

Reacción de la dentina a los sistemas adhesivos resinosos: aspectos biológicos relacionados y biodegradación de la capa híbrida

Hidalgo-Loستاunau R. Reacción de la dentina a los sistemas adhesivos resinosos: aspectos biológicos relacionados y biodegradación de la capa híbrida. Rev Estomatol Herediana. 2008; 18(1):50-64.

RESUMEN

La adhesión con sistemas adhesivos resinosos en dentina está siendo cuestionada, los estudios longitudinales in vivo y de envejecimiento in vitro al respecto demuestran que existe una degradación de la capa híbrida a nivel de las paredes pulpares del diseño cavitario. El presente artículo plantea una síntesis de numerosas conclusiones obtenidas de diversas investigaciones, para dar a entender la realidad de la adhesión en dentina y despertar una actitud restauradora diferente más allá del empleo único de sistemas adhesivos resinosos para pretender una unión adhesiva longeva en la dentina.

Palabras clave: DENTINA / METALOPROTEINASAS (MMPs) / HIDRÓLISIS / SISTEMAS ADHESIVOS / CAPA HÍBRIDA.

Reaction of the dentine to adhesive resin systems: biological aspects and biodegradation of the hybrid layer

ABSTRACT

The adhesion with resinous adhesive systems in dentine has been questioned. Longitudinal studies in vivo and in vitro have demonstrated degradation of the hybrid layer at the level of the pulpar walls. The present article summarizes numerous conclusions obtained from different investigations, to explain the updates of adhesion in dentine and to promote a different restoring attitude that goes beyond the resinous adhesive systems alone.

Key words: DENTIN / MATRIX METALLOPROTEINASES (MMPs) / HYDROLYSIS / DENTAL BONDING SYSTEMS / HYBRID LAYER.

Rony Christian Hidalgo Loستاunau¹

¹Docente del Diplomado en Odontología Estética Funcional. Unidad de Segunda Especialización. Facultad de Estomatología. Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

Correspondencia

Rony Christian Hidalgo Loستاunau
Alameda del Crepúsculo 195. Urb. Alboarda. Lima
33 - Perú.
Teléfono: 2718942
e-mail: hidalgo@endoroot.com

Recibido : 19 de febrero del 2008

Aceptado : 15 de mayo del 2008

Introducción

A lo largo del tiempo hemos visto que muchas restauraciones directas e indirectas adheridas en dentina no han demostrado la longevidad esperada y por cierto esta longevidad no ha sido mayor que antiguas técnicas donde se empleaba oro, amalgama o ionómeros vítreos; de hecho no podríamos considerarlas exitosas, pues la longevidad en retención y sellado es lo que finalmente se ha menguado con secuelas como el dolor post-operatorio y lesiones cariosas recidivantes o secundarias a estas.

La presente revisión bibliográfica ofrece un análisis de la adhesión desde la perspectiva del entendimiento de la fisiología del sustrato y la interacción de los sistemas adhesivos resinosos con el mismo, resaltando características de los sistemas adhesivos y del proceso que influyen en la reactividad de la den-

tina donde se apoyan.

Dentina y metaloproteinasas

La matriz extracelular (MEC) de la dentina, llamada también matriz orgánica, está compuesta de proteínas de colágeno (I, III, VI y V, que tienen características de autoensamblaje), proteínas específicas de dentina (fosforina, sialoproteína, AG1 proteína, factores de crecimiento -TGF β 1, FGF2, ILGF- y proteínas morfogenéticas) y no específicas (amelogenina, osteocalcina, osteoporina, osteonectina, proteínas ricas en leucina, fosfosialoproteínas y sialoproteínas -SIBLING-), proteoglicanos, glucosaminoglicanos, proteínas derivadas del suero (como la albúmina), glicoproteínas, fosfolípidos y enzimas de la matriz (colagenasas, gelatinasas, peptidasas, fosfatasas, esteratas, etc), variando su composición a merced de la posición y tipo de dentina, la cual

tiene incrustada minerales de apatita en todo su grosor (1-3).

Los conductillos dentinarios que atraviesan todo el espesor de la dentina primaria contienen líquido tisular (fluido dentinario), prolongaciones citoplasmáticas celulares (procesos odontoblasticos extendidos hasta por lo menos el 50% de la distancia dentinaria), fibras nerviosas y colágenas (4). El diámetro interno y su densidad varían de acuerdo a la profundidad dentinaria que a su vez está relacionada con el área de dentina intertubular y la humedad superficial (Tabla 1) (5).

El fluido pulpar intersticial ejerce presión positiva centrífuga y se expresa como fluido dentinario a través de los túbulos dentinales, los que son expuestos durante la preparación cavitaria (6).

En la dentina ya formada, el proceso odontoblastico consta de un tronco principal grueso (0,5-1,0 μ m)

Tabla 1. Número de túbulos y humedad superficial, en relación a su profundidad o distancia pulpar.

distancia de la pulpa (mm)	túbulos por cm ² (x10 ⁶)	área ocupada por dentina intertubular (%)	área ocupada por túbulos llenos de agua (%)
Pulpa	4,5	68,2	31,8
0,1 – 0,5	4,3	69,6	30,4
0,6 – 1,0	3,8	73,1	26,9
1,1 – 1,5	3,5	75,3	24,7
1,6 – 2,0	3,0	78,8	21,2
2,1 – 2,5	2,3	83,7	16,3
2,6 – 3,0	2,0	85,9	14,1
3,1 – 3,5	1,9	86,6	13,4
3,6 – 4,5	-	-	10,0

Adaptado de: Costa CAS, Hebling J.(5)

y unas ramas laterales más delgadas (0,1-0,2µm). El proceso odontoblástico contiene organelas responsables para exocitosis y endocitosis, forma glóbulos o vesículas de mineralización y es rico en filamentos intermedios y microtúbulos (2). Y se extiende al menos de un tercio a la mitad de la dentina mineralizada, aunque elementos celulares probablemente de origen odontoblástico han sido observados muchas veces a todo lo largo de su espesor (2,7,8). Los cuerpos de los odontoblastos están conectados entre si por uniones tipo desmosomas, y están altamente especializados en la síntesis y excreción de moléculas orgánicas y la mineralización de la dentina (7). El 18-20% de la dentina es materia orgánica (donde casi el 90% es colágeno tipo I) y 11-12% es agua (9). Estas características como veremos mas adelante proveen el mejor sustrato para la degradación, consecuencia de las enzimas bacterianas y enzimas endógenas presentes en diferente proporción según el lado de la lesión cariosa.

Las MMPs o metaloproteinasas de la matriz extracelular de la dentina, están involucradas en procesos de degradación del colágeno, proteoglicanos, fibronectina y proteínas en general. Estas enzimas están presentes en la dentina en estado inactivo y han estado presen-

tes desde la dentinogénesis, donde tomaron activamente su primer rol organizando la matriz orgánica donde luego se desarrollaría histológicamente el diente, y finalmente se formaría y mineralizaría la dentina, para luego quedarse incrustadas -en estado inactivo- en la estructura orgánica dentinaria (3,10-14).

Los odontoblastos producen metaloproteinasas MMPs -2,-8,-9,-14,-20, (15,16,17) siendo la más abundante en la dentina la MMP -8. (14) Recientemente se ha publicado que las MMPs -2,-10,-11,-14,-15,-16,-20 y -23 están intensamente expresadas en odontoblastos, mientras que las MMPs -13 y -17 están abundantemente expresadas en pulpa (17). A su vez, los inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) 1, 2 y 3 están expresados en odontoblastos y pulpa de dientes totalmente desarrollados (1,17). Los TIMPs son proteínas multifuncionales que contrarrestan a las MMPs, sin embargo no son meramente inhibidores de MMPs, sus niveles cambian durante procesos fisiológicos y patológicos, por lo tanto el efecto biológico es dependiente del balance relativo entre estos (18).

Las MMPs son un tipo de endopeptidasas no séricas que dependen de la interacción con el Zinc para permanecer en latencia. Se les ha clasificado en seis grupos, de los cuales resaltan tres: las colagenasas

(degradan colágeno), las gelatinasas (degradan gelatín -colágeno desnaturalizado-) y las estromelinas (degradan proteoglicanos y proteínas no colágenas); además de las menos estudiadas: Matrilisinas, MMPs de membrana (MT-), cisteín Metaloproteinasas y otras Metaloproteinasas aún por clasificar (19).

