

## IMPORTANCIA DE LA INTERFAZ DENTINA-ADHESIVO EN LA LONGEVIDAD DE LAS RESTAURACIONES ADHERIDAS. EL PAPEL DE LOS NUEVOS AGENTES RETICULADORES.

### IMPORTANCE OF THE DENTINE-ADHESIVE INTERFACE IN THE LONGEVITY OF BONDED RESTORATIONS. ROLE OF NEW CROSS-LINKING AGENTS.

Pignata, S.<sup>1</sup>, Vola, J.<sup>2</sup>

1. Profesor Pre- Clínico de Operatoria Dental, Facultad Odontología Universidad Católica del Uruguay. Prof. Adjunto Clínica de Operatoria Dental II, Integral III, Facultad de Odontología Universidad de la República del Uruguay. Dictante de la Carrera de Especialidad de Odontología Restauradora Integral UDELAR Especialista en Odontología Restauradora Integral, UDELAR.  
2. Especialista en Odontología Restauradora Integral. Docente Grado 2 Titular Clínica de Operatoria Dental II, Integral III, Facultad Odontología, Universidad de la República.

## RESUMEN

Las restauraciones adheridas dependen de los sistemas adhesivos que unen el material restaurador a la estructura dentaria subyacente. En la adhesión a dentina, los monómeros adhesivos infiltran y encapsulan las fibrillas de colágeno expuestas creando la llamada "capa híbrida"<sup>30</sup>.

Existe un consenso general de que las uniones resina-dentina, creadas por los adhesivos dentinarios hidrofílicos contemporáneos, se deterioran a lo largo del tiempo<sup>13</sup>. Aunque estos sistemas adhesivos modernos generalmente logran sellado marginal de alta calidad y buena resistencia adhesiva inmediatamente a su colocación, estas propiedades comienzan a deteriorarse en cuestión de meses, tanto in vitro como in vivo. La interfaz resina-dentina continúa siendo el área más débil de las restauraciones dentocoloradas adheridas<sup>6,31</sup>. La alteración de la capa híbrida es debida a factores químicos y físicos. El deterioro de las fibrillas de colágeno dentinario ha sido sugerido como uno de los más importantes mecanismos responsables de la degradación de las uniones adhesivas<sup>33</sup>. La resistencia mecánica y estabilidad de las fibrillas de colágeno expuestas y desprotegidas son a menudo bajas porque están sujetas a hidrólisis y degradación enzimática<sup>6,20</sup>. También las redes de polímeros dentales se han mostrado susceptibles a efectos higroscópicos, hidrolíticos y enzimáticos, en variado grado, dependiendo de su química y estructura<sup>19,20</sup>.

Por otra parte, se cree que a medida que los componentes de la capa híbrida comienzan a deteriorarse se forman canales de agua dentro de la capa híbrida. Estos canales dan acceso a los fluidos oral y dentinal, así como también a productos bacterianos y enzimas proteolíticas endógenas, aumentando la probabilidad de una mayor degradación<sup>9</sup>. Los estudios más recientes sugieren que las metaloproteinasas derivadas de la matriz del huésped (MMP) juegan un importante rol en la alteración de la capa híbrida<sup>23</sup>.

Diferentes maniobras clínicas han sido propuestas para mejorar la infiltración con monómeros y reducir el nivel de absorción de agua y la degradación del colágeno<sup>6</sup>. Recientemente se ha propuesto el uso de agentes promotores de la formación de enlaces en el colágeno<sup>1</sup>.

La biomodificación de la matriz de colágeno dentinaria consiste en utilizar agentes reticuladores que promueven el mantenimiento de su estabilidad, disminuyen su degradación enzimática e hidrolítica al inducir su reticulación a través de la formación de enlaces covalentes intermoleculares e intermicrofibrilares adicionales<sup>1,16,22</sup>. De esta forma aumenta la resistencia a la tracción y el módulo elástico de la dentina desmineralizada<sup>3</sup> y disminuye la degradación<sup>4,16,22</sup>.

**Palabras Clave** Restauraciones adheridas, capa híbrida, interfaz dentina-adhesivo, agentes reticuladores.

## ABSTRACT

Bonded restorations depend on adhesive systems linking the restorative material to the underlying tooth structure. In the dentin bonding, adhesive monomers infiltrate and encapsulate the exposed collagen fibrils creating the so called "hybrid layer"<sup>30</sup>.

There is general consensus that resin-dentin bonds, created by contemporary hydrophilic dentin adhesives, deteriorate over time<sup>13</sup>. Although these modern adhesive systems generally achieve marginal seal of high quality and good adhesive strength immediately to placement, these properties begin to deteriorate in a matter of months, both in vitro and in vivo. The resin-dentin interface remains the weakest area of the adhered esthetic restorations<sup>6,31</sup>. The alteration of the hybrid layer is due to chemical and physical factors. The deterioration of the dentin collagen fibrils has been suggested as one of the most important mechanisms responsible for the degradation of adhesive bonds<sup>33</sup>. The strength and stability of the collagen fibrils exposed and unprotected are often low because they are subject to hydrolysis and enzymatic degradation<sup>6,20</sup>. Also dental polymer networks have proven susceptible to hygroscopic, hydrolytic and enzymatic effects, in varying degrees, depending on their chemistry and structure<sup>19,20</sup>.

Moreover, it is believed that as the hybrid layer's components begin to deteriorate water channels are formed inbetween. These channels provide access to oral and dentinal fluids, as well as proteolytic enzymes and endogenous bacterial products, increasing the likelihood of further degradation<sup>9</sup>. Recent studies suggest that host derived matrix metalloproteinases (MMP) play an important role in altering the hybrid layer<sup>23</sup>.

Different clinical maneuvers have been proposed to improve the infiltration with monomers and reduce the level of water sorption and collagen degradation<sup>6</sup>. Recently it has been proposed the use of agents to promote bond formation within collagen<sup>1</sup>.

The bio-modification of dentin collagen matrix consists in using crosslinking agents which promote the maintenance of its stability, reduce enzymatic and hydrolytic degradation through the induction of the formation of intermolecular covalent bonds and additional intermicrofibrillar bonds<sup>1,16,22</sup>. This increases the tensile strength and elastic modulus of the demineralized dentine<sup>3</sup> and decreases its degradation<sup>4,16,22</sup>.

**Keywords** Bonded restorations, hybrid layer, dentine-adhesive interface, cross-linking agents.



## INTRODUCCIÓN

Adhesión, en odontología restauradora, significa unir a las estructuras dentales el biomaterial a aplicar, manifestándose la adhesión como tal en la interfaz diente-restauración<sup>23</sup>.

La durabilidad de la técnica adhesiva al esmalte tiene un alto porcentaje de éxito clínico, de ahí que la presencia de esmalte en los márgenes cavitarios sea un factor decisivo en la calidad y estabilidad de la restauración. Cuando los márgenes cavitarios están en dentina las restauraciones se ven más comprometidas por los factores externos que promueven el deterioro de la unión<sup>13</sup>.

