



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ETHANOL WET BONDING – ESTADO DA ARTE

Trabalho submetido por
Filipe José Leitão Moreira
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Outubro de 2018



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ETHANOL WET BONDING – ESTADO DA ARTE

Trabalho submetido por
Filipe José Leitão Moreira
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Professora Doutora Ana Mano Azul

Outubro de 2018

Agradecimentos

Culmina com este trabalho um ciclo pessoal e académico que contribuiu significativamente para a pessoa que sou hoje, e que é parte inequívoca do percurso que construo todos os dias.

À Professora Doutora Ana Mano Azul, pela coragem com que aceitou orientar a minha tese. Pelo constante profissionalismo e incentivo no decorrer do trabalho. Pela referência que se tornou desde muito cedo e a quem agradeço a constante disponibilidade.

Ao Hugo, pela amizade que fomos construindo neste caminho. Sinto que nunca conseguirei agradecer devidamente os mundos que se abriram apenas pelo privilégio de conversar genuinamente contigo. De forma inegável, mudaste a forma como encaro a profissão que escolhi abraçar.

À Inês, por toda a paciência, suporte e ajuda que foi fundamental no decorrer deste trabalho.

Ao Roman Krasnevs'kyy, um camarada que comigo partilhou diariamente esta jornada de aprendizagem, e que tornou sempre mais ameno o que sobrava da espuma dos dias.

Ao Núcleo de Estudantes de Medicina Dentária, pelo porto de abrigo quando o mar se levantava. Pela coragem e bravura que sempre ousámos ter. Por acreditarem num associativismo de pessoas, de valores e de acção. “Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”.

À ANEMD, e a todos os que comigo acreditaram que era possível juntar todos os estudantes de Medicina Dentária em Portugal.

À Comissão das XXVI Jornadas Internacionais de Medicina Dentária, pela tremenda demonstração de que “juntos seremos sempre mais fortes”.

Aos amigos que fizeram deste percurso um caminho de sabedoria, de alegria e felicidade, recheado de grandes momentos que comigo levarei ao longo da vida. Um dia serão apenas histórias, esses momentos, mas de tão genuínos, fomos por vezes donos e senhores de um mundo que foi, por momentos, só nosso. “Apenas o vivido é compreendido”.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, a todos os funcionários, a todo o pessoal académico, por toda a compreensão e ajuda. A esta grande casa que um dia me abriu as portas e que me fez tentar abri-las para outros. Ser aluno da Egas Moniz é um privilégio pela forma como se vive o ambiente académico que ali é proporcionado. Será sempre um até já.

Aos meus pais, por serem condão das mais belas e puras faculdades que poderão existir no mundo. O Amor e Educação que tive a felicidade e o privilégio de receber, são os pilares centrais de todas as conquistas e objectivos a que me proponho. Sobre a égide dos seus conselhos conquisto as mais nobres acções. Sentir-me-ei sempre um privilegiado por tudo o que me deram oportunidade de viver.

Obrigado!

Resumo

A adesão de materiais restauradores tem sido um campo em constante desenvolvimento na Medicina Dentária. O problema da adesão duradoura e previsível ao substrato dentinário é considerado como um dos grandes desafios nesta área.

A degradação hidrolítica, a incompleta infiltração de monómeros do adesivo, e a acção das metaloproteínases endógenas da dentina têm sido descritos como as razões principais para a deterioração da interface adesiva.

Existia na literatura publicada a necessidade de se compilar a evidência científica existente sobre a técnica *ethanol wet bonding*, uma das soluções para este problema, que tem merecido algum destaque pelas potencialidades que tem demonstrado nos resultados dos estudos *in vivo* e *in vitro*.

A técnica *ethanol wet bonding* permite alterar quimicamente o substracto dentinário, ao substituir a água do *water wet bonding* tradicional, por etanol. Este facto permite que as fibras de colagénio se mantenham suspensas, permitindo a infiltração de monómeros, ao mesmo tempo que as desidrata, prevenindo fenómenos de degradação hidrolítica.

A seguinte revisão bibliográfica procurou compilar informação publicada sob a forma de artigos científicos sobre a técnica de *ethanol wet bonding*, e respectivas vantagens e limitações clínicas. São também abordados os sistemas adesivos contemporâneos, os principais mecanismos de degradação da adesão e respectivas estratégias para prevenir a sua degradação.

Palavras-chave: *ethanol wet bonding, dentin, enamel, wet bonding, etch and rinse, dentin bonding, hybrid layer, hydrophobic resin*

Abstract

The adhesion of restorative materials has been a constantly developing field in dentistry. The problem of durable and predictable adhesion to the dentin substrate is considered as one of the major challenges in this area of knowledge

Hydrolytic degradation, incomplete monomer infiltration of the adhesive, and the action of endogenous dentin MMPs, have been described as one of the main reasons for the interface deterioration.

Thus, there was a need to compile the existing scientific evidence in the published literature on the ethanol wet bonding technique, one of the solutions to this problem, which has deserved some attention due to its potential evidenced in the results of *in vivo* and *in vitro* studies.

The ethanol wet bonding technique allows to chemically alter the dentin substrate by replacing traditional water wet bonding, with ethanol. This allows the collagen fibers to remain suspended, allowing the infiltration of monomers at the same time as they dehydrate, preventing phenomena of hydrolytic degradation.

The following literature review sought to compile published information in the form of scientific papers on the ethanol wet bonding technique and their clinical advantages and limitations. Contemporary adhesive systems, the main degradation mechanisms of adhesion and respective strategies to prevent their degradation are also discussed.

Key-words: *ethanol wet bonding, dentin, enamel, wet bonding, etch and rinse, dentin bonding, hybrid layer, hydrophobic resin*

Índice

I. INTRODUÇÃO	15
II. DESENVOLVIMENTO.....	17
2.1. DENTINA.....	17
2.1.1. Composição e estrutura da dentina mineralizada	17
2.1.2. Colagénio.....	18
2.2. ESTRATÉGIAS ADESIVAS	19
2.2.1. <i>Etch and Rinse</i>	19
2.2.2. <i>Self-etch</i>	25
2.2.3. Adesivos Universais/Multimodo	30
2.3. DEGRADAÇÃO DA ADESÃO.....	32
2.3.1 Acção das metaloproteínases.....	33
2.3.2 Degradação Hidrolítica.....	34
2.3.3 Infiltração incompleta dos monómeros de resina	35
2.3.4 Formas de prevenir a degradação da interface adesiva	36
2.4. <i>ETHANOL WET BONDING</i>	38
2.4.1 O Conceito	38
2.4.2. Protocolo integral vs protocolo simplificado.....	40
2.4.3. Adesão hidrofílica vs hidrofóbica.....	41
2.4.4. Evidência dos benefícios de <i>Ethanol Wet Bonding</i>	43
2.4.5. Adesivo experimental aplicado ao <i>Ethanol Wet Bonding</i>	50
III. CONCLUSÕES.....	51
IV. BIBLIOGRAFIA	53

Índice de Figuras

Figura 1- Esquema da camada híbrida criada com um adesivo *etch and rinse*. Notar que a camada híbrida tem cerca de 5-8 μm de profundidade e que as fibras de colagénio são contínuas com a matriz mineralizada. Na imagem está representado um único túbulo dentinário desprovido de *resin tag* para ilustrar a sua presença. (Adaptada de David H Pashley et al., 2011)..... 22

Figura 2 - Micrografia de transmissão electrónica de uma camada de adesivo que contém uma loca preenchida por fluído dentinário que exsudou do túbulo dentinário antes do adesivo ser polimerizado. H=camada híbrida; T=túbulo dentinário; D= dentina mineralizada que foi desmineralizada durante os processos laboratoriais, expondo as fibras de colagénio. (Adaptado de David H Pashley et al., 2011). 23

Figura 3- Micrografia electrónica de varrimento de dentina desmineralizada, onde são observados dois túbulos dentinários que contêm remanescentes da matriz de dentina peritubular. Na magnificação, é possível observar ramificações das fibras de colagénio separadas por espaços interfibrilares que servem de canais para a infiltração da resina na aplicação do adesivo. (Adaptado de David H Pashley et al., 2011). 25

Figura 4- Limitações significativas dos adesivos de um passo contemporâneos. (Adaptado de B. Van Meerbeek et al., 2011). 28

Figura 5 - Esquemática do conceito de adesão-descalcificação, ou “conceito AD”. Após a interacção iónica do monómero funcional (normalmente um grupo fosfato ou carboxilo) (fase 1) existem duas opções: ou a ligação iónica é hidroliticamente estável, resultando num sal de cálcio-monómero, que pode co-polimerizar com monómeros de resina do adesivo (fase 2, opção 1 ou 2.1), ou a ligação iónica não é estável, resultando numa descalcificação e libertação de cálcio e fosfato da superfície dentária (fase2, opção 1 ou 2.2). (Adaptado de B. Van Meerbeek et al., 2011). 29

Figura 6- Imagens de TEM de uniões resina-dentina de Optibond FL à dentina desmineralizada. (A) Após armazenamento em água durante 48 horas. FA - adesivo; H -

camada híbrida; D - dentina desmineralizada laboratorialmente; Seta preta - base da camada híbrida. Notar que a camada híbrida contém fibras de colagénio marcadas. (B) espécime semelhante após incubação em água durante 44 meses. Mais de metade das fibras de colagénio da camada híbrida perderam a sua capacidade de marcação (*). Pensa-se que MMPs endógenas da dentina tenham a capacidade de quebrar as fibras de colagénio em péptidos gelatinosos. (Adaptado de David H Pashley et al., 2011). 32

Figura 7 - Micrografia de transmissão de electrões de uma adesão resina-dentina feita com Single Bond Plus após 12 meses de função in vivo. O espécime foi imerso em 50% nitrato de prata amoniacal para marcar os locais preenchidos por água na camada híbrida. Normalmente existem poucos locais com presença de água na camada híbrida. Aqui vemos grandes quantidades do marcador de prata, mostrando a presença de água que substituiu o colagénio hidrolisado. A= adesivo; H= camada híbrida; D= dentina mineralizada subjacente. (Adaptado de David H. Pashley et al., 2011)..... 34

Figura 8 - A: Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de ligações resina-dentina feitas em segmentos de coroas. Após a polimerização da resina, a câmara pulpar foi preenchida com amarelo lúcifer e colocada sob de pressão de água para permitir que o marcador fluorescente se infiltrasse onde quer que houvessem canais submicrométricos desde a câmara pulpar até à camada híbrida. A: ligação resina-dentina realizada com *water wet bonding*. Notar que existe uma marcação constante fluorescente desde o túbulo dentinário (t), à volta do *resin tag* (rt), dentro da camada híbrida. Toda a camada híbrida está fluorescente. B: Quando a mesma resina foi aderida com a dentina saturada por etanol (*ethanol wet bonding*), o amarelo lucifer parou nos túbulos dentinários (t), porque encontrou uma zona espessa de 10 µm de *resin tags* devidamente hibridizados (rt). O amarelo lúcifer não passou pelos *resin tags*, deixando a camada híbrida livre de fluorescência. (Adaptado de Sauro et al., 2008)..... 41

Figura 9- TEM de um espécime aderido com uma resina de BisGMA/TEGDMA com a técnica de *ethanol wet bonding*. A=adesivo; H=camada híbrida ocupa o espaço por cima das duas setas abertas. Aparência da união após um ano de armazenamento em água. (B) TEM de uma união com Scotchbond Multipurpose Plus (SBMP) feita com dentina desmineralizada saturada com água, após um ano de armazenamento em água. C=

compósito híbrido; A= adesivo; Hδ= camada híbrida; D=dentina mineralizada subjacente que foi desmineralizada durante o procedimento de TEM; T= *resin tags* nos túbulos. De notar a quantidade de marcação que foi absorvida pela dentina desmineralizada laboratorial e quão pouca foi absorvida pela camada híbrida devido à degradação do colagénio por MMPs endógenas. (Adaptado de David H Pashley et al., 2011)..... 44

Figura 10 - Esquema teórico das relações entre a resina nos espaços interfibrilares e as fibras de colagénio. (A) Modelo de interface: a presença de uma camada de água no colagénio limita a um nível molecular a interacção entre a resina e o colagénio para uma interface estreita. Quando esticada, o colagénio estica mais do que a resina, carregando a maior parte do stress. (B) Modelo de interface: a presença de etanol dentro e a rodear as fibras de colagénio permite que os co-monomeros se dissolvam, permitindo um contacto íntimo com o colagénio, criando uma interface tridimensional, ao invés de uma interface a duas dimensões. Quando traccionados, tanto o colagénio como a resina dividem o stress, portanto melhorando a distribuição da força. (Adaptado de David H Pashley et al., 2011). 45

Figura 11 - Esquema de micropermeabilidade de A: hibridização pobre de *resin tags* na dentina desmineralizada saturada por água, antes da infiltração de resina vs B: perfeita hibridização das *resin tags* na dentina saturada por etanol antes da infiltração com resina. O marcador amarelo fluorescente foi forçado a partir da câmara pulpar, pelos túbulos até à camada híbrida. A: a resina não conseguiu deslocar a água presente nos canais laterais dos túbulos na camada híbrida. Isto permitiu que o marcador amarelo se difundisse pela camada híbrida. B: a resina dissolveu-se facilmente no etanol presente nos canais laterais dos túbulos dentinários, selando a camada híbrida do fluido dentinário. (Adaptado de David H Pashley et al., 2011). 46

Figura 12 – (A) TEM não marcado de uma ligação resina-dentina com um ano de duração feita *in vitro* com uma resina BisGMA/TEGDMA aderida à dentina desmineralizada com a técnica de *ethanol wet bonding*. Após imersão do espécime em nitrato de prata durante 24 horas, foi observada a marcação muito ligeira de muito poucos grãos de prata. (B) TEM não marcado de uma ligação resina-dentina com um ano realizada com Scotchbond Multi Purpose com a técnica de *water wet bonding*. Após imersão em nitrato de prata, a

camada híbrida absorveu grandes quantidades de prata, indicando que as fibras de colagénio que estavam na camada híbrida foram completamente destruídas pelas MMPs endógenas e substituídas por água. (Adaptado de Fernanda T. Sadek et al., 2010)..... 48

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Composição teórica da dentina desmineralizada antes e depois do processo de adesão. (Adaptado de David H Pashley et al., 2011) 23

Tabela 2 – Força de adesão de adesivos comerciais aderidos com *water wet bonding* vs *ethanol wet bonding*. (Adaptado de David H. Pashley et al., 2011)..... 47

Lista de Siglas e Abreviaturas

BisGMA – Bis Glicidil Metacrilato

CHX – Clorexidina

EWB – *Ethanol Wet Bonding*

GAG - Glicosaminoglicana

HEMA – 2-Hidroxietyl Metacrilato

IUEM – Instituto Universitário Egas Moniz

MMP – Metaloproteínases da Matriz Dentinária

SBMP – Scotchbond Multi-Purpose

TEM – Microscopia electrónica de transmissão

I. Introdução

A Dentisteria Operatória é uma área fundamental na Medicina Dentária. G.V.Black, em 1908, no seu trabalho *A Work on Operative Dentistry* estruturou as bases que permitiram a evolução científica a que assistimos diariamente nesta área (G. V. Black, 1922).

Desde a definição das classes de Black destinadas a materiais restauradores compactáveis, como as amálgamas, até à utilização das resinas compostas, não compactáveis, têm sido copiosos os avanços técnicos e científicos com o propósito de elevarem a qualidade e previsibilidade dos tratamentos restauradores.

A adesão ao esmalte é um desses paradigmas, estudada desde que Buonocore adaptou os princípios industriais da ligação da tinta ao metal, através de um tratamento com ácido fosfórico (M. G. Buonocore, 1955). Observamos hoje para o esmalte uma solução previsível e com excelentes resultados nos ensaios clínicos realizados (Bart Van Meerbeek et al., 2006). Contudo, apesar de todo o investimento realizado, ainda não se logrou uma solução previsível e durável para a adesão de uma resina à dentina (P. Spencer, Ye, Misra, Goncalves, & Laurence, 2014).

Quando em 1982, Nakabayashi et al. descobriram que a união da resina à dentina acontecia por difusão de monómeros líquidos biocompatíveis que se envolviam nos espaços das fibras de colagénio na dentina desmineralizada, sendo subsequentemente polimerizados, deu-se um grande passo no entendimento do mecanismo de adesão à dentina (Nakabayashi, Kojima, & Masuhara, 1982).

O tradicional *water wet bonding* tem sido apresentado como a melhor forma de conferir força de adesão inicial para os adesivos *etch-and-rinse* (Kanca, 1992), uma vez que a água, por ter um elevado índice de solubilidade, consegue reerguer as fibras de colagénio colapsadas pelo ataque ácido que desmineraliza a dentina, permitindo a infiltração de resinas monoméricas (David H. Pashley et al., 2007). No entanto, a água condiciona a polimerização dos monómeros de resina infiltrados; adicionalmente, a miscibilidade dos monómeros de resina é limitada em meio aquoso, resultando muitas vezes numa separação de fase na camada híbrida (Liu et al., 2011; Paulette Spencer & Wang, 2002). A camada híbrida obtida com a técnica tradicional de *water wet bonding* é

assim susceptível à biodegradação num ambiente especialmente desafiante como o da cavidade oral (P. Spencer et al., 2014).

O *ethanol wet bonding* (EWB) representa uma nova abordagem para a adesão à dentina com os princípios da filosofia adesiva *etch and rinse*. Esta filosofia adesiva tem como premissa a substituição da água dos espaços inter e intra-fibrilares do colagénio por etanol. O objectivo é criar uma matriz de colagénio desmineralizada suspensa em etanol para permitir a infiltração de monómeros de resina hidrofóbicos (Hosaka et al., 2009; Nishitani et al., 2006; David H. Pashley et al., 2007; Fernanda T. Sadek et al., 2008; F.R. Tay et al., 2007). Esta abordagem tem sido especialmente relevante pelo contributo que tem dado na compreensão das limitações encontradas nos adesivos *etch and rinse* e *self-etch* contemporâneos, nomeadamente, a sua incapacidade de remover totalmente a água presente nos espaços inter e intra-fibrilares do colagénio (Cameron, Short, & Fullerton, 2007; Pashley et al., 2007). Mais ainda, previne a separação de fase que ocorre na camada híbrida quando monómeros de resina hidrofóbicos entram em contacto com a água residual presente na dentina (Ye et al., 2008), uma vez que esta é totalmente substituída por etanol antes da aplicação de monómeros hidrofóbicos (Sauro, Watson, et al., 2009).

Com a quantidade de estudos *in vitro* realizados recentemente, e de técnicas desenvolvidas em torno desta filosofia adesiva promissora (Hosaka et al., 2009; Fernanda T. Sadek et al., 2010), é importante rever a informação disponível na literatura científica para que se possa evoluir e perceber se esta é uma solução clinicamente possível, previsível e eficiente para colmatar a ineficácia há muito reconhecida da adesão contemporânea à dentina.

O objectivo deste trabalho consistiu em avaliar o estado da arte relativo ao *ethanol wet bonding*. Para tal, recorreu-se a uma pesquisa bibliográfica nas bases de dados primárias B-on, Medline/Pubmed, Cochrane Library e NICE, entre os anos 1989 e 2018 com as palavras chave: *ethanol wet bonding, dentin, enamel, wet bonding, etch and rinse, dentin bonding, hybrid layer, hydrophobic resin*. Foram ainda consultados artigos mais antigos para contextualizações históricas. Excluíram-se os artigos que não estivessem escritos em português, francês, castelhano e inglês.

II. Desenvolvimento

2.1. Dentina

2.1.1. Composição e estrutura da dentina mineralizada

A dentina é o tecido que fica revestido pelo esmalte dentário e constitui o corpo do dente. De uma perspectiva anatômica a dentina funciona sinergicamente com o esmalte para criar a morfologia do dente. De um ponto de vista fisiológico, a dentina pode ser descrita como uma barreira semi-permeável nanoestruturada entre o esmalte e a polpa, ao passo que biomecânicamente funciona como uma base sólida que ajuda a prevenir a propagação de *cracks* do esmalte (Imbeni, Kruzic, Marshall, Marshall, & Ritchie, 2005).

A matriz dentinária tem uma morfologia peculiar. Composta por túbulos com um diâmetro de aproximadamente 1-2 μm rodeados por uma camada hipermineralizada, a dentina peritubular, e por uma matriz intertubular menos mineralizada, onde se concentra grande parte da matéria orgânica sob a forma de fibras de colagénio, proteínas não colagénicas, como as proteoglicanas, glicosaminoglicanas e proteínas fosforiladas (Bertassoni, Stankoska, & Swain, 2012).

Apesar de existirem algumas variações no que corresponde à espessura, a dentina coronal possui na sua região mais periférica uma camada conhecida como dentina de manto. Esta é sobretudo atubular, tendo alguns túbulos estreitos e curvos. A dentina de manto é menos mineralizada e conseqüentemente mais resiliente para que se possa adaptar, dissipando as forças e pressões que de outra forma iriam induzir fissuras e/ou fracturas de esmalte na junção amelodentinária (Goldberg, 2011).

Por baixo da dentina de manto temos a dentina circumpulpar formando a maior parte da camada dentinária. Apesar de nas primeiras etapas da dentinogénese ser uma zona estreita, a sua espessura vai continuamente aumentando a um ritmo estável ao longo do tempo, ocupando o espaço inicialmente ocupado pela polpa. Não sendo uma camada homogénea, é formada por dentina intertubular, ao passo que a dentina peritubular é encontrada a rodear o lúmen dos túbulos. Diferenças na estrutura e composição das duas dentinas estão bem documentadas. O colagénio tipo I é a proteína principal da dentina intertubular, cerca de 90%. Na dentina peritubular, pelo contrário, não são observadas fibras de colagénio. Também estão descritas diferenças na composição de proteínas não-

colagénicas das duas dentinas, bem como especificidades químicas e de mineralização na dentina inter e peritubular (Gotliv & Veis, 2007; Weiner et al., 1999).

Durante a odontogénese, os odontoblastos são indispensáveis para a formação de dentina primária, até que o dente se torne funcional. Quando os contactos com as cúspides dos antagonistas se estabelecem inicia-se a formação de dentina secundária, que irá continuar o resto da vida. Não existem grandes diferenças entre a dentina primária e secundária. Talvez a diferença mais significativa seja morfológica, visto que os túbulos que possuem uma curvatura mais acentuada com uma conformação em forma de “S” existem na dentina secundária. Isto acontece devido à gradual restrição de espaço dos odontoblastos localizados na periferia da polpa (Goldberg, 2011).

Após a erupção, como reacção a um processo de cárie ou abrasão, é formada a dentina terciária ou reaccional. A dentina reaccional aparece de duas formas. Como uma camada de osteodentina, ou como uma camada de ortodentina tubular ou atubular, dependendo da velocidade e gravidade do processo de cárie, da progressão da reacção e da idade do doente. Esta dentina pode também ser uma resposta fisiopatológica à libertação de alguns componentes dentários como os monómeros livres das resinas, as amálgamas de prata que contêm mercúrio, entre outros. A dentina reaccional é diferente da dentina reparadora. A dentina reaccional é sintetizada pelos odontoblastos, enquanto que a reparadora não resulta da actividade destes, ou de células associadas, mas sim de progenitores da polpa específicos implicados na formação de estruturas semelhantes ao osso, menos mineralizadas (Goldberg, 2011; Xu & Wang, 2012).

2.1.2. Colagénio

O colagénio é a proteína mais encontrada na dentina constituindo cerca de 90% da matriz orgânica. A grande maioria do colagénio é do tipo I, apesar de existirem também descritos o tipo III e o tipo V. O colagénio do tipo I resulta de um auto arranjo em tripla hélice com uma forma cilíndrica entre duas cadeias alfa 1 (I), e uma cadeia alfa 2 (I) (Van der Rest & Garrone, 1991). Cerca de 3% das fibras de colagénio são compostas por colagénio tipo III ou tipo V, estas são encontradas em jovens, ou quando ocorre um defeito na síntese de colagénio (Van der Rest & Garrone, 1991).

O crescimento fibrilar é essencialmente devido a um arranjo das subunidades das fibrilas, seguido por uma fusão linear implicada no seu comprimento. A fibrilogénese é influenciada por pequenas proteoglicanas ricas em leucina. A remoção de glicosaminoglicanas (GAGs) atrasa a fibrilogénese. As prostaglandinas inibem a fibrilogénese e a espessura das fibrilas (Milan, Sugars, Embery, & Waddington, 2005).

2.2. Estratégias adesivas

2.2.1. *Etch and Rinse*

Buonocore foi o primeiro a demonstrar que a aplicação de ácido fosfórico no esmalte aumenta a força de ligação entre esmalte e resina. Acreditava-se que esta acção do ácido aumentava microscopicamente a área de superfície disponível para a retenção da resina (M. G. Buonocore, 1955). Contudo, um dos seus alunos, John Gwinnett, com formação em microscopia electrónica, observou a interface entre o esmalte e o adesivo ao microscópio, tendo reportado que o adesivo conseguia penetrar nos prismas de esmalte desmineralizado, envolvendo os cristais de hidroxiapatite (Gwinnett & Matsui, 1967). Esta foi a primeira camada híbrida, embora ainda não existisse esta definição à época. O tratamento do esmalte desmineralizado com resina criou uma nova estrutura que não era nem esmalte, nem resina, mas sim uma hibridização de dois materiais. Este foi o primeiro exemplo *in situ* de engenharia de tecidos dentários (M. G. Buonocore, 1955; Gwinnett & Matsui, 1967).

Evolução dos adesivos *etch and rinse*

Quando Fusayama introduziu o conceito revolucionário de realizar *total etch* nas preparações (aplicação de ácido simultânea no esmalte e na dentina), a técnica sofreu alguma resistência por parte dos médicos dentistas europeus e americanos. Estas duas comunidades assumiam que uma concentração de 40% de ácido fosfórico fosse induzir reacções pulpares adversas quando aplicada na dentina. Investigações futuras vieram a revelar que a acção do ácido na dentina não conduzia a reacções adversas desde que este passo fosse realizado num ambiente livre de bactérias orais. As reacções pulpares

observadas aconteciam devido à infiltração bacteriana, e não ao ácido *per si* (David H Pashley et al., 2011; Bart Van Meerbeek et al., 2006).

A referência, no Japão, a um número reduzido de reacções pulparem adversas era justificada por uma filosofia restauradora minimamente invasiva, na qual se seguia o princípio da forma de conveniência, removendo apenas dentina cariada, e nunca ultrapassando os limites da preparação para a dentina sã, o que não acontecia nos EUA e na Europa (David H Pashley et al., 2011).

Introdução do *dry bonding*

O primeiro adesivo *etch and rinse* comercializado foi o Clearfil Bond System-F (Kuraray Co., Ltd., Tóquio, Japão) em 1978. Este utilizava 40 % de ácido fosfórico simultaneamente no esmalte e na dentina (*total etch*). Com a utilização deste adesivo eram continuamente reportadas reacções pulparem adversas nos Estados Unidos da América após a aplicação do ácido na dentina, uma vez que os clínicos estariam a aplicar o princípio de *dry bonding*. Isto é, após o *total etch* as paredes da cavidade eram secas com jacto de ar para confirmar que o esmalte tinha um aspecto fosco, significando que o esmalte teria sido devidamente desmineralizado (David H Pashley et al., 2011).

O que não era inteiramente compreendido na altura, é que secar a cavidade provocava um colapso das fibras de colagénio na dentina desmineralizada. Por conseguinte, desapareciam os espaços interfibrilares entre as fibras de colagénio expostas (Bart Van Meerbeek et al., 2006), que servem como canais de difusão para a infiltração de monómeros. Consequentemente, as forças de adesão entre resina e esmalte eram altas (20MPa), todavia as forças de adesão resina-dentina eram extremamente baixas (5MPa). Tais forças de adesão entre resina e dentina mostravam-se insuficientes para resistir às forças de contracção de polimerização (cerca de 24 MPa nas preparações de classe I), criando zonas de microinfiltração marginal de bactérias e consequentemente, sensibilidade dentária (David H Pashley et al., 2011).

Introdução do *wet bonding*

À semelhança do esmalte, à época, o procedimento adesivo pressupunha desidratar completamente a dentina desmineralizada, designando-se esta técnica *dry bonding*. Os baixos valores observados das forças de adesão associados à excessiva desidratação obtida pela técnica *dry bonding*, levavam ao aparecimento generalizado de casos de sensibilidade dentária pós-operatória. Estudos laboratoriais conduziram posteriormente à evidência de microinfiltração nas restaurações efectuadas com esta técnica. O que não se percebia na altura, é que a desidratação da dentina desmineralizada levava ao colapso das fibras de colagénio expostas (David H Pashley et al., 2011).

Para Kanca, a água, pelos seus princípios de solubilidade, demonstrou ser um excelente agente re-hidratante da malha colagénica colapsada pela excessiva secagem. Este facto levou a que ele introduzisse o conceito de *wet bonding*. Esta técnica aumentou drasticamente os valores das forças adesivas à dentina permitindo um melhor selamento da dentina e diminuindo a sensibilidade pós-operatória (Kanca, 1992; David H Pashley et al., 2011).

Nakabayashi et al. foram os primeiros a demonstrar verdadeiramente a formação da camada híbrida na dentina desmineralizada por ácido fosfórico. Esta foi melhor observada por microscopia electrónica de transmissão (TEM), e mais tarde demonstrada por microscopia de varrimento (SEM). Este grupo de estudo foi o primeiro a demonstrar que é possível infiltrar resina na dentina desmineralizada para formar esta nova estrutura composta por uma matriz de resina micro-retida nas fibras de colagénio (Figura 1) (Nakabayashi et al., 1982).

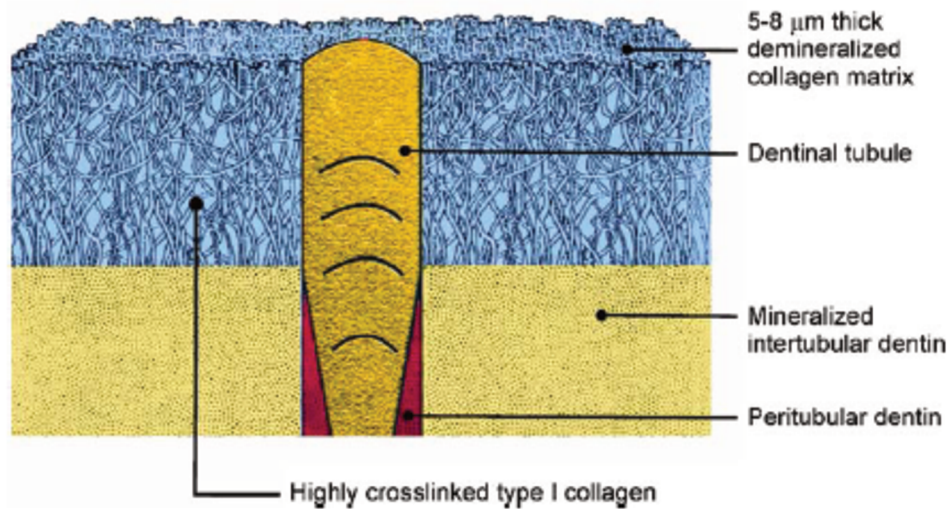


Figura 1- Esquema da camada híbrida criada com um adesivo *etch and rinse*. Notar que a camada híbrida tem cerca de 5-8 µm de profundidade e que as fibras de colágeno são contínuas com a matriz mineralizada. Na imagem está representado um único túbulo dentinário desprovido de *resin tag* para ilustrar a sua presença (Adaptada de David H Pashley et al., 2011)

Composição da dentina mineralizada vs desmineralizada vs camada híbrida nos adesivos *etch and rinse*

A dentina mineralizada é aproximadamente constituída de forma volumétrica por 50% conteúdo mineral, 30% colágeno e 20% de água (Tabela 1). Durante a aplicação do ácido, os 50% de volume mineral superficial e subsuperficial são solubilizados, extraídos e substituídos por água que, combinada com os 20% de água intrínseca perfazem um novo conteúdo volumétrico de água total de 70%, a rodear os 30% de colágeno, que se mantêm ancorados na dentina mineralizada mais profunda. Subsequentemente, durante a fase de infiltração do adesivo, este conteúdo de 70% de água deveria idealmente ser substituído por comonomeros de resina que polimerizassem *in situ* para produzir um biocompósito híbrido de resina, reforçado por fibras de colágeno, conhecido como camada híbrida, ou zona de interdifusão (Tabela 1). Contudo, devido à presença do solvente residual, e devido ao movimento do fluido para fora dos túbulos dentinários (Figura 2), no sentido da mistura hipertónica de monómeros de resina, a substituição de água por resina nunca é ideal (Cadenaro et al., 2009). Resulta deste modo, uma incompleta infiltração de resina na matriz de colágeno envolvida em água. Adicionalmente, poderá deslocar-se água para a camada híbrida através dos túbulos dentinários, durante a evaporação do solvente, no passo da aplicação do adesivo (M. Hashimoto et al., 2004). Esta deslocação de água cria

pequenas locas dentro da camada híbrida polimerizada, que são ricas em água e pobres em resina. Estas podem ser identificadas utilizando marcadores solúveis em água (Figura 2) (F. R. Tay et al., 2003).

Tabela 1 - Composição teórica da dentina desmineralizada antes e depois do processo de adesão (Adaptado de David H Pashley et al., 2011)

Table 1 - Theoretical composition of demineralized dentin before and after bonding procedures.				
	Mineralized dentin	Etched/rinsed dentin	Primed/infiltrated dentin	Aged/degradation
Mineral	50	0	0	0
Collagen	30	30	30	0-30 ^b
Water	20	70	0 ^a	0-30 ^b
Resin	0	0	70 ^a	20-50 ^c

^a Perfect hybrid layer.
^b Water replaces destroyed collagen fibrils.
^c Loss of collagen fibrils often leads to loss of interfibrillar resin.

