



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**PRINCIPAIS ESTRATÉGIAS CONTRA A DEGRADAÇÃO DA
CAMADA HÍBRIDA EM DENTISTERIA ADESIVA - REVISÃO
SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE EM REDE**

Trabalho submetido por
Isabel Cabral Pessanha Alcoforado Cunha e Sá
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

setembro de 2020



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**PRINCIPAIS ESTRATÉGIAS CONTRA A DEGRADAÇÃO DA
CAMADA HÍBRIDA EM DENTISTERIA ADESIVA - REVISÃO
SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE EM REDE**

Trabalho submetido por
Isabel Cabral Pessanha Alcoforado Cunha e Sá
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Ana Cristina Mano Azul

e coorientado por
Mestre Paulo Sobral Mascarenhas
Mestre Tomás Amorim Afonso

setembro de 2020

Agradecimentos

À Prof. Doutora Ana Mano Azul por me ter acompanhado ao longo do curso e ter despertado o meu interesse e curiosidade pela dentisteria, pelo seu apoio e disponibilidade permanente e especialmente pelo seu sentido de humor incomparável que tornou a realização deste trabalho mais leve.

Ao meu coorientador Mestre Paulo Mascarenhas, por ter estado sempre presente e pronto a ajudar, pela sua paciência sem limites, boa disposição e atitude positiva.

Ao Mestre Tomás Amorim por ter confiado neste estudo e no meu trabalho, pelo seu incentivo e motivação constante e por me ter ensinado a ser mais ambiciosa e tentar sempre ser melhor.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz por estes cinco anos onde tive oportunidade de aprender, crescer e onde conheci pessoas que levo para o resto da vida.

À minha família, Bernardo e Zé Diogo por me fazerem querer ser melhor todos os dias e darem sentido à minha vida. Tudo o que faço é por vocês.

Aos meus pais, pelo apoio, amor e confiança incondicional que me deram ao longo deste curso e ao longo de toda a minha vida, por serem um exemplo em todos os sentidos e por nunca me deixarem desistir. Às minhas irmãs e sobrinhos por estarem sempre do meu lado e sempre disponíveis nos bons e maus momentos.

Aos meus avós que me ensinaram o verdadeiro sentido da palavra “família” e terem incentivado sem reticências o meu percurso académico.

Aos meus parceiros de box, Mar, Leonor e Tiago que tornaram a minha experiência na clínica inesquecível, por terem sido presenças constantes na alegria e na tristeza e sobretudo por se terem tornado amigos verdadeiros.

Ao António Delgado e à Teresa Pinheiro de Melo por me terem ajudado a organizar ideias, por terem estado incondicionalmente disponíveis e especialmente por serem quem são. São um exemplo para mim, tanto a nível profissional como humano.

Às minhas amigas Madalena, Matilde e Inês por todas as memórias que já criámos e pelas que ainda vamos criar, pelo apoio em todos os momentos mais frágeis e por todos os momentos felizes que me proporcionaram. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Resumo

Introdução: As restaurações dentárias adesivas sofrem degradação da camada híbrida ao longo do tempo. Atualmente existem vários estudos dedicados à degradação enzimática, mas poucos exploram as estratégias de prevenção da degradação hidrolítica. A degradação hidrolítica é uma das principais responsáveis pela deterioração da camada híbrida.

Objetivo: Avaliar tratamentos que pretendem prevenir a degradação hidrolítica na camada híbrida da dentina, comparando os resultados imediatos e a longo prazo da resistência adesiva das diferentes intervenções.

Materiais e Métodos: A pesquisa da revisão sistemática foi realizada através de 5 bases de dados: *PubMed/Medline; Scopus; Web of Science; Open Grey e Mednar*, tendo sido selecionadas referências dos últimos 6 anos. Avaliou-se o risco de viés nos 11 estudos incluídos na revisão sistemática e foram selecionados 9 estudos para a meta-análise em rede.

Resultados: A técnica *etanol wet bonding* (EWB), quando utilizada em combinação com o inibidor enzimático riboflavina, demonstrou melhores resultados na preservação da resistência adesiva que os outros tratamentos analisados ($p < 0.001$). A estratégia *etch-and-rinse* mostrou ser mais eficaz na manutenção da interface adesiva quando realizada juntamente com DMSO a 50% ($p = 0.014$).