La unión resina-dentina es una forma única de ingeniería tisular en donde la matriz de colágeno desmineralizada es utilizada como andamio para la infiltración y encapsulación por medio de monómeros resinosos, para producir una capa híbrida que acopla adhesivos y compuestos resinosos a la dentina desmineralizada subyacente<sup>17,30</sup>. Para que los monómeros adhesivos logren íntimo contacto con las fibrillas de colágeno, deben competir con el agua por estas superficies. La resina infiltrante envuelve los cristales de apatita y las fibras colágenas haciéndolos resistentes a la degradación. Las propiedades químicas y físicas de esta zona son muy diferentes a las de la estructura dentaria original<sup>31</sup>.

## DESARROLLO

La adhesión a las estructuras dentales se obtiene cumpliendo tres etapas sucesivas bien definidas:

I. Preparación de la superficie para recibir el adhesivo, logrando básicamente con ello la remoción selectiva de hidroxiapatita.

En 1979 Fusayama et al. proponen el acondicionamiento ácido de la dentina, aceptado por los occidentales recién en 1989. El acondicionamiento ácido dentinario tiene por finalidad retirar totalmente la capa de barro producida durante la preparación cavitaria y disolver parcialmente la hidroxiapatita, componente mineral de la dentina. En la dentina intertubular, dicha disolución expone una trama de fibras colágenas; mientras que, en los túbulos dentinarios, cuyas paredes están constituidas por una dentina más mineralizada, la disolución de la hidroxiapatita promueve la apertura de los túbulos, confiriéndoles forma de embudo<sup>23</sup>.

El grabado ácido de la dentina es necesario para aumentar la porosidad de la dentina intertubular para la infiltración monomérica. Este procedimiento lleva a una contracción o colapso de la matriz<sup>31</sup>.

En la técnica de grabado y lavado, luego de estos procedimientos se realiza el secado con aire del agua superficial. Al evaporarse el agua de la red de colágeno, las fuerzas de tensión superficiales que operan en la interfaz aire-agua tienden a colapsar la trama colágena generando una red rígida y relativamente impermeable<sup>28</sup>.

Generalmente la profundidad de desmineralización de la dentina intertubular es del orden de 4 a 5 micrómetros, y la penetración del adhesivo de 3 micrómetros. Como consecuencia de ello, subyacen-

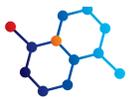
te a la capa híbrida, queda una capa de colágeno sin ser impregnada por esos monómeros, es decir, desprotegida<sup>23</sup>. La presencia de esta capa desmineralizada y no impregnada reduce la resistencia de la unión así como también la duración de la restauración<sup>35</sup>.

Los sistemas adhesivos corrientes interactúan con el sustrato esmalte/dentina utilizando dos estrategias diferentes, ya sea removiendo la capa de barrillo dentinario (técnica de grabado y lavado), o manteniendo esa capa como sustrato para la adhesión (técnica de autograbado). En los sistemas de grabado y lavado, el grabado se realiza en forma separada (usualmente utilizando un gel de ácido fosfórico al 35-37%) que es luego lavado. Los otros pasos fundamentales para la adhesión son la imprimación y la adhesión, los cuales pueden estar tanto separados (tres pasos), como combinados (dos pasos), dependiendo del sistema adhesivo. En el caso de la técnica de autograbado el agente imprimador autograbante es secado únicamente con aire, y de esa forma permanece dentro de la capa de barrillo modificada. Estos adhesivos autograbantes pueden ser de uno o dos pasos dependiendo de si el agente grabador y el primer se combinan con el adhesivo de manera de permitir un procedimiento de una única aplicación, o si el agente grabador y el primer están separados del adhesivo<sup>6</sup>. Los adhesivos autograbantes levemente ácidos dependen de una combinación de traba micromecánica y adhesión química a la hidroxiapatita, con casi ausencia de formación de tags de resina<sup>12</sup>.

2. Aplicación de monómero que se infiltra en los espacios dejados por la remoción de la hidroxiapatita.

El grabado ácido disminuye la energía superficial de la dentina; por lo que el siguiente desafío es armonizar la tensión superficial del primer con el de la superficie dentinaria desmineralizada, dependiendo de si ésta está húmeda o seca. Para que un líquido cubra uniformemente una superficie sólida la tensión superficial del líquido debe ser menor que la del sustrato. A su vez, si la fibrilla está rodeada de agua, los monómeros deben ser capaces de competir exitosamente con el agua por la superficie de la fibrilla. La humectación de la superficie dentinaria por los monómeros es un paso inicial necesario para la adhesión, pero en forma aislada no es suficiente para garantizar una unión exitosa, porque no asegura la penetración del monómero en la sub superficie<sup>31</sup>.

Debido a que, una vez desmineralizada la dentina, los espacios que se generan por pérdida mineral se encuentran llenos de agua, el único mecanismo disponible para la infiltración monomérica es la difusión de los monómeros en este solvente. Ésta es la razón por la cual esta zona es a veces llamada zona de interdifusión de resina. La capacidad de infiltración de los monómeros en los espacios interfibrilares depende de su solubilidad en el solvente que ocupa dichos espacios, de su concentración, del coeficiente de difusión del monómero en ese solvente, de la afinidad del monómero por el sustrato, del tiempo permitido para la penetración y de la temperatura y viscosidad de la solución. Tiempos más largos de difusión conducen a una difusión más profunda<sup>31</sup>. También es de fundamental importancia para la infiltración monomérica de la red de colágeno el estado de la misma; vale decir, si el entramado se encuentra expandido o, por el contrario, colapsado.



La teoría pasiva asume que la red de colágeno de la dentina desmineralizada está suspendida en agua. Bajo algunas condiciones como ser alta concentración de agua y pH ácido, las fibrillas de colágeno se embeben levemente aumentando su diámetro y longitud y reduciéndose los espacios interfibrilares, haciendo más difícil la infiltración de la red de colágeno por el primer <sup>31</sup>. La aplicación de adhesivos resinosos en solventes no acuosos que se realiza luego del acondicionamiento ácido tiende a mantener la rigidez, previniendo de esa manera la expansión de la red <sup>28</sup>. Bajo otras condiciones, como ser el secado con aire o la deshidratación por acción de solventes orgánicos miscibles en agua, las fibrillas colágenas pueden contraerse aumentando por lo tanto los espacios interfibrilares.

Aquí se considera el secado con aire que permite la remoción de la cantidad justa de agua, necesaria para lograr adhesión con primers hidrofílicos que contienen una concentración crítica de agua; y no un secado excesivo que lleva al colapso pasivo de la red de colágeno interfiriendo con la infiltración de los monómeros adhesivos. La adición de agua revierte rápidamente esta situación, causando una reexpansión pasiva al decrecer el módulo de elasticidad del colágeno, abriéndose de esa manera los espacios entre las fibrillas, los cuales son necesarios para la infiltración resinosa. Esta serie de eventos puede explicar, en parte, por qué la adhesión húmeda mejora la adhesión a dentina <sup>28,31</sup>.

El agua (sin dudas el principal enemigo de los procedimientos adhesivos) es muy importante en esta fase inicial de penetración del sistema adhesivo. De ahí que, en los procedimientos de acondicionamiento ácido total, lo más difícil sea eliminar, sin exageración, el exceso de agua usada en el lavado; esto es sin llegar a provocar que las fibras colágenas se aproximen entre sí al extremo de dificultar la penetración del adhesivo <sup>23</sup>. La técnica húmeda de adhesión se torna aún más compleja debido al hecho de que la humedad intrínseca de la dentina varía desde aproximadamente un 1% en la dentina superficial a un 22% en la dentina profunda <sup>31</sup>. Por otro lado, la eliminación insuficiente de agua representa un perjuicio aún mayor <sup>23</sup>.

En la técnica húmeda de aplicación de los sistemas adhesivos de acondicionamiento ácido total, el agua debe ser eliminada antes de la polimerización del sistema adhesivo, lo que se produce por un proceso de deshidratación química regida por los solventes anhidros, acetona o etanol, contenidos en los sistemas adhesivos. Merced a su naturaleza hidrófila, los solventes tienen la función de ayudar a penetrar en la dentina húmeda a los monómeros del primer, que son menos hidrófilos. Estos solventes que contienen los primers, si bien son indispensables en las etapas iniciales de su aplicación, deben ser eliminados totalmente antes de la polimerización <sup>23</sup>. De forma análoga el secado con aire de los primers solubles en agua produce una deshidratación física. La diferencia es que la deshidratación química rigidiza la matriz dentinaria desmineralizada en su estado expandido más que en su estado colapsado <sup>31</sup>.

Una vez expuesto el colágeno, en su estado completamente expandido, los monómeros adhesivos penetran en la trama colágena formando una capa híbrida in situ, que se cree que es esencial para la unión a dentina. Por lo tanto, para una unión efectiva, la estabilidad y el mantenimiento del colágeno dentinario son críticos <sup>4</sup>. Al mismo tiempo que la capa híbrida es esencial para la unión a dentina, es

también el componente más débil y vulnerable de la interfaz, donde el estrés tiende a concentrarse y se producen la mayoría de las fallas <sup>1</sup>.

El objetivo de la imprimación es reemplazar todo el agua o la totalidad de la mezcla monómero-solvente en los espacios interfibrilares con monómeros polimerizables <sup>31</sup>. La capacidad de los adhesivos les permite unirse, por un lado, al diente mediante microtraba y, por el otro, a las resinas compuestas o a los cementos resinosos en función de una unión química <sup>23</sup>.

**3.** Transformación de los monómeros líquidos en polímeros sólidos, mediante una reacción química que es activada por un proceso físico y/o químico <sup>23</sup>.

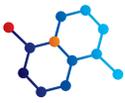
Los estudios de Nakabayashi et al. (1982)<sup>30</sup> demostraron que era posible conseguir una adhesión eficiente a la dentina mediante un mecanismo de hibridación del tejido dentinario desmineralizado con resinas adhesivas, dando lugar a una capa híbrida de colágeno, hidroxiapatita y resina, (de ahí el término híbrida = mezcla); o de interdifusión o capa de resina-dentina infiltrada <sup>23</sup>. Si este procedimiento resulta en incompleta hibridación, el colágeno queda desprotegido y vulnerable a la degeneración hidrolítica y enzimática por un largo período de tiempo <sup>6,13,20</sup>, lo que conduce a una reducción de la fuerza adhesiva <sup>35</sup>.

Un segundo inconveniente está dado por la diferencia entre la profundidad de desmineralización ocasionada por el ácido y la capacidad de penetración del adhesivo <sup>23</sup>, lo que se pone de manifiesto en la técnica de acondicionamiento ácido total.

Usualmente no existe brecha entre los materiales adhesivos y la estructura dentaria, a menos que la contracción de polimerización supere la resistencia de la unión a dentina. Es por esto que no existe en las restauraciones adheridas microfiltración. Sin embargo, la capa de dentina desmineralizada y desprotegida que permanece en la base de la interfaz resina-dentina es porosa y permite la difusión de fluidos desde los márgenes de la restauración, profundamente dentro de la capa híbrida, vía defectos interconectados, porosidades, que existen entre la capa híbrida y la dentina desmineralizada subyacente<sup>31</sup>. Este fenómeno es denominado nanofiltración <sup>14,23</sup>, y puede llevar a la falla adhesiva <sup>35</sup>.

La paradoja surgió al advertir que la compatibilidad necesaria de los sistemas adhesivos actuales para actuar en un medio húmedo, característica imperiosa para aplicarse al sustrato dentinario, es a su vez el factor que limita la durabilidad de los adhesivos y consecuentemente de la unión. Adicionalmente a las dificultades técnicas para infiltrar adhesivos en la dentina debe considerarse también que ésta constituye la mayor parte de todo el sustrato disponible para lograr adhesión en la mayoría de las restauraciones que se realizan diariamente. A esto se suma que los procesos de desmineralización o esclerosis que pueden afectar la dentina y las diferencias de profundidad en las preparaciones cavitarias, las cuales determinan la cantidad de dentina intertubular disponible para la adhesión, comprometen la calidad adhesiva de las restauraciones <sup>23</sup>.

La degradación de la interfaz adhesiva es el resultado de un proceso simultáneo de hidrólisis de colágeno, también llamada degradación



hidrolítica activa, (dependiente de la actividad de las MMP sobre el colágeno) y disolución pasiva de la resina (hidrólisis dependiente de los fenómenos de solubilización del polímero) <sup>23</sup>. Esta degradación combinada de resina y colágeno puede aumentar el contenido de agua de la interfaz adhesiva generando debilitamiento de la resistencia de la unión resina-dentina y disminución de la longevidad de la unión <sup>6</sup>.

Un factor conocido que produce la degradación de la unión diente-composite es la exposición al agua. En sus diferentes formas, ya sea filtración marginal, nanofiltración o el ingreso de fluidos orales a través de canales nanométricos a lo largo de las fibrillas de colágeno en la capa híbrida, el ingreso de agua es considerado sumamente dañino para la integridad de la unión <sup>6,13</sup>. Estudios in vitro recientes sugieren que el componente resinoso de la capa híbrida sufre hidrólisis más rápidamente, siendo el primer paso en la degradación de dichas interfaces <sup>29</sup>.

La permeabilidad de las resinas polimerizadas está relacionada a su polaridad. La naturaleza hidrófila de los sistemas adhesivos actuales conduce a una mayor absorción de agua por parte del polímero, lo cual promueve su plastificación y favorece su degradación hidrolítica en el medio bucal <sup>19,23,29,35</sup>. Por consiguiente, los sistemas simplificados que mezclan primer y adhesivo en una misma solución son más susceptibles a la degradación que las versiones multipasos, debido a que son más hidrófilos <sup>13</sup>. Los sistemas adhesivos autoacondicionadores, particularmente los de un solo paso, ofrecen los más bajos valores de resistencia adhesiva y el peor desempeño clínico <sup>23</sup>.

La mayoría de los adhesivos dentinarios incorporan monómeros resinosos hidrofílicos y/o iónicos -grupos polares- que les permiten unirse al sustrato dentinario que posee humedad intrínseca, volviéndose en ocasiones autograbantes. Cuanto más polar, más hidrofílica es una resina. Estas resinas presentan una mayor absorción de agua y un menor módulo elástico en comparación con las especies menos polares. El agua es atraída por los grupos polares formando puentes de hidrógeno, esto es lo que comúnmente se llama "bound water" <sup>25</sup>. Las moléculas de agua firmemente unidas a los sitios polares rompen las uniones hidrógeno intercatenarias induciendo imbibición y plastificación del polímero, causando así una reducción de sus propiedades mecánicas. Al contrario, los polímeros no polares con baja densidad de energía cohesiva permiten a las moléculas de agua moverse libremente a través de nanoporos como agua "no unida".