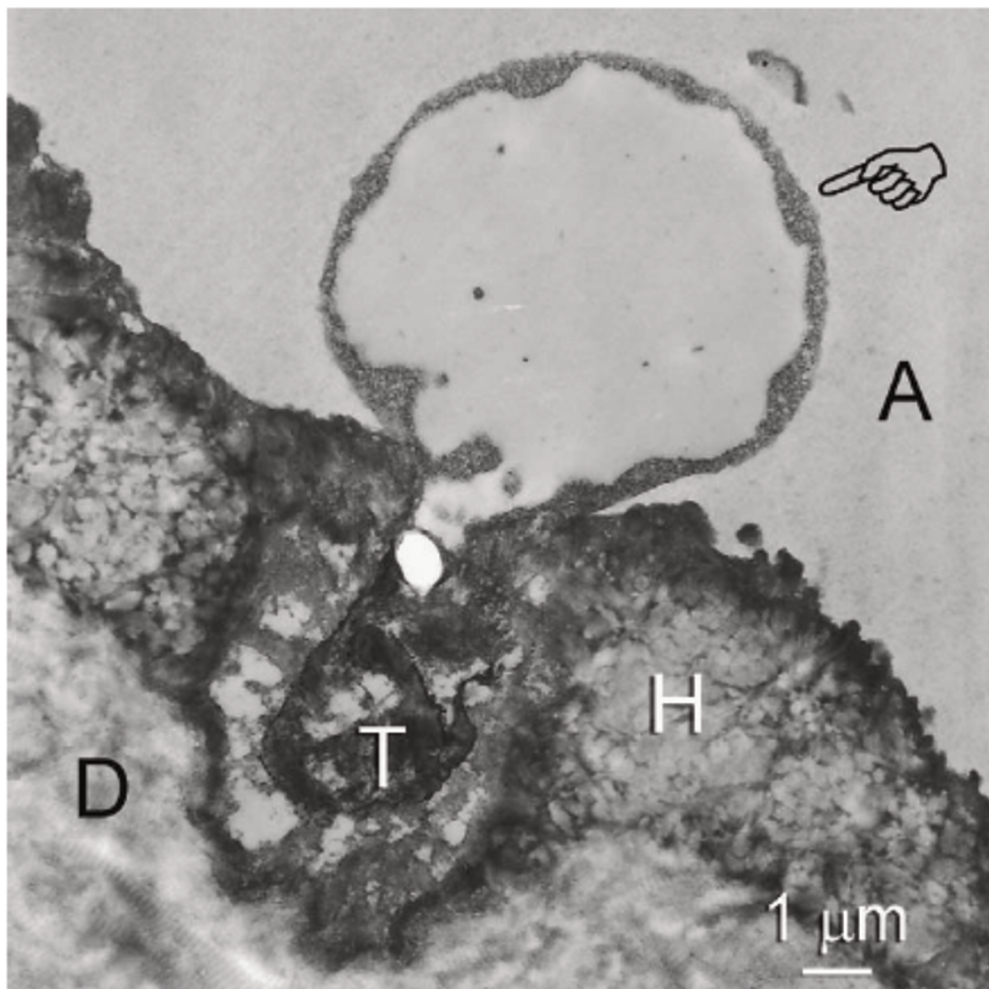


Figura 2 - Micrografia de transmissão electrónica de uma camada de adesivo que contém uma loca preenchida por fluido dentinário que exsudou do túbulo dentinário antes do adesivo ser polimerizado. H=camada híbrida; T=túbulo dentinário; D= dentina mineralizada que foi desmineralizada durante os processos laboratoriais, expondo as fibras de colagénio (Adaptado de David H Pashley et al., 2011).

Acções terapêuticas dos adesivos *etch and rinse*

Os adesivos *etch and rinse* que utilizam três passos são mais duráveis do que os de dois passos (J. De Munck et al., 2005). Ao manterem separados o ácido, o *primer* e o adesivo, conseguem-se atingir múltiplas acções terapêuticas em cada passo. Olhando para os adesivos *etch and rinse* de três passos como uma forma de engenharia de tecidos, é possível descobrir várias oportunidades para terapias de valor acrescentado. A grande vantagem dos adesivos de três passos é precisamente utilizar cada passo para diversos propósitos.

Estudos demonstram que o ácido fosfórico de 32%-37% tem acção bactericida sobre as bactérias residuais na dentina exposta ou afetada por cárie (Mertz-Fairhurst, Curtis, Ergle, Rueggeberg, & Adair, 1998). O ácido fosfórico também inactiva em cerca de 65% a 95% a actividade das metaloproteínases (MMPs) na dentina (Mazzoni et al., 2006; D.H. Pashley et al., 2004). Isto é um excelente exemplo de como os vários passos podem ser utilizados para diversas acções terapêuticas na dentina. Outros autores adicionaram 2% clorexidina (CHX) ao ácido fosfórico pela sua acção nas MMPs (Stanislawczuk et al., 2009). Alguns clínicos utilizam a CHX na dentina desmineralizada seja em água ou etanol. Tanto o etanol como a CHX tendem a eliminar as bactérias que sobrevivem à acção do ácido. A CHX liga-se à dentina desmineralizada (Kim et al., 2010) onde inibe as MMPs e prolonga a durabilidade das ligações (Hebling, Pashley, Tjäderhane, & Tay, 2005).

Existem desde o início preocupações relativamente à durabilidade das restaurações com resina composta. Estas restaurações têm um tempo de vida reduzido devido à degradação da interface entre a resina e a dentina. O *water wet bonding* foi introduzido na década de noventa com o objectivo de prevenir o colapso das fibrilas de colagénio após o ataque ácido, aumentando a penetração de resina nas mesmas e aumentando a durabilidade da ligação resina-dentina (Figura 3) (Liu et al., 2011).

Apesar dos sistemas adesivos *etch and rinse* serem considerados como o “*gold standard*” em termos de durabilidade das restaurações em resina à dentina (J. De Munck et al., 2005), existem vários estudos que demonstram que é susceptível à degradação após ciclos de temperatura e armazenamento em água (W. W. Brackett et al., 2007).

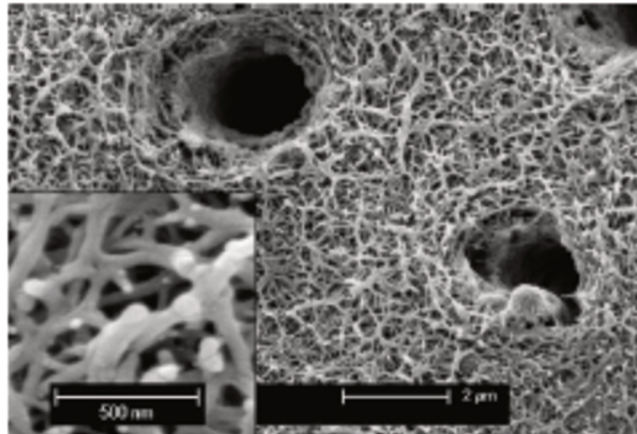


Figura 3- Micrografia eletrônica de varrimento de dentina desmineralizada, onde são observados dois túbulos dentinários que contêm remanescentes da matriz de dentina peritubular. Na magnificação, é possível observar ramificações das fibras de colágeno separadas por espaços interfibrilares que servem de canais para a infiltração da resina na aplicação do adesivo (Adaptado de David H Pashley et al., 2011).

2.2.2. *Self-etch*

Diferentes dos adesivos *etch and rinse*, os adesivos *self-etch* não necessitam de um passo de condicionamento ácido separado, visto que estes contêm monómeros acídicos que funcionam simultaneamente como ácido e *primer* para o substrato dentário. Esta abordagem tem sido considerada mais “*user friendly*” e menos sensível, por necessitar de um menor tempo de aplicação, e por utilizar um menor número de passos. A ausência de uma estratégia *wet bonding* resulta num desempenho clínico fiável (Peumans et al., 2010, 2005). Outro benefício clínico importante dos adesivos *self-etch* é a menor incidência de sensibilidade pós-operatória, comparada com os adesivos *etch and rinse* (Perdigão, Geraldini, & Hodges, 2003). Isto deverá ser atribuído em grande parte à menor agressividade e a uma interação mais superficial com a dentina, em comparação com o ácido ortofosfórico, deixando os túbulos dentinários obstruídos com a *smear layer*. Todos estes aspectos positivos têm sido um factor chave para o crescente aumento de popularidade dos adesivos *self-etch* na prática clínica (B. Van Meerbeek et al., 2011).

Os adesivos *self-etch* podem ser de dois passos, ou de um passo, dependendo se o *primer* ácido e o adesivo (praticamente desprovido de solvente) são separados ou combinados numa única solução. Os adesivos *self-etch* de um passo poderão ainda ser subdivididos em adesivos de dois componentes, ou de um componente, separando os ingredientes activos, como os monómeros funcionais, da água. Os adesivos *self-etch* de dois componentes teoricamente têm um prazo de validade mais alargado, contudo é

necessário misturá-los adequadamente para poderem ser utilizados. Os adesivos *self-etch* de um componente apenas, são considerados os verdadeiros “tudo em 1”, visto que combinam o ácido, *primer* e adesivo numa única aplicação e não carecem de mistura (B. Van Meerbeek et al., 2011).

Por forma a possibilitar a acção do ácido, todos os adesivos *self-etch* contêm água como meio de ionização (Van Landuyt, Mine, et al., 2008), o que nos leva novamente à pergunta “Quão molhada tem que estar a dentina?” (G. D. Pereira, Paulillo, De Goes, & Dias, 2001).

De uma forma geral, os adesivos *self-etch* têm a vantagem de simultaneamente desmineralizar e infiltrar o substrato dentário à mesma profundidade, assegurando teoricamente a completa penetração do adesivo (Ricardo M. Carvalho et al., 2005). Com o aumento da profundidade, os monómeros funcionais são gradualmente tamponados pelo conteúdo mineral do substrato, perdendo a sua capacidade de desmineralização. As características morfológicas da interface adesivo-dente realizadas com adesivos *self-etch* dependem em grande parte da forma como os monómeros funcionais interagem com o substrato (B. Van Meerbeek et al., 2011).

As soluções de *self-etch* têm diferentes valores de pH e a profundidade da sua interacção com a dentina varia de acordo com este valor. Poderá, assim, ir de umas centenas de nanómetros após uma abordagem “*ultra mild*” dos *self-etch* (pH > 2.5), que por vezes é referida como “ nano-interacção” (Koshiro, Sidhu, Inoue, Ikeda, & Sano, 2006), até profundidades de interacção de cerca de 1 µm para uma abordagem *self-etch* “*mild*” (pH \cong 2), entre 1 e 2 µm para uma abordagem “*intermediately strong*” (pH entre 1 e 2), ou ainda uma interacção de vários micrómetros de profundidade para uma abordagem de *self-etch* “*strong*” (pH \leq 1). Apenas com os adesivos *self-etch* mais agressivos conseguimos obter os típicos *resin tags* na dentina. Dificilmente se formam com os “*mild*”; no máximo, os *smear plugs* são levemente desmineralizados, e posteriormente infiltrados com resina. O desempenho da ligação dos adesivos *self-etch* tem uma grande variabilidade, dependendo não só da própria classe do adesivo *self-etch*, mas também da sua composição, especificamente, do monómero funcional incluído na formulação do adesivo (B. Van Meerbeek et al., 2011).

Limitações dos adesivos de um passo

A última geração de adesivos de um passo é constituída por uma complexa mistura de componentes hidrofílicos e hidrofóbicos, que pela sua dificuldade, deverá ser considerada um compromisso, devido às suas limitações (Figura 4) (Van Landuyt, Mine, et al., 2008). Geralmente, uma redução imediata da força de adesão é aferida em comparação com as forças dos adesivos de vários passos (Bart van Meerbeek et al., 2005). Adicionalmente, qualquer tipo de envelhecimento demonstra uma baixa eficácia de ligações de longa duração. A acrescentar a isto, numerosos estudos reportaram um aumento da nano-infiltração na interface do adesivo (Suppa et al., 2005). Adesivos de um passo que são ricos em 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA) mostraram um aumento da absorção de água por parte da dentina, particularmente quando o compósito não é imediatamente polimerizado para bloquear este efeito de osmose (Van Landuyt et al., 2007).

Por outro lado, também é tipicamente observada uma separação de fase nos adesivos que contenham pouco ou nenhum HEMA. Uma secagem com jacto de ar forte possibilita uma forma de remover a água presente na zona da interface, que fica separada dos componentes mais hidrofóbicos, teoricamente, permitindo uma polimerização mais completa do adesivo. Enquanto que esta técnica funciona em superfícies relativamente planas, as bolhas de água formadas assim que o solvente começa a evaporar, uma vez que os componentes hidrofóbicos já não se encontram na solução, são mais difíceis de remover em preparações mais complexas. A mistura de todos estes componentes num único recipiente tem causado problemas relativos ao prazo de validade da mistura. Por último, um desempenho clínico inferior dos adesivos de um passo apenas veio confirmar os resultados laboratoriais pouco favoráveis (Peumans et al., 2005; B. Van Meerbeek et al., 2010).

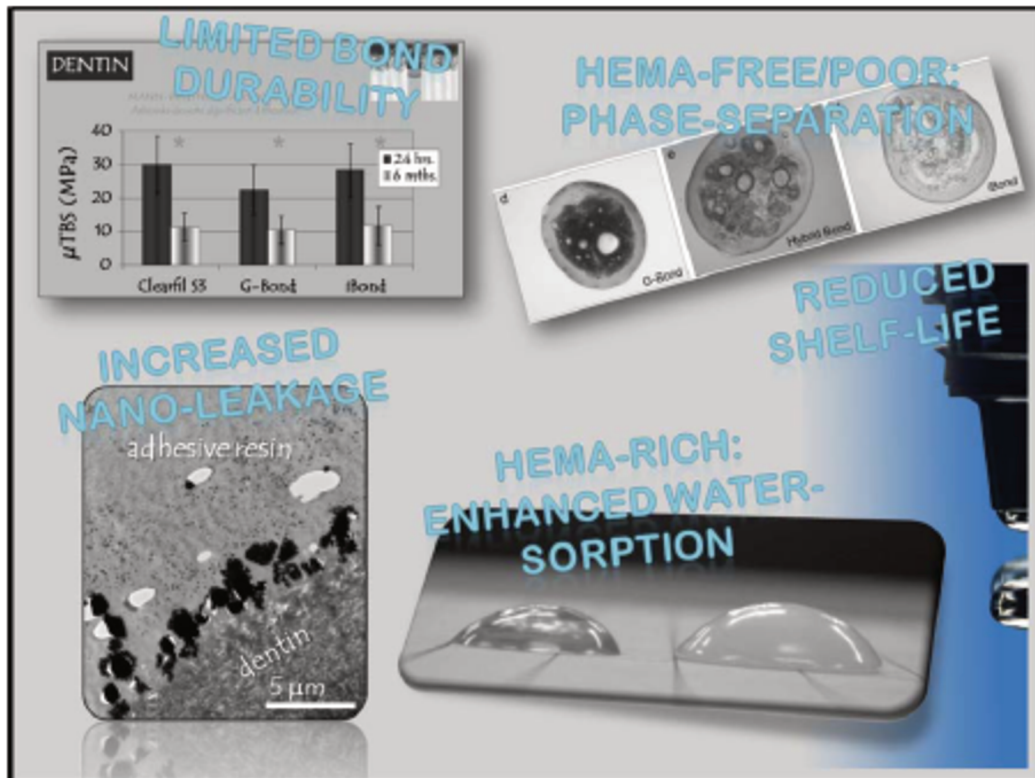


Figura 4- Limitações significativas dos adesivos de um passo contemporâneos (Adaptado de B. Van Meerbeek et al., 2011).

O “conceito de Adesão-Descalcificação” revisitado como base para uma adesão durável

O mecanismo fundamental de adesão ao esmalte e dentina é essencialmente baseado numa permuta, na qual os minerais removidos dos tecidos são substituídos por monómeros de resina, que após polimerização ficam interligados mecanicamente nas porosidades criadas (Bart Van Meerbeek et al., 2006). Enquanto que a restante interligação micro-mecânica é um pré-requisito para se atingir uma boa adesão (mediante as circunstâncias clínicas). O potencial benefício de interação química adicional entre os monómeros funcionais e o substrato tem ganho recentemente mais atenção (Yoshida et al., 2004). Pensa-se que a interação química primária é particularmente importante na melhoria da durabilidade da ligação. A forma como as moléculas interagem com tecidos à base de hidroxiapatite tem sido descrita no “conceito A-D” ou “Conceito Adesão-Descalcificação” (Figura 5) (B. Van Meerbeek et al., 2011).

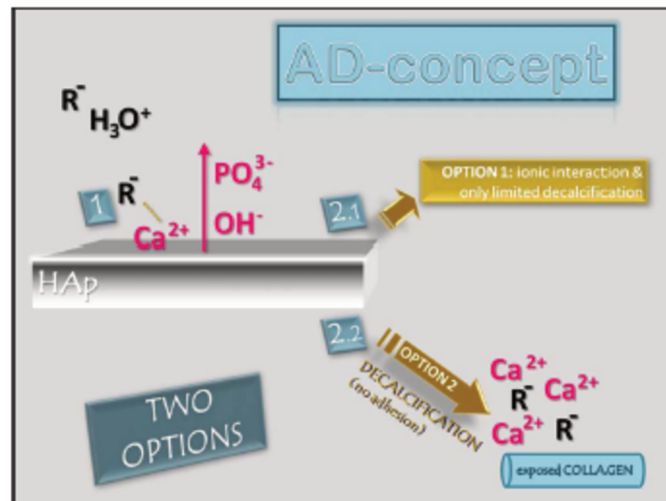


Figura 5 - Esquemática do conceito de adesão-descalcificação, ou “conceito AD”. Após a interação iônica do monómero funcional (normalmente um grupo fosfato ou carboxilo) (fase 1) existem duas opções: ou a ligação iônica é hidroliticamente estável, resultando num sal de cálcio-monómero, que pode co-polimerizar com monómeros de resina do adesivo (fase 2, opção 1 ou 2.1), ou a ligação iônica não é estável, resultando numa decalcificação e libertação de cálcio e fosfato da superfície dentária (fase 2, opção 1 ou 2.2) (Adaptado de B. Van Meerbeek et al., 2011).