Conclusão: A utilização de estratégias de desidratação influenciou positivamente os resultados da resistência adesiva a longo prazo. A combinação de EWB com inibidores enzimáticos como a riboflavina parece ser a estratégia que tem mais capacidade de estabilizar a interface adesiva. É essencial a realização de mais estudos para uma possível futura aplicação clínica.

Palavras-chave: adesivos; adesão dentária; hidrólise; revisão sistemática

Abstract

Introduction: Adhesive restorations are prone to degradation within the hybrid layer (HL), which is persistently described as the weakest link. A lot of research has been dedicated to enzymatic breakdown; however, few studies have focused on strategies to prevent hydrolytic degradation, which is still one of the major reasons of HL deterioration.

Objective: To evaluate treatments that deem to prevent hydrolysis within the hybrid layer, by comparing immediate vs. long-term bond strength results of different interventions.

Materials and Methods: The systematic review research was carried out through 5 databases: Pubmed/Medline; Scopus; Web of Science; Open Gray and Mednar. References were selected from the last 6 years. The risk of bias was assessed in the 11 studies included in the systematic review and 9 studies were selected for the network meta-analysis.

Results: The ethanol wet bonding technique (EWB) when used in combination with the enzymatic inhibitors riboflavin ($p < 0.001$), showed better results compared to other treatments. DMSO with 50% concentration applied together with the etch-and-rinse strategy has also shown to be statistically different from the control group ($p = 0.014$).

Conclusion: The use of dehydration strategies positively influenced the results of long-term bond strength. The combination of EWB with enzyme inhibitors such as riboflavin seems to be the strategy that has the best ability to stabilize the adhesive interface. Further studies are essential for possible future clinical applications.

Keywords: adhesives; dental bonding; hydrolysis; systematic review

Índice geral

I. Introdução	13
1. Dentina	13
1.1. Características, estrutura e tipos	13
2. Adesão à dentina.....	14
2.1. Dentina como substrato adesivo	14
2.2. Sistemas adesivos.....	15
3. Degradação da interface adesiva	17
3.1. Formação e características da camada híbrida	17
3.2. Mecanismos de degradação da interface adesiva	17
3.3. Estratégias de inibição da degradação da interface adesiva	18
3.4. Investigação da degradação da camada híbrida.....	20
4. Objetivos	20
II. Materiais e métodos	21
1. Pesquisa sistemática.....	21
2. Critérios de inclusão e exclusão	21
3. Seleção dos estudos e extração de dados	22
4. Análise estatística	23
4.1. Avaliação da resistência imediata	24
4.2. Avaliação da inibição da degradação hidrolítica a longo prazo	24
III. Resultados	27
1. Estratégia de pesquisa	27
2. Sumário dos estudos - Revisão sistemática	28
2.1. Métodos de envelhecimento	28
2.2. Risco de viés - Resultados	28
3. Meta-análise	32
3.1. Meta-análise da resistência adesiva no imediato	32
3.1.1. Comparação com controlo.....	34
3.1.2. Comparação entre intervenções	35

3.2. Meta-análise da resistência adesiva a longo prazo	35
3.2.1. Comparação com controlo.....	36
3.2.2. Comparação entre as intervenções.....	36
IV. Discussão	39
V. Conclusão.....	45
VI. Bibliografia	47

Índice de figuras

Figura 1. Fluxograma de acordo com o PRISMA.....	27
Figura 2. <i>Traffic light plot (RobVis tool)</i> para análise de risco de viés construído com resposta SIM/NÃO a sete domínios.	32
Figura 3. Gráfico de folha (<i>forest plot</i>) de resistência adesiva imediata (24h) consoante as diferenças médias estandardizadas.	33
Figura 4. Gráfico de folha (<i>forest plot</i>) de subgrupo para estratégia isolada (<i>Single</i>) versus combinada (<i>Hybrid</i>) da resistência adesiva imediata (24h).....	34
Figura 5. Gráfico de folha (<i>forest plot</i>) de resistência adesiva a longo prazo consoante as médias estandardizadas.....	35
Figura 6. Gráfico de folha (<i>forest plot</i>) de subgrupo para estratégia isolada (<i>Single</i>) versus combinada (<i>Hybrid</i>) da resistência adesiva ao longo do tempo.....	36
Figura 7. Gráfico de <i>Galbraith</i> relativo à heterogeneidade dos resultados imediatos (24h) da resistência adesiva.....	37
Figura 8. Gráfico de <i>Galbraith</i> relativo à heterogeneidade dos resultados a longo prazo da resistência adesiva.....	37