Debido a que este agua no unida está llenando el volumen libre no se espera que cause cambios dimensionales ni altere de manera significativa las propiedades del polímero <sup>29</sup>.

Se ha observado que, en aquellos casos en que existe esmalte en todo el borde cavo, la adhesión a este nivel brinda un efecto sellador que se opone a la degradación, la cual se da más lentamente. Aún en los casos en que hay esmalte a nivel del borde cavo, la sensibilidad a la degradación hidrolítica en las técnicas adhesivas simplificadas es mayor <sup>13</sup>. En ausencia de adhesión a esmalte, la difusión de agua desde el exterior hacia áreas de porosidad interna y áreas del polímero donde se localizan las moléculas hidrófilas juega un papel importante. La nanofiltración puede acelerar el proceso de degradación de la interfaz, contribuyendo así a la pérdida de resistencia

adhesiva <sup>14,23</sup>. El camino trazado por la penetración del agua adopta una configuración semejante a las ramas de un árbol "water treeing" y es reconocido como la primera señal de degradación de los polímeros por hidrólisis <sup>23</sup>.

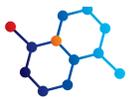
A pesar del enfoque adhesivo en sí mismo, el resultado de la interacción resina-dentina es, a menudo, la hibridización incompleta de la superficie dentinaria. El colágeno expuesto en el área más profunda de la capa híbrida se torna vulnerable a la degradación hidrolítica y proteolítica <sup>23</sup>. También es susceptible a otros factores promotores de la degradación, como ser el solvente residual del adhesivo <sup>6</sup>. La degradación hidrolítica de las fibrillas colágenas desnudas ocurre en ausencia de colonización bacteriana <sup>6,33</sup>. Sin embargo, el colágeno es propenso a la acción potencial de enzimas colagenolíticas de origen bacteriano, como las producidas por el *Streptococcus mutans* <sup>14</sup> y a MMP que son activadas y liberadas a lo largo del tiempo <sup>6,23</sup>.

Las MMP son enzimas proteolíticas, presentes en la saliva <sup>14</sup>, que son liberadas de la matriz dentinaria mineralizada <sup>23,33</sup>, activadas por el bajo pH y la presencia de iones metálicos como el calcio (liberado por la desmineralización inherente al proceso adhesivo <sup>23</sup>) y el zinc <sup>33</sup>. Causan degradación del colágeno expuesto <sup>20</sup>, hidrolizando regiones de la triple hélice de colágeno incluso bajo condiciones fisiológicas, digieren la matriz dentinaria desmineralizada aun luego de la neutralización del pH por acción de los buffers salivales <sup>14</sup>, y pueden causar su degradación bajo diferentes condiciones fisiológicas y patológicas <sup>33</sup>.

La aplicación de adhesivos de grabado y lavado simplificados a la dentina desmineralizada activa MMP endógenas de la matriz que se encuentran unidas (la mayoría) y no unidas al colágeno, lo cual resulta en una pérdida progresiva de las fibrillas de colágeno desprotegidas de la capa híbrida <sup>16</sup>, dado su actividad colagenolítica y gelatinolítica <sup>33</sup>.

En relación al colágeno podemos afirmar que en sí mismo no es muy químicamente reactivo. La mayoría de los aminoácidos en este polímero biológico (70%) se vuelven no disponibles para posteriores reacciones químicas una vez que son incorporados en las uniones peptídicas covalentes que conforman la estructura primaria del colágeno. Es por ello que la unión química al colágeno contribuye en forma minoritaria a la unión resina-dentina; siendo la retención resultado mayoritario del entrecruzamiento molecular entre las cadenas de polímero y las fibrillas de colágeno <sup>31</sup>.

En ausencia de agua u otras sustancias que forman puentes de hidrógeno, los péptidos del colágeno pueden formar uniones hidrógeno intermoleculares con el péptido colagenoso más cercano donde antes existían uniones hidrógeno con agua libre. Estas uniones contribuyen al acortamiento de las fibrillas y a un aumento en su rigidez. La remoción de agua de las fibras de colágeno puede estabilizar la estructura aumentando la cantidad de interacciones de fuerzas débiles (ejemplo: uniones van der Waals, interacciones iónicas, uniones hidrofóbicas) entre moléculas de colágeno adyacentes. Se puede confirmar que la deshidratación aumenta la rigidez del colágeno. La acción plastificante del agua en el colágeno es remarkable; la relativa rigidez del colágeno decrece a medida que el contenido de agua aumenta <sup>28</sup>.



La habilidad de la deshidratación para aumentar la rigidez del colágeno parece ser debida a la remoción de agua per se, más que al efecto de los solventes orgánicos que son utilizados en los adhesivos dentinarios, ya que la deshidratación física producida por acción del aire es la que genera los más altos módulos de elasticidad. Si bien ambos métodos de deshidratación aumentan la rigidez de la matriz dentinaria desmineralizada, producen efectos muy diferentes en el volumen de la matriz. Durante el secado con aire, el agua que ocupa los espacios entre las fibrillas de colágeno se pierde por evaporación. Las fuerzas de tensión superficial actúan colapsando la red de fibras de colágeno a un volumen de tan sólo 32,5% de su volumen original. Durante la deshidratación con solventes orgánicos los espacios llenos de agua no son expuestos a las fuerzas de tensión superficiales en el aire. Las fibras se vuelven más rígidas a medida que pasa el tiempo, por lo que se contraen mucho menos cuando son subsecuentemente expuestas al aire. Presumiblemente este último tratamiento preserva mucho mejor los espacios entre las fibras de colágeno de la matriz dentinaria descalcificada lo cual permite una mejor infiltración de la resina durante la adhesión <sup>31</sup>.

Podríamos resumir de la siguiente manera los procedimientos clínicos que han sido propuestos para optimizar la unión resina-dentina y reducir su envejecimiento:

1. La necesidad de obtener una capa hidrofóbica con un adhesivo no soluble parece ser de suma importancia para reducir la absorción de agua y la retención de solvente. Por lo cual los adhesivos de tres pasos de grabado y lavado y de dos pasos autograbantes, son preferidos a los simplificados. La aplicación de capas múltiples por medio de una técnica de frotamiento continuo también aumenta la resistencia de la unión a la vez que disminuye la nanofiltración <sup>6</sup>.
2. La mejora en la evaporación del solvente mediante sopleteo del adhesivo evita la separación en fases dentro del agente adhesivo y remueve una sustancial cantidad de agua <sup>6</sup>.
3. Tiempo de polimerización extendido -veinte segundos más del período recomendado por el fabricante- que resulta en una mejor polimerización y reducida permeabilidad <sup>6</sup>.
4. Uso de inhibidores de las MMP, que son responsables de la degradación de las fibrillas colágenas en ausencia de contaminación bacteriana <sup>6</sup>.

Un importante agente inhibidor de estas enzimas es la clorhexidina (CHX) al 2%, utilizada posteriormente al grabado con ácido fosfórico de la dentina y previo al uso de adhesivos dentinarios<sup>23,33</sup>. También se puede utilizar un primer con riboflavina activada por luz ultravioleta A (UVA), lo que resulta en la inhibición parcial de las MMP <sup>33</sup> a través de la formación de enlaces directos con estas enzimas y reforzando las fibrillas de colágeno a través de la promoción de la formación de enlaces <sup>6</sup>. También se puede inhibir la actividad de las MMP a través del uso de agentes reticuladores <sup>22</sup>, como el extracto de semillas de uva (GSE) y el extracto de arándanos (CRE).

Cuando las moléculas de colágeno se encuentran enlazadas por acción de un agente reticulador, los sitios que sirven como sustrato para las colagenasas pueden ser escondidos o modificados debido

al plegamiento proteico, y la digestión enzimática puede ser significativamente detenida <sup>8,35</sup>, a la vez que se produce un aumento en la rigidez del colágeno dentinario <sup>10</sup>.

5. Impregnación mejorada: varios métodos nos permiten lograr este objetivo; por ejemplo, un tiempo prolongado de aplicación del sistema adhesivo, técnica de cepillado o frotamiento vigoroso y técnica de aplicación del adhesivo asistida por impulso eléctrico <sup>6</sup>.

6. Uso de agentes naturales y/o sintéticos que promueven la formación de enlaces en el colágeno de la dentina desmineralizada, lo cual lleva a un aumento de la rigidez de la red colágena evitando el colapso de la trama y permitiendo una mejor impregnación por parte del sistema adhesivo <sup>6</sup>.

Los enfoques disponibles para aumentar la cantidad de enlaces a nivel del colágeno pueden ser divididos en:

a. métodos físicos, también llamados foto oxidativos. Consiste en un método combinado de aplicación de un primer que contiene riboflavina (vitamina B2) fotosensible y luego la exposición a UVA, o luz halógena <sup>10,11,18</sup>.

b. métodos mecánicos, en los cuales se utilizan diferentes soluciones de agentes reticuladores <sup>3,4,9,22</sup>. El colágeno tipo I presente en los tejidos en forma de fibrillas es estabilizado por enlaces covalentes intermoleculares. La inducción de enlaces exógenos por medio de estos agentes ha sido propuesta como un mecanismo para mejorar su estabilidad mecánica y reducir su biodegradación<sup>3,4,17,22</sup>. La actividad de las MMP es inhibida a través del uso de agentes reticuladores<sup>22</sup>, especialmente el extracto de semillas de uva (GSE) y el extracto de arándanos (CRE) <sup>8</sup>. Cuando las moléculas de colágeno se encuentran enlazadas por acción de un agente reticulador, los sitios que sirven como sustrato para las colagenasas pueden ser escondidos o modificados debido al plegamiento proteico, y la digestión enzimática puede ser significativamente detenida <sup>[8,35]</sup>, a la vez que se produce un aumento en la rigidez del colágeno dentinario <sup>10</sup>.

## AGENTES RETICULADORES

### Riboflavina

En el método foto oxidativo de generación de enlaces a nivel del colágeno se requiere la presencia de oxígeno libre, y la riboflavina (vitamina B2) es uno de los más potentes productores de estos radicales de oxígeno. La riboflavina (RA) es biocompatible, debido a lo cual la reticulación del colágeno inducida por irradiación UVA de RA fotosensible ha sido reportada como un tratamiento exitoso <sup>[10]</sup>.

El principio básico de la formación de enlaces por medio de la foto oxidación es el mismo que el de la fotopolimerización, es decir, la radiación UVA causa la liberación de especies reactivas de oxígeno –radicales libres– que pueden inducir la formación de enlaces covalentes a través de la oxidación <sup>[10,18]</sup>. En la terapia reticuladora con RA-UVA, la RA amarilla trabaja como fotosensibilizador que estimula la formación de especies reactivas de oxígeno y, al mismo tiempo, actúa como un escudo contra la penetración de UVA <sup>[10]</sup>. La riboflavina es también foto activada por la luz visible azul, como la generada por las lámparas halógenas de las unidades de curado, lo



que garantiza mayor seguridad clínica que el uso de UVA, fácil uso clínico, y aplicación y tiempo de activación aceptables. La máxima absorción de luz, y por lo tanto la mayor producción de radicales libres, se da respectivamente a longitudes de onda de 270 (luz ultravioleta B), 366 (UVA) y 445 nanómetros (luz azul visible). La alta energía de la UVA rompe los enlaces débiles en el colágeno y los grupos hidroxilo funcionales en la RA se unen a la prolina o lisina en el colágeno, induciendo enlaces covalentes intermoleculares. La formación de estos enlaces es acompañada por la pérdida de residuos de tirosina e histidina del colágeno<sup>11</sup>. La luz UVA promueve mejores resultados en relación al aumento en la resistencia a la tracción y disminución de la liberación de residuos de hidroxiprolina producto de la actividad colagenasa, en comparación con la activación con luz azul<sup>18</sup>. Los resultados obtenidos son mejores cuando la RA y el agente adhesivo son fotoactivados separadamente en dos pasos distintos, en comparación con el proceso en un paso. Esto podría ser explicado porque tanto la RA como el sistema foto iniciador en el agente adhesivo dentinario compiten en la absorción de la luz azul. Por lo tanto se puede asumir que cuanto mayor es el contenido de RA en la matriz dentinaria desmineralizada, menor es el grado de polimerización de la resina adhesiva, porque la RA actúa como un escudo contra la luz que incide<sup>18</sup>. El resultado del tratamiento con RA-UVA depende más de un protocolo específico que de la concentración de los agentes. Se ha visto que el uso de RA al 0,1% seguido de dos minutos de irradiación resulta efectivo, además de ser práctico y permitir el ahorro de tiempo en relación al uso de otros agentes naturales, en que el tiempo promedio de aplicación es de una hora<sup>11</sup>.

Por otro lado, la utilización de un primer con riboflavina resulta en la inhibición parcial de las MMP<sup>33</sup>. Se especula que la riboflavina activada por UVA puede reducir la actividad de las MMP a través de la formación de enlaces directos con estas enzimas y reforzando las fibrillas de colágeno a través de la promoción de la formación de enlaces. Esta inhibición de las MMP puede ser responsable de la durabilidad aumentada de las capas híbridas, considerando el importante rol de estas enzimas en la degradación de estas capas a lo largo del tiempo<sup>6</sup>.

La ventaja de la inactivación de enzimas proteolíticas en la matriz dentinaria mediante la formación de enlaces es que el mecanismo no es específico, es decir que se promueve la formación de enlaces en todos los tipos de MMP que se encuentran en la dentina así como también en las catepsinas y en el colágeno. Estos enlaces involucran uniones covalentes que son estables a lo largo del tiempo<sup>10</sup>.

### Glutaraldehído

El glutaraldehído (GD) es un agente reticulador sintético dialdehído que promueve la formación de enlaces cruzados exógenos que aumentan el módulo elástico de la dentina desmineralizada, aumentando la rigidez de las fibrillas de colágeno<sup>3,4,9</sup>. Mejora las propiedades mecánicas mediante la fijación de proteínas, dada su afinidad molecular por los grupos de nitrógeno activos de los aminoácidos<sup>3,4,14,17</sup>. El GD reacciona en forma primaria mediante la formación de enlaces inter e intramoleculares con los grupos amino de los residuos peptídicos lisina e hidroxilisina de las fibrillas de colágeno, a través de sus grupos funcionales aldehído<sup>1,4,14,15,27,35</sup>. Consecuentemente, aumenta la resistencia traccional de la unión adhesiva<sup>1,3</sup>, así

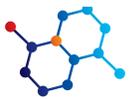
como también disminuyen los índices de degradación tisular<sup>3,4,14</sup>. Sin embargo, la reacción parece estar limitada por la disponibilidad de estos grupos amino libres, por lo cual los valores del módulo elástico alcanzan un tope<sup>3</sup>. Con la polimerización del GD, subsecuente a la fijación, se puede crear una estructura con una reticulación aumentada a nivel de las fibrillas de colágeno<sup>4,27</sup>.

Parte de la acción del GD in vivo es causada por su efecto antibacteriano, que puede influenciar el crecimiento de la placa microbiana. Este efecto es dependiente de la concentración del pH, la temperatura y el tiempo de exposición, y tiene poca duración<sup>2</sup>. Este agente es también conocido por su alta citotoxicidad<sup>3,4,22</sup>. La baja concentración requerida para evitar este efecto adverso no es efectiva como agente reticulador<sup>35</sup>.

### Proantocianidina

La proantocianidina (PA) se encuentra ampliamente presente y disponible en frutas (nueces, uvas, cerezas, arándanos y cacao), vegetales, semillas, flores y en las hojas y corteza de ciertas especies de árboles (pinos, olmo),<sup>3,4,8,16,22</sup>. Las uvas y el cacao están entre las fuentes más ricas de PA<sup>1,16</sup>. PA es una clase de bioflavonoide que se encuentra en la naturaleza como metabolito secundario de plantas<sup>22</sup>. Es un agente reticulador biocompatible debido a su baja toxicidad -la PA es 120 veces menos tóxica que el GD-<sup>22</sup>, que posee vastas actividades biológicas entre las cuales podemos destacar: potente antioxidante<sup>3,4,14,16,22,34</sup>, antibacteriana, antiviral, anticarcinogénica, antiinflamatoria, antialérgica, analgésica y efectos inhibitorios enzimáticos<sup>34</sup>. La PA consiste en estructuras altamente hidroxiladas capaces de formar complejos insolubles con carbohidratos y proteínas<sup>1,3,4,27</sup>. Este polifenol natural interactúa con las proteínas del colágeno mediante uniones covalentes, iónicas e hidrógeno, e interacciones hidrofóbicas<sup>7,22</sup>. La PA puede biomodificar la matriz dentinaria desmineralizada y mejorar las propiedades mecánicas, disminuir los niveles de biodegradación y aumentar la resistencia de la unión dentina-resina a la tracción<sup>1,3,4,27</sup>. La PA interactúa con las proteínas ricas en prolina, como lo es el colágeno, precipitándolas a través de las uniones antes mencionadas<sup>26,16,22</sup>, promoviendo la formación de enlaces exógenos<sup>22</sup>. Los polipéptidos con alto contenido de prolina presentan una conformación abierta, y son fuertes receptores de uniones hidrógeno, de ahí su gran afinidad por el tanino, siendo ésta una unión resistente<sup>26,21,22</sup>.

La hidrofobia y propiedades mecánicas del colágeno biomodificado con PA mejoran como resultado del aumento del entrecruzamiento, disminuyendo la permeabilidad al agua debido a la formación de una estructura más densa<sup>16,21</sup>. Esto su vez puede resultar en una disminución de la absorción de colagenasas y, por tanto, en una reducción de la degradación enzimática de la matriz dentinaria tratada con PA<sup>8,9</sup>. Esta resistencia aumentada a la degradación por las colagenasas bacterianas<sup>22</sup> ha sido atribuida al ocultamiento de los sitios de clivaje en el colágeno<sup>16</sup> debido a la formación de uniones hidrógeno con la PA<sup>8,9</sup>. La estabilidad del complejo colágeno dentinario-PA contribuye a altos valores de dureza y módulo elástico de la capa híbrida y dentina subyacente<sup>15</sup>. La mejora de las propiedades mecánicas observadas es dependiente del tiempo de actuación del agente reticulador<sup>3,4</sup>. La concentración de la solución del agente reticulador utilizado es importante, no solo por la relación que guarda con el grado de entrecruzamiento que promueve, sino también para



la eficiencia del mismo<sup>22</sup>. El nivel de entrecruzamiento y grado de penetración de la PA puede ser controlado variando no solo su concentración, sino también las condiciones de la reacción, como ser el pH, temperatura, formas de PA (monomérica, dimérica y oligomérica) y los aditivos<sup>22</sup>.

La PA es introducida en el procedimiento adhesivo en forma separada, como un pre tratamiento, y no adicionándola en forma directa al adhesivo. Este paso separado no solamente evita los efectos adversos en el comportamiento de curado de los adhesivos sino que también permite una mayor incorporación de PA. Sin embargo, este paso extra complica el procedimiento clínico de adhesión y requiere de un mayor tiempo de consulta clínica<sup>17</sup>. El pre acondicionamiento con PA mejora la unión resina-dentina cuando el solvente del adhesivo utilizado es agua/etanol en mejor forma que cuando es agua/acetona. Varios factores deben ser tenidos en cuenta. Factores como los solventes, el proceso de extracción del producto, el pH y la temperatura pueden influenciar su estructura y composición así como también su potencia reticuladora en general<sup>17</sup>.

La PA exhibe efectos inhibitorios contra proteasas como ser las MMP<sup>17</sup>, disminuyendo significativamente los niveles de hidroxiprolina liberada cuando el colágeno es expuesto a una colagenasa<sup>26</sup>. La reacción inhibitoria de la PA involucra quelación de metales, entrapamiento de radicales o unión directa a enzimas<sup>34</sup>. En este sentido, la PA es el biomodificador dentinario más prometedor para la estabilización del colágeno expuesto en la capa híbrida y la mejora de la matriz dentinaria contra la degradación<sup>17</sup>.

#### Extracto de semillas de uva

El extracto de semillas de uva es un tanino extraído de las semillas de uvas *Vitis Vitífera* por lo cual presenta una gran disponibilidad<sup>15</sup>. Consiste en una compleja mezcla de oligómeros y polímeros, siendo el componente predominante las PA oligoméricas (97,8%)<sup>14, 15</sup>, (95%)<sup>9</sup>. El GSE interactúa con proteínas para inducir enlaces cruzados<sup>22</sup>. Los cambios en las propiedades mecánicas y físicas de la matriz dentinaria promovidos por el GSE resultan en un aumento de la resistencia de la unión del sistema adhesivo a dentina<sup>1, 3, 4</sup> y en una mejora de la resistencia de la dentina en sí misma<sup>3, 4, 24</sup>. La dentina tratada con GSE presenta una disminución en la degradación de colágeno que es atribuida al enmascaramiento de los sitios de reconocimiento de las colagenasas por parte del agente reticulador, o a la retención de fragmentos peptídicos clivados en la red formada por los nuevos enlaces<sup>27</sup>. Ha sido reportado que la rigidez de la dentina desmineralizada puede ser afectada por la concentración y el tiempo de exposición a una solución de GSE<sup>3</sup>.