Este modelo mostra que inicialmente todos os ácidos se ligam quimicamente ao cálcio da hidroxiapatite (fase 1). A primeira fase de ligação acontece com a libertação dos grupos fosfato (PO_4^{3-}) e grupos hidróxido (OH^-) dos cristais de hidroxiapatite para a solução, até esta se encontrar electroliticamente estável, portanto neutra. Se a molécula se mantém ligada (fase 2, opção 1 ou 2.1), ou se perde a ligação (fase 2, opção 2 ou 2.2) depende da estabilidade do respectivo sal de cálcio (B. Van Meerbeek et al., 2011).

Moléculas como o 10-MDP (monómero funcional dos adesivos *self-etch*), mas também o ácido polialquénóico (monómero funcional do ionómero de vidro), vão se ligar quimicamente com o cálcio da hidroxiapatite (de acordo com o conceito A-D, fase 2, opção 1 ou 2.1) formando uma ligação estável de sais de cálcio-fosfato e cálcio-carboxilato respectivamente, em conjunto com um efeito ligeiro de decalcificação superficial. Os adesivos *self-etch “mild”* e o ionómero de vidro apenas interagem superficialmente com o esmalte e dentina, sendo que mal dissolvem os cristais de hidroxiapatite, antes mantendo-os no seu lugar, dentro de uma camada híbrida submicrométrica (B. Van Meerbeek et al., 2011).

Pelo contrário, moléculas como o ácido fosfórico e o ácido maleico, bem como monómeros funcionais de adesivos *self-etch* como o fenil-P e fosfatos de HEMA, inicialmente ligam-se ao cálcio da hidroxiapatite (fase 1), mas desligam-se rapidamente

(de acordo com o conceito A-D fase 2, opção 2 ou 2.2). Os iões fosfato carregados negativamente, ou os grupos carboxilo para os monómeros funcionais baseados em carboxilatos, irão remover os iões positivos, porque se atraem de um ponto de vista electrostático, são estes os iões de cálcio superficiais. Até certa profundidade a intensidade destas ligações depende do tempo de aplicação. Isto resulta numa descalcificação marcada, conhecida como *etching*, sendo o ácido fosfórico o mais empregue e conhecido da abordagem para os adesivos *etch and rinse* (B. Van Meerbeek et al., 2011).

Como as ligações cálcio-fosfato/carboxilato formadas originalmente (durante a fase 1) na superfície do esmalte/dentina não são estáveis, a ligação dissocia-se levando a um padrão típico de desmineralização no esmalte e a uma camada híbrida relativamente profunda (3-5 µm) na dentina, que não contém cristais de hidroxiapatite (B. Van Meerbeek et al., 2011).

2.2.3. Adesivos Universais/Multimodo

No final da década de 1990 era amplamente utilizada uma classificação cronológica baseada na geração dos adesivos. Nesta classificação os adesivos eram classificados em sete gerações de acordo com a cronologia do seu desenvolvimento. A 4ª geração de adesivos foi a mais conhecida, ao ponto de estes adesivos terem sido referidos como os “*gold standard*” ou “clássicos”, referindo-se aos actuais adesivos *etch and rinse* de três passos. As gerações subsequentes foram introduzidas para simplificar o uso clínico dos adesivos, até à 7ª geração que compreende os adesivos “tudo em um” (Elkaffas, Hamama, & Mahmoud, 2018).

Devido a várias sobreposições e barreiras pouco definidas entre as sucessivas gerações, esta classificação tem praticamente desaparecido, bem como a sua utilização clínica regular. Uma nova classificação foi introduzida por Van Meerbeek no início dos anos 2000 (B. Van Meerbeek et al., 2006). De acordo com esta classificação, os adesivos dentários contemporâneos são categorizados em três diferentes grupos baseados na estratégia de tratamento da *smear layer*: *etch and rinse*, *self-etch* e a abordagem do ionómero de vidro modificado por resina. Depois desta separação, dividem-se pelo número de passos clínicos. Os adesivos *etch and rinse* são assim depois divididos em dois

ou três passos. De forma semelhante os adesivos *self-etch* são depois divididos em dois passos, ou de um passo (“tudo em um”). Recentemente, outro grupo conhecido como adesivos universais, ou multi-modo foram acrescentados à anterior classificação (Elkaffas et al., 2018).

Estes novos adesivos universais reduzem a complexidade dos procedimentos clínicos de aplicação. Os adesivos desta categoria podem ser utilizados como *self-etch* ou *etch and rinse*, ou como *self-etch* na dentina e *etch and rinse* no esmalte, uma técnica conhecida como *selective enamel etching* (Lopes, Vieira, Monteiro, Caldeira de Andrada, & Baratieri, 2003). O principal constituinte dos adesivos universais desenvolvidos recentemente são os monómeros funcionais (Van Landuyt, Yoshida, et al., 2008; T. Wang, Nikaido, & Nakabayashi, 1991), visto que estes desempenham um papel fundamental na adesão química à dentina. Há trinta anos atrás, uma marca (Kuraray Noritake Dental Inc. Tóquio, Japão) incorporou 10-MDP como monómero funcional nos seus adesivos dentários. O grupo fosfato do 10-MDP interage com a hidroxiapatite e contribui de forma significativa para a durabilidade a longo prazo da interface resina dentina (R.M. Carvalho et al., 2004).

Os adesivos que contêm uma base de MDP conseguem ligar-se quimicamente aos cristais de hidroxiapatite da dentina por via das interações electrostáticas. As ligações iónicas formadas com os iões de cálcio dos cristais de hidroxiapatite resultam num sal insolúvel de MDP (Yoshida et al., 2012; Yoshihara et al., 2011). A deposição contínua de sucessivas camadas destes sais na superfície externa dos cristais de hidroxiapatite é um processo de *nanolayering* (Fukeygawa et al., 2006). Os estudos laboratoriais das forças de adesão poderão revelar noções importantes acerca do desempenho clínico de um adesivo (Sano et al., 1994).

Os resultados dos últimos estudos relativos a este ponto em particular são pouco conclusivos, e por vezes discrepantes. Wagner et al. (Wagner, Wendler, Petschelt, Belli, & Lohbauer, 2014) avaliaram as resistências adesivas à microtracção para três adesivos universais diferentes, aplicados de duas maneiras distintas, *self-etch* e *etch and rinse*. Os resultados deste grupo de estudo revelaram que o passo de *etching* não melhorou a força microtensional da ligação dos adesivos universais quando comparado com a estratégia de *self-etch*. Adicionalmente, o estudo de Chen et al mostrou que não existem diferenças entre aplicar um adesivo universal com uma estratégia *self-etch* ou *etch and rinse*.

Antagonicamente, o estudo de Muñoz et al. (Muñoz et al., 2015) declara que esta nova categoria de adesivos apresenta valores de resistências adesivas à microtração inferiores em comparação com os adesivos convencionais utilizados como controlo (Chen et al., 2015).

2.3. Degradação da adesão

Evidência da degradação do colagénio por microscopia electrónica de transmissão.

Armstrong e colaboradores conduziram um estudo (Armstrong et al., 2004), no qual aderiram Optibond FL à dentina desmineralizada, e simularam o envelhecimento a 5 anos. Neste estudo, descobriram que a resistência adesiva à tração sofreu uma alteração de 46.7MPa para 17.7MPa após um período simulado de 5 anos. A observação mais importante deste estudo foram os resultados da microscopia electrónica de transmissão (TEM) de uniões resina-dentina sem *stress* funcional, que não apresentaram degradação da camada híbrida ao fim de 48 horas (Figura 6A), mas extensa degradação ao fim de 44 meses (Figura 6B). Cerca de metade do volume da camada híbrida não conseguiu segurar a marcação por metais pesados que acontece tipicamente com as fibras de colagénio. Este foi o primeiro indicador de que as fibras de colagénio poderiam sofrer degradação. Esta observação foi confirmada por Pashley et al. (D.H. Pashley et al., 2004), e mais tarde por Hebling et al. (Hebling et al., 2005).

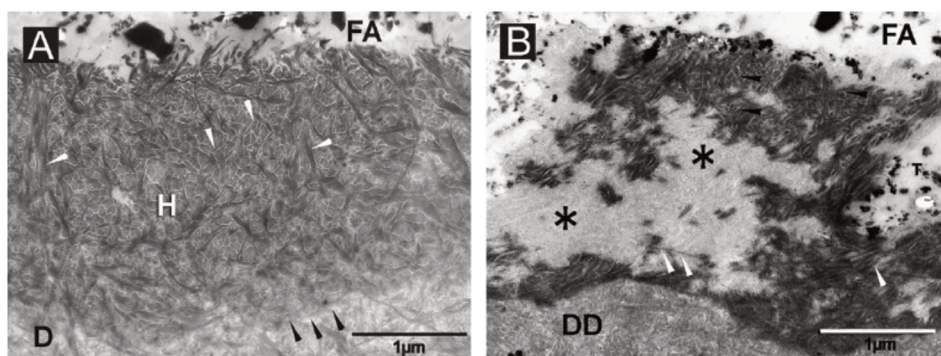


Figura 6- Imagens de TEM de uniões resina-dentina de Optibond FL à dentina desmineralizada. (A) Após armazenamento em água durante 48 horas. FA - adesivo; H - camada híbrida; D - dentina desmineralizada laboratorialmente; Seta preta - base da camada híbrida. Notar que a camada híbrida contém fibras de colagénio marcadas. (B) espécime semelhante após incubação em água durante 44 meses. Mais de metade das fibras de colagénio da camada híbrida perderam a sua capacidade de marcação (*). Pensa-se que MMPs endógenas da dentina tenham a capacidade de quebrar as fibras de colagénio em péptidos gelatinosos. (Adaptado de David H Pashley et al., 2011).

Apesar dos importantes avanços técnicos que melhoraram a qualidade da ligação resina-dentina, são continuamente reportados artigos que demonstram a degradação da interface adesiva dentina-adesivo e a diminuição da força de ligação ao longo do tempo (Jan De Munck et al., 2004). Provavelmente, são estas as principais razões para a redução da longevidade das restaurações com resina (Peumans et al., 2005).

O aumento das concentrações de monómeros acídicos hidrofílicos pode reduzir a durabilidade da ligação resina-dentina devido à absorção de água pelos mesmos (Peumans et al., 2005).

2.3.1 Acção das metaloproteínases

Proteases endógenas da dentina degradam fibras de colagénio.

A dentina desmineralizada contém na sua matriz metaloproteínases -2,-3,-8,-9,-20 e catepsinas (M. R. O. Carrilho et al., 2007; Zhang & Kern, 2009) que, uma vez activadas pelo ácido, têm a capacidade de lentamente degradar as fibras de colagénio presentes nas camadas híbridas realizadas com resina (W. W. Brackett et al., 2007; M. R. O. Carrilho et al., 2007; Hebling et al., 2005). Como podem estas enzimas ser inactivadas, ou inibidas?

A fracção do volume de 30% ocupada pelo colagénio na camada híbrida, após a acção das MMPs fica maioritariamente ocupada por água, devido à perda de colagénio insolúvel (Figura 7). Pensa-se que o colagénio seja quebrado em fragmentos de $\frac{3}{4}$ e $\frac{1}{4}$ pela MMP-8, uma verdadeira colagenase, e que a degradação seguinte é feita pela MMP-2 e MMP-9 que são gelatinases (Zhang & Kern, 2009).

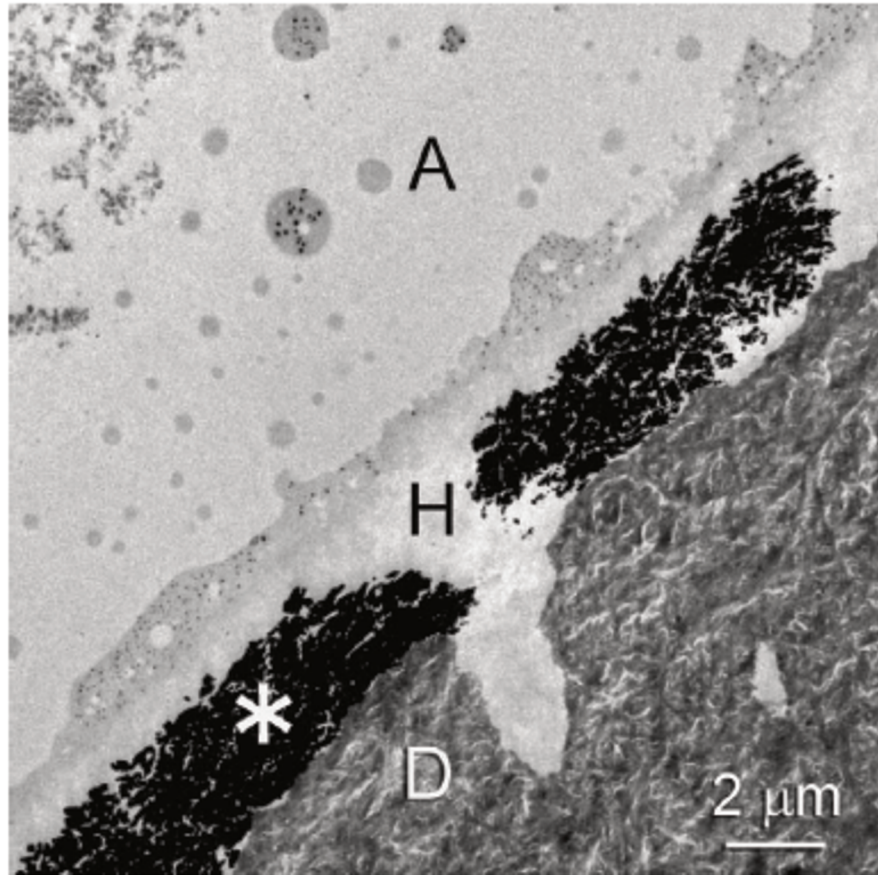


Figura 7 - Micrografia de transmissão de electrões de uma adesão resina-dentina feita com Single Bond Plus após 12 meses de função *in vivo*. O espécime foi imerso em 50% nitrato de prata amoniacal para marcar os locais preenchidos por água na camada híbrida. Normalmente existem poucos locais com presença de água na camada híbrida. Aqui vemos grandes quantidades do marcador de prata, mostrando a presença de água que substituiu o colagénio hidrolisado. A= adesivo; H= camada híbrida; D= dentina mineralizada subjacente. (Adaptado de David H. Pashley et al., 2011).

2.3.2 Degradação Hidrolítica

Evidência directa da degradação da camada híbrida

Com o tempo, tanto *in vitro*, como *in vivo* as camadas híbridas criadas com adesivos *etch and rinse* degradam ao fim de 6 meses a 3-5 anos (figuras 6 A e B) (M. R. O. Carrilho et al., 2007). Isto manifesta-se pela perda do padrão de marcação em bandas cruzadas das fibras de colagénio, que é devido a uma perda de capacidade de marcação por metais pesados, resultado de um aumento significativo na absorção de água por parte das fibras de colagénio (David H Pashley et al., 2011).

A conversão de fibras de colagénio insolúvel para péptidos gelatinosos solúveis em água leva à perda de continuidade entre a camada híbrida e as fibras de colagénio ancoradas em dentina mineralizada. Isto resulta na perda de retenção de compósitos de resina à dentina, que é mesurável numa significativa diminuição das forças de adesão microtraccionais (M. R. O. Carrilho et al., 2007).

2.3.3 Infiltração incompleta dos monómeros de resina

Para além das reacções de hidrólise, a água residual diminui a durabilidade da união resina-dentina devido à insuficiente penetração de resina nas fibras de colagénio (Liu et al., 2011). Estudos recentes demonstraram que os adesivos para a dentina não conseguem substituir a água que se encontra nos espaços interfibrilares, mesmo que os monómeros consigam encapsular as fibras de colagénio (Hosaka et al., 2009; E. Osorio, Toledano, Aguilera, Tay, & Osorio, 2010).

Os monómeros ácidos dos sistemas adesivos *self-etch* e *etch and rinse* aumentam a actividade colagenolítica e gelatinolítica da matriz de colagénio (Mazzoni et al., 2006; Nishitani et al., 2006). Existem várias abordagens estudadas com o intuito de superar estes problemas, para que se atinja o principal objectivo da adesão à dentina, a completa infiltração dos monómeros resinosos nas fibras de colagénio desmineralizadas e a completa remoção de água destes espaços (Breschi et al., 2008).

O papel dos hidrogéis de proteoglicanas nos espaços interfibrilares

Os espaços interfibrilares na dentina desmineralizada contêm mais do que água, também contêm proteoglicanas altamente hidratadas com carga negativa que formam um hidrogel nesse espaço (Scott & Thomlinson, 1998).

Se os hidrogéis de GAGs permanecerem hidratados nos espaços interfibrilares, serão responsáveis por uma “peneira molecular” que irá impedir a progressão da infiltração de dimetacrilatos de grandes dimensões como o Bis-GMA. Mazzoni et al. utilizaram condroitinase ABC para remover glicosaminoglicanas (GAGs) interfibrilares, que contêm sulfato de condroitina, o que permite melhor infiltração de resina.

Infelizmente, o tempo necessário para a remoção enzimática das GAGs (24h) não é clinicamente relevante (Mazzoni et al., 2008).

Estes problemas necessitam de ser resolvidos para que as uniões de resina-dentina sejam tão duradouras como as restaurações a amálgama. É importante identificar que abordagens terapêuticas são possíveis para colmatar estas falhas. Nem todas as soluções serão clinicamente viáveis. Contudo, serão o suficiente para que, no futuro, a união resina dentina seja consideravelmente mais durável do que é nos dias de hoje (David H Pashley et al., 2011).

2.3.4 Formas de prevenir a degradação da interface adesiva

Agentes Queladores de Cálcio e de Zinco

As MMPs precisam de cálcio para manter a sua estrutura terciária e de iões de zinco para a sua actividade catalítica de hidrólise (Visse & Nagase, 2003). É possível inactivar estas MMPs tratando a dentina desmineralizada com queladores de catiões divalentes como o EDTA. Contudo, o efeito desmineralizador do EDTA é tão fraco que demorariam vários minutos para desmineralizar 1-2 μm (R. Osorio, Erhardt, Pimenta, Osorio, & Toledano, 2005; Sauro, Mannocci, et al., 2009).

Agentes de *cross-linking* proteicos

Outra opção para inactivar as MMPs endógenas da dentina é fazer um *cross-linking* das suas cadeias peptídeas imediatamente a seguir à utilização do ácido. Isto leva à perda de mobilidade molecular, que é essencial para a sua actividade enzimática.

Apesar de vários autores terem demonstrado que o *cross-linking* aumenta a força de adesão entre resina e dentina, o tempo necessário para a realização deste tratamento (10 minutos, 30 minutos, ou horas) torna a técnica clinicamente irrelevante (Bedran-Russo, Vidal, Dos Santos, & Castellan, 2010).

Inibidores de protease específicos e não específicos

Vários autores mostraram a eficácia de incorporar clorexidina nos *primers*, na prevenção da degradação da camada híbrida (W. W. Brackett et al., 2007; M. R. O. Carrilho et al., 2007; Hebling et al., 2005; Loguercio et al., 2009). A clorexidina pode ainda inibir algumas cisteína catepsinas, outra classe de enzimas colagenolíticas encontradas na dentina (Tersariol et al., 2010).

Apesar de existir ampla evidência científica a suportar a utilização de uma solução aquosa de CHX 2% na preservação da integridade da camada híbrida (W. W. Brackett et al., 2007; M. R. O. Carrilho et al., 2007; Hebling et al., 2005; Komori et al., 2009), existem quatro preocupações que não estão reportadas relativamente ao seu uso.

Em primeiro lugar, mesmo que a degradação da camada híbrida seja travada pela CHX, a zona da matriz de colagénio exposto estará inadvertidamente susceptível à degradação, ou à ruptura por ciclos de fadiga após função intraoral prolongada (Thornton, Schwab, & Oxland, 2007).

Segundo, como a CHX é solúvel em água e poderá eventualmente percolar da camada híbrida, fica por determinar se a sua actividade inibitória das MMPs é provisória, ou permanente. A sua acção poderá apenas atrasar a degradação do colagénio ao invés de a evitar permanentemente (Fernanda T. Sadek et al., 2010).

Terceiro, apesar da aplicação profilática de CHX na dentina desmineralizada aparentemente evitar a quebra das fibrilas de colagénio, não previne a absorção de água. A água é responsável pela hidrólise e subsequente lixiviação de componentes hidrofílicos das resinas, que contribuem para o declínio das propriedades mecânicas das interfaces resina-dentina ao longo do tempo (Fernanda T. Sadek et al., 2010).

Quarto, para além das MMPs, existem outras enzimas colagenolíticas, como as cisteínas e catepsinas, que foram detectadas na dentina (Bertassoni et al., 2012). A acção colagenolítica das catepsinas na dentina poderá não ser alterada pelos mesmos inibidores das MMPs. É necessário identificar e investigar métodos alternativos para aumentar a longevidade das ligações resina-dentina (Fernanda T. Sadek et al., 2010).

Para além de todas estas soluções, e suas respectivas limitações clínicas, surge ainda como opção terapêutica na prevenção da degradação da interface adesiva, uma filosofia

adesiva inspirada nos princípios de conservação da matéria orgânica, também implicados na conservação de peças de estudo anatómicas. O *ethanol wet bonding*, pelos excepcionais resultados obtidos em ambiente laboratorial, poderá fazer parte da solução de um dos grandes problemas contemporâneos da Medicina Dentária, a adesão à dentina (David H. Pashley et al., 2007).

2.4. Ethanol Wet Bonding

2.4.1 O Conceito

A técnica *ethanol wet bonding* é baseada no conceito de substituição da água dos espaços interfibrilares e intrafibrilares por etanol, o que altera a matriz de colagénio para um estado simultâneo de desidratação e suspensão das fibras de colagénio (E. Osorio et al., 2010). A matriz de colagénio suspensa em etanol tem menos hidrofiliçidade e previne a separação dos monómeros de resina hidrofóbicos na camada híbrida (E. Osorio et al., 2010; Shin, Yao, Huenergardt, Walker, & Wang, 2009).

O conceito de *ethanol wet bonding* não é tão inverosímil como possa parecer, visto que a ideia tem sido utilizada durante mais de meio século pela microscopia electrónica, com o intuito de incorporar resinas epóxi hidrofóbicas em tecidos moles hidrofílicos (David H. Pashley et al., 2007). No processo de incorporação de resina epóxi nos tecidos moles hidratados, a água é gradualmente substituída durante horas por uma imersão, passo a passo, do órgão ou tecido em séries ascendentes de solventes não aquosos (por exemplo, o etanol). Seguidamente, aumentam-se as concentrações de resina dissolvida nos solventes não aquosos (solventes de transição) de forma progressiva. No final utiliza-se um meio de resina epóxi pura. Num sentido lato, este processo de incorporação de resinas em tecidos moles é uma forma de *wet bonding*, no qual o processo implica que um tecido esteja permanentemente suspenso num líquido para evitar o colapso, ou a alteração volumétrica tridimensional dos componentes tecidulares. Deste modo, deverá ser possível simular o mesmo processo na adesão à dentina ao utilizarmos concentrações de etanol crescentes para obtermos uma completa desidratação química, por substituição da água por um meio não aquoso e mantendo simultaneamente a arquitectura volumétrica do colagénio desmineralizado (F.R. Tay et al., 2007).

Apesar desta técnica não eliminar toda a retração da matriz de colagénio desmineralizada, não existe colapso dos espaços interfibrilares suficiente para impedir a infiltração da resina. Recentemente este protocolo foi adaptado, tendo-se criado um adesivo experimental *etch and rinse* constituído por 50% de etanol e 50% de resina utilizado como *primer*, e resina pura como adesivo. Ao se utilizar uma substituição passo a passo do etanol presente na dentina saturada pelo *primer* experimental e subsequentemente pelo adesivo experimental, descobriu-se que as uniões resina-dentina criadas pelo protocolo de *ethanol wet bonding* apresentaram resistências adesivas que não são significativamente diferentes dos adesivos hidrofílicos de 3 passos (4ª geração) disponíveis comercialmente (Fernanda T. Sadek et al., 2008). Utilizando a técnica de marcação de prata para comparar a nano-infiltração aquosa dentro das camadas híbridas formadas com o adesivo experimental de *ethanol wet bonding* vs as camadas híbridas criadas com os adesivos hidrofílicos convencionais de três passos, foram observadas mínimas ou inexistentes nano-infiltrações aquosas nas camadas híbridas hidrofóbicas, comparando com extensa nano-infiltração aquosa e ramificações em árvore da progressão da água nas camadas híbridas hidrofílicas criadas com os adesivos *water wet bonding* convencionais (Fernanda T. Sadek et al., 2008).

Um estudo realizado por Pashley et al. mostrou que são obtidas forças de ligação superiores quando a dentina foi saturada com etanol. Isto indica que o *wet bonding* com 100% etanol poderá ser ainda melhor do que o *wet bonding* com água. O modelo previu uma superioridade do *wet bonding* sobre o *dry bonding* e a utilização de *wet bonding* com etanol em vez de água (David H. Pashley et al., 2007).

Existem duas versões desta técnica. No método progressivo, a água é gradualmente substituída por concentrações ascendentes de etanol. Já no método simplificado uma concentração de 100% de etanol é aplicada na dentina desmineralizada saturada por água durante um minuto, antes da aplicação da mistura de monómeros resinosos hidrofóbicos solúveis em etanol (Hosaka et al., 2009; E. Osorio et al., 2010).

A saturação por etanol causa a diminuição do diâmetro das fibras de colagénio e aumenta os espaços interfibrilares para que os monómeros hidrofóbicos de maior peso molecular se infiltrem na matriz dentinária, o que poderá aumentar a longevidade da união resina-dentina. Li et al. e Sadek et al. demonstraram que a técnica *ethanol wet bonding* apresenta forças de ligação iguais ou superiores à técnica *water wet bonding* (Hosaka et

al., 2009; Li, Liu, Zhang, Kang, & Chen, 2012; Fernanda T. Sadek et al., 2010).

2.4.2. Protocolo integral vs protocolo simplificado

O protocolo integral de desidratação química utilizado para o *ethanol wet bonding* consiste em tratar a dentina com séries de concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 80%, 95% e 100% durante 3 vezes) 30 segundos cada, o que perfaz um total de 3 minutos e 30 segundos no total do procedimento (Fernanda T. Sadek et al., 2008).

Sadek et al. nos resultados do seu estudo de 2010 de estabilidade a um ano da união resina-dentina criada com *ethanol wet bonding*, referem que a degradação da camada híbrida não foi evidente no grupo do adesivo hidrofóbico experimental após um ano de envelhecimento (Fernanda T. Sadek et al., 2010).

Acredita-se que tanto a redução da absorção de água como a difusão da resina na matriz de colagénio contribuam para a estabilidade da ligação hidrofóbica criada entre resina-dentina através do *ethanol wet bonding*. A largura dos espaços interfibrilares criada pelo EWB é provavelmente causada pelo colapso das proteoglicanas interfibrilares, devido à desidratação do etanol a 100% o que permite um aumento do rácio resina colagénio dentro da camada híbrida (Mazzoni et al., 2008; Fernanda T. Sadek et al., 2010).

Neste estudo, as camadas híbridas criadas com um adesivo hidrofóbico experimental apresentaram praticamente nenhuma nano-infiltração na camada híbrida mesmo após um ano de envelhecimento acelerado (Fernanda T. Sadek et al., 2010).

As metaloproteínases necessitam de água para desenvolverem a sua actividade. Quando existe uma infiltração da camada híbrida, a água permite a acção colagenolítica e gelatinolítica das MMP's. Será interessante verificar se a utilização de um adesivo convencional, de um sistema adesivo de três passos, em conjunto com a técnica *ethanol wet bonding* gera ligações mais estáveis. Notavelmente, a presença da integridade estrutural das camadas híbridas hidrofóbicas deste estudo foram atingidas sem o uso de inibidores das MMPs, como a CHX (Fernanda T. Sadek et al., 2010).

Têm sido levantadas algumas críticas relativamente a esta abordagem integral,

devido ao elevado número de passos durante a saturação da dentina por etanol. O protocolo sugere a utilização de soluções com crescentes concentrações de etanol, o que poderá levar cerca de três minutos e meio a realizar. Este protocolo poderá prejudicar algumas aplicações clínicas da técnica devido à morosidade do processo. Propostas de protocolos simplificados têm sido apresentadas utilizando apenas uma aplicação de 100% de etanol (Mortazavi, Samimi, Rafizadeh, & Kazemi, 2012) e duas aplicações sequenciais de 50% e 100% de etanol (Araujo et al., 2013), que não mostraram diferenças, quando comparadas com a técnica de *water wet bonding* (Fernanda T. Sadek et al., 2010).

2.4.3. Adesão hidrofílica vs hidrofóbica

Uma descoberta interessante foi a de que um tecido hidrofílico tem uma força adesiva menos duradoura, em condições laboratoriais, uma vez que os adesivos hidrofílicos absorvem mais água do que os hidrofóbicos ao longo do tempo (Figura 8) (Franklin R Tay & Pashley, 2003).

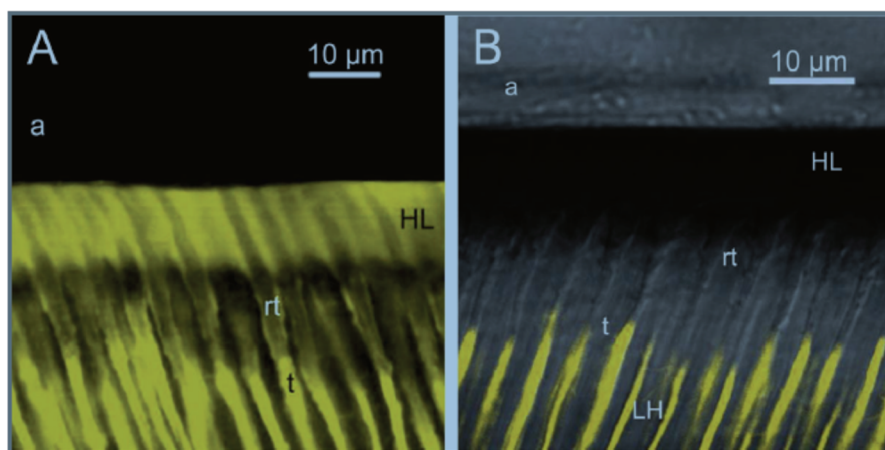


Figura 8 - A: Imagens de microscopia confocal de varredura a laser de ligações resina-dentina feitas em segmentos de coroas. Após a polimerização da resina, a câmara pulpar foi preenchida com amarelo lúcido e colocada sob pressão de água para permitir que o marcador fluorescente se infiltrasse onde quer que houvessem canais submicrométricos desde a câmara pulpar até à camada híbrida. A: ligação resina-dentina realizada com *water wet bonding*. Notar que existe uma marcação constante fluorescente desde o túbulo dentinário (t), à volta do *resin tag* (rt), dentro da camada híbrida. Toda a camada híbrida está fluorescente. B: Quando a mesma resina foi aderida com a dentina saturada por etanol (*ethanol wet bonding*), o amarelo lúcido parou nos túbulos dentinários (t), porque encontrou uma zona espessa de 10 µm de *resin tags* devidamente hibridizados (rt). O amarelo lúcido não passou pelos *resin tags*, deixando a camada híbrida livre de fluorescência. (Adaptado de Sauro et al., 2008).

Trabalhos anteriores correlacionaram a instabilidade da ligação resina-dentina com o aumento da hidrofiliidade dos monómeros de resina presentes nos adesivos (David H. Pashley et al., 2007; F.R. Tay et al., 2004; Franklin R Tay & Pashley, 2003).

É possível ligar monómeros hidrofóbicos à dentina previamente tratada com condicionamento ácido através de um protocolo de *ethanol wet bonding* (Nishitani et al., 2006; David H. Pashley et al., 2007; F T Sadek, Pashley, Ferrari, & Tay, 2007; Fernanda T. Sadek et al., 2008; F.R. Tay et al., 2007).

A filosofia por detrás desta técnica assume que a desidratação através do etanol confere menos hidrofília à dentina, permitindo que monómeros relativamente hidrofóbicos se infiltrem no colagénio retraído já desmineralizado, mas não colapsado, que está suspenso em etanol (F.R. Tay et al., 2007).

O EWB mostrou um desempenho igual aos adesivos Optibond FL e Clearfil SE após 12 meses de função na cavidade oral. Visto que a união obtida com o *ethanol wet bonding* apenas depende dos monómeros hidrofóbicos, teoricamente, este facto melhora a durabilidade da ligação resina-dentina, dado que esta técnica minimiza a absorção de água através do adesivo hidrofóbico polimerizado (Mortazavi et al., 2012).

O etanol é um solvente bipolar com menor capacidade de criar pontes de hidrogénio do que a água, o que leva a uma desidratação química da rede de colagénio desmineralizada (Liu et al., 2011; Nishitani et al., 2006; E. Osorio et al., 2010). Subsequentemente, os espaços interfibrilares e intrafibrilares são preenchidos por etanol, que é um melhor solvente para os monómeros de resina do que a água. Este facto resulta numa melhor penetração dos monómeros de resina na rede de colagénio desmineralizada que está suspensa em etanol (Breschi et al., 2008; Hosaka et al., 2009).

Na técnica de *water wet bonding*, a penetração de Bis-GMA na rede de colagénio vai gradualmente diminuindo. Contudo, no *ethanol wet bonding* existe uma distribuição homogénea do Bis-GMA hidrofóbico, o que inibe a separação da camada híbrida (Shin et al., 2009).

Para além disto, os espaços interfibrilares contêm um hidrogel de proteoglicanas, o que interfere com o processo de penetração dos monómeros. O etanol remove a água destes espaços (E. Osorio et al., 2010; Scott & Thomlinson, 1998). Como o etanol encolhe

as fibrilas, estes espaços estão também aumentados, o que permite uma maior penetração da resina (Hosaka et al., 2009; F.R. Tay et al., 2007).

Hosaka et al. estudou a durabilidade da união da resina à dentina entre o *water wet bonding* e o *ethanol wet bonding*, tendo demonstrado que a dentina saturada com etanol obteve forças de ligação mais elevadas do que com água, e que estas não diminuem ao longo do tempo do estudo, e nos respectivos controlos a 3, 6 e 12 meses (Hosaka et al., 2009).

Apesar do método progressivo da técnica *ethanol wet bonding* ser considerado um protocolo menos sensível, consome mais tempo e este poderá ser um factor de desinteresse clínico (E. Osorio et al., 2010).

Não existem diferenças estatisticamente significativas na taxa de sucesso clínico entre as ligações efectuadas com a técnica *ethanol wet bonding*, o Optibond FL (*etch and rinse*) e o Clearfil SE (*self-etch*) após 12 meses (Mortazavi et al., 2012).

2.4.4. Evidência dos benefícios de EWB

Pode o *ethanol wet bonding* inibir as proteases da dentina?

A Figura 9 mostra-nos uma imagem de TEM de um adesivo *etch and rinse* (Scotchbond Multipurpose Plus) aderido utilizando a técnica de *ethanol wet bonding*. Este procedimento está associado ao aumento de largura dos espaços interfibrilares. Teoricamente, este aumento leva a que mais resina consiga penetrar e envolver as fibras de colagénio, protegendo-as da absorção de água. Este processo é tão válido como a utilização de enzimas ABC para remover as GAGs dos espaços interfibrilares. Contudo, pode ser atingido em 1 minuto de lavagem com etanol em vez de 24 horas de incubação das enzimas. As imagens de TEM destes espécimes revelam que camadas híbridas com um ano, de resinas 2,2-bis(4(2-hidroxi-3-metacryloyloxy)-fenil) propano (BisGMA)/TEGDMA aderidas com *ethanol wet bonding* mostram-se iguais aos controlos de 24 horas (Figura 9A). As fibras de colagénio são marcadas pelos metais pesados e mostram uma ultramorfolgia normal. Em contraste, quando os espécimes de SBMP aderidos em dentina saturada por água foram observados, passado um ano de envelhecimento acelerado, cerca de 80% da camada híbrida tinha sido degradada ao ponto

de apenas se conseguir observar um número muito reduzido de fibras de colagénio, e a marcação por metais pesados apenas residual. O que sobrou da camada híbrida foi degradado em péptidos gelatinosos (Figura 9B) (David H Pashley et al., 2011).

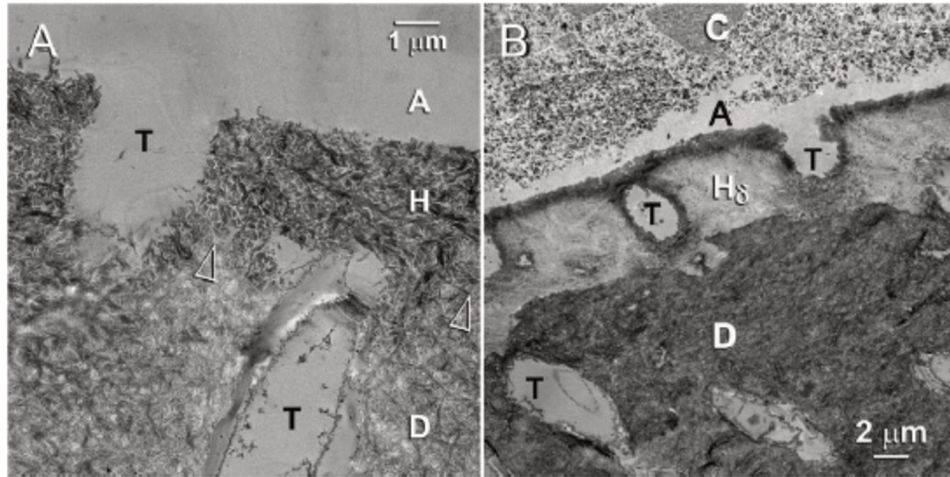


Figura 9- TEM de um espécime aderido com uma resina de BisGMA/TEGDMA com a técnica de *ethanol wet bonding*. A=adesivo; H=camada híbrida ocupa o espaço por cima das duas setas abertas. Aparência da união após um ano de armazenamento em água. (B) TEM de uma união com Scotchbond Multipurpose Plus (SBMP) feita com dentina desmineralizada saturada com água, após um ano de armazenamento em água. C= compósito híbrido; A= adesivo; Hδ= camada híbrida; D=dentina mineralizada subjacente que foi desmineralizada durante o procedimento de TEM; T= *resin tags* nos túbulos. De notar a quantidade de marcação que foi absorvida pela dentina desmineralizada laboratorial e quão pouca foi absorvida pela camada híbrida devido à degradação do colagénio por MMPs endógenas. (Adaptado de David H Pashley et al., 2011).

O facto de não ter existido diminuição na força de adesão da resina de BisGMA/TEGDMA aderida com *ethanol wet bonding* após um período de um ano merece mais discussão. Ou o etanol consegue desnaturar as MMPs que estão ligadas à matriz, ou torna mais íntima a associação entre as resinas dos adesivos e as fibras de colagénio (com a sua ligação às MMPs) do que a água. Se as resinas conseguem de facto infiltrar o colagénio saturado por etanol, elas conseguem não só inactivar as enzimas proteolíticas ligadas ao colagénio, mas também obter uma ligação nanomecânica às fibras de colagénio (David H Pashley et al., 2011).

Se existe demasiada água nos espaços interfibrilares as resinas não polimerizam de forma adequada (Jacobsen & Söderholm, 1995; Paul, Leach, Rueggeberg, & Pashley, 1999), portanto, existe uma fraca associação entre a resina do adesivo e o colagénio. Se existir água residual no colagénio, as cadeias poliméricas da resina poderão não conseguir penetrar os péptidos de colagénio. Contudo, se existir uma camada de etanol no colagénio,

os monómeros do adesivo irão dissolver-se no álcool e criar uma rede de interpenetração de cadeias de péptidos e de polímeros (David H Pashley et al., 2011).

Na dentina saturada por etanol (modelo de interfase, Figura 10 B), existe uma íntima associação entre a resina e o colagénio. Assim, tanto o adesivo como o colagénio dividem o *stress* funcional, por forma a que exista uma menor concentração do stress localizado. Especula-se que a dentina saturada em etanol permite que a resina do adesivo flua para os locais de ligação catalítica das MMPs e polimerizem, portanto, inactivando as enzimas. Este é outro exemplo de como os *primers* podem ter uma função terapêutica, e aumentar a durabilidade das uniões resina-dentina (Huang, Li, Huang, & Du, 2011).

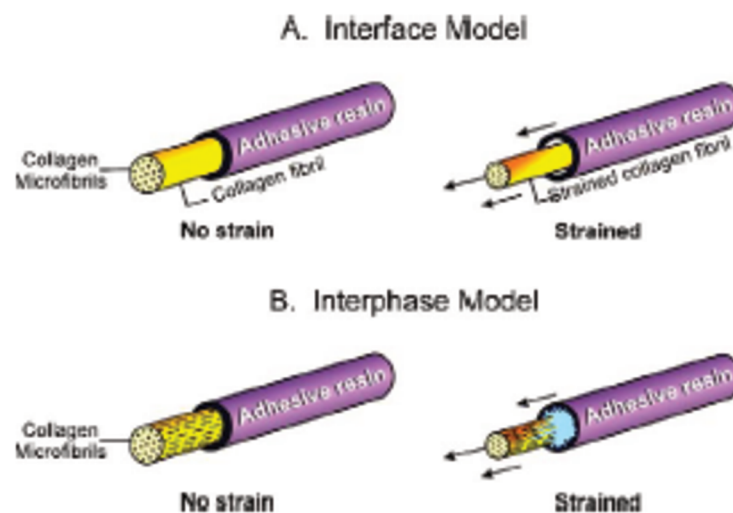


Figura 10 - Esquema teórico das relações entre a resina nos espaços interfibrilares e as fibras de colagénio. (A) Modelo de interface: a presença de uma camada de água no colagénio limita a um nível molecular a interacção entre a resina e o colagénio para uma interface estreita. Quando esticada, o colagénio estica mais do que a resina, carregando a maior parte do stress. (B) Modelo de interface: a presença de etanol dentro e a rodear as fibras de colagénio permite que os co-monómeros se dissolvam, permitindo um contacto íntimo com o colagénio, criando uma interface tridimensional, ao invés de uma interface a duas dimensões. Quando traccionados, tanto o colagénio como a resina dividem o *stress*, portanto melhorando a distribuição da força. (Adaptado de David H Pashley et al., 2011).

As implicações clínicas do *ethanol wet bonding*

O *ethanol wet bonding* (David H. Pashley et al., 2007) foi desenvolvido para aumentar a durabilidade dos adesivos *etch and rinse*. Nesta técnica, o etanol é utilizado para desidratar quimicamente a matriz da dentina desmineralizada (Nishitani et al., 2006). Isto resulta numa diminuição do diâmetro das fibras de colagénio, aumentando a largura

dos espaços interfibrilares e uma redução da hidrofiliicidade da matriz de colagénio (David H Pashley et al., 2011).

Tay et al. misturaram Bis-GMA com etanol e aplicaram-no numa dentina pré-tratada saturada com etanol. Obtiveram excelentes resultados nas forças de adesão exclusivamente entre o Bis-GMA e dentina através do *ethanol wet bonding*, tendo assim demonstrado o *proof of concept* do EWB, utilizando um monómero insolúvel em água (F.R. Tay et al., 2007).

Especula-se que a união dos adesivos *etch and rinse* contemporâneos à dentina saturada por água, deixa uma camada muito fina de água, ou de um hidrogel entre o adesivo infiltrado e as fibras de colagénio da matriz. Esta camada parece permitir que exista um fluido contínuo desde as *resin tags* para a base da camada híbrida através de ramos laterais dos túbulos dentinários (Figura 11), que se estende por toda a espessura da camada híbrida (Sauro, Watson, et al., 2009).

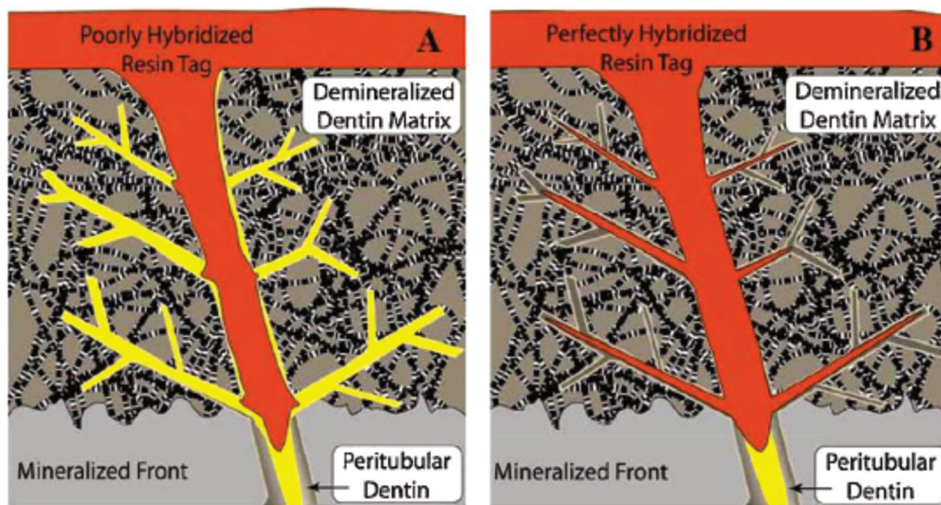


Figura 11 - Esquema de micropermeabilidade de A: hibridização pobre de *resin tags* na dentina desmineralizada saturada por água, antes da infiltração de resina vs B: perfeita hibridização das *resin tags* na dentina saturada por etanol antes da infiltração com resina. O marcador amarelo fluorescente foi forçado a partir da câmara pulpar, pelos túbulos até à camada híbrida. A: a resina não conseguiu deslocar a água presente nos canais laterais dos túbulos na camada híbrida. Isto permitiu que o marcador amarelo se difundisse pela camada híbrida. B: a resina dissolveu-se facilmente no etanol presente nos canais laterais dos túbulos dentinários, selando a camada híbrida do fluido dentinário. (Adaptado de David H Pashley et al., 2011).

Efeitos do *ethanol wet bonding* nos adesivos dentários contemporâneos

Quando se utiliza o *ethanol wet bonding* para unir Scotchbond Multi-Purpose, Single Bond e All Bond 2 à dentina desmineralizada, as resistências adesivas à

microtracção aumentam cerca de 17% comparando com o *water wet bonding* (tabela 2). Ao fim de 18 meses o Scotchbond Multi-Purpose aderido com *water wet bonding* diminuiu 28%, o mesmo adesivo aderido com *ethanol wet bonding* não se alterou ao fim de 18 meses (Tabela 2). As adesões feitas com Single Bond com *water wet bonding* diminuíram 52 % nos testes de resistência adesiva à microtracção (Fernanda T. Sadek et al., 2008).

Tabela 2 – Força de adesão de adesivos comerciais aderidos com *water wet bonding* vs *ethanol wet bonding*. (Adaptado de David H. Pashley et al., 2011).

Table 4 – Bond strength of commercial adhesives bonded to water vs. ethanol-saturated dentin.					
Adhesive	Testing-time	Acid-etched dentin saturation			
		WSD (control)	ESD	CHX/WSD	CHX/ESD
SBMP	Baseline	37.8 ± 4.9 ^{ba}	43.5 ± 4.5 ^{ba}	35.8 ± 5.8 ^{ba}	46.1 ± 4.5 ^{ba}
	18 months	27.4 ± 5.4 ^{ba}	43.6 ± 3.4 ^{ba}	30.1 ± 5.0 ^{ba}	44.4 ± 3.0 ^{ba}
SB	Baseline	35.7 ± 5.7 ^{ba}	42.0 ± 5.6 ^{ba}	34.4 ± 6.0 ^{ba}	40.4 ± 6.1 ^{ba}
	18 months	17.1 ± 4.3 ^{bc}	30.6 ± 4.7 ^{ba}	26.2 ± 5.3 ^{ba}	36.3 ± 5.9 ^{ba}
AL-2	Baseline	34.4 ± 6.1 ^{ba}	41.3 ± 7.3 ^{ba}	32.5 ± 4.9 ^{ba}	42.9 ± 4.9 ^{ba}
	18 months	22.3 ± 4.6 ^{bc}	30.1 ± 5.2 ^{ba}	26.1 ± 5.6 ^{ba}	38.7 ± 6.5 ^{ba}

Values are mean ± SD. N = 7 teeth/group, from 15–25 beams/tooth. Analysis per row – differences between groups are identified with different lower case letters. Analysis per column – differences between groups are identified with different upper case letters (p < 0.05). Abbreviations: Scotchbond Multi-Purpose (SBMP); Single Bond (SB); All-Bond 2 (AB-2); Applied on dentin saturated with water (WSD); Ethanol-saturated dentin (ESD); Chlorhexidine in water base (CHX/WSD); Chlorhexidine in ethanol base (CHX/ESD).

O *ethanol wet bonding* previne a degradação da camada híbrida, que é frequentemente observada em estudos de microporabilidade (Sauro, Watson, et al., 2009). Várias publicações recentes indicam que o *ethanol wet bonding*, sem mais nenhuma estratégia anti degradação, ou inibidor extrínseco, parece prevenir a degradação que acontece aos sistemas adesivos contemporâneos a longo prazo, nas uniões resina-dentina (Fernanda T. Sadek et al., 2010).

Num estudo recente *in vivo* a um ano aderiu-se Scotchbond Multi-Purpose à dentina saturada por água, enquanto que uma mistura mais hidrofóbica de 70% de BisGMA e 28% de TEGDMA foi aderida segundo os princípios do *ethanol wet bonding*. Após um ano de envelhecimento, as ligações de SBMP aderidas em dentina saturada por água desceram de 40.6±2.5MPa para 27.5±3.3MPa, um decréscimo de 32% comparado com o controlo a 24 horas. Em contraste, as ligações feitas com a resina mais hidrofóbica, BisGMA/TEGDMA, com a dentina saturada em etanol desceram apenas de 43.7±7.4 para 39.8±2.7MPa, uma redução insignificante (Figura 12) (Fernanda T. Sadek et al., 2010).

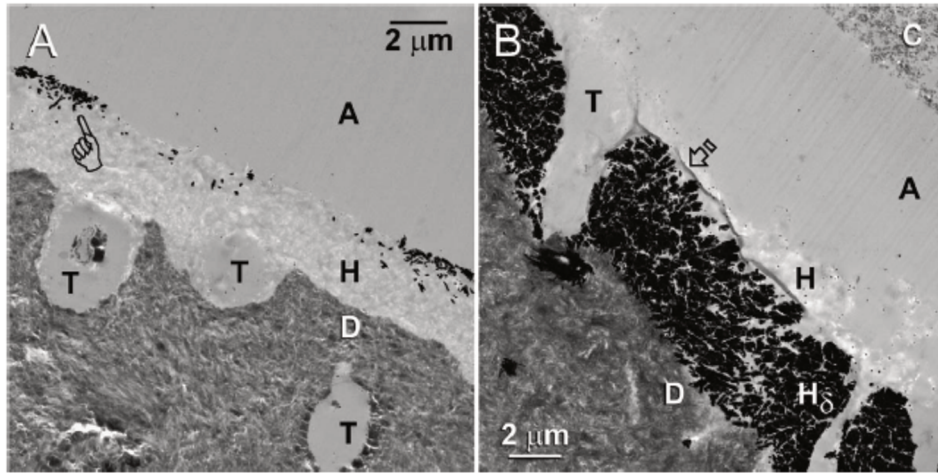


Figura 12 – (A) TEM não marcado de uma ligação resina-dentina com um ano de duração feita *in vitro* com uma resina BisGMA/TEGDMA aderida à dentina desmineralizada com a técnica de *ethanol wet bonding*. Após imersão do espécime em nitrato de prata durante 24 horas, foi observada a marcação muito ligeira de muito poucos grãos de prata. (B) TEM não marcado de uma ligação resina-dentina com um ano realizada com *Scotchbond Multi Purpose* com a técnica de *water wet bonding*. Após imersão em nitrato de prata, a camada híbrida absorveu grandes quantidades de prata, indicando que as fibras de colagénio que estavam na camada híbrida foram completamente destruídas pelas MMPs endógenas e substituídas por água. (Adaptado de Fernanda T. Sadek et al., 2010).