Además de los fibroblastos, osteoblastos y odontoblastos, otras células producen MMPs, incluidas células de defensa como los leucocitos (polimorfonucleares-PMN). Las MMPs se expresan generalmente en diversos procesos biológicos, como es el desarrollo y remodelado de tejidos normales o la angiogénesis (19). Diversas proteínas y sustancias inhiben o detienen su accionar, siendo su metabolismo altamente relacionado al pH (9,20), las MMPs son contrarrestadas naturalmente por los Inhibidores Tisulares de Metaloproteinasas (TIMPs), los cuales detienen su actividad y por consiguiente restringen la degradación de la MEC (18,21). La trascipción de las MMPs puede ser inducida por varias señales, incluyendo citoquinas, factores de crecimiento, estrés mecánico y cambios en la MEC que conduzcan a interacciones distintas entre la matriz y las células (22).

Muchas MMPs son secretadas como precursores enzimáticos (pro-MMP o zymógenos); in vitro la conversión del pro-MMP en una forma activa puede ser lograda por la extracción proteolítica de propéptido que compone un extremo de su molécula, la perturbación de la interacción proteica de cisteína y el zinc, o la modificación del grupo del sulfhidril, permitiendo la interacción del zinc del sitio activo con una molécula de agua y la expresión de su dominio catalítico (23). Agentes thiol-modificados, agentes SH-

reactivos, desnaturalizantes, agentes caotrópicos, oxígeno reactivo, calor, compuestos mercuriales, ácidos y fluctuaciones de pH han demostrado la expresión de MMPs in vitro (19,24,25), así como las fluctuaciones de pH propias de un proceso activo de desmineralización de la dentina por invasión bacteriana (9,10,12,26,27). Se ha estudiado previamente que valores de pH entre 2,3 y 5 son efectivos para activar gelatinas salivales; a este tipo de activación de MMPs se le ha denominado "activación ácida" (12).

Algunas MMPs son activadas por proteínas séricas (como plasmina, calicreina, furina), proteasas bacterianas, u otras MMP (9) e inclusive factores de crecimiento como el factor transformador de crecimiento $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), factor de crecimiento afín a la insulina (ILGF I y II) y factor de crecimiento fibroblástico (FGF 2) (28,29).

Son varias las MMPs relacionadas a la formación y mantenimiento del órgano dentino pulpar (3,11,15-17), así como en reacciones de reparación y defensa durante el progreso de la lesión cariosa (15,27); los que a su vez, están involucradas en procesos patológicos, ya que intervienen en la destrucción de la MEC durante la progresión de la caries en dentina (12), la liberación y activación de factores de crecimiento, la formación de dentina terciaria (27), y la destrucción de tejido conjuntivo durante la inflamación pulpar (30-32).

Las MMPs intervienen dinámicamente en la degradación final del colágeno (componente principal de la matriz orgánica extracelular de la dentina), como una reacción inmune para restablecer el equilibrio natural entre los componentes de construcción (Factores de Crecimiento -FC-) y destrucción,

buscando un distanciamiento físico de la noxa que altera el isosistema, para encontrarse nuevamente con una cantidad suficiente de factores positivos de recuperación y dar paso a la mineralización luego de la reorganización del colágeno, por efecto de formar dentina esclerótica, dentina reaccional o terciaria, donde nuevamente jugarán un rol activo los FC. Se sabe que el factor transformador de crecimiento $\beta 1$ (TGF $\beta 1$), es un regulador de la expresión de la MMP- 9, y produce reducciones en la expresión de MMP-8, MMP-20 y la síntesis de varias otras proteínas (15,33). Sin embargo, se conoce que dependiendo de la concentración y actividad las MMPs pueden interferir en la biodisponibilidad de los FC, debido a la degradación de proteínas ligadas a estos y necesarias para la activación de procesos constructivos (34).

Se conoce que el balance entre MMPs y TIMPs es variable, tanto en condiciones fisiológicas (crecimiento y desarrollo), como en procesos patológicos como la artritis reumatoide o la periodontitis; y en general la relevancia de los niveles sistémicos de las enzimas y sus inhibidores puede ser cuestionada, ya que es el balance local de estas proteínas las que finalmente determinan la degradación de la matriz orgánica (18).

Dentina con lesión de caries: Extremo de degradación - extremo de secreción

La capacidad de las células de la pulpa para resistir y reparar las injurias o lesiones, es fundamental para el mantenimiento de la integridad y homeostasis del órgano dental (35). Es de acuerdo al potencial y la facultad de respuesta del hospedero, que se puede promover la movilización y activación de facto-

res de crecimiento relacionados a procesos reparativos (36,37).

En las lesiones cariosas de dentina superficial se ha encontrado una expresión notable de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en túbulos dentinarios, catalizador del ácido láctico bacteriano, además de enzimas colagenasas y glicoproteinasas, la mayor parte de estas provenientes de las bacterias que invaden la dentina infectada (38,39). Las MMPs latentes han de activarse subyacentemente con finalidad de organizar el tejido dañado y alterado para la neomineralización (11,12,15,24). Teóricamente, la presencia de TIMPs estabilizaría el accionar enzimático, y en paralelo el aumento de la actividad de los FC conllevarán a la reorganización y formación de dentina reparativa si las condiciones de pH son favorables para ello (40), pues se sabe que el balance entre MMP/TIMP juega un rol crucial en la actividad de las MMPs in vivo (21). Los odontoblastos primarios sintetizan dentina reaccionaria durante formas incipientes de lesión, como por ejemplo en lesiones no cavitadas de esmalte o progresiones lentas de lesiones cariosas de la dentina (41), sin embargo en lesiones muy severas o avanzadas se puede estimular un disturbio en la capa odontoblástica generándose el desplazamiento de proteinasas y células inflamatorias en los túbulos dentinarios (9). La presencia de LDH en una lesión cariosa profunda sugeriría que la formación bacteriana de ácido láctico también puede ocurrir a profundidad en la lesión, si los substratos apropiados están allí presentes (42). Esto explicaría en parte la naturaleza socavante de los procesos de descalcificación en lesiones cariosas (40). Por otra parte, la presencia de muchas enzimas proteolíticas, inclu-

yendo endopeptidasas diferentes (colagenasas y gelatinasas) y aminopeptidasas, puede explicar la degradación de la matriz proteica de la dentina (42), pues se sabe por estudios *in vitro* que las enzimas bacterianas no pueden degradar la matriz orgánica de la dentina cariada (43,44).

El espectro de enzimas en la dentina cariada superficial es grande, señalando que muchos procesos y reacciones biológicas son posibles allí (42). La magnitud y naturaleza de la respuesta refleja tanto la extensión de la lesión, como las condiciones predominantes del órgano dentino pulpar, donde los procesos de reparación y respuesta tienen como principio sobrecoger los efectos de la lesión, y restituir la distancia entre la pulpa dentaria y la cavidad oral, contribuyendo significativamente en la defensa del órgano dentino-pulpar (45,46). Las lesiones avanzadas de caries dental -y esto está relacionado directamente con su profundidad en la dentina-, causan frecuentemente la muerte de odontoblastos primarios, seguidos por el reclutamiento y la diferenciación de odontoblastos de reposición (41). Bajo las lesiones cariosas existen cambios en las fibras nerviosas, que se coagregan con células dendríticas (47,48), estas en la pulpa expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, es decir son capaces de iniciar respuestas inmunes ante estímulos antigénicos exógenos (49). Los procesos de reparación también pueden involucrar a angiogénesis, es decir, la formación de vasos capilares nuevos en la pulpa (45,46). Se ha estudiado que las señales para la reparación de la dentina son mediadas por FC, que son liberados como consecuencia del ataque ácido y enzimático de las bacterias a la dentina (36,46).

