

Efeitos de agentes de ligação cruzada no colágeno dentinário: uma revisão de literatura

Effects of cross-linking agents on dentin collagen: a literature review

DOI:10.34119/bjhrv6n4-342

Recebimento dos originais: 18/07/2023

Aceitação para publicação: 18/08/2023

Victor Batalha dos Santos

Graduado em Odontologia

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Rua Miracema, 398, Messejana, Fortaleza - CE, CEP: 60871-120

E-mail: victbatalha@gmail.com

Nayara de Oliveira Souza

Mestra em Odontologia

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Rua Alexandre Baraúna, 949, Rodolfo Teófilo, Fortaleza - CE, CEP: 60430-160

E-mail: nayaraoliv.d@gmail.com

Susana Joice Mendes Maia

Graduada em Odontologia

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Rua Alexandre Baraúna, 949, Rodolfo Teófilo, Fortaleza - CE, CEP: 60430-160

E-mail: susanajoicem@gmail.com

Julianne Coelho da Silva Cetira

Doutora em Odontologia

Instituição: Universidade de Fortaleza

Endereço: Av Washington Soares, 1321, Edson Queiroz, Fortaleza - CE, CEP: 60811-905

E-mail: juliannecoelhos@gmail.com

Emmanuel Arraes de Alencar Júnior

Doutor em Odontologia

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Rua Alexandre Baraúna, 949, Rodolfo Teófilo, Fortaleza - CE, CEP: 60430-160

E-mail: arraesalencar2@gmail.com

Celiane Mary Carneiro Tapety

Pós-Doutora em Dentística

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Rua Conselheiro José Júlio, s/n, Sobral - CE, CEP: 62010-820

E-mail: cmct@ufc.br

Vicente de Paulo Aragão Saboia

Doutor em Odontologia

Instituição: Universidade Federal do Ceará

Endereço: Rua Alexandre Baraúna, 949, Rodolfo Teófilo, Fortaleza - CE, CEP: 60430-160

E-mail: vpsaboia@yahoo.com

RESUMO

O colágeno, principal componente da matriz orgânica dentinária, tem importância fundamental no processo de adesão e conseqüentemente, na durabilidade das restaurações adesivas. A degradação do colágeno na interface de união resina-dentina é causada pela hidrólise da água proveniente dos túbulos dentinários e pela ativação de enzimas endógenas durante o procedimento adesivo, tais como metaloproteinasas (MMPs) e cisteínas-catepsinas. Agentes de ligação cruzada de colágeno (*crosslinkers*) tem sido propostos para aumentar a resistência do colágeno a biodegradação. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão de literatura sobre a influência de agentes de ligação cruzada no colágeno dentinário. Para isso, foi realizada uma busca nas bases de dados PubMed, Lilacs, Web of Science e Scopus por meio da estratégia de busca “*cross-linking reagents*” AND “*collagen*” AND “*dentin*”. Empregou-se como critério de inclusão ensaios clínicos e estudos *in vitro* que avaliaram algum agente biomodificador na matriz de colágeno da dentina publicados nos últimos 10 anos, resultando em 21 artigos selecionados. Os agentes *crosslinkers* avaliados eram de origem sintética (glutaraldeído e carbodiimida) ou natural (proantocianidinas, teaflavina, riboflavina/UVA, curcumina e sumagre). De acordo com os estudos, seu mecanismo de ação está relacionado ao aumento da resistência mecânica do colágeno desmineralizado e inibição inespecífica de MMPs. Observou-se grande variedade metodológica entre os artigos incluídos nessa revisão, o que dificulta a comparação entre eles. No entanto, numa visão geral, a proantocianidina, pelos bons resultados exibidos em testes resistência adesiva e pela baixa citotoxicidade, apresenta melhor potencial para uso clínico. Pode-se concluir, que o uso dos agentes *crosslinkers* melhoram as propriedades biomecânicas e bioquímicas do colágeno dentinário. No entanto, ainda há necessidade de mais pesquisas sobre essas substâncias.

Palavras-chaves: agentes de ligação cruzada, colágeno, dentin.

ABSTRACT

Collagen, the main component of the dentin organic matrix, is of fundamental importance in the adhesion process and, consequently, in the durability of adhesive restorations. Collagen degradation at the resin-dentin bond interface is caused by the hydrolysis of water from the dentinal tubules and the activation of endogenous enzymes during the adhesive procedure, such as metalloproteinases (MMPs) and cysteine-cathepsins. Collagen crosslinking agents have been proposed to increase the resistance of collagen to biodegradation. The aim of this study was to conduct a literature review on the influence of crosslinking agents on dentin collagen. To this end, a search was carried out in the PubMed, Lilacs, Web of Science and Scopus databases using the search strategy "cross-linking reagents" AND "collagen" AND "dentin". Clinical trials and *in vitro* studies evaluating biomodifying agents in the dentin collagen matrix published in the last 10 years were used as inclusion criteria, resulting in 21 selected articles. The crosslinking agents evaluated were synthetic (glutaraldehyde and carbodiimide) or natural (proanthocyanidins, theaflavin, riboflavin/UVA, curcumin and sumac). According to the studies, their mechanism of action is related to increasing the mechanical resistance of demineralized collagen and non-specific inhibition of MMPs. There was great methodological variety among the articles included in this review, which makes it difficult to compare them. However, in general terms, proanthocyanidin, due to its good results in adhesive resistance tests

and low cytotoxicity, has the best potential for clinical use. It can be concluded that the use of crosslinking agents improves the biomechanical and biochemical properties of dentin collagen. However, there is still a need for further research into these substances.

Keywords: cross-linking agents, collagen, dentin.

1 INTRODUÇÃO

A dentina é um tecido conjuntivo mineralizado que circunda a polpa dentária, apresentando em sua composição fibras de colágeno do tipo I envolvidas por cristais mineralizados (MARSHALL *et al.*, 1997). Essas fibras de colágeno apresentam propriedades mecânicas e elásticas essenciais ao elemento dentário (LANDIS, 1995). Além disso, elas são fundamentais para a formação da camada híbrida, responsável pela união dos materiais restauradores a estrutura dentária. Essa zona de interdifusão resinosa é composta por monômeros do adesivo e as fibrilas de colágeno desmineralizadas pelo condicionamento ácido (NAKABAYASHI *et al.*, 1982). 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 (LIU *et al.*, 2011).

A resina composta apresenta como vantagem boas propriedades mecânicas e estéticas. Contudo, este material é susceptível a falhas de união ao substrato dentário, o que pode causar microinfiltração marginal, e em sequência, acúmulo de biofilme, resultando em cárie secundária (SPENCER *et al.*, 2010, 2014). Em consequência, há uma redução da durabilidade das restaurações adesivas. Estudos clínicos mostram que aproximadamente metade de todas as restaurações realizadas por dentistas são substituições de restaurações existentes (SARRETT *et al.*, 2005; ELTAHLAH *et al.*, 2018). As possíveis falhas de união são atribuídas a degradação das fibrilas colágenas, colapso de malha de fibrilas e degradação hidrolítica dos polímeros resinosos (TAY *et al.*, 2003; A GÖPFERICH, 1996).

A degradação do colágeno dentinário é causada pela hidrólise das fibras de colágeno e pela ação de enzimas endógenas, tais como metaloproteinasas (MMPs) e cisteínas catepsinas (SANTANA *et al.*, 2017; BRESCHI *et al.*, 2018). Durante o procedimento adesivo, as fibras de colágeno desmineralizadas não são completamente infiltradas por monômeros resinosos. Estas fibras desnudas são mais propensas à degradação pelas MMPs ativadas pelo condicionamento ácido de sistemas adesivos convencionais e primer condicionante de adesivos autocondicionantes/universais. Ao serem ativadas degradam o colágeno na porção inferior da

camada híbrida, que gradualmente se desintegra devido ao crescimento e à fusão de porosidades (MAZZONI *et al.*, 2012).

Uma abordagem para obter restaurações mais duradouras é a inibição destas enzimas proteolíticas (LIU *et al.*, 2011). A clorexidina (CHX) atua como inibidor específico de MMP-2 e MMP-9 por meio da quelação de íons metálicos (Ca^{2+} , Zn^{2+}), os quais são essenciais para sua ativação (MOON, 2010; STROBEL; HELLWIG, 2015). Contudo seus efeitos são apenas a curto prazo. De acordo com o estudo de Osorio *et al.* (2011) a CHX falhou em reduzir a degradação do colágeno depois de 9 meses, sendo atribuído ao efeito de ligação eletrostática da clorexidina que pode se difundir com o tempo diante da presença de outros cátions no meio.

Uma alternativa viável para inibição das MMPs são os agentes de ligação cruzada de colágeno, chamados de *crosslinkers*. Estes possuem vantagens sobre outros inibidores de MMPs, já que são inespecíficos quanto aos tipos de enzimas, bloqueando o sítio de clivagem da molécula (LIU *et al.*, 2011; SCHEFFEL *et al.*, 2014). Além desse efeito inibidor, os *crosslinkers* aumentam a quantidade de ligações cruzadas na matriz de colágeno através da união de cadeia polimérica, tornando a malha dentinária mais resistente à biodegradação (BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2007). Portanto, a formação de ligações cruzadas de colágeno na dentina desmineralizada melhora a estabilidade da camada híbrida, considerada o ponto crítico da durabilidade de restaurações adesivas (MAZZONIT *et al.*, 2013).

Os agentes de ligação cruzada podem ser classificados de acordo com sua origem em naturais (proantocianidinas, teaflavina, genipina, quitosana, riboflavina/UVA) e agentes sintéticos (glutaraldeído, transglutaminase, carbodiimidas, formaldeído, compostos epóxi) (LIU; DUSEVICH; WANG, 2014). Visto a grande variedade de agentes *crosslinkers* torna-se necessária uma melhor compreensão da interação desses agentes com o colágeno dentinário e seus efeitos a curto e longo prazo. Portanto, este trabalho tem o objetivo de realizar uma revisão de literatura sobre a influência de agentes de ligação cruzada no colágeno dentinário.

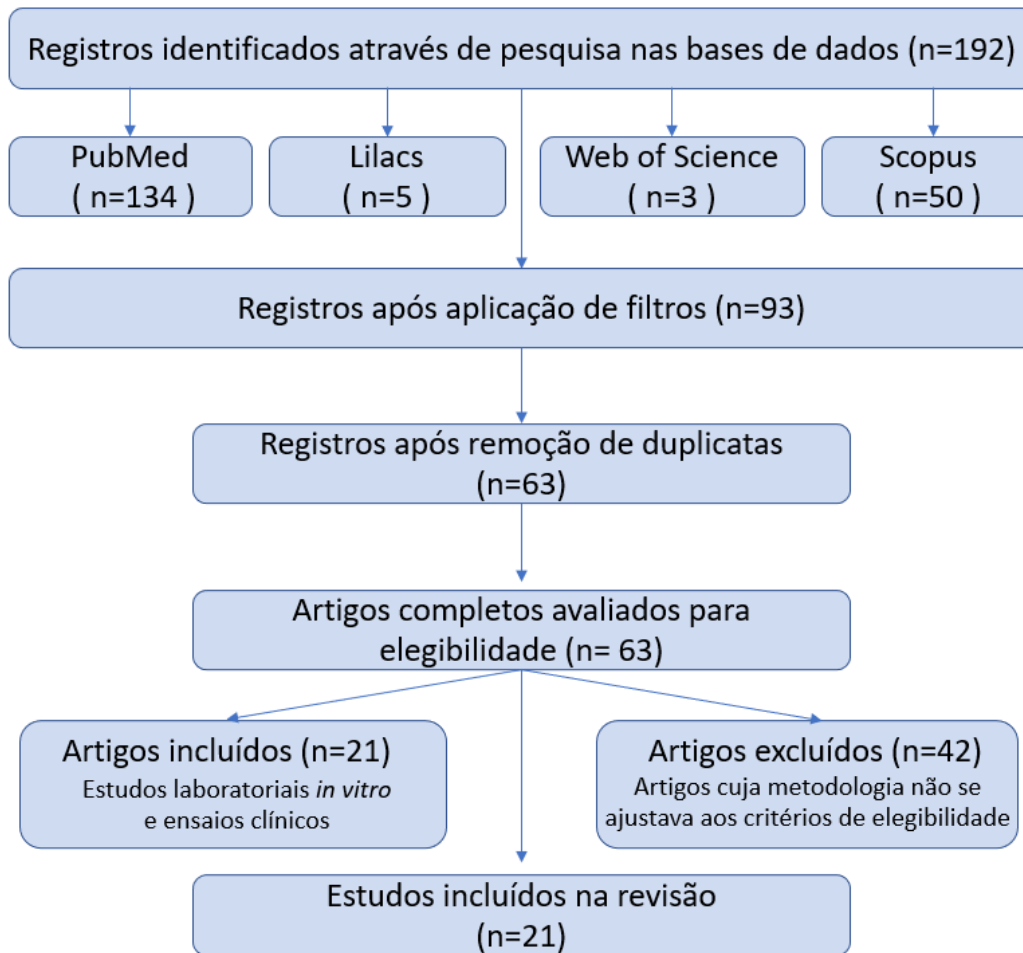
2 METODOLOGIA

O presente estudo trata-se de uma revisão narrativa de literatura. Para tal, realizou-se uma busca nas bases de dados PubMed, Lilacs, Web of Science e Scopus, com os descritores “cross-linking reagents”, “collagen” e “dentin” cadastrados nas plataformas Medical Subject Headings (MeSH) e Descritores em Ciências da Saúde (DeCS), conectados pelo operador booleano “AND” e publicados nos últimos 10 anos.

Inicialmente foram identificados 192 artigos nas bases de dados eletrônicas, após aplicação de filtros restaram 93 apenas. Trinta estudos duplicados foram removidos. Em

seguida, títulos e resumos foram analisados e 28 estudos foram lidos na íntegra, sendo selecionados 21 estudos para compor esta revisão. Os estudos incluídos avaliaram no mínimo um agente biomodificador na matriz de colágeno da dentina, sendo excluídos capítulos de livros, revisões de literatura, bem como artigos que não se ajustaram a temática abordada pela revisão. O fluxograma abaixo mostra detalhadamente a seleção dos estudos (Figura 1).

Figura 1. Diagrama de fluxo do processo de identificação, seleção e inclusão de estudos.



Fonte do autor

3 REVISÃO DE LITERATURA/DISCUSSÃO

Tabela 1. Estudos selecionados com base na metodologia.

Autor	Agente crosslinker	Metodologia	Desfecho principal
MENDES <i>et al.</i> , 2022.	<ul style="list-style-type: none"> - Etanol + Proantocianidina 6,5%; - Etanol + Carbodiimida 0,3M; - Etanol + Glutaraldeído 5%; 	<ul style="list-style-type: none"> - Módulo de elasticidade; - Variação de massa; - Grau de conversão in situ; - Resistência de união; - Micropermeabilidade. 	<p>A associação da técnica úmida etanólica com agentes de ligação cruzada melhorou as propriedades mecânicas do colágeno, porém não demonstrou influência no procedimento adesivo.</p>
LIU <i>et al.</i> , 2021.	<ul style="list-style-type: none"> - Teaflavina (TF) 0,4% e 2%; - Proantocianidina (PAC) 0,4% e 2%. 	<ul style="list-style-type: none"> - Espectroscopia de infravermelho transformado por Fourier; - Variação de massa pós-digestão colagenolítica; - Espectroscopia micro-Raman; - Microscopia eletrônica de varredura; -Quantificação de hidroxiprolina. 	<p>Ambas as substâncias realizaram ligações cruzadas de colágeno. Contudo, TF na concentração de 0,4% exibiu um efeito estabilizador do colágeno significativamente melhor do que PAC, enquanto o colágeno não tratado foi completamente digerido.</p>
GRÉ <i>et al.</i> , 2018.	<ul style="list-style-type: none"> - Glutaraldeído (GA) 5%; - PAC 6,5%; - Riboflavina ativada por UVA 0,5%. 	<ul style="list-style-type: none"> - Tenacidade à fratura; -Microscopia eletrônica de varredura. 	<p>A PAC aplicada em condições clinicamente relevantes foi capaz de manter a tenacidade a fratura estável após 6 meses de envelhecimento. Por outro lado, a incorporação de riboflavina ativada por UVA e GA não se mostrou eficaz para melhorar a estabilidade de união resina-dentina.</p>
SESEOGULLARI-DIRIHAN <i>et al.</i> , 2017.	<ul style="list-style-type: none"> - Carbodiimida (EDC) 0,3M solubilizada em água destilada com pH de 2, 4, 6, 7, 9 ou 11; - EDC solubilizada em tampão de ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico (MES) 0,1 M com pH ajustado para 6. 	<ul style="list-style-type: none"> - Variação de massa pós-digestão colagenolítica; - Quantificação de telopeptídeo carboxiterminal do colágeno tipo I (ICTP) e telopeptídeo de cross-linking C-terminal (CTX). 	<p>Os espécimes tratados com EDC em tampão MES apresentaram a menor degradação do colágeno, perda de massa e liberação de telopeptídeos. Já no meio alcalino apresentaram a maior degradação de colágeno.</p>
EPASINGHE; BURROW; YIU. 2017.	<ul style="list-style-type: none"> - PAC 6,5%; - PAC 2%. 	<ul style="list-style-type: none"> - Microscopia eletrônica de transmissão; - Difração de área selecionada; - Microscopia Eletrônica de Varredura de Emissão de Campo. 	<p>A estrutura tridimensional do colágeno foi mantida nos grupos tratados com PAC. O aumento da concentração do agente reduziu o tamanho e número de espaços interfibrilares.</p>
LEE; SABATINI. 2016.	<ul style="list-style-type: none"> - Glutaraldeído (GA) associado a três dessensibilizantes (Gluma Desensitizer, Gluma Desensitizer Power Gel e MicroPrime G) e dois adesivos de condicionamento e enxague (Confort Bond & Desensitizer e iBond TE). 	<ul style="list-style-type: none"> - Teste de microtração (μTBS); - Variação de massa pós-digestão colagenolítica; - Quantificação de hidroxiprolina. 	<p>O tratamento com o Gluma Liquid Desensitizer e o adesivo iBond TE estabilizou a interfaces adesiva dos espécimes após 6 meses de armazenamento. Além disso, reduziu a liberação de hidroxiprolina e diminuiu a perda de massa da dentina desmineralizados.</p>

CHEN <i>et al.</i> , 2016.	- Glutaraldeído (GA) 5%;	- Espectroscopia micro-Raman; - Microscopia eletrônica de varredura e transmissão; - Ensaio de nanoindentação; - Variação de massa pós-digestão colagenolítica.	GA mostrou uma afinidade específica com o colágeno da dentina, resultando na formação de uma superestrutura reticulada. As propriedades mecânicas (módulo elástico e dureza) e a bioestabilidade contra a degradação enzimática do colágeno foram significativamente melhoradas.
CADENARO <i>et al.</i> , 2016.	- Carbodiimida (EDC) 0.5M e 1 M.	- Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS).	O colágeno dentinário tratado com EDC mostrou uma temperatura de desnaturação mais alta que o controle negativo (água destilada) em todas as concentrações e tempos de imersão testados. Uma temperatura de desnaturação mais alta pode ser considerada indicadora indireta de uma rede de colágeno mais resistente e altamente reticulada
TURCO <i>et al.</i> , 2016.	- Carbodiimida (EDC) 0,5M.	- Mastigação simulada; - Quantificação de ICTP e CTX.	As tensões mastigatórias aplicadas na dentina desmineralizada não tratada aumentaram a degradação do colágeno em termos de liberação de CTX, enquanto o uso de EDC pode prevenir a degradação do colágeno dentinário, independentemente da função oclusal simulada.
RYOU <i>et al.</i> , 2016.	- Carbodiimida (EDC) 0,5M.	- Teste de indentação; - Teste de flexão de três pontos.	O tratamento com EDC causou aumento na rigidez em amostras totalmente desmineralizadas e em superfícies de dentina desmineralizadas condicionadas com ácido <i>in situ</i> .
SESEOGULLARI-DIRIHAN <i>et al.</i> , 2016.	- Glutaraldeído (GA) 1% e 5%; - Extrato de semente de uva (GSE) 1% e 5%; - Riboflavina 0,1% e 0,5% com luz UVA 365nm, 7mW/cm ² ; - Riboflavina-5- fosfato 0,1% com luz UVA 370nm; - Sumagre 10%; - Curcumina 20 M e 200 M.	- Ensaio clínico cego randomizado; - Análise zimográfica e zimografia <i>in situ</i> ; - Quantificação de ICTP e CTX; - Imunoensaio baseado em esferas multiplex.	Os zimogramas confirmaram diminuição na atividade gelatinolítica. A atividade de MMP em amostras de dentina pré-tratadas com agentes crosslinkers diminuiu significativamente entre 21% e 70%, enquanto a atividade de amostras controle não tratadas aumentou até 84%.
LEME-KRAUS <i>et al.</i> , 2016.	- Extrato da semente uva (GSE) 6,5%;	- Teste de flexão de 3 pontos; - Quantificação de hidroxiprolina; - Análises nanomecânicas estáticas e dinâmicas; - Teste de microtração (μ TBS); - Micropermeabilidade na interface adesiva.	O grupo tratado com GSE aumentou o módulo de elasticidade. A solubilização típica de colágeno por proteases endógenas observada no grupo controle foi significativamente reduzida pelo pré-tratamento com GSE. Dentro de 1 min de aplicação de GSE, as propriedades nanomecânicas da matriz de dentina aumentaram significativamente. As matrizes de dentina biomodificadas com GSE exibiram um comportamento mais elástico quando comparadas ao tecido nativo.

<p>LIU <i>et al.</i>, 2015.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Seis espécies monoméricas, duas espécies diméricas de extrato de semente de uva (GSE): (+)- catequina (pCT), (-)- catequina (CT), (-) epicatequina (EC), (-)- epigallocatequina (EGC), (-) epicatequinagalato (ECG), (-)- epigallocatequinagalato (EGCG), procianidina B2; - Uma fração de baixo peso molecular (PALM) de extrato de semente de uva comercialmente disponível; - Fração de alto peso molecular de extrato de semente de uva (PAHM); - Extrato de semente de uva original (GSE). 	<ul style="list-style-type: none"> - Espectroscopia de infravermelho com transformado de Fourier (FTIR); - Variação de massa pós-digestão colagenolítica; - Teste de microtração (μTBS). 	<p>As espécies monoméricas não galoiladas, incluindo pCT, CT, EC e EGC, falharam em aumentar a estabilidade enzimática do colágeno de dentina. Os dois compostos monoméricos galoilados ECG e EGCG aumentaram significativamente a resistência do colágeno dentinário à colagenase. O PAHM aumentou o μTBS.</p>
<p>SESEOGULLARI-DIRIHAN <i>et al.</i>, 2015.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Glutaraldeído (GA) 1% e 5%; - Extrato da semente de uva (GSE) 1% e 5%; - Sumagre (SG) 10%; - Curcumina (CR) 20M e 200M; - Riboflavina/UV 0,1% e 0,5%; - Riboflavina-5- fosfato/UV 0,1%; 	<ul style="list-style-type: none"> - Variação de massa pós-digestão colagenolítica; - Quantificação de ICTP e CTX. 	<p>A curcumina na concentração de 200 M foi capaz de reduzir a perda de massa dos espécimes de dentina desmineralizadas e diminuir a liberação de CTX.</p>
<p>EKAMBARAMA <i>et al.</i>, 2015.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Carbodiimida (EDC) 0,3 M em água; - Carbodiimida (EDC) 0,3 M em acetona 90%; - Carbodiimida (EDC) 0,3 M em etanol a 90%. 	<ul style="list-style-type: none"> - Teste de flexão de três pontos; - Teste de microtração (μTBS); - Razão de intumescimento; - Variação de massa pós-digestão colagenolítica. 	<p>EDC com acetona apresentou mais altos valores de módulo de elasticidade. A taxa de intumescimento foi menor nos grupos EDC com solvente acetona e etanol do que o solvente água. Após a colagenase, apenas o grupo EDC acetona manteve seu μTBS. O ganho de massa foi maior nos grupos com acetona e álcool.</p>
<p>LIU; DUSEVICH; WANG. 2014.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Extrato da semente da uva (GSE) 2%; - GSE com ácido fosfórico 5,10 e 20%; - Glutaraldeído 2,5%; 	<ul style="list-style-type: none"> - Espectroscopia de infravermelho transformado por Fourier; - Ensaio por espectrometria de massa por desorção / ionização a laser assistida por matriz; 	<p>O condicionamento da dentina com ácido fosfórico incorporado com GSE resultou em colágeno inerte a colagenase. A adição de GSE tornou o ácido fosfórico um condicionador e estabilizador de colágeno, sendo a concentração preferencial de ácido fosfórico <20%.</p>