Início da adesão hidrofóbica à dentina

Existem tentativas para ligar resinas hidrofóbicas à dentina desde a introdução do uso do ácido ortofosfórico e a síntese de BisGMA (M. G. Buonocore, 1955; Laswell, Welk, & Regenos, 1971).

Uma vez que o BisGMA não tem grupos químicos específicos para competir com a água, foram introduzidos co-monomeros com superfície activa para promover a adesão à dentina. Os monómeros hidrofílicos são utilizados na adesão para melhorar as propriedades hidrofílicas do adesivo, e para evitar separações de fase quando os dimetacrilatos hidrofóbicos são adicionados à água (Paulette Spencer & Wang, 2002). Adesivos que contenham resinas hidrofílicas apresentam afinidade com a água (Ito et al., 2005; Cynthia K.Y. Yiu et al., 2006), resultando numa rápida deteriorização das suas propriedades mecânicas (Ito et al., 2005; C.K.Y. Yiu et al., 2004).

Para aumentar a longevidade das ligações resina-dentina, tem sido proposto que os futuros adesivos para a dentina sejam menos hidrofílicos (Franklin R Tay & Pashley,

2003).

O ideal para a adesão à dentina seria um monómero que fosse hidrofílico, e que passasse a hidrofóbico após a polimerização. Contudo, não existe nenhuma evidência de que tal quimérico exista na química de polímeros. A estratégia alternativa é tornar a dentina desmineralizada menos hidrofílica para que seja compatível com monómeros resinosos hidrofóbicos. Isto pode ser atingido pela substituição da água na matriz de colagénio desmineralizada por etanol, conhecida como técnica *ethanol wet bonding*. Este protocolo previne a separação dos dimetacrilatos hidrofóbicos na camada híbrida, uma vez que são aplicados na dentina saturada por etanol em vez de água (David H. Pashley et al., 2007).

O Bis-GMA por ser altamente viscoso, devido à sua organização molecular e à sua propensão para criar ligações intermoleculares hidrogeniónicas, tem que ser diluído com dimetacrilatos glicosilados como o TEGDMA para facilitar o seu manuseamento. As potenciais desvantagens da utilização de TEGDMA como diluente incluem a sua potencial lixiviação (Ortengren, Wellendorf, Karlsson, & Ruyter, 2001), e a elevada absorção de água (Sideridou, 2003).

Visto que os adesivos solúveis em etanol podem ser utilizados próximos da polpa em dentes vitais, as potenciais interações químico-biológicas do TEGDMA com os tecidos orais podem ser preocupações clínicas a ter em conta (Abebe & Maddux, 2006).

É expectável que a viscosidade do Bis-GMA, solúvel em etanol, seja suficientemente baixa para infiltrar a dentina desmineralizada saturada em etanol sem a necessidade de um diluente adicional (TEGDMA, por exemplo). O resultado será uma camada híbrida mais hidrofóbica e hidroliticamente estável, pela eliminação do TEGDMA que é relativamente hidrofílico (Engelmann, Leyhausen, Leibfritz, & Geurtsen, 2002).

Como a ligação de resinas hidrofóbicas à dentina, utilizando a técnica *ethanol wet bonding*, preserva a integridade da ligação, sem necessidade da acção conjunta de inibidores das MMPs, esta técnica permite mais testes clínicos. É no entanto importante perceber através de estudos, se pela utilização de etanol a 100% existem alguns efeitos na vitalidade pulpar, para garantir a segurança do paciente e assegurar que este novo conceito de adesão é clinicamente viável (Fernanda T. Sadek et al., 2010).

2.4.5. Adesivo experimental aplicado ao *ethanol wet bonding*

Constituído em massa por 70 % de BisGMA (Esstech, Essington, PA) 28,75% TEGMA (Esstech) 0,25% canforoquinona (Sigma-Aldrich SA Louis) e 1% ethyl N, N-dimetil-4aminobenzoato (Sigma-Aldrich), é utilizado para formular um adesivo *etch and rinse* hidrofóbico experimental. O *primer* é preparado diluindo o adesivo numa proporção de 50 % da massa de etanol (Fernanda T. Sadek et al., 2008).

Como já foi referido anteriormente, a utilização de TEGMA como um comonomero diluente na formulação de adesivos hidrofóbicos para o *ethanol wet bonding* é uma preocupação devido à sua potencial lixiviação, elevada absorção de água e bioincompatibilidade. Num estudo com simulação da pressão pulpar, um adesivo experimental constituído apenas por Bis-GMA aderido com a técnica de *ethanol wet bonding* mostrou resistências adesivas à tracção que não foram diferentes das atingidas com Optibond FL aderido de acordo com as recomendações do fabricante. O adesivo experimental apresentou uma camada híbrida, *resin tags* e distribuição de nano-infiltração semelhantes (F.R. Tay et al., 2007).

Existem ainda algumas reservas relativamente à eficácia do EWB para os sistemas adesivos convencionais *in vivo*, em aspectos como a contaminação da água proveniente da polpa. No entanto, deverá ser referido que a dentina afectada é menos permeável do que a sã, e que a administração de anestésicos com vasoconstrictor diminuem a pressão do fluido pulpar (Sauro et al., 2008).

Os estudos sobre a técnica de EWB têm sido de elevada importância pelo contributo que têm oferecido à ciência, na compreensão do comportamento da dentina após a desidratação por etanol, nomeadamente a inactivação das MMPs endógenas e a preservação da integridade da interface resina-dentina. Deste modo, existe suporte para que se desenvolvam mais estudos a longo prazo sobre a estabilidade da camada híbrida composta por monómeros hidrofóbicos diluídos em etanol. Deverão ser considerados factores como a integridade dos *resin tags*, a nano-infiltração marginal, a remineralização da camada híbrida que não consegue ficar coberta pelos monómeros de resina, e a remineralização da dentina que fica adstrita à interface resina dentina (Souza Júnior, 2015).

III. Conclusões

A adesão à dentina permanece como uma das grandes limitações da Medicina Dentária contemporânea. Todavia, exploraram-se nos últimos 30 anos soluções para colmatar esta evidência, tendo-se obtido resultados bastante satisfatórios a curto prazo para as várias estratégias adesivas desenvolvidas, algumas com excelentes desempenhos nos testes das forças adesivas.

A durabilidade das restaurações a longo prazo parece ser o principal factor de ineficácia no tratamento de lesões de cárie. As características morfológicas e fisiológicas da dentina desempenham um papel importante neste insucesso, devido a fenómenos como a incompleta infiltração dos monómeros de resina, a degradação hidrolítica e a acção das metaloproteínases.

Têm surgido várias estratégias para solucionar estes problemas de forma a prevenir a degradação da interface adesiva a longo prazo. De todas elas, aquela que aparenta ter algum potencial clínico para o aumento da durabilidade das restaurações é o *ethanol wet bonding*, visto que previne a degradação da camada híbrida por substituição da água, como solvente, por etanol. Esta substituição parece prevenir os problemas contemporâneos da adesão à dentina tanto nos estudos *in vitro* como *in vivo*.

Contudo, são necessários estudos de longa duração para sustentar cientificamente esta afirmação de que o EWB é uma opção clínica viável e com resultados previsíveis. No entanto, a bibliografia analisada neste trabalho comprova que existem potencialidades muito interessantes na utilização do EWB.

No futuro, será importante também, investigar os benefícios da utilização de protocolos integrais, ou simplificados, já estudados da técnica, ou eventualmente reestruturar um protocolo que apesar de não necessitar de tanto tempo de aplicação, consiga não comprometer os princípios utilizados na conservação de matéria orgânica, mas adaptado à utilização clínica diária, que caminha para a simplificação dos sistemas adesivos e de técnicas aplicadas em consultório.

IV. Bibliografia

- Abebe, W., & Maddux, W. F. (2006). Roles of nitric oxide and prostacyclin in triethyleneglycol dimethacrylate (TEGDMA)-induced vasorelaxation. *Dental Materials*, 22(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.02.008>
- Araujo, J. F. de, Barros, T. A. de F., Braga, E. M. F., Loretto, S. C., Souza, P. de A. R. S. e, & Souza Junior, M. H. S. e. (2013). One-Year Evaluation of a Simplified Ethanol-Wet Bonding Technique: A Randomized Clinical Trial. *Brazilian Dental Journal*, 24(3), 267–272. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302128>
- Armstrong, S., Vargas, M., Chung, I., Pashley, D., Campbell, J., Laffoon, J., & Qian, F. (2004). Resin-dentin interfacial and microtensile bond strength after five-year water storage. *Operative Dentistry*, 29(6), 705–712. <https://doi.org/10.2341/1559-2863-29-6-1>
- Bedran-Russo, A. K. B., Vidal, C. M. P., Dos Santos, P. H., & Castellan, C. S. (2010). Long-term effect of carbodiimide on dentin matrix and resin-dentin bonds. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 94(1), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31649>
- Bertassoni, L. E., Stankoska, K., & Swain, M. V. (2012). Insights into the structure and composition of the peritubular dentin organic matrix and the lamina limitans. *Micron*, 43(2–3), 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.08.003>
- Black, J. V. (1992). *A Work on Operative Dentistry*. Chicago, USA: Medico-Dental Publishing Company.
- Brackett, W. W., Tay, F. R., Brackett, M. G., Dib, A., Sword, R. J., & Pashley, D. H. (2007). The Effect of Chlorhexidine on Dentin Hybrid Layers In Vivo. *Operative Dentistry*, 32(2), 107–111. <https://doi.org/10.2341/06-55>
- Breschi, L., Cammelli, F., Visintini, E., Mazzoni, A., Vita, F., Carrilho, M., Pashley, D. (2009). Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse

dentin bonds: a 12-month in vitro study. *The Journal of Adhesive Dentistry*, 11(3), 191–198.

Breschi, L., Mazzoni, A., Ruggeri, A., Cadenaro, M., Di Lenarda, R., & De Stefano Dorigo, E. (2008). Dental adhesion review: Aging and stability of the bonded interface. *Dental Materials*, 24(1), 90–101.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2007.02.009>

Buonocore, M. G. (1955). A Simple Method of Increasing the Adhesion of Acrylic Filling Materials to Enamel Surfaces. *Journal of Dental Research*, 34(6), 849–853.
<https://doi.org/10.1177/00220345550340060801>

Cadenaro, M., Breschi, L., Rueggeberg, F. A., Suchko, M., Grodin, E., Agee, K., Pashley, D. H. (2009). Effects of residual ethanol on the rate and degree of conversion of five experimental resins. *Dental Materials*, 25(5), 621–628.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.11.005>

Cameron, I., Short, N., & Fullerton, G. (2007). Verification of simple hydration/dehydration methods to characterize multiple water compartments on Tendon Type 1 Collagen. *Cell Biology International*, 31(6), 531–539.
<https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2006.11.020>

Carrilho, M. R. O., Geraldeli, S., Tay, F., de Goes, M. F., Carvalho, R. M., Tjäderhane, L., Pashley, D. (2007). In vivo Preservation of the Hybrid Layer by Chlorhexidine. *Journal of Dental Research*, 86(6), 529–533.
<https://doi.org/10.1177/154405910708600608>

Carvalho, R. M., Chersoni, S., Frankenberger, R., Pashley, D. H., Prati, C. & Tay, F. R. (2005). A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomaterials*, 26(9), 1035–1042.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.04.003>

Carvalho, R. M., Pegoraro, T. A., Tay, F. R., Pegoraro, L. F., Silva, N. R. F. A., & Pashley, D. H. (2004). Adhesive permeability affects coupling of resin cements that

- utilise self-etching primers to dentine. *Journal of Dentistry*, 32(1), 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2003.08.003>
- Chen, C., Niu, L.-N., Xie, H., Zhang, Z.-Y., Zhou, L.-Q., Jiao, K., ... Tay, F. R. (2015). Bonding of universal adhesives to dentine – Old wine in new bottles? *Journal of Dentistry*, 43(5), 525–536. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.03.004>
- De Munck, J., Van Landuyt, K., Peumans, M., Poitevin, A., Lambrechts, P., Braem, M., & Van Meerbeek, B. (2005). A Critical Review of the Durability of Adhesion to Tooth Tissue: Methods and Results. *Journal of Dental Research*, 84(2), 118–132. <https://doi.org/10.1177/154405910508400204>
- De Munck, J., Van Meerbeek, B., Yoshida, Y., Inoue, S., Suzuki, K., & Lambrechts, P. (2004). Four-year water degradation of a resin-modified glass-ionomer adhesive bonded to dentin. *European Journal of Oral Sciences*, 112(1), 73–83. <https://doi.org/10.1111/j.0909-8836.2004.00089.x>
- Elkaffas, A. A., Hamama, H. H. H., & Mahmoud, S. H. (2018). Do universal adhesives promote bonding to dentin? A systematic review and meta-analysis. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 43(3), 1–13. <https://doi.org/10.5395/rde.2018.43.e29>
- Engelmann, J., Leyhausen, G., Leibfritz, D., & Geurtsen, W. (2002). Effect of TEGDMA on the intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*, 63(6), 746–751. <https://doi.org/10.1002/jbm.10465>
- Fukegawa, D., Hayakawa, S., Yoshida, Y., Suzuki, K., Osaka, A., & Van Meerbeek, B. (2006). Chemical Interaction of Phosphoric Acid Ester with Hydroxyapatite. *Journal of Dental Research*, 85(10), 941–944. <https://doi.org/10.1177/154405910608501014>
- Goldberg, M. (2011). Dentin structure composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience*, E3(2), 281. <https://doi.org/10.2741/e281>

- Gotliv, B.-A., & Veis, A. (2007). Peritubular Dentin, a Vertebrate Apatitic Mineralized Tissue without Collagen: Role of a Phospholipid-Proteolipid Complex. *Calcified Tissue International*, 81(3), 191–205. <https://doi.org/10.1007/s00223-007-9053-x>
- Gwinnett, A. J., & Matsui, A. (1967). A study of enamel adhesives. *Archives of Oral Biology*, 12(12), 1615-IN46. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(67\)90195-1](https://doi.org/10.1016/0003-9969(67)90195-1)
- Hashimoto, M., Ito, S., Tay, F. R., Svizero, N. R., Sano, H., Kaga, M., & Pashley, D. H. (2004). Fluid Movement across the Resin-Dentin Interface during and after Bonding. *Journal of Dental Research*, 83(11), 843–848. <https://doi.org/10.1177/154405910408301104>
- Hebling, J., Pashley, D. H., Tjäderhane, L., & Tay, F. R. (2005). Chlorhexidine Arrests Subclinical Degradation of Dentin Hybrid Layers in vivo. *Journal of Dental Research*, 84(8), 741–746. <https://doi.org/10.1177/154405910508400811>
- Hosaka, K., Nishitani, Y., Tagami, J., Yoshiyama, M., Brackett, W. W., Agee, K. A., Pashley, D. H. (2009). Durability of Resin-Dentin Bonds to Water- vs. Ethanol-saturated Dentin. *Journal of Dental Research*, 88(2), 146–151. <https://doi.org/10.1177/0022034508328910>
- Huang, X., Li, L., Huang, C., & Du, X. (2011). Effect of ethanol-wet bonding with hydrophobic adhesive on caries-affected dentine. *European Journal of Oral Sciences*, 119(4), 310–315. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2011.00830.x>
- Imbeni, V., Kruzic, J. J., Marshall, G. W., Marshall, S. J., & Ritchie, R. O. (2005). The dentin–enamel junction and the fracture of human teeth. *Nature Materials*, 4(3), 229–232. <https://doi.org/10.1038/nmat1323>
- Jacobsen, T., & Söderholm, K.-J. (1995). Some effects of water on dentin bonding. *Dental Materials*, 11(2), 132–136. [https://doi.org/10.1016/0109-5641\(95\)80048-4](https://doi.org/10.1016/0109-5641(95)80048-4)
- Kanca, J. (1992). Improving Bond Strength Through Acid Etching of Dentin and Bonding to Wet Dentin Surfaces. *The Journal of the American Dental Association*, 123(9),

35–43. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1992.0248>

Kim, J., Uchiyama, T., Carrilho, M., Agee, K. A., Mazzoni, A., Breschi, L., Pashley, D. H. (2010). Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. *Dental Materials*, 26(8), 771–778. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.04.001>

Komori, P. C. P., Pashley, D. H., Tjäderhane, L., Breschi, L., Mazzoni, A., de Goes, M. F., ... Carrilho, M. R. (2009). Effect of 2% Chlorhexidine Digluconate on the Bond Strength to Normal Versus Caries-affected Dentin. *Operative Dentistry*, 34(2), 157–165. <https://doi.org/10.2341/08-55>

Koshiro, K., Sidhu, S. K., Inoue, S., Ikeda, T., & Sano, H. (2006). New concept of resin-dentin interfacial adhesion: The nanointeraction zone. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 77B(2), 401–408. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30450>

Laswell, H. R., Welk, D. A., & Regenos, J. W. (1971). Attachment of Resin Restorations to Acid Pretreated Enamel. *The Journal of the American Dental Association*, 82(3), 558–563. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1971.0104>

Li, F., Liu, X.-Y., Zhang, L., Kang, J.-J., & Chen, J.-H. (2012). Ethanol-wet bonding technique may enhance the bonding performance of contemporary etch-and-rinse dental adhesives. *The Journal of Adhesive Dentistry*, 14(2), 113–120. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a21853>

Liu, Y., Tjäderhane, L., Breschi, L., Mazzoni, A., Li, N., Mao, J., ... Tay, F. R. (2011). Limitations in Bonding to Dentin and Experimental Strategies to Prevent Bond Degradation. *Journal of Dental Research*, 90(8), 953–968. <https://doi.org/10.1177/0022034510391799>

Loguercio, A. D., Stanislawczuk, R., Polli, L. G., Costa, J. A., Michel, M. D., & Reis, A. (2009). Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. *European Journal of Oral Sciences*, 117(5),

587–596. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2009.00663.x>

Lopes, G., Vieira, L., Monteiro, S. J., Caldeira de Andrada, M., & Baratieri, C. (2003). Dentin bonding: effect of degree of mineralization and acid etching time. *Operative Dentistry*, 28(4), 429–439.

Mazzoni, A., Pashley, D. H., Nishitani, Y., Breschi, L., Mannello, F., Tjäderhane, L., Tay, F. R. (2006). Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials*, 27(25), 4470–4476. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.040>

Mazzoni, A., Pashley, D. H., Ruggeri, A., Vita, F., Falconi, M., Di Lenarda, R., & Breschi, L. (2008). Adhesion to chondroitinase ABC treated dentin. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 86B(1), 228–236. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31010>

Meerbeek, B. van, Landuyt, K. van, Munck, J. de, Hashimoto, M., Peumans, M., Lambrechts, P., ... Suzuki, K. (2005). Technique-Sensitivity of Contemporary Adhesives. *Dental Materials Journal*, 24(1), 1–13. <https://doi.org/10.4012/dmj.24.1>

Mertz-Fairhurst, E. J., Curtis, J. W., Ergle, J. W., Rueggeberg, F. A., & Adair, S. M. (1998). Ultraconservative and cariostatic sealed restorations: results at year 10. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 129(1), 55–66. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1998.0022>

Milan, A. M., Sugars, R. V., Embery, G., & Waddington, R. J. (2005). Modulation of Collagen Fibrillogenesis by Dentinal Proteoglycans. *Calcified Tissue International*, 76(2), 127–135. <https://doi.org/10.1007/s00223-004-0033-0>

Mortazavi, V., Samimi, P., Rafizadeh, M., & Kazemi, S. (2012). A randomized clinical trial evaluating the success rate of ethanol wet bonding technique and two adhesives. *Dental Research Journal*. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.104878>

Muñoz, M., Luque-Martinez, I., Malaquias, P., Hass, V., Reis, A., Campanha, N., &

- Loguercio, A. (2015). In Vitro Longevity of Bonding Properties of Universal Adhesives to Dentin. *Operative Dentistry*, 40(3), 282–292. <https://doi.org/10.2341/14-055-L>
- Nakabayashi, N., Kojima, K., & Masuhara, E. (1982). The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *Journal of Biomedical Materials Research*, 16(3), 265–273. <https://doi.org/10.1002/jbm.820160307>
- Nishitani, Y., Yoshiyama, M., Donnelly, A. M., Agee, K. A., Sword, J., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2006). Effects of Resin Hydrophilicity on Dentin Bond Strength. *Journal of Dental Research*, 85(11), 1016–1021. <https://doi.org/10.1177/154405910608501108>
- Ortengren, U., Wellendorf, H., Karlsson, S., & Ruyter, I. E. (2001). Water sorption and solubility of dental composites and identification of monomers released in an aqueous environment. *Journal of Oral Rehabilitation*, 28(12), 1106–1115. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2842.2001.00802.x>
- Osorio, E., Toledano, M., Aguilera, F. S., Tay, F. R., & Osorio, R. (2010). Ethanol Wet-bonding Technique Sensitivity Assessed by AFM. *Journal of Dental Research*, 89(11), 1264–1269. <https://doi.org/10.1177/0022034510376403>
- Osorio, R., Erhardt, M. C. G., Pimenta, L. A. F., Osorio, E., & Toledano, M. (2005). EDTA Treatment Improves Resin-Dentin Bonds' Resistance to Degradation. *Journal of Dental Research*, 84(8), 736–740. <https://doi.org/10.1177/154405910508400810>
- Pashley, D. H., Tay, F. R., Breschi, L., Tjäderhane, L., Carvalho, R. M., Carrilho, M., & Tezvergil-Mutluay, A. (2011). State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dental Materials*, 27(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.016>
- Pashley, D. H., Tay, F. R., Breschi, L., Tjäderhane, L., Carvalho, R. M., Carrilho, M., & Tezvergil-Mutluay, A. (2011). State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dental Materials*, 27(1), 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.016>

- Pashley, D. H., Tay, F. R., Carvalho, R. M., Rueggeberg, F. A., Agee, K. A., Carrilho, M., ... García-Godoy, F. (2007). From dry bonding to water-wet bonding to ethanol-wet bonding. A review of the interactions between dentin matrix and solvated resins using a macromodel of the hybrid layer. *American Journal of Dentistry*, 20(1), 7–20.
- Pashley, D. H., Tay, F. R., Yiu, C., Hashimoto, M., Breschi, L., Carvalho, R. M., & Ito, S. (2004). Collagen Degradation by Host-derived Enzymes during Aging. *Journal of Dental Research*, 83(3), 216–221. <https://doi.org/10.1177/154405910408300306>
- Paul, S. J., Leach, M., Rueggeberg, F. A., & Pashley, D. H. (1999). Effect of water content on the physical properties of model dentine primer and bonding resins. *Journal of Dentistry*, 27(3), 209–214. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(98\)00042-6](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(98)00042-6)
- Perdigão, J., Geraldeli, S., & Hodges, J. S. (2003). Total-etch versus self-etch adhesive: effect on postoperative sensitivity. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 134(12), 1621–1629. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2003.0109>
- Pereira, G. D., Paulillo, L. a, De Goes, M. F., & Dias, C. T. (2001). How wet should dentin be? Comparison of methods to remove excess water during moist bonding. *The Journal of Adhesive Dentistry*, 3(3), 257–264.
- Peumans, M., De Munck, J., Van Landuyt, K. L., Poitevin, A., Lambrechts, P., & Van Meerbeek, B. (2010). Eight-year clinical evaluation of a 2-step self-etch adhesive with and without selective enamel etching. *Dental Materials*, 26(12), 1176–1184. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.08.190>
- Peumans, M., Kanumilli, P., De Munck, J., Van Landuyt, K., Lambrechts, P., & Van Meerbeek, B. (2005). Clinical effectiveness of contemporary adhesives: a systematic review of current clinical trials. *Dental Materials : Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 21(9), 864–881. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2005.02.003>
- Sadek, F. T., Castellán, C. S., Braga, R. R., Mai, S., Tjäderhane, L., Pashley, D. H., &

- Tay, F. R. (2010). One-year stability of resin–dentin bonds created with a hydrophobic ethanol-wet bonding technique. *Dental Materials*, 26(4), 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.12.009>
- Sadek, F. T., Pashley, D. H., Ferrari, M., & Tay, F. R. (2007). Tubular occlusion optimizes bonding of hydrophobic resins to dentin. *Journal of Dental Research*, 86(6), 524–528. <https://doi.org/10.1177/154405910708600607>
- Sadek, F. T., Pashley, D. H., Nishitani, Y., Carrilho, M. R., Donnelly, A., Ferrari, M., & Tay, F. R. (2008). Application of hydrophobic resin adhesives to acid-etched dentin with an alternative wet bonding technique. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 84A(1), 19–29. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31290>
- Sano, H., Shono, T., Sonoda, H., Takatsu, T., Ciucchi, B., Carvalho, R., & Pashley, D. H. (1994). Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength — Evaluation of a micro-tensile bond test. *Dental Materials*, 10(4), 236–240. [https://doi.org/10.1016/0109-5641\(94\)90067-1](https://doi.org/10.1016/0109-5641(94)90067-1)
- Sauro, S., Mannocci, F., Toledano, M., Osorio, R., Pashley, D. H., & Watson, T. F. (2009). EDTA or H3PO4/NaOCl dentine treatments may increase hybrid layers' resistance to degradation: A microtensile bond strength and confocal-micropermeability study. *Journal of Dentistry*, 37(4), 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2008.12.002>
- Sauro, S., Watson, T. F., Mannocci, F., Miyake, K., Huffman, B. P., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2008). Two-photon laser confocal microscopy of micropermeability of resin-dentin bonds made with water or ethanol wet bonding. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 90B(1), 327–337. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31290>
- Sauro, S., Watson, T. F., Mannocci, F., Miyake, K., Huffman, B. P., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2009). Two-photon laser confocal microscopy of micropermeability of resin-dentin bonds made with water or ethanol wet bonding. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 90 B(1), 327–337.

<https://doi.org/10.1002/jbm.b.31290>

Scott, J. E., & Thomlinson, A. M. (1998). The structure of interfibrillar proteoglycan bridges (shape modules') in extracellular matrix of fibrous connective tissues and their stability in various chemical environments. *Journal of Anatomy*, 192 (Pt 3(3)), 391–405. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1998.19230391.x>

Shin, T. P., Yao, X., Huenergardt, R., Walker, M. P., & Wang, Y. (2009). Morphological and chemical characterization of bonding hydrophobic adhesive to dentin using ethanol wet bonding technique. *Dental Materials*, 25(8), 1050–1057. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.03.006>

Sideridou, I. (2003). Study of water sorption, solubility and modulus of elasticity of light-cured dimethacrylate-based dental resins. *Biomaterials*, 24(4), 655–665. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00380-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00380-0)

Souza Júnior, M. H. S. (2015). Is the Ethanol Wet-bonding Technique a Promising One? *Int. J. Odontostomat.*, 9(3), 463–468.

Spencer, P., & Wang, Y. (2002). Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *Journal of Biomedical Materials Research*, 62(3), 447–456. <https://doi.org/10.1002/jbm.10364>

Spencer, P., Ye, Q., Misra, A., Goncalves, S. E. P., & Laurence, J. S. (2014). Proteins, pathogens, and failure at the composite-tooth interface. *Journal of Dental Research*, 93(12), 1243–1249. <https://doi.org/10.1177/0022034514550039>

Stanislawczuk, R., Amaral, R. C., Zander-Grande, C., Gagler, D., Reis, A., & Loguercio, A. D. (2009). Chlorhexidine-containing Acid Conditioner Preserves the Longevity of Resin-dentin Bonds. *Operative Dentistry*, 34(4), 481–490. <https://doi.org/10.2341/08-016-L>

Suppa, P., Breschi, L., Ruggeri, A., Mazzotti, G., Prati, C., Chersoni, S., ... Tay, F. R. (2005). Nanoleakage within the hybrid layer: A correlative FEISEM/TEM

- investigation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 73B(1), 7–14. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30217>
- Tay, F. R., Frankenberger, R., Krejci, I., Bouillaguet, S., Pashley, D. H., Carvalho, R. M., & Lai, C. N. S. (2004). Single-bottle adhesives behave as permeable membranes after polymerization. I. In vivo evidence. *Journal of Dentistry*, 32(8), 611–621. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2004.04.006>
- Tay, F. R., Gwinnett, J. A., & Wei, S. H. Y. (1996). Micromorphological spectrum from overdrying to overwetting acid-conditioned dentin in water-free, acetone-based, single-bottle primer/adhesives. *Dental Materials*, 12(4), 236–244. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(96\)80029-7](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(96)80029-7)
- Tay, F. R., Hashimoto, M., Pashley, D. H., Peters, M. C., Lai, S. C. N., Yiu, C. K. Y., & Cheong, C. (2003). Aging affects two modes of nanoleakage expression in bonded dentin. *Journal of Dental Research*, 82(7), 537–541. <https://doi.org/10.1177/154405910308200710>
- Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2003). Have dentin adhesives become too hydrophilic? *Journal (Canadian Dental Association)*, 69(11), 726–731. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(03\)00110-6](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(03)00110-6)
- Tay, F. R., Pashley, D. H., Kapur, R. R., Carrilho, M. R. O., Hur, Y. B., Garrett, L. V., & Tay, K. C. Y. (2007). Bonding BisGMA to Dentin—a Proof of Concept for Hydrophobic Dentin Bonding. *Journal of Dental Research*, 86(11), 1034–1039. <https://doi.org/10.1177/154405910708601103>
- Tersariol, I. L., Geraldeli, S., Minciotti, C. L., Nascimento, F. D., Pääkkönen, V., Martins, M. T., ... Salo, T. (2010). Cysteine Cathepsins in Human Dentin-Pulp Complex. *Journal of Endodontics*, 36(3), 475–481. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.12.034>
- Thornton, G. M., Schwab, T. D., & Oxland, T. R. (2007). Fatigue is More Damaging than Creep in Ligament Revealed by Modulus Reduction and Residual Strength. *Annals of Biomedical Engineering*, 35(10), 1713–1721. <https://doi.org/10.1007/s10439->

007-9349-z

- Van der Rest, M., & Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. *The FASEB Journal*, 5(13), 2814–2823. <https://doi.org/10.1096/fasebj.5.13.1916105>
- Van Landuyt, K. L., Mine, A., De Munck, J., Coutinho, E., Peumans, M., Jaecques, S., ... Van Meerbeek, B. (2008). Technique sensitivity of water-free one-step adhesives. *Dental Materials*, 24(9), 1258–1267. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2008.02.003>
- Van Landuyt, K. L., Snauwaert, J., De Munck, J., Coutinho, E., Poitevin, A., Yoshida, Y., ... Van Meerbeek, B. (2007). Origin of Interfacial Droplets with One-step Adhesives. *Journal of Dental Research*, 86(8), 739–744. <https://doi.org/10.1177/154405910708600810>
- Van Landuyt, K. L., Yoshida, Y., Hirata, I., Snauwaert, J., De Munck, J., Okazaki, M., ... Van Meerbeek, B. (2008). Influence of the Chemical Structure of Functional Monomers on Their Adhesive Performance. *Journal of Dental Research*, 87(8), 757–761. <https://doi.org/10.1177/154405910808700804>
- Van Meerbeek, B., De Munck, J., Yoshida, Y., Inoue, S., Vargas, M., Vijay, P., Vanherle, G. (2006). Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Operative Dentistry*, 28(3), 215–235.
- Van Meerbeek, B., Peumans, M., Poitevin, A., Mine, A., Van Ende, A., Neves, A., & De Munck, J. (2010). Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dental Materials*, 26(2), e100–e121. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.11.148>
- Van Meerbeek, B., Yoshihara, K., Yoshida, Y., Mine, A., J., D. M., & K.L., V. L. (2011). State of the art of self-etch adhesives. *Dental Materials*, 27(1), 17–28. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.023>
- Visse, R., & Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation Research*,

92(8), 827–839. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000070112.80711.3D>

Wagner, A., Wendler, M., Petschelt, A., Belli, R., & Lohbauer, U. (2014). Bonding performance of universal adhesives in different etching modes. *Journal of Dentistry*, 42(7), 800–807. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.04.012>

Wang, T., Nikaido, T., & Nakabayashi, N. (1991). Photocure bonding agent containing phosphoric methacrylate. *Dental Materials*, 7(1), 59–62. [https://doi.org/10.1016/0109-5641\(91\)90029-X](https://doi.org/10.1016/0109-5641(91)90029-X)

Weiner, S., Veis, A., Beniash, E., Arad, T., Dillon, J. W., Sabsay, B., & Siddiqui, F. (1999). Peritubular Dentin Formation: Crystal Organization and the Macromolecular Constituents in Human Teeth. *Journal of Structural Biology*, 126(1), 27–41. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1999.4096>

Xu, C., & Wang, Y. (2012). Chemical composition and structure of peritubular and intertubular human dentin revisited Changqi. *Archives of Oral Biology*, 57(4), 383–391. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.09.008>.

Ye, Q., Park, J. G., Topp, E., Wang, Y., Misra, A., & Spencer, P. (2008). In vitro Performance of Nano-heterogeneous Dentin Adhesive. *Journal of Dental Research*, 87(9), 829–833. <https://doi.org/10.1177/154405910808700911>

Yiu, C. K. Y., King, N. M., Carrilho, M. R. O., Sauro, S., Rueggeberg, F. A., Prati, C., ... Tay, F. R. (2006). Effect of resin hydrophilicity and temperature on water sorption of dental adhesive resins. *Biomaterials*, 27(9), 1695–1703. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.09.037>

Yiu, C. K. Y., King, N. M., Pashley, D. H., Suh, B. I., Carvalho, R. M., Carrilho, M. R. O., & Tay, F. R. (2004). Effect of resin hydrophilicity and water storage on resin strength. *Biomaterials*, 25(26), 5789–5796. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.026>

Yoshida, Y., Nagakane, K., Fukuda, R., Nakayama, Y., Okazaki, M., Shintani, H., ...

Van Meerbeek, B. (2004). Comparative Study on Adhesive Performance of Functional Monomers. *Journal of Dental Research*, 83(6), 454–458. <https://doi.org/10.1177/154405910408300604>

Yoshida, Y., Yoshihara, K., Nagaoka, N., Hayakawa, S., Torii, Y., Ogawa, T., Meerbeek, B. Van. (2012). Self-assembled nano-layering at the adhesive interface. *Journal of Dental Research*, 91(4), 376–381. <https://doi.org/10.1177/0022034512437375>

Yoshihara, K., Yoshida, Y., Hayakawa, S., Nagaoka, N., Irie, M., Ogawa, T., ... Van Meerbeek, B. (2011). Nanolayering of phosphoric acid ester monomer on enamel and dentin. *Acta Biomaterialia*, 7(8), 3187–3195. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.04.026>

Zhang, S., & Kern, M. (2009). The Role of Host-derived Dentinal Matrix Metalloproteinases in Reducing Dentin Bonding of Resin Adhesives. *International Journal of Oral Science*, 1(4), 163–176. <https://doi.org/10.4248/IJOS.09044>