Se conoce, que la degradación de la matriz orgánica y la desmineralización de la dentina puede ocurrir simultáneamente debido a las oscilaciones en el pH crítico de la dentina (50,51). El extremo de degradación dentinal (conocido como dentina cariada externa o dentina infectada) es abundante en microorganismos invasores que secretan una gran cantidad de enzimas hidrolíticas que llegan al fluido dentinal de los túbulos y además forman ácidos durante la glicólisis anaerobia (Fig. 1) (40,42).

Se ha propuesto que estos ácidos disuelven las paredes mineralizadas de los túbulos de la dentina superficial infectada, los cristales de la dentina peritubular, degradando y liberando de su letargo a proteínas no colagénicas de la MEC hacia el fluido dentinal que activan a las proteasas del anfitrión, las cuales catalizan la degradación de colágeno en zonas subyacentes a la lesión, que podríamos llamar: el lado secretor (o de la dentina afectada) (42,44). Consideremos que este proceso puede hacerse cíclico si es que los la desmineralización ocurre indefinidamente y consecuencia de ello la liberación de FC y la activación de MMPs.

Los azúcares hacen daño al diente en el sentido que aceleran el proceso carioso en la dentina, no solo induciendo a la mayor formación de ácidos carboxílicos por microorganismos anaerobios, sino también interviniendo en la disminución de la secreción por parte de los odontoblastos del procolágeno tipo I (y por consiguiente en la formación de dentina terciaria), como ha sido estudiado en cultivos de tejido odontoblástico (52).

En la lesión cariosa en dentina de un diente vital, los ácidos, metabolitos y toxinas bacterianas,

generan una respuesta del hospedero que incluye subyacente a la lesión: Activación de monocitos, macrófagos y otras células, más la producción pulpar de mediadores inflamatorios - citoquinas (interleuquina 1 - prostaglandinas E2), y metaloproteinasas, que intervienen en el proceso de destrucción y reorganización de la matriz dentinaria antes de su posible remineralización; a este lado le hemos denominado el extremo de secreción, que involucraría desde la pulpa hasta la dentina afectada. En este lado ocurre una reacción doble, una cercana a la lesión (posible formación de dentina esclerótica, que responde al equilibrio o desequilibrio sobre ella) y otra cercana a la pulpa (formación de dentina terciaria, que responde a una reacción fisiológica). FC como el TGF β 1, son reguladores de la actividad secretoria de los odontoblastos afectados, les señalan como reaccionar ante la situación patológica presente, pudiendo activar MMPs o mediar los procesos reparativos en el lado de secreción si externamente se promueve la homeostasis (15,33,53).

Las colagenasas bacterianas a pH neutral son capaces de degradar colágeno y proteínas no colágenas en dentina cariada (53,54). Al no resistir un pH inferior a 4,3 (55), se entiende ahora que estas enzimas no son las únicas importantes en los procesos cariosos, atribuyéndole a las enzimas proteolíticas endógenas (o del hospedero) un rol más importante en la degradación de la matriz orgánica de la dentina (12,43,44,50,56-58).

Este proceso de desmineralización y desorganización, desnaturalización y degradación del colágeno dentinal ocurre enfáticamente en la dentina infectada, extendiéndose paulatinamente a través

de la misma en dirección a la pulpa; en ese trayecto hemos de enfrentarnos a distinguir clínicamente una dentina afectada o en algunas ocasiones inmediatamente una dentina esclerótica, esta última sin duda ofrecería una barrera natural a la noxa, una reacción de defensa certera ante la enfermedad, lograda crónicamente consecuencia de estímulos favorables, sin embargo la dentina afectada es una dentina transicional entre la infección y un proceso incipiente de esclerosis o simplemente la dentina todavía sana (pero altamente metabólica) esperando subyacentemente a nivel pulpar la formación de una dentina reaccional profunda o dentina terciaria. Por las características que tiene la dentina afectada, donde la protección estructural de la hidroxiapatita aún se conserva parcialmente y es posible el reensamblaje del colágeno y las uniones de glicanos como la completa remineralización para devolverle características fisiológicamente útiles, es el sustrato en el que pretendemos terminar nuestro diseño cavitario para conservar distancias biológicas y pro-

mover la salud y vitalidad pulpar (Fig. 2).

Ha sido comprobado in vivo que cuando se trabaja sobre una pared o piso pulpar de dentina sana o afectada a 2mm de la pulpa, los adhesivos de V generación penetran a través de los túbulos dentinarios en dirección centrípeta hacia la pulpa, llegando a alojarse en ella (5,59,60). Se ha comprobado también que no existe problema clínico o procedimental en manejar dentina afectada, puesto que las lesiones están normalmente rodeadas por dentina sana y/o esmalte (61,62). Sin embargo, por las características microscópicas de este tejido afectado, muchas veces clínicamente, durante el diseño cavitario, llegamos a una dentina esclerótica o a una dentina sana, o en muchos de los casos nos encontramos ante una combinación de dos, o las tres dentinas mencionadas: afectada, esclerótica y sana, lo que complica la interacción con los materiales restuaradores (Fig. 3)

En cualquiera de estas tres posibilidades, lo esperado para el equilibrio del órgano dentino pulpar, es una barrera que detenga el paso de las toxinas bacterianas o les oblitere el

paso de carbohidratos degradables, que tenga -si fuese posible- una capacidad estimulante de la reparación del sustrato remanente y lo más importante, que a lo largo del tiempo forme una unión confiable, con la menor posibilidad de hidrólisis o biodegradación, conceptos que retomaremos más abajo. Cabe aquí formularnos una pregunta crucial: ¿Son los sistemas adhesivos resinosos contemporáneos, el mejor "biomaterial" para restablecer el equilibrio del isosistema dentino pulpar?

Sistemas adhesivos contemporáneos y su biodegradación

Los materiales dentales no se consideran sustancias inertes, ya que cuando se aplican sobre los seres vivos promueven daño tisular, debido a una respuesta específica, local o sistémica (63,64). A pesar de esto, hemos sido benevolentes al atribuirles el calificativo de bio-materiales. En estos tiempos los verdaderos biomateriales recién están desarrollándose, pues la ingeniería biológica está impulsando la creación de productos realmente compatibles con las células de nuestro cuerpo. Un verdadero biomaterial es aquel que con-

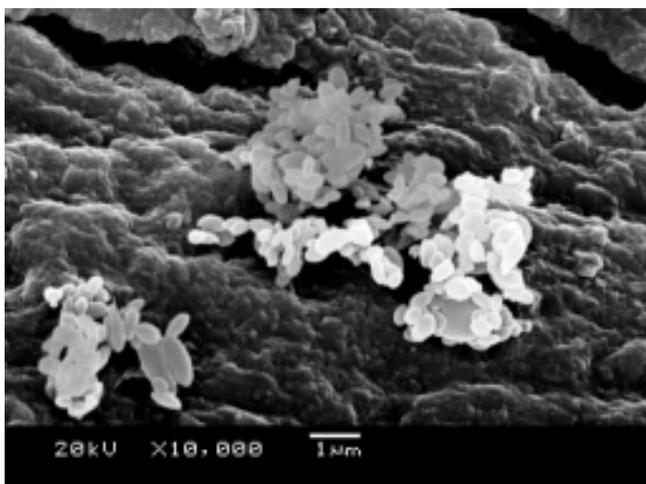


Fig. 1. Microfotografía evidenciando la dentina infectada con abundantes microorganismos en las entradas de los túbulos dentinarios y la dentina desmineralizada y completamente desorganizada (x10000) (Cortesía del Dr. Gustavo Parodi E. - Universidad Católica del Uruguay).

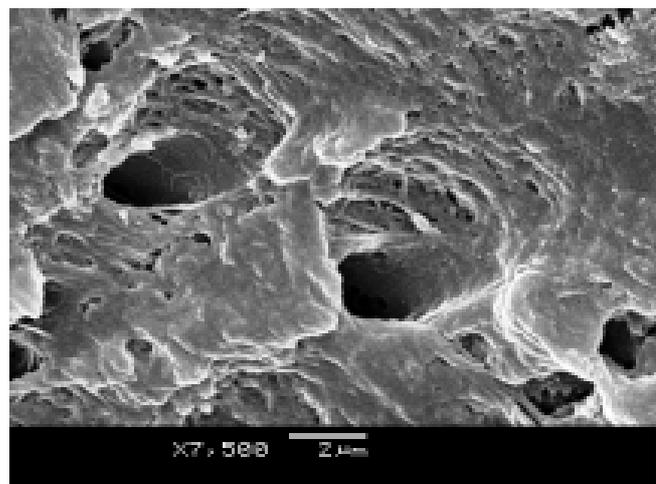


Fig. 2. Microfotografía evidenciando la dentina afectada con algunos microorganismos en las entradas de los túbulos dentinarios y la dentina parcialmente desmineralizada y desorganizada. (x7500) (Cortesía del Dr. Gustavo Parodi E. - Universidad Católica del Uruguay).

duce a la restauración natural del tejido humano (65).