	- GA com ácido fosfórico 5,10 e 20%.	- Condicionamento de dentina e proteção de colágeno pelo agente <i>crosslinker</i> através de espectroscopia micro-Raman; - Microscopia eletrônica de varredura e transmissão (SEM e TEM).	
VIDAL <i>et al.</i> , 2014.	- Dímeros e trímeros de PAC misturados com derivados de ácido gálico.	- Teste de flexão de três pontos; - Variação de massa pós-digestão colagenolítica.	O PAC aumentou o módulo de elasticidade e reduziu a digestão por colágeno. Entre os seus derivados, o éster pentagalloyl de glicose apresentou melhores efeitos na elasticidade e resistência a digestão.
SCHEFFEL <i>et al.</i> , 2014.	- Carbodiimida (EDC) 0,5M, 1M e 2M; - Glutaraldeído (GA) 10%.	- Teste de flexão de três pontos; - Variação de massa pós-digestão colagenolítica; - Quantificação de hidroxiprolina; - Atividade de MMP; - Varredura diferencial de calorimetria (DSC).	O EDC foi capaz de aumentar significativamente a rigidez do colágeno, sendo as concentrações de 1M e 2M com menor atividade de MMPs. O grupo de GA 10% obteve os maiores valores de elasticidade.
CHIANG <i>et al.</i> , 2013.	- Riboflavina-5-fosfato a 0,1% e 1% ativada por 1 ou 2 min por UVA; - Glutaraldeído (GA) 0,5% e 5%.	- <i>Cross-linking</i> de colágeno por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida; - Avaliação da resistência de união (μ TBS); - Teste de Nanoinfiltração; - Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).	O glutaraldeído induziu uma maior gelificação de colágeno. O glutaraldeído, 0,1% RF/2-min-UVA e 1% RF/1-minUV mostrou maior rigidez em comparação com os não tratados. O tratamento com RF/2-minUVA a 0,1% manteve o TBS alto após os 5000 termociclos. 0,1% RF/2-minUVA mostrou a menor taxa de nanoinfiltração
LIU <i>et al.</i> , 2013.	- PAC 3,75%.	- Perda de massa após a digestão colagenolítica; - Espectroscopia de infravermelho transformado por Fourier.	A PAC aumentou a massa dos espécimes, principalmente em exposições mais prolongadas.
FAWZY <i>et al.</i> , 2012.	- Riboflavina 0,1% e UVA 1% (Rb/UVA); - Riboflavina 0,1% e BL 1% (Rb/BL).	- Desafio à colagenase bacteriana; - Teste de flexão de 3 pontos (UTS); - Resistência de união (μ TBS).	Todas as espécies tratadas com riboflavina fotoativada por UVA e luz natural aumentaram a rigidez do colágeno e diminuíram a hidroxiprolina depois de 24 horas, sendo a fotoativação por UVA mais eficaz no aumento da UTS.

Fonte: do autor

Os agentes *crosslinkers* podem melhorar as propriedades mecânicas das fibras de colágeno dentinário através de pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações iônicas e covalentes, melhorando a resistência de união resina-dentina de forma imediata e a longo prazo, preservando contra os efeitos da degradação enzimática/hirolítica (FAWZY *et al.*, 2012; HASS *et al.*, 2016). Contudo, devido a grande variedade de agentes pesquisados, é necessário sintetizá-los em relação as suas propriedades biológicas, técnicas de aplicação e métodos de fotoativação. Tendo em vista que os estudos analisados tiveram variações metodológicas, tais como testes mecânicos/químicos, concentração dos agentes, técnica de aplicação e tempo de armazenamento, comparou-se aqueles com metodologias similares com o propósito de melhor analisar seus efeitos sobre o colágeno dentinário.

As proantocianidinas (PACs) são flavanoides encontrados de forma abundante no reino vegetal. Este composto polifenólico está presente no extrato da semente da uva (GSE), cranberries, casca da canela, semente do cacau, chá verde e branco, sendo utilizado como suplemento alimentar com propriedade anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana e antiviral (CASTELLAN *et al.*, 2013; LIU; DUSEVICH; WANG, 2014). Na odontologia uma atenção especial tem sido dada à sua capacidade de se ligar a proteínas ricas em prolina, como o colágeno (CASTELLAN *et al.*, 2013; EPASINGHE *et al.*, 2017). Estudos mostraram que a utilização de PACs na dentina desmineralizada aumentou propriedades mecânicas e reduziu as taxas de biodegradação (LIU *et al.*, 2021; EPASINGHE *et al.*, 2017; LEME-KRAUS *et al.*, 2016). De acordo com Liu *et al.* (2014), o GSE nas concentrações de 5%, 10% e 20% tornou a dentina desmineralizada inerte à collagenase bacteriana. Já Leme-Kraus *et al.* (2016) observou que o GSE na concentração de 6,5% aumentou no módulo de elasticidade da dentina. Liu *et al.* (2013), Vidal *et al.* (2014), Epasinghe *et al.* (2017) e Liu *et al.* (2021) relataram que as PACs aumentaram a massa dos espécimes de colágeno, assim como o módulo de elasticidade. O efeito está provavelmente relacionado a indução de ligações cruzadas a nível intermicrofibrilar. Estas interações ocorrem principalmente através de pontes de hidrogênio entre a hidroxila (-OH) do grupo fenólico da PA e o grupo carbonil (C=O) colágeno, resultando em união mais forte entre as fibrilas de colágeno (HASS *et al.*, 2016). Além disso, Liu *et al.* (2013) e Liu *et al.* (2021) observaram que o uso do PAC em concentrações e tempos maiores aumentavam a resistência a degradação e formavam películas de *crosslinker* mais grossas. De fato, o aumento no tempo de exposição permite uma melhor difusão do agente no substrato dentinário, permitindo que mais ligações cruzadas sejam estabelecidas (LIU *et al.*, 2015). De forma distinta aos agentes agentes *crosslinkers* sintético, tais como glutaraldeído e carbodiimida, a PAC apresenta baixa citotoxicidade, sendo seu uso considerado seguro (BEDRAN-RUSSO *et al.*, 2014).

A riboflavina é uma vitamina (B2) utilizado na área oftalmológica para tratamentos de ceratocone, sendo capaz de aumentar a resistência da córnea humana em até 3 vezes (ARBELAEZ *et al.*, 2009). Na odontologia, é utilizado como agente de ligação cruzada fotoativado com picos de absorção em 270, 366 e 445 nm. A irradiação da riboflavina por luz UVA libera radicais livres de oxigênios que reagem com o grupo amina presente na molécula de colágeno formando ligações covalente, responsável pelos *crosslinkings* (SNIBSON, 2010; SESEOGULLARI-DIRIHAN *et al.*, 2016). Fawzy *et al.* (2012) e Chiang *et al.* (2013) por meio dos testes de flexão de três pontos (UTS) e de microtração (μ TBS), relataram que o uso de riboflavina na concentração de 0,1% a 1% fotoativada por UVA foi capaz de aumentar a rigidez da dentina desmineralizada e melhorou resistência de união da resina a dentina. Já no estudo de Seseogullari-Dirihan *et al.* (2015) por meio da quantificação das proteínas ICTP e CTX, indicativas de degradação do colágeno, observaram que 0,1% de riboflavina irradiada por UVA de 1-5 minutos foi capaz de reduzir a liberação destas proteínas depois de 14 dias de armazenamento. De acordo Seseogullari-Dirihan *et al.* (2016), a riboflavina/UVA nas concentrações de 0,1 e 0,5% inativaram 46% e 52% de MMPs, respectivamente. Além disso, Fawzy *et al.* (2012) ao compararem a fonte de ativação da riboflavina, raios ultravioletas (UVA) ou luz visível (400 a 500nm), observaram que em uma concentração de 1%, a fotoativação por UVA se mostrou mais eficaz quando comparada a luz visível. Contudo, a aplicabilidade deve ser considerada, pois a luz visível é uma alternativa com maior custo-benefício (FAWZY *et al.*, 2012; HEISKANEN; HAMBLIN, 2018).

Os polifenóis derivados da curcumina (*Curcuma longa*) e sumagre (*Rhus coriaria*) são utilizados na medicina aos seus efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e anti-carcinogênicos (HEWLINGS; KALMAN, 2017; GUMUS *et al.*, 2018). Os polifenóis presentes nessas plantas são capazes de formar *crosslinkings* através de pontes de hidrogênio com o colágeno (SESEOGULLARI-DIRIHAN *et al.*, 2015). Seseogullari-dirihan *et al.* (2015) e Seseogullari-Dirihan *et al.* (2016) observaram que a curcumina na concentração de 20 M e sumagre a 10% inibiram a atividade da catepsina K. Além disso, os agentes *crosslinkers* evitaram a perda de massa dos espécimes de colágeno dentinário quando comparado ao grupo controle.

Apenas um dos artigos desta revisão incluía a teaflavina (TF), uma substância derivada do chá preto, como agente de ligação cruzada de colágeno. Liu *et al.* (2021) mostrou que a TF na concentração de 0,4% e 2% preservou a matriz de colágeno contra a degradação enzimática em um tempo clinicamente relevante (30 segundos). Ainda, na concentração de 0,4% exibiu um efeito estabilizador de colágeno significativamente melhor que a PAC. De fato, a TF é uma molécula de tamanho menor e com mais fácil difusão entre a malha dentinária, o que explicaria

os resultados. Além disso, sabe-se que esta concentração de PAC não é suficiente para desempenhar sua melhor eficácia, sendo a concentração ideal a 6,5%. A estrutura da TF apresenta grupos hidroxifenol e galóilo, o que favorece a formação de ligações covalentes com o colágeno dentinário. Apesar dos bons resultados apresentados, a TF é um agente recentemente descoberto, sendo necessários estudos futuros para ratificar sua eficácia e melhor compreender seu mecanismo de ação.

O glutaraldeído (GA), um agente *crosslinker* sintético, possui em sua estrutura cinco carbonos alifáticos com um aldeído em cada extremidade da cadeia, o que permite a ligação química com aminoácidos lisina e hidroxilisina do colágeno, formando ligações cruzadas do tipo covalente (SCHEFFEL *et al.*, 2014). Tais propriedades explicam os resultados dos estudos de Chiang *et al.* (2013), Seseogullari-dirihan *et al.* (2015) e Seseogullari-dirihan *et al.* (2016) que avaliaram o efeito das concentrações de 1% e 5% de glutaraldeído no colágeno dentinário. Chiang *et al.* (2013) por meio do teste de μ TBS mostrou uma rede de colágeno densa e fechada na interface adesiva, enquanto Seseogullari-dirihan *et al.* (2015) observaram a redução de marcadores da degradação do colágeno, como ICTP e HYP depois de 14 dias de armazenamento. Por outro lado, Gré *et al.* (2018) observaram que o tratamento com GA a 5% não aumentou significativamente a rigidez do colágeno quando comparado ao grupo controle após armazenamento por 6 meses. De fato, o GA forma ligações cruzadas de forma imediata na superfície do tecido, formando uma barreira que impede sua maior difusão em todo volume tecidual, não sendo capaz de inibir completamente a atividade de MMPs na região mais profunda da camada híbrida (HASS *et al.*, 2016). A maior desvantagem do GA é sua alta citotoxicidade ocasionada por grupamentos não ligados ou degradados, sendo 100 vezes mais tóxico que as proantocianidina (HAN *et al.*, 2003).

A 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimida (EDC) é um agente *crosslinker* sintético assim como o glutaraldeído, porém com menor citotoxicidade (LIU *et al.*, 2014). A EDC é um isômero de cianamida estável capaz de realizar ligações covalentes entre grupos carboxila (-COOH) e amina primária (-NH₂) de proteínas das fibras colágenas. Além disso, esta substância é capaz de inativar proteases dentinárias endógenas ligadas à matriz (SCHEFFEL *et al.*, 2014). Turco *et al.* (2016), Ryou *et al.* (2016) e Cadenaro *et al.* (2016) avaliaram o EDC numa concentração de 0,5M. Ryou *et al.* (2016) observaram um aumento na rigidez do colágeno tratado com EDC através de teste de flexão de três pontos, enquanto Scheffel *et al.*, (2014) mostrou um aumento da resistência de união do adesivo a dentina após o pré-tratamento dentinário com a mesma substância. Turco *et al.* (2016), por meio da quantificação de marcadores ICTP e CTX, observaram uma redução da degradação enzimática.

Já Cadenaro et al. (2016), através da espectroscopia de raios X por dispersão em energia, observaram um aumento na temperatura de desnaturação do colágeno dentinário após a aplicação do agente. Estes efeitos se devem as ligações covalentes interfibrilares promovidas pelo EDC.

4 CONCLUSÃO

Os agentes de ligação cruzadas melhoram as propriedades mecânicas e bioquímicas do colágeno dentinário. Observou-se grande variedade metodologica entre os artigos incluídos nessa revisão, o que dificulta a comparação entre eles. No entanto, numa visão geral, a proantocianidina, pelos bons resultados exibidos em testes resistência adesiva e pela ausência de citotoxicidade, apresenta melhor potencial para uso clínico. No entanto, ainda há necessidade de mais pesquisas sobre essas substâncias.

REFERÊNCIAS

- A GÖPFERICH. Mechanisms of polymer degradation and erosion. **Biomaterials**, v. 17, n. 2, p. 103-114, 1996.
- ARBELAEZ, M. C. *et al.* Collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: one-year results. **Oman Journal of Ophthalmology**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2009.
- BEDRAN-RUSSO, A.K.; PEREIRA, P.N.; DUARTE, W.R.; DRUMMOND, J.L.; YAMAUCHI, M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. **Journal Of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 80, n. 1, p. 268- 272, 2007.
- BEDRAN-RUSSO, A. K.; PAULI, G. F.; CHEN, S. N.; MCALPINE, J.; CASTELLAN, C. S.; PHANSALKAR, R. S.; AGUIAR, T. R.; VIDAL, C. M.; NAPOTILANO, J. G.; NAM, J. W.; LEME, A. A. Biomodificação da dentina: estratégias, recursos renováveis e aplicações clínicas. **Dental Materials Journal**. v. 30, n. 1, p. 62-76, 2014.
- BRESCHI, L.; MARAVIC, T.; CUNHA, S. R.; COMBA, A.; CADENARO, M.; TJÄDERHANE, L.; PASHLEY, D.H.; TAY, F.R.; MAZZONI, A. Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. **Dental Materials Journal**, v. 34, n. 1, p. 78-96, 2018.
- CADENARO, M. *et al.* Effect of carbodiimide on thermal denaturation temperature of dentin collagen. **Dental Materials**, v. 32, n. 4, p. 492-498, 2016.
- CASTELLAN, C.S.; BEDRAN-RUSSO, A.K.; ANTUNES, A.; PEREIRA, P.N. Effect of dentin biomodification using naturally derived collagen cross-linkers: one-year bond strength study. **International Journal of Dentistry**, v. 2013, n. 918010, p. 1-6, 2013.
- CHEN, C. *et al.* Glutaraldehyde-induced remineralization improves the mechanical properties and biostability of dentin collagen. **Materials Science and Engineering**, v. 67, p. 657-665, 2016.
- CHIANG, Y. S. *et al.* Riboflavin-ultraviolet-A-induced collagen cross- linking treatments in improving dentin bonding. **Dental Materials**, v. 29, n. 6, p. 682-692, 2013.
- EKAMBARAMA, M. Effect of Solvents on Dentin Collagen Cross- linking Potential of Carbodiimide. **The Journal of Adhesive Dentistry**, v. 17, n. 3, p. 219-226, 2015.
- ELTAHLAH, D.; LYNCH, C.D.; CHADWICK, B.L.; BLUM, I.R.; WILSON, N.H.F. An update on the reasons for placement and replacement of direct restorations. **Journal of Dentistry**, v. 72, p. 1-7, 2018.
- EPASINGHE, D.J.; BURROW, M.F.; YIU, C.K. Effect of proanthocyanidin on ultrastructure and mineralization of dentine collagen. **Archives of Oral Biology**, v. 84, p. 29-36, 2017.
- FAWZY, Amr S. *et al.* Riboflavin as a dentin crosslinking agent: ultraviolet a versus blue light. **Dental Materials**, v. 28, n. 12, p. 1284-1291, 2012.

GRÉ, C. P. *et al.* Do collagen cross-linkers improve dentin's bonding receptiveness? **Dental Materials**, v. 34, n. 11, p. 1679-1689, 2018.

GUMUS, H. *et al.* Effects of sumac and turmeric as feed additives on performance, egg quality traits, and blood parameters of laying hens. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 47, n. 1, p. 1-7, 2018.

HAN, B. *et al.* Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. **Journal Of Biomedical Materials Research**, v. 65, n. 1, p. 118-124, 2003.

HASS, V.; LUQUE-MARTINEZ, I.; MUÑOZ, M.A.; REYES, M.F.; ABUNA, G.; SINHORETI, M.A.; LIU, A.Y.; LOGUERCIO, A.D.; WANG, Y.; REIS, A. The effect of proanthocyanidin-containing 10% phosphoric acid on bonding properties and MMP inhibition. **Dental Materials**, v. 32, n. 3, p. 468-75, 2016.

HEISKANEN, V.; HAMBLIN, M. R. Photobiomodulation: lasers vs. light emitting diodes? **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1003-1017, 2018.

HEWLINGS, S; KALMAN, D. Curcumin: a review of its effects on human health. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 1-11, 2017.

LANDIS, W.J. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. **Bone**, v. 16, n. 5, p. 533-544, 1995.

LEE, J. *et al.* Glutaraldehyde collagen cross-linking stabilizes resin-dentin interfaces and reduces bond degradation. **European Journal of Oral Sciences**, v. 125, n. 1, p. 63-71, 2016.

LEME-KRAUS, A.A. *et al.* Biostability of the Proanthocyanidins-Dentin Complex and Adhesion Studies. **Journal of Dental Research**, v. 96, n. 4, p. 406-412, 2016.

LIU, H.; GUO, J.; WANG, R. *et al.* Theaflavins as a novel cross-linker quickly stabilize demineralized dentin collagen against degradation. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 11-19, 2021.

LIU, Y. *et al.* Enhancement in dentin collagen's biological stability after proanthocyanidins treatment in clinically relevant time periods. **Dental Materials**, v. 29, n. 4, p. 485-492, 2013.

LIU, Y. *et al.* Molecular weight and galloylation affect grape seed extract constituents' ability to cross-link dentin collagen in clinically relevant time. **Dental Materials**, v. 31, n. 7, p. 814-821, 2015.

LIU, Y.; DUSEVICH, V.; WANG, Y. Addition of Grape Seed Extract Renders Phosphoric Acid a Collagen-stabilizing Etchant. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 8, p. 821-827, 2014.

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. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 8, p. 953-968, 2011.

MARSHALL, G. W. *et al.* The dentin substrate: structure and properties related to bonding. **Journal of Dentistry**, v. 25, n. 6, p. 441-458, 1997.

MAZZONI, A.; NASCIMENTO, F. D.; CARRILHO, M.; TERSARIOL, I.; PAPA, V.; TJÄDERHANE, L. *et al.* MMP activity in the hybrid layer detected with in situ zymography. São Paulo, Brasil. **Journal of Dental Research**, v. 5, n.91, p. 467- 472, 2012.

MENDES, T. A. D. *et al.* **Biomodification of dentin collagen by primers with crosslinking reagents using ethanol wet bonding technique.** International Journal of Adhesion & Adhesiveness, v. 119, p. 1-6, 2022.

MOON, P. C; WEAVER, J.; BROOKS, C. N. Review of matrix metalloproteinases effect on the hybrid dentin bond layer stability and chlorhexidine clinical use to prevent bond failure. **Open Dentistry Journal**, v. 4, n.1, p. 147-152, 2010.

NAKABAYASHI, N.; KOJIMA, K.; MASUHARA, E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 16, n. 3, p. 265-273, 1982.

OSORIO, R. *et al.* Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. **European Journal of Oral Sciences**, v. 119, n. 1, p. 79-85, 2011.

RYOU, H. *et al.* On the stiffness of demineralized dentin matrices. **Dental Materials**, v. 32, n. 2, p. 161-170, 2016.

SANTANA, L. G. Efeito da solução de clorexidina na adesão dentinária: uma revisão de literatura. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - União Metropolitana de Educação e Cultura – UNIME. Lauro de Freitas/BA, 2017.

SARRETT, D.C. Clinical challenges and the relevance of materials testing for posterior composite restorations. **Dental Materials**, v. 21, n. 1, p. 9-20, 2005.

SCHEFFEL, D.L.; HEBLING, J.; SCHEFFEL, R.H.; AGEE, K.A.; CADENARO, M.; TURCO, G.; BRESCHI, L.; MAZZONI, A.; COSTA, C.A.; PASHLEY, D.H. Stabilization of dentin matrix after cross-linking treatments, in vitro. **Dental Materials**, v. 30, n. 2, p. 227-33, 2014.

SESEOGULLARI-DIRIHAN, R. *et al.* Effect of pH on dentin protease inactivation by carbodiimide. **European Journal of Oral Sciences**, v. 125, n. 4, p. 288-293, 2017.

SESEOGULLARI-DIRIHAN, R. *et al.* Effect of pretreatment with collagen crosslinkers on dentin protease activity. **Dental Materials**, v. 31, n. 8, p. 941-947, 2015.

SESEOGULLARI-DIRIHAN, R. *et al.* Use of crosslinkers to inactivate dentin MMPs. **Dental Materials**, v. 32, n. 3, p. 423-432, 2016.

SNIBSON, G. R. Collagen cross-linking: a new treatment paradigm in corneal disease - a review. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, v. 38, n. 2, p. 141-153, 2010.

SPENCER, P. *et al.* Adhesive/Dentin Interface: the weak link in the composite restoration. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 38, n. 6, p. 1989-2003, 2010.

SPENCER, P. *et al.* Proteins, Pathogens, and Failure at the Composite-Tooth Interface. **Journal Dental Research**, v. 93, n. 12, p. 1243-1249, 2014.

STROBEL, S.; HELLWIG, E. The effects of matrix metalloproteinases and chlorhexidine on the adhesive bond. **Swiss Dental Journal SSO**, v. 125, n. 2, p.134-140, 2015.

TAY, F.R. *et al.* Aging Affects Two Modes of Nanoleakage Expression in Bonded Dentin. **Journal of Dental Research**, v. 82, n. 7, p. 537-541, 2003.

TURCO, G. *et al.* Occlusal loading and cross-linking effects on dentin collagen degradation in physiological conditions. **Dental Materials**, v. 32, n. 2, p. 192-199, 2016.

VIDAL, C. M. P. *et al.* Mimicking the Hierarchical Functions of Dentin Collagen Cross-Links with Plant Derived Phenols and Phenolic Acids. **Langmuir**, v. 30, n. 49, p. 14887-14893, 2014.