreement." OpDent must maintain/receive a detailed reconciliation of the commercial support funds at the conclusion of the activity. Honoraria and expenses are paid from the net revenue of the activity. If a joint sponsor organization does not have its own policy, it is encouraged to use OpDent's policy. The Editor must approve any changes or deviation to the following for OpDent Board of Directors.

The Managing Editor must approve any changes or deviation to the following for OpDent staff. Tier 1 – For Board of Directors (as approved by Editor), Editorial and Office Staff of Operative Dentistry

1. Airfare a. Reimbursable expenses i. 21-day advance purchase ii. Coach airfare b. Non-reimbursable expenses i. Less than 21-day advance purchase ii. First class airfare iii. Additional\* &/or overweight baggage fees \*Additional applies to more than one standard luggage piece
2. Lodging a. Reimbursable expenses i. Standard room at host hotel ii. Length of stay 1. One night per calendar day containing an invited lecture/presentation 2. One night per calendar day containing any number of required meeting(s) b. Non-reimbursable expenses i. Phone charges ii. Internet charges iii. Movies iv. Alcohol v. Mini-bar items vi. Business center expenses 1. Exception for Office Manager or Editorial Assistant for reasonable business center charges in performance of official duties.

3. Transportation to/from airport
  - a. Reimbursable expenses
    - i. Personal vehicle – mileage to/from airport (current standard IRS rate)
    - ii. Airport shuttle
    - iii. Hotel shuttle
    - iv. Standard taxi service
    - v. Rental vehicle – economy class only (only applicable for Board & Staff members with prior Editor approval)
  - b. Non-reimbursable expenses
    - i. Limo service
    - ii. Rental vehicle – any other class above economy
4. Meals & Entertainment
  - a. Reimbursable expenses
    - i. Business related (following items must be detailed on the expense report)
      1. Where
      2. With whom
      3. Business purpose
    - ii. \$60/day maximum
  - b. Non-reimbursable expenses
    - i. Alcohol
5. Honoraria
  - a. OPDENT requests speakers to waive all fees
  - b. Prior approval required to pay honorarium
6. Miscellaneous Expenses
  - a. Tips (not to exceed 20% of documented expense)
    - i. Airport
    - ii. Transportation
    - iii. Hotel

OPDENT requires all expense reports to be submitted within 10 business days following the activity. Tier 2 – For Joint-Sponsor presenters that are not eligible for Tier 1 reimbursement.

  1. Airfare
    - a. Reimbursable expenses
      - i. 21-day advance purchase
      - ii. Coach airfare
    - b. Non-reimbursable expenses
      - i. Less than 21-day advance purchase
      - ii. First class airfare
      - iii. Additional\* &/or overweight baggage fees

\*Additional applies to more than one standard luggage piece
  2. Other Expenses
    - a. Per Diem
      - i. Should pay for hotel, food, travel and reasonable incidentals
      - ii. Paid per calendar day containing an invited lecture/presentation plus one day
    - b. Based on the Globalization and World Cities Research Network (GaWC) list of city tiers
      - i. Rates
        1. Alpha Cities - USD400/day
        2. Beta Cities - USD325/day
        3. Gamma Cities - USD275/day
        4. High Sufficiency cities - USD225/day
        5. Sufficiency Cities - USD200/day
      - ii. Unlisted Cities
        1. Unlisted cities will be categorized by the Editor