La gran mayoría de los materiales restauradores a base de resinas compuestas usadas en operatoria dental necesitan de un agente de enlace o unión, ya que por si mismos no son adhesivos. Son los sistemas adhesivos resinosos (SAR) los que se encargan de unir la dentina y las resinas compuestas fotopolimerizables o agentes de cementación de restauraciones indirectas, con el fin de generar un mecanismo de enlace simultáneo entre el material restaurador o protésico y el diente.

El mecanismo de unión a la dentina, en la mayor parte de los SAR, está basado en la hibridización. En este proceso, las superficies dentinarias son tratadas con agen-



Fig. 3. Situación clínica común (al recambiar una restauración) donde durante el diseño cavitario podemos apreciar la existencia de dentina afectada en proximal por una lesión cariosa activa, en el centro dentina esclerótica y en el resto del piso y paredes dentina aparentemente sana.

tes ácidos acondicionantes, los cuales conducen a la remoción (o modificación) del barro dentinario, desmineralización de la dentina subyacente y consecuente exposición de la red de fibras colágenas. La introducción de sustancias resinosas en este substrato posibilita la adhesión micromecánica, resultando en una zona de dentina infiltrada por monómeros: la capa híbrida (66). Inmediatamente debajo de esta capa encontramos el lado de secreción, con todos sus componentes orgánicos aguardando reaccionar de acuerdo al manejo y relación que pefile el SAR empleado.

Los SAR contemporáneos han sido clasificados de muchas maneras, pero pueden ubicarse en tres grupos, dos resinosos: que incluyen a los de Acondicionado y lavado (etch & rinse) y a los Autoacondicionantes (self-etch) y un grupo ionomérico o autoadherente (self-adhesion) (67-69). Conjugando distintas nomenclaturas, y solamente con fines de que todos los lectores puedan ubicarse en el mismo contexto, en la figura 4 hemos agrupado a los sistemas adhesivos de manera en que se visualicen también los pasos necesarios o las llamadas generaciones comerciales.

Se sabe que el ácido fosfórico (35%-37%) aplicado en dentina elimina el barro dentinario, expone las fibras colágenas (inclusive sobreponiéndolas más allá de lo que el

adhesivo podrá penetrar o desnaturizándolas por pérdida de amidas en su estructura molecular - tiempo dependiente) (70-72), desoblitera los túbulos dentinarios en diferente medida y profundidad dependiendo si el diseño cavitario es o no en dentina superficial, sea esta, joven, adulta o esclerosada (73,74) se presentará incrementada permeabilidad a los fluidos que es más severa mientras nos acercamos a la pulpa, a expensas de una desmineralización y lavado de cristales (73-75), y de componentes orgánicos no colagenosos como las MMPs, a las que desnatura, generando una inactivación de la actividad proteolítica momentáneamente (75,76) y una liberación de Factores de Crecimiento del tipo TGF-β1 y otras proteínas no colágenas; es sabido que de por si mismo el ácido acondicionador no genera respuestas desfavorables en la pulpa o toxicidad (77,78). Hasta aquí parecería que bien manejado el paso de acondicionamiento ácido (también llamado: grabado ácido), en cuestión de concentración empleada, tiempo de aplicación y lavado, como en la posterior manutención de la humedad necesaria para evitar el colapso de la red colágena (79-81), estaríamos actuando favorablemente para con la biología dental en el intento de retirar los restos de la dentina infectada remanente en el detritus comúnmente llamado "barro



Fig. 4. Organización de los sistemas adhesivos contemporáneos según distintas nomenclaturas. Adaptado de: Kanca J III.(88), Van Meerbeek B et al.(89), De Góes MF, Conceição E.(90).

dentinario". Sin embargo, luego de este paso, es necesario emplear SAR para generar el enlace entre el tejido vivo y las resinas compuestas, además de, como hemos mencionado antes, el sustrato dentinario probablemente sea muy diferente en toda su extensión, presentando espacios de dentina afectada, esclerótica o sana (Fig. 3). Se acepta hoy que un inadecuado control del acondicionamiento ácido en diferentes zonas de la dentina generaría al momento de la infiltración del adhesivo y posterior polimerización, zonas vacías o no infiltradas, susceptibles a la degradación a largo plazo (81-83).

Se pensó que al evitar el paso del acondicionamiento ácido, es decir empleando SAR autoacondicionantes (tipo self-etch), se soslayaría la incompleta infiltración de los monómeros resinosos, sin embargo ya ha sido demostrado que existen discrepancias entre el potencial de grabado de los monómeros acídicos y la capacidad de infiltración y total polimerización de los componentes hidrófilos de estos SAR tipo self etch (no rinse), por lo tanto también deja sitios potenciales de degradación bajo la capa híbrida formada (84,85). Los SAR de dos pasos tipo self etch (no rinse) tienen al agua como un componente principal para permitir a los monómeros acídicos ionizarse efectivamente para desmineralizar el sustrato dentinario a la vez de conducirlos en su interior (85). Los SAR tipo self etch de un paso son los más hidrófilos, por su contenido acuoso y por la gran cantidad de monómeros hidrófilos en su composición, pues los componentes del primer acídico y del adhesivo propiamente dicho están mezclados (85,86). Este tipo de adhesivos (VII Generación) se asemejan a los etch and rinse de dos pasos (V Generación), en el sentido

de que no son cubiertos con una capa de adhesivo más hidrófugo, a diferencia de los sistemas adhesivos resinosos self-etching primer (o no rinse) conocidos como de VI generación (dos pasos) que cuentan con un frasco final o segundo paso de adhesivo más hidrófugo (86). En general, todos los adhesivos colocados sobre la dentina contienen además del agua, solventes orgánicos contenidos en los primers, que no son meros vehículos, sino que actúan como "Buscadores de agua" (Water Chasers), desplazándola y transportando los monómeros resinosos dentro de la dentina desmineralizada y húmeda, favoreciendo la hibridización. Monómeros resinosos hidrófilos típicos son: HEMA, Acrilato de ácido Fosfónico, BPDm, TEGDMA, GPDM, ó 4-META, en un componente o frasco separado o combinado con los monómeros denominados hidrófugos; estos últimos, químicamente cuentan con extremos hidrófilos ya que son macromoléculas anfibólicas (BisGMA, DMA, UDMA, etc). Ha sido comprobado in vitro e in vivo que la perfusión a través de la dentina no es detenida tan efectivamente con ningún SAR actual como lo es por el propio barro dentinario o smear layer (87-89), los smear plugs proveen efectivamente una resistencia del 86% a los movimientos de fluidos en dentina profunda (90).

Los monómeros resinosos y/o las aminas terciarias presentes en los SAR y cementos resinosos juegan un rol en la activación de las MMPs (76, 91-93) sea por: la inhibición de TIMPs, activando las formas latentes de MMPs interfiriendo en el grupo cistein de su estructura molecular zinc dependiente, o estimulando a los odontoblastos para la expresión y secreción de nuevas MMPs (23, 92-95).

Justamente son estos monómeros resinosos hidrófilos y anfibólicos (ya sean componentes de los SAR etch & rinse o de los self etch (no rinse)) los que incrementan la absorción de agua (gotas de agua, water blisters, water trees), durante su aplicación y fotocurado en la dentina (83,96-100), decreciendo con esto sus propiedades mecánicas (61,101). Se sabe que una vez fotocurados se comportan como membranas semipermeables, aunque los túbulos dentinarios estén virtualmente obliterados con barro dentinario (smear plugs) (61,84,96,101-103) y al comportarse así los hace expeditos a la hidrólisis, pues la degradación hidrolítica dentro de la capa híbrida se incrementa gradualmente a través del tiempo, manifestándose como una disminución notable de la fuerza adhesiva y en ensanchamiento y aumento de gaps o fallas en la interfase dentina-adhesivo resinoso (83,104-110). Cabe enfatizar que la hidrólisis de los componentes resinosos derivados de metacrilato es catalizada por esterases propias de la matriz dentinaria o de la saliva (111,112)

Los water trees representan regiones nanométricas en las cuales ha sido retenida agua dentro de la interfase dentina-adhesivo resinoso (96,113-115). La transudación del fluido dentinario a través de los adhesivos resinosos resultan en la presencia de estas regiones e inclusive de gaps micrométricos que contribuyen a la degradación de la unión adhesiva además de interferir desde un principio en la infiltración del agente adhesivo a nivel de la pared pulpar(113,115); esta nanofiltración ha sido observada (in vivo e in vitro) en todos los tipos de sistemas adhesivos resinosos, aunque en menor escala en los SAR self etch (no

rinse) de dos pasos (69,83,86,90,97-99,102,103,109,113-116). Y las alteraciones micromorfológicas de la dentina, al SEM (Microscopio electrónico de Scaneo) y al TEM (Microscopio electrónico de Transmisión) muestran un desarreglo de la red colágena, ensanchamiento del espacio interfibrilar y adelgazamiento en los diámetros de las fibrillas colágenas (117).

Hace más de una década se describían los primeros hallazgos de la llamada nanofiltración (espacios de 20 a 100nm de amplitud que permitían la filtración a través de la capa híbrida) (115), se avizoraba el inicio de una serie de investigaciones al respecto de la verdadera integridad de la unión dentina-SAR. Por otro lado, en la misma década ya se estudiaba el potencial de la clorhexidina (CHX) como inhibidor extrínseco de la metaloproteinasas -2, -8, y -9 (20). Los primeros estudios in vivo le otorgaban una longevidad de hasta 3 años a la capa híbrida lograda en dentina de pared pulpar, encontrándose reducciones en la fuerza adhesiva en un rango de -40% a -70% (107); paralelamente se estudiaba que la CHX, generalmente vista como un agente desinfectante en la operatoria dental, no alteraba la fuerza adhesiva si era colocado antes de generar adhesión en dentina con SAR etch & rinse (118), posteriormente desde inicios de este siglo, los estudios más profundos in vitro e in vivo han demostrado que la capa híbrida a nivel de pared pulpar puede hidrolizarse, pues es una membrana permeable en menos de un año (103,108,114,119). Actualmente se estudia cómo inhibir el accionar de las MMPs inherentes de la dentina, el empleo de CHX y su intervención terapéutica para con la longevidad e integridad de la unión dentina-SAR etch & rinse. Es así

que estudios in vitro e in vivo proponen la aplicación de CHX como un paso intermedio entre el acondicionamiento ácido de la dentina y los SAR etch & rinse de dos pasos (V Generación), siendo capaz de preservar la adhesión en dentina en un lapso entre 6 y 14 meses, por su efecto inhibitorio de la actividad proteolítica de las MMPs dentinales (110,120-123).

La biodegradación de la unión adhesiva, es decir, la hidrólisis de los elementos hidrófilos (y posiblemente los extremos hidrófilos de las macromoléculas hidrófugas) de los SAR y la degradación de las fibras colágenas enmarañadas o no en la capa híbrida, pone una pauta a la historia de intentos adhesivos resinosos sobre dentina más allá de mediana profundidad y marcan el inicio de una nueva posición al respecto al riesgo-beneficio cuando sistemas adhesivos resinosos son usados directamente en el piso cavitario. Queda como premisa que la hidrofiliidad de los monómeros adhesivos y la estabilidad hidrolítica a largo plazo es la paradoja de la adhesión con sistemas adhesivos resinosos, pues se le han dedicado innumerables investigaciones hasta llegar a encontrar monómeros resinosos ideales y niveles de humedad dentinaria idóneos para la adhesión y que sin embargo, a corto o mediano plazo son conceptos antagónicos y en la realidad opuestos a una unión adhesiva longeva.

El asunto es que todos los sistemas adhesivos etch & rinse de tres o dos pasos y los self etch (no rinse) de uno o dos pasos, activan irremediablemente la actividad colagenolítica, precipitando el fenómeno degradativo por MMP endógenas siendo la reactivación de la actividad proteolítica relacionada a la acidez del sistema adhesivo resinoso

empleado (76) e inclusive en ausencia de bacterias o sus subproductos (75), incitando la secreción de endoproteinasas en el caso de los adhesivos etch and rinse (94), los cuales exhiben una relación inversamente proporcional entre pH y reactivación de la actividad proteolítica (76), además los agentes adhesivos tienen que ser polimerizados (sabiendo que nunca se logra la total polimerización de los monómeros y algunos toman libre movilidad en la dentina tubular) (101) sobre y en los túbulos dentinarios ya de incrementada permeabilidad por el previo paso del acondicionamiento ácido, y por ende generan contracción de polimerización con un efecto de "succión" de fluidos y sus contenidos proteicos capaces de activar progresivamente zimógenos de MMPs (97,100). Los SAR self etch (no rinse), incitarían las MMPs presentes inherentemente en inactivos o activos (pues trabajamos sobre el lado de secreción de la dentina) por "activación ácida", promoviendo la reacción de las MMPs cerca de los niveles máximos que degradan la unión dentina-resina a través del tiempo (76). Resalta entonces la importancia del manejo inteligente del pH de los SAR self etch (no rinse), para evitar la posible "activación ácida".

Se ha propuesto que los SAR self etch (no rinse) de alta acidez o strong versions (pH menor a 1) no afectarían gravemente la activación de endoproteinasas en la dentina ya que las desnaturarían, en un proceso semejante al que ocurre con el ácido fosfórico (76), sin embargo esto requiere de más investigaciones in vivo, sobretodo a largo plazo y en dentina más allá de profundidad media. Por el momento se sabe que aunque los SAR self etch (no rinse) de un paso (VII Generación) sean

del tipo mild (pH entre 3 y 1) o strong (pH menor a 1), son también permeables, pues ocurre transudación de fluidos a través del adhesivo polimerizado sobre dentina in vitro e in vivo (88), lo que afectaría longitudinalmente su estabilidad hidrolítica.

Lo novedoso de los adhesivos self etch (no rinse), estaría en que dejan una capa residual de cristales de hidroxiapatita intactos (124,125), lo que prevendría la degradación de la malla colágena que conforma la capa híbrida, pues cuando el colágeno es protegido por la hidroxiapatita, las enzimas peptidasas no son hábiles para romper o degradar los péptidos colagénicos (125) y además estos cristales residuales tienen potencialidad de unión química a algunos monómeros de estos adhesivos (grupos carboxil y fosfato) (106,124), siendo estas dos razones que contribuirían en la longevidad de la interface dentina - adhesivo.

Se ha comprobado la estabilidad de la fuerza adhesiva de los sistemas de dos pasos self etch (no rinse) en dentina, hasta un año después de su polimerización y generación de un estrato híbrido (104); esto sucede siempre y cuando la profundidad de la preparación no altere la permeabilidad dentinaria y estimule una buena cantidad de odontoblastos (recordemos que sus prolongaciones ocupan por o menos el 50% de la distancia dentinaria) y consecuente expresión de una cantidad considerablemente mayor de MMPs que influyan posteriormente en la biodegradación de la capa adhesiva. Los factores preponderantes en una situación clínica desfavorable serían: contaminación bacteriana importante, disposición de carbohidratos degradables, la profundidad cavitaria, el incremento de la per-

meabilidad, la presencia de humedad y fluidos, la liberación de FC y la activación de enzimas de la matriz dentinaria, las variaciones de pH del sistema adhesivo, los componentes citotóxicos incitantes de una respuesta inflamatoria importante, la ausencia de proteínas estimulantes de homeostasis y de inhibidores de MMPs.

Conclusiones

En los últimos 15 años se ha consolidado un entendimiento de los mecanismos de unión entre los materiales restauradores y las estructuras dentarias, especialmente la dentina, sin embargo entre las interrogantes pendientes se discute la longevidad de la unión adhesiva con SAR. Es un error haber considerado a la dentina como una estructura inerte, el entendimiento de su abundante actividad metabólica debe conducirnos a plantearnos diferentes "Actitudes Restauradoras", terapéuticas consecuentes que persigan fines biológicamente compatibles. Es objetivo de la odontología preventiva, en lo que se refiere a preparaciones de lesiones cariosas y diseños cavitarios, mantener la dentina la que es capaz de reorganizarse y remineralizarse: preparándola, tratándola con sustancias y finalmente restaurándola con materiales dentales que permitan esta meta. Es importante resaltar que a la fecha no se ha reportado ningún artículo científico que demuestre que existe remineralización o reorganización de la dentina subyacente al empleo de SAR.

Los corolarios clínicos serían los siguientes:

1. Las diferencias al respecto de la dentina de superficie, media y profunda, debido a la presencia de prolongaciones odontoblásticas dentro de los túbulos dentinarios y

la actividad metabólica del lado de secreción al estar la dentina con alguna lesión cariosa o simplemente preparada con un tallado o diseño cavitario, nos hace proponer que consideremos trabajar sobre sólo dos niveles de dentina de acuerdo a su profundidad, sea superficial y al pasar la mitad de la misma denominarla profunda, esto nos dará un margen de seguridad biológica mayor al llevar a cabo procedimientos restauradores con sistemas adhesivos resinosos.

2. Los sistemas adhesivos etch & rinse o no rinse - self etch han de ser manejados en dentina cuando se conozca quedan más de 2mm de grosor en la pared pulpar de dientes vitales, siguiendo los criterios ya investigados previamente con respecto a los detalles propios del procedimiento clínico (tiempo de acondicionamiento ácido, tiempo de lavado, humedad de la dentina, aplicación activa del adhesivo, evaporación máxima de solventes, ampliando el tiempo de fotocurado, aplicando múltiples capas, optimizando el sistema con un agente totalmente hidrófugo), en todo caso siempre es preferible el contacto dentinario en pared o piso pulpar con un material que promueva la remineralización y reorganización de la dentina subyacente.
3. El empleo de SAR tipo etch & rinse de dos pasos (V generación) requiere imprescindiblemente el empleo de CHX luego del acondicionamiento ácido. Para los SAR self etch (no rinse) no se ha estudiado el beneficio de la asociación con CHX, sin embargo proponemos que también debe aplicarse en dentina antes de emplear estos SAR.
4. Los SAR contemporáneos no son

longitudinalmente confiables para llevar a cabo adhesión en pared pulpar de dentina (de mediana a gran profundidad), por la complejidad metabólica de la dentina y la fragilidad del colágeno como principal componente orgánico; la durabilidad adhesiva sobre ella estaría garantizada si se considerase además del enlace micromecánico a la interacción química con los cristales de hidroxiapatita y whitlockita remanentes, que aunque podrían ser uniones débiles en cuestión de fuerza adhesiva inmediata son más estables y duraderos.

5. Los SAR self etch (no rinse) de dos pasos podrían ser los más promisorios actualmente, por autocontrolar su pH y capacidad autolimitante de acondicionamiento, su hidrofiliidad sin depender necesariamente de una dentina húmeda, su facilidad para evaporar solventes, su adicional capacidad de unirse químicamente con la hidroxiapatita y el colágeno y finalmente su relación química con una segunda capa lo más hidrófuga posible. Parece ser que conjugar un primer suficientemente ácido ($\text{pH} \approx 1$), de monómeros estables hidrolíticamente y afines a enlaces químicos con la hidroxiapatita, con una subsiguiente capa adhesiva hidrófuga (SAR de VI Generación) se fusionarían los aspectos adecuados para evitar la biodegradación de la unión adhesiva en paredes pulpares de la dentina.

Referencias bibliográficas

- Hoshino T, Kishi J, Kawai T, Kobayashi K, Hayakawa T. Immunoelectron microscopic localization of collagenase inhibitor in bovine dentin. *Coll Relat Res.* 1986; 6(4):303-12.
- Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4(5):679-728.
- Hall R, Septier D, Embery G, Goldberg M. Stromelysin-1 (MMP-3) in forming enamel and predentine in rat incisor-coordinated distribution with proteoglycans suggests a functional role. *Histochem J.* 1999; 31(12):761-70.
- Paul SJ, Scharer P. Factors in dentin bonding. Part 1: A review of the morphology and physiology of human dentin. *J Esthet Dent.* 1993; 5(1):5-8.
- Costa CAS, Hebling J. Biología del complejo dentino-pulpar en relación a su protección mediante adhesivos. En: Henostroza G. Adhesión en odontología oestauradora. Curitiba: Editora Maio; 2003.
- Orchardson R, Cadden SW. An update on the physiology of the dentine-pulp complex. *Dent Update.* 2001; 28(4):200-9.
- Garant PR, editor. Oral cells and tissues. Illinois: Quintessence Publishing Co, Inc.; 2003.
- Yoshida K, Yoshida N, Ejiri S, Iwaku M, Ozawa H. Odontoblast processes in human dentin revealed by fluorescence labeling and transmission electron microscopy. *Histochem Cell Biol.* 2002; 118(3):205-12.
- Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res.* 2006; 85(1):22-32.
- Sulkala M. Matrix metalloproteinases (MMPs) in the dentin-pulp complex of healthy and carious teeth [dissertation]. [Finland]: University of Oulu; 2004.
- Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol.* 2000; 45(9):757-65.
- Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* 1998; 77(8):1622-9.
- Dumas J, Hurion N, Weill R, Keil B. Collagenase in mineralized tissues of human teeth. *FEBS Lett.* 1985; 187(1):51-5.
- Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(2):121-7.
- Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Rönkä H, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1. *J Dent Res.* 2000; 79(1):77-84.
- Palosaari H, Ding Y, Larmas M, Sorsa T, Bartlett JD, Salo T, Tjäderhane L. Regulation and interactions of MT1-MMP and MMP-20 in human odontoblasts and pulp tissue in vitro. *J Dent Res.* 2002; 81(5):354-9.
- Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci.* 2003; 111(2):117-27.
- Verstappen J, Von den Hoff JW. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J*

- Dent Res. 2006; 85(12):1074-84.
19. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92(8):827-39.
 20. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999; 6(3):437-9.
 21. Mannello F, Gazzanelli G. Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: conundrums, controversies and potential implications. *Apoptosis.* 2001; 6(6):479-82.
 22. Overall CM, López-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(9):657-72.
 23. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1993; 4(2):197-250.
 24. Tjäderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Adv Dent Res.* 2001; 15:55-8.
 25. Davis GE. Identification of an abundant latent 94-kDa gelatin-degrading metalloprotease in human saliva which is activated by acid exposure: implications for a role in digestion of collagenous proteins. *Arch Biochem Biophys.* 1991; 286(2):551-4.
 26. Dayan D, Binderman I, Mechanic GL. A preliminary study of activation of collagenase in carious human dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 1983; 28(2):185-7.
 27. Tjäderhane L, Palosaari H, Sulkala M, Wahlgren J, Salo T. The expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in human odontoblasts. In: Ishikawa T, Takahashi K, Maeda T, Suda H, Shimono M, Inoue T. *Proceedings of the international conference on dentin/pulp complex.* Tokyo: Quintessence Publishing Co; 2001.
 28. Mu D, Cambier S, Fjellbirkeland L, Baron JL, Munger JS, Kawakatsu H, Sheppard D, Broaddus VC, Nishimura SL. The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1. *J Cell Biol.* 2002; 157(3):493-507.
 29. Sadowski T, Dietrich S, Koschinsky F, Sedlacek R. Matrix metalloproteinase 19 regulates insulin-like growth factor-mediated proliferation, migration, and adhesion in human keratinocytes through proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3. *Mol Biol Cell.* 2003; 14(11):4569-80.
 30. Gusman H, Santana RB, Zehnder M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110(5):353-7.
 31. Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J Endod.* 2002; 28(4):313-5.
 32. Wahlgren J, Salo T, Teronen O, Luoto H, Sorsa T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root canal exudates. *Int Endod J.* 2002; 35(11):897-904.
 33. Tjäderhane L, Palosaari H, Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Bartlett JD, et al. Caries induces the expression of MMP-20 mRNA in human teeth [abstract]. *J Dent Res.* 2000; 78(Spec Iss):334.
 34. Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 2000; 14(17):2123-33.
 35. Mitsiadis TA, Rahiotis C. Parallels between tooth development and repair: conserved molecular mechanisms following carious and dental injury. *J Dent Res.* 2004; 83(12):896-902.
 36. Magloire H, Bouvier M, Joffre A. Odontoblast response under carious lesions. *Proc Finn Dent Soc.* 1992; 88(Suppl 1):257-74.
 37. Smith AJ, Lesot H. Induction and regulation of crown dentinogenesis: embryonic events as a template for dental tissue repair? *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001; 12(5):425-37.
 38. Larmas M. Observations on endopeptidases in human carious dentin. *Scand J Dent Res.* 1972; 80(6):520-3.
 39. Larmas M, Mäkinen KK. The ability of various microorganisms to produce histochemically determinable enzyme activity in human dentine. *Acta Odontol Scand.* 1971; 29(4):471-86.
 40. Hidalgo RC. Las metaloproteinasas: sus implicancias en la caries y la odontología adhesiva. En: Henostroza N. *Libro de resúmenes de cursos y conferencias del 6º Congreso de APORYB; 2007.*
 41. Bjørndal L, Darvann T. A light

- microscopic study of odontoblastic and non-odontoblastic cells involved in tertiary dentinogenesis in well-defined cavitated carious lesions. *Caries Res.* 1999; 33(1):50-60.
42. Larmas M. Odontoblast function seen as the response of dentinal tissue to dental caries. *Adv Dent Res.* 2001; 15:68-71.
43. Katz S, Park KK, Palenik CJ. In vitro root surface caries studies. *J Oral Med.* 1987; 42(1):40-8.
44. van Strijp AJ, van Steenberg TJ, ten Cate JM. Bacterial colonization of mineralized and completely demineralized dentine in situ. *Caries Res.* 1997; 31(5):349-55.
45. Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1996; 7(2):104-33.
46. Smith AJ. Pulpal responses to caries and dental repair. *Caries Res.* 2002; 36(4):223-32.
47. Yoshida N, Yoshida K, Iwaku M, Ozawa H. Immunohistochemical localizations of class II antigens and nerve fibers in human carious teeth: HLA-DR immunoreactivity in Schwann cells. *Arch Histol Cytol.* 1998; 61(4):343-52.
48. Sakurai K, Okiji T, Suda H. Co-increase of nerve fibers and HLA-DR- and/or factor-XIIIa-expressing dendritic cells in dentinal caries-affected regions of the human dental pulp: an immunohistochemical study. *J Dent Res.* 1999; 78(10):1596-608.
49. Yoshida K, Yoshida N, Iwaku M. Class II antigen-presenting dendritic cell and nerve fiber responses to cavities, caries, or caries treatment in human teeth. *J Dent Res.* 2003; 82(6):422-7.
50. Clarkson BH, Hall DL, Heilman JR, Wefel JS. Effect of proteolytic enzymes on caries lesion formation in vitro. *J Oral Pathol.* 1986; 15(8):423-9.
51. Hoppenbrouwers PM, Driessens FC, Borggreven JM. The mineral solubility of human tooth roots. *Arch Oral Biol.* 1987; 32(5):319-22.
52. Välikangas L, Pekkala E, Larmas M, Risteli J, Salo T, Tjäderhane L. The effects of high levels of glucose and insulin on type I collagen synthesis in mature human odontoblasts and pulp tissue in vitro. *Adv Dent Res.* 2001; 15:72-5.
53. Cassidy N, Fahey M, Prime SS, Smith AJ. Comparative analysis of transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Arch Oral Biol.* 1997; 42(3):219-23.
54. Goldberg M, Septier D. Visualization of predentine matrix components and endocytic structures in rat incisor odontoblasts with tannic acid. *J Biol Buccale.* 1989; 17(4):245-54.
55. Schüpbach P, Guggenheim B, Lutz F. Human root caries: histopathology of initial lesions in cementum and dentin. *J Oral Pathol Med.* 1989; 18(3):146-56.
56. Kawasaki K, Featherstone JD. Effects of collagenase on root demineralization. *J Dent Res.* 1997; 76(1):588-95.
57. Dung TZ, Liu AH. Molecular pathogenesis of root dentin caries. *Oral Dis.* 1999; 5(2):92-9.
58. Hidalgo R. Las metaloproteinasas y el progreso de la lesión cariosa en dentina. *Rev Estomatol Herediana* 2006; 16(1):64-72.
59. Camps J, Déjou J, Rémusat M, About I. Factors influencing pulpal response to cavity restorations. *Dent Mater.* 2000; 16(6):432-40.
60. Espinosa R, Espinosa D. Difusión de los adhesivos dentinarios en el complejo pulpo dentinario, un estudio in vivo. *Rev ADM.* 2005; 62(1):5-11.
61. Yoshiyama M, Tay FR, Doi J, Nishitani Y, Yamada T, Ito K, Carvalho RM, Nakajima M, Pashley DH. Bonding of self-etch and total-etch adhesives to carious dentin. *J Dent Res.* 2002; 81(8):556-60.
62. Nakornchai S, Harnirattisai C, Surarit R, Thiradilok S. Microtensile bond strength of a total-etching versus self-etching adhesive to caries-affected and intact dentin in primary teeth. *J Am Dent Assoc.* 2005; 136(4):477-83.
63. Hanks CT, Wataha JC, Parsell RR, Strawn SE. Delineation of cytotoxic concentrations of two dentin bonding agents in vitro. *J Endod.* 1992; 18(12):589-96.
64. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. *Dent Mater.* 1996; 12(3):186-93.
65. Bayne SC. Dental biomaterials: where are we and where are we going? *J Dent Educ.* 2005; 69(5):571-85.
66. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res.* 1982; 16(3):265-73.
67. Kanca J 3rd. Dentin bonding system nomenclature: the next generation. *J Esthet Restor Dent.* 2005; 17(5):271-2.
68. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, Van Landuyt K, Lambrechts P, Vanherle G. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin:

- current status and future challenges. *Oper Dent.* 2003; 28(3):215-35.
69. De Góes MF, Conceição E. Materiais e técnicas para o selamento da dentina e a cimentação da restaurações indiretas. En: Conceição EN. *Restaurações Estéticas*. Porto Alegre: Ed Artmed; 2005.
70. Sano H, Shono T, Takatsu T, Hosoda H. Microporous dentin zone beneath resin-impregnated layer. *Oper Dent.* 1994; 19(2):59-64.
71. Sencer P, Wang Y, Walker MP, Swafford JR. Molecular structure of acid-etched dentin smear layers--in situ study. *J Dent Res.* 2001; 80(9):1802-7.
72. Van Meerbeek B, Inokoshi S, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different dentin adhesive systems. *J Dent Res.* 1992; 71(8):1530-40.
73. Prati C, Chersoni S, Mongiorgi R, Montanari G, Pashley DH. Thickness and morphology of resin-infiltrated dentin layer in young, old, and sclerotic dentin. *Oper Dent.* 1999; 24(2):66-72.
74. Pashley EL, Tao L, Matthews WG, Pashley DH. Bond strengths to superficial, intermediate and deep dentin in vivo with four dentin bonding systems. *Dent Mater.* 1993; 9(1):19-22.
75. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res.* 2004; 83(3):216-21.
76. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, Toledano M, Pashley EL, Tay FR. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials.* 2006; 27(25):4470-6.
77. Eriksen HM, Leidal TI. Monkey pulpal response to composite resin restorations in cavities treated with various cleansing agents. *Scand J Dent Res.* 1979; 87(4):309-17.
78. Kanca J 3rd. One-year evaluation of a dentin-enamel bonding system. *J Esthet Dent.* 1990; 2(4):100-3.
79. Fusayama T. Factors and prevention of pulp irritation by adhesive composite resin restorations. *Quintessence Int.* 1987; 18(9):633-41.
80. Gwinnett AJ. Moist versus dry dentin: its effect on shear bond strength. *Am J Dent.* 1992; 5(3):127-9.
81. Nakabayashi N, Nakamura M, Yasuda N. Hybrid layer as a dentin-bonding mechanism. *J Esthet Dent.* 1991; 3(4):133-8.
82. Pashley DH, Horner JA, Brewer PD. Interactions of conditioners on the dentin surface. *Oper Dent.* 1992; Suppl 5:137-50.
83. Sano H. Microtensile testing, nanoleakage, and biodegradation of resin-dentin bonds. *J Dent Res.* 2006; 85(1):11-4.
84. Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials.* 2005; 26(9):1035-42.
85. Tay FR, Pashley DH. Aggressiveness of contemporary self-etching systems. I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater.* 2001; 17(4):296-308.
86. Tay FR, Carvalho RM, Pashley DH. Water movement across bonded dentin - too much of a good thing. *J Appl Oral Sci.* 2004; 12(spec issue):12-25.
87. Gillam DG, Mordan NJ, Newman HN. The Dentin Disc surface: a plausible model for dentin physiology and dentin sensitivity evaluation. *Adv Dent Res.* 1997; 11(4):487-501.
88. Chersoni S, Suppa P, Grandini S, Goracci C, Monticelli F, Yiu C, Huang C, Prati C, Breschi L, Ferrari M, Pashley DH, Tay FR. In vivo and in vitro permeability of one-step self-etch adhesives. *J Dent Res.* 2004; 83(6):459-64.
89. Nikaido T, Burrow MF, Tagami J, Takatsu T. Effect of pulpal pressure on adhesion of resin composite to dentin: bovine serum versus saline. *Quintessence Int.* 1995; 26(3):221-6.
90. Pashley DH, Livingston MJ, Greenhill JD. Regional resistances to fluid flow in human dentine in vitro. *Arch Oral Biol.* 1978; 23(9):807-10.
91. Nakashima Y, Sun DH, Maloney WJ, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL. Induction of matrix metalloproteinase expression in human macrophages by orthopaedic particulate debris in vitro. *J Bone Joint Surg Br.* 1998; 80(4):694-700.
92. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjäderhane L, Tay FR, Pashley DH. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2006; 114(2):160-6.
93. Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R. Self-etching adhesives

- increase collagenolytic activity in radicular dentin. *J Endod.* 2006; 32(9):862-8.
94. Lehmann N, Roméas A, Magloire H, Seux D, Bleicher F. Effect of dentin bonding systems on the expression of matrix metalloproteinases by odontoblasts. *Eur Cell Mater.* 2007; 13(Suppl 1):14.
95. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87(14):5578-82.
96. Reis AF, Giannini M, Pereira PN. Long-term TEM analysis of the nanoleakage patterns in resin-dentin interfaces produced by different bonding strategies. *Dent Mater.* 2007; 23(9):1164-72.
97. Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, Yiu CK, Carrilho MR. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater.* 2006; 22(10):973-80.
98. Hashimoto M, Tay FR, Sano H, Kaga M, Pashley DH. Diffusion-induced water movement within resin-dentin bonds during bonding. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006; 79(2):453-8.
99. Wadgaonkar B, Ito S, Svizero N, Elrod D, Foulger S, Rodgers R, Oshida Y, Kirkland K, Sword J, Rueggeberg F, Tay F, Pashley D. Evaluation of the effect of water-uptake on the impedance of dental resins. *Biomaterials.* 2006; 27(17):3287-94.
100. Hashimoto M, de Gee AJ, Kaga M, Feilzer AJ. Contraction stress in dentin adhesives bonded to dentin. *J Dent Res.* 2006; 85(8):728-32.
101. Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, Biasotto M, Contardo L, Breschi L. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2005; 113(6):525-30.
102. Sauro S, Watson TF, Tay FR, Chersoni S, Breschi L, Bernardi F, Prati C. Water uptake of bonding systems applied on root dentin surfaces: a SEM and confocal microscopic study. *Dent Mater.* 2006; 22(7):671-80.
103. Tay FR, Frankenberger R, Krejci I, Bouillaguet S, Pashley DH, Carvalho RM, Lai CN. Single-bottle adhesives behave as permeable membranes after polymerization. I. In vivo evidence. *J Dent.* 2004; 32(8):611-21.
104. Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Morigami M, Tagami J, Pashley DH. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo. *J Dent Res.* 1999; 78(4):906-11.
105. Armstrong SR, Vargas MA, Chung I, Pashley DH, Campbell JA, Laffoon JE, Qian F. Resin-dentin interfacial ultrastructure and microtensile dentin bond strength after five-year water storage. *Oper Dent.* 2004; 29(6):705-12.
106. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, Van Meerbeek B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res.* 2005; 84(2):118-32.
107. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res.* 2000; 79(6):1385-91.
108. Koshiro K, Inoue S, Tanaka T, Koase K, Fujita M, Hashimoto M, Sano H. In vivo degradation of resin-dentin bonds produced by a self-etch vs. a total-etch adhesive system. *Eur J Oral Sci.* 2004; 112(4):368-75.
109. Okuda M, Pereira PN, Nakajima M, Tagami J, Pashley DH. Long-term durability of resin dentin interface: nanoleakage vs. microtensile bond strength. *Oper Dent.* 2002; 27(3):289-96.
110. Amaral FL, Colucci V, Palma-Dibb RG, Corona SA. Assessment of in vitro methods used to promote adhesive interface degradation: a critical review. *J Esthet Restor Dent.* 2007; 19(6):340-53;
111. Larsen IB, Freund M, Munksgaard EC. Change in surface hardness of BisGMA/TEGDMA polymer due to enzymatic action. *J Dent Res.* 1992; 71(11):1851-3.
112. Munksgaard EC, Freund M. Enzymatic hydrolysis of (di)methacrylates and their polymers. *Scand J Dent Res.* 1990; 98(3):261-7.
113. Tay FR, Hashimoto M, Pashley DH, Peters MC, Lai SC, Yiu CK, Cheong C. Aging affects two modes of nanoleakage expression in bonded dentin. *J Dent Res.* 2003; 82(7):537-41.
114. Tay FR, Pashley DH. Water treeing--a potential mechanism for degradation of dentin adhesives. *Am J Dent.* 2003; 16(1):6-12.
115. Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, Horner JA, Matthews WG, Pashley DH. Nanoleakage: leakage within the hybrid layer.

- Oper Dent. 1995; 20(1):18-25.
116. Donmez N, Belli S, Pashley DH, Tay FR. Ultrastructural correlates of in vivo/in vitro bond degradation in self-etch adhesives. *J Dent Res.* 2005; 84(4):355-9.
117. Hashimoto M, Tay FR, Ohno H, Sano H, Kaga M, Yiu C, Kumagai H, Kudou Y, Kubota M, Oguchi H. SEM and TEM analysis of water degradation of human dentinal collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2003; 66(1):287-98.
118. Bocangel JS, Kraul AOE, Vargas AG, Demarco FF, Matson E. Influence of disinfectant solutions on the tensile bond strength of a fourth generation dentin bonding agent. *Pesq Odont Bras.* 2000; 14(2):107-11.
119. Carrilho MR, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L, Carvalho RM. Mechanical stability of resin-dentin bond components. *Dent Mater.* 2005; 21(3):232-41.
120. Hashimoto M, Tjäderhane L, Tay FR, Ito S, Sano H, Pashley DH. Effect of chlorhexidine on MMP activity of human dentin [abstract]. *J Dent Res* 2005; 84(Spec Iss A):1697.
121. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res.* 2005; 84(8):741-6.
122. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldini S, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res.* 2007; 86(1):90-4.
123. Carrilho MR, Geraldini S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley D. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res.* 2007; 86(6):529-33.
124. Van Meerbeek B. Mechanism of self adhesion of glass-ionomers. International Dental Innovation Symposium, Munich 2004.
125. Van Strijp AJ, Klont B, Ten Cate JM. Solubilization of dentin matrix collagen in situ. *J Dent Res.* 1992; 71(8):1498-502.