El efecto del GSE estaría restringido a la capa más superficial de la dentina, debido al alto peso molecular de las PA oligoméricas. Esto explicaría por qué un primer autograbante conteniendo este agente no es capaz de mejorar la resistencia traccional de la unión adhesiva, ya que el gran tamaño molecular compromete la penetración y difusión de los monómeros funcionales del primer, dificultando así la hibridación. Sin embargo, cuando este agente se incorpora en un sistema adhesivo de grabado y lavado los resultados obtenidos en términos de resistencia de la unión adhesiva y mejora de las propiedades del colágeno son muy buenos; incluso superiores a los obtenidos con otros agentes reticuladores<sup>7, 24</sup>.

#### Ácido tánico

El ácido tánico, forma comercial de tanino condensado<sup>5</sup> puede afectar las propiedades mecánicas y la estabilidad de la matriz dentinaria; así como las propiedades de la interfaz adhesiva. Mejora las propiedades de la dentina desmineralizada mediante el aumento del módulo elástico y la disminución de la degradación enzimática por efecto inhibitorio de las colagenasas, ya sea ocultando los sitios de clivaje o disminuyendo la actividad enzimática de las MMP<sup>9, 24</sup>. La formación de enlaces por medio de uniones hidrógeno es la responsable de los cambios que se producen al utilizar este agente<sup>8</sup>. Estos cambios son dependientes de su concentración y del tiempo de exposición al agente, mientras que son independientes del pH utilizado<sup>5, 9</sup>.

#### Galato de catecina

Entre los agentes reticuladores encontramos el galato de epigala o catecina, la catecina más abundante en el té verde. Este agente reduce la desmineralización erosiva de la dentina, posiblemente a través de su propiedad inhibitoria de las MMP<sup>24</sup>.

#### Hesperidina

La hesperidina (HPN), que es extraída de las frutas cítricas, es un compuesto polifenólico, tal como lo es la PA. Si bien el efecto reticulador de la HPN no ha sido bien elucidado, su unidad estructural fundamental es similar a la de las PA del GSE. Es por ello que la acción química de la HPN en el colágeno se explica de la misma forma que el efecto reticulador de las PA. Entre sus beneficios se destacan su poder antioxidante, antiinflamatorio y anticarcinogénico<sup>24</sup>.

La incorporación de HPN en un primer autograbante aumenta la resistencia inmediata de la unión a dentina, así como también la dureza y el módulo elástico de la interfaz resina-dentina. La aplicación de HPN en conjunción con adhesivos dentales constituye un enfoque prometedor para mejorar la longevidad de las uniones adhesivas y conducir al éxito clínico de las restauraciones adheridas<sup>24</sup>.

#### Genipina

La genipina (GE) es un agente reticulador natural y componente común de frutas, vegetales y semillas. Es obtenida principalmente del compuesto genoposide, que es aislado de la fruta *Gardenia Jasminoides* Ellis<sup>4</sup>. El tratamiento con GE aumenta la resistencia traccional del colágeno mediante la promoción de la formación de enlaces, indicando el efecto potencial del agente en la estabilización del colágeno de la dentina<sup>35</sup>.

Los mecanismos de reacción entre la GE y los tejidos biológicos no son bien comprendidos. La GE puede reaccionar con los grupos amino libres dentro de la molécula de colágeno; o de moléculas de colágeno adyacentes para formar enlaces intra e intermoleculares. A esto se suma que pueden darse enlaces entre fibrillas de colágeno, enlaces intermicrofibrilares, por medio de la polimerización de moléculas de GE previo a la formación de enlaces (enlaces oligoméricos)<sup>4, 35</sup>. Se ha propuesto que la GE polimeriza primero y luego reacciona con los grupos amino<sup>35</sup>.

#### Extracto de semillas de cacao

El extracto de semillas de cacao (CSE) contiene un 45% de PA<sup>8, 9</sup>. El CSE promueve una importante disminución de la degradación enzimática, aumento de la rigidez y disminución del grado de imbibición de la matriz dentinaria<sup>9</sup>.



### Bromelina

La bromelina es una enzima desproteinizante que pertenece a una sub clase de enzimas conocidas como proteasas o enzimas proteolíticas. Tiene la capacidad de remover la red de colágeno de la dentina desmineralizada mediante la catalización de la hidrólisis de esta proteína, la que se descompone en aminoácidos. Esto hace que la composición química de la dentina se torne más similar a la del esmalte, al minimizar el componente orgánico, lo que a su vez promueve un cambio en las propiedades hidrofílicas de la dentina. Cuando se utiliza este agente desproteinizante con la finalidad de remover el colágeno de la dentina previamente grabada con ácido se produce un aumento en la permeabilidad de ésta debido al agrandamiento de los túbulos dentinarios en la dentina superficial. Esto mejora la humectación y difusión de los monómeros adhesivos a través de la dentina. Además la energía superficial de la dentina aumenta conforme aumenta la eliminación de colágeno que tiene una baja energía superficial. Esto también conduce a una mayor difusión de los monómeros a través del tejido dentinario. Como resultado de esta mejora en la infiltración monomérica se observa una menor nanofiltración<sup>32</sup>. Cabe resaltar que se trata de un agente en estudio y que no se dispone de resultados clínicos, siendo los resultados de laboratorio escasos.

## CONCLUSIONES

Existe gran preocupación acerca del envejecimiento de la interfaz resina-dentina debido a la degradación que experimenta la capa híbrida a lo largo del tiempo, relacionada a la absorción de agua e hidrólisis de la resina, así como también a la ruptura de la red de colágeno y degradación de esta proteína<sup>6</sup>.

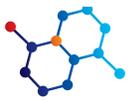
Varios procedimientos clínicos han sido propuestos para optimizar la unión resina-dentina y reducir su envejecimiento. La introducción de agentes reticuladores naturales, reestructuradores y estabilizadores del colágeno, permite aumentar la resistencia inmediata de la unión adhesiva y estabilizarla a lo largo del tiempo. El agente reticulador se utiliza luego del grabado ácido, como tratamiento previo a la aplicación del primer. Lo que aún no se ha logrado es establecer tiempos factibles de aplicación clínica del agente que permitan obtener resultados útiles<sup>1</sup>.

Cabe destacar la necesidad de evaluar el comportamiento a largo plazo de las interfaces biomecánicamente modificadas, así como también los efectos de los agentes reticuladores del colágeno en relación a todos y cada uno de los sistemas adhesivos, y en relación a composites con diferentes composiciones<sup>4, 14</sup>.

La biomodificación de la matriz dentinaria constituye un enfoque nuevo y original para mejorar las propiedades de los componentes más importantes de la unión resina-dentina<sup>14</sup>. Desde que un aumento en las propiedades mecánicas del colágeno en la capa híbrida resulta en una vida más prolongada de la restauración, la inducción de enlaces con estos componentes biocompatibles puede ser beneficiosa para la odontología restauradora<sup>4</sup>.

El logro de una adhesión fuerte y estable entre el composite y la dentina continúa siendo un desafío en odontología restauradora<sup>6</sup>; entre otros motivos debido a su imprevisibilidad.

RECIBIDO 05-Octubre- 2014  
ACEPTADO 11-Noviembre 2014



## Referencias

1. Al-Amr, A., Drummond, J.L., Bedran-Russo, A.K. The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2009; 91(1): 419-424.
2. Arends, J., Ogaard, B., Ruben, J., Wemes, J., Rolla, G.. Influence of glutardialdehyde on dentin demineralization in vitro and in vivo. *Scand. J. Dent. Res.* 1989; 97: 307-310.
3. Bedran-Russo, A.K., Pashley, D.H., Agee, K., Drummond, J.L., Miescke, K.J.. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2008; 86(2): 331-334.
4. 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. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2007; 80(1): 268-272.
5. Bedran-Russo, A.K., Yoo, K.J., Ema, K.C., Pashley, D.H.. Mechanical properties of tannic-acid-treated dentin matrix. *J. Dent. Res.* 2009; 88(9): 807-811.
6. Breschi, L., Mazzoni, A., Ruggeri, A., Cadenaro, M., Di Leandra, R., De Stefano Dorigo, E.. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent. Mater.* 2008; 24(1): 90-101.
7. Broyles, A., Pavan, S., Bedran-Russo, A.K.. Effect of dentin surface modification on the microtensile bond strength of self-adhesive resin cements. *J. Prosthodont.* 2013; 22(1): 59-62.
8. Castellan, C.S., Bedran-Russo, A.K., Karol, S., Pereira, P.N.. Long-term stability of dentin matrix following treatment with various natural collagen cross-linkers. *J. Mechanical Behaviour Biomed. Mater.* 2011; 4: 1343-1350.
9. Castellan, C.S., Pereira, P.N., Grande, R.H., Bedran-Russo, A.K.. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. *Dent. Mater.* 2010; 26(10): 968-973.
10. Cova, A., Breschi, L., Nato, F., Ruggeri, A., Carrilho, M., Tjaderhane, L., et al.. Effect of UVA-activated riboflavin on dentin bonding. *J. Dent. Res.* 2011; 90(12): 1439-1445.
11. Chiang, Y-S., Chen, Y-L., Chuang, S-F., Wu, C-M., Wei, P-J., Han, C-F., et al.. Riboflavin-ultraviolet-A-induced collagen cross-linking treatments in improving dentin bonding. *Dent. Mat.* 2013; 29(6): 682-692.
12. De Munk, J., Mine, A., Cardoso, M., De Almeida Neves, A., Van Landuyt, L., Poitevin, et al.. Effect of dentin location and long-term water storage on bonding effectiveness of dentin adhesives. *Dent. Mater. J.* 2011; 31(1): 7-13.
13. De Munck, J., Van Meerbeek, B., Yoshida, Y., Inoue, S., Vargas, M., Suzuki, K., et al.. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J. Dent. Res.* 2003; 82(2): 136-140.
14. Dos Santos, P.H., Karol, S., Bedran-Russo, A.K.. Nanomechanical properties of biochemically modified dentin bonded interfaces. *J. Oral Rehabil.* 2011; 38: 541-546.
15. Dos Santos, P.H., Karol, S., Bedran-Russo, A.K.. Long-term nanomechanical properties of biomodified dentin-resin interface components. *J. Biomech.* 2011; 44(9): 1691-1694.
16. Epasinghe, D.J., Yiu, C.K., Burrow, M.F., Tay, F.R., King, N.M.. Effect of proanthocyanidin incorporation into dental adhesive resin on resin-dentine bond strength. *J. Dent.* 2012; 40: 173-180.
17. Fang, M., Liu, R., Xiao, Y., Li, F., Wang, D., Hou, R., et al.. Biomodification to dentin by a natural crosslinker improved the resin-dentin bonds. *J. Dent.* 2012; 40: 458-466.
18. Fawzy, A., Nitisusanta, L., Iqbal, K., Daood, U., Neo, J.. Riboflavin as a dentin crosslinking agent: ultraviolet A versus blue light. *Dent. Mat.* 2012; 28(12): 1284-1291.
19. Ferracane, J.. Hygroscopic and hydrolytic effects in dental polymer networks. *Dent. Mater.* 2006; 22: 211-222.
20. Green, B., Yao, X., Ganguly, A., Xu, C., Dusevich, V., Walker, M.P., et al.. Grape seed proanthocyanidins increase collagen biodegradation resistance in the dentin/adhesive interface when included in an adhesive. *J. Dent.* 2010; 38(11): 908-915.
21. Hagerman, A.E., Butler, L.G.. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 1981; 256(9): 4494-4497.
22. Han, B., Jaurequi, J., Tang, B.W., Nimni, M.E.. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2003; 65: 118-124.
23. Henostroza Haro, G. (et al.). *Adhesión en Odontología Restauradora. 2ª edición.* Madrid: Editorial Médica Ripano; 2010.
24. Islam, S., Hiraishi, N., Nassar, M., Yiu, C., Otsuki, M., Tagami, J.. Effect of natural cross-linkers incorporation in a self-etching primer on dentine bond strength. *J. Dent.* 2012; 40: 1052-1059.
25. Ito, S., Hashimoto, M., Wadgaonkar, B., Svizero, N., Carvalho, R.M., Yiu, C., et al.. Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomater.* 2005; 26: 6449-6459.
26. Kalra, M., Iqbal, K., Nitisusanta, L., Daood, U., Sum, C., Fawzy, A.. The effect of proanthocyanidins on the bond strength and durability of resin sealer to root dentine. *Int. Endod. J.* 2013; 46(2): 169-178.
27. Macedo, G.V., Yamauchi, M., Bedran-Russo, A.K.. Effects of chemical cross-linkers on caries-affected dentin bonding. *J. Dent. Res.* 2009; 88(12): 1096-1100.
28. Maciel, K.T., Carvalho, R.M., Ringle, R.D., Preston, C.D., Russell, C.M., Pashley, D.H.. The effects of acetone, ethanol, HEMA, and air on the stiffness of human decalcified dentin matrix. *J. Dent. Res.* 1996; 75(11): 1851-1858.
29. Malacarne, J., Carvalho, R.M., De Goes, M.F., Svizero, N., Pashley, D.H., Tay, F.R., et al.. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent. Mater.* 2006; 22: 973-980.
30. Nakabayashi, N., Kojima, K., Masuhara, E.. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J. Biomed. Mater. Res.* 1982; 16: 265-273.
31. Nakabayashi, N., Pashley, D.H.. *Hybridization of dental hard tissues.* Tokyo: Quintessence Publishing Co., Ltd., 1998.
32. Niama, R., Tameesh, M.. A new concept in hybridization: bromelain enzyme for deproteinizing dentin before application of adhesive system. *Smile Dent. J.* 2013; 8: 18-23.
33. Pashley, D.H., Tay, F.R., Yiu, C., Hashimoto, M., Breschi, L., Carvalho, R.M., et al.. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J. Dent. Res.* 2004; 83(3): 216-221.
34. Song, S.E., Choi, B.K., Kim, S.N., Yoo, Y.J., Kim, M.M., Park, et al.. Inhibitory effect of procyanidin oligomer from **elm cortex on the matrix metalloproteinases and proteases of periodontopathogens.** *J. Periodont. Res.* 2003; 38: 292-299.
35. Walter, R., Miguez, P.A., Arnold, R.R., Pereira, P.N.R., Duarte, W.R., Yamauchi, M.. Effects of natural cross-linkers on the stability of dentin collagen and the inhibition of root caries in vitro. *Caries Res.* 2008; 42: 263-268.