Índice de tabelas

Tabela 1. Palavras-chave utilizadas para pesquisa sistemática nas diferentes bases de dados.....	21
Tabela 2. Critérios de inclusão e exclusão aplicados na pesquisa para revisão sistemática.....	22
Tabela 3. Resumo dos estudos incluídos na revisão sistemática.....	29

Lista de siglas

10-MDP - 10-Metacriloiloxidecil dihidrogenofosfato

BAI - baicaleína

Bis-GMA - bisfenol glicidil metacrilato

CC - catepsinas de cisteína

CD - carbodiimida

CHX - clorohexidina

DMSO - dimetilsulfóxido

E&R – etch-and-rinse

EWB - ethanol wet bonding

GD - glutaraldeído

HEMA - 2-hidroxietil metacrilato

MMP - Metaloproteínases

PAA - proantociadininas

RBF - riboflavina

SE - self-etch

TEGDMA - dimetacrilato de trietileno glicol

WWB - water wet bonding

SMD - diferenças médias estandardizadas

I. Introdução

1. Dentina

1.1. Características, estrutura e tipos

A dentina é uma matriz de colagénio mineralizada, cuja composição varia em diferentes áreas do dente, influenciada por diversos fatores como a proximidade ao tecido pulpar, ou a presença de lesões causadas por cárie, provocando a desmineralização da matriz (Breschi et al., 2018). Estas alterações podem influenciar não só as propriedades mecânicas, como a capacidade de adesão de materiais restauradores ao substrato dentinário. Aproximadamente 50% do peso da dentina é mineral, 30% é composto por colagénio tipo I e proteínas não colagénicas e 20% é composto por água (Goldberg et al., 2011; Breschi et al., 2018).

A dentina é considerada um tecido vivo com a capacidade de reagir tanto a estímulos patológicos como fisiológicos. Encontramos três tipos de dentina no dente: a dentina primária, a secundária e a terciária. A dentina primária ou dentina circumpulpar é a camada que circunda a câmara pulpar e é o tipo de dentina mais abundante no dente. A camada mais externa da dentina primária, que se encontra mais próxima do esmalte e cemento, é denominada dentina do manto, e difere da restante dentina primária por apresentar uma estrutura de mineralização divergente (Nanci, 2017). A dentina secundária constitui uma continuação da dentina primária, e embora mais irregular e com estrutura tubular, a composição de material orgânico e mineral não se altera (Ritter, 2019). Ao longo da vida, os túbulos da dentina secundária preenchem-se com material calcificado, reduzindo a sua permeabilidade e desta forma protegendo a polpa (Ghazali, 2003; Nanci, 2017). A dentina terciária, também reconhecida como dentina reparadora ou reacional, é produzida apenas quando ocorrem estímulos, como por exemplo cárie. Estes estímulos provocam reações locais nas células afetadas (Mjör, 2009). A formação desta dentina vai depender da força e longevidade do estímulo aplicado, fatores que determinam a quantidade de dentina que irá ser produzida. A dentina terciária pode ainda ser subclassificada em dentina reacional, quando se deposita em células

odontoblásticas já existentes, e dentina reparadora, quando se forma através de odontoblastos diferenciados recentes (Nanci, 2017; Ritter, 2019).

A dentina é composta por uma rede de túbulos compacta que une a polpa à junção amelodentinária. Estes túbulos encontram-se preenchidos por fluido dentinário que se movimenta no seu interior causando pressão pulpar (Ritter, 2019). Quando a dentina se encontra exposta, após a preparação mecânica do dente, o fluido dentinário que se encontra no interior dos túbulos chega à superfície, humedecendo o substrato e tornando-o intrinsecamente hidrofílico (Cardoso et al., 2011).

2. Adesão à dentina

2.1. Dentina como substrato adesivo

A adesão é a força de atração que ocorre entre moléculas de dois substratos diferentes no momento em que se unem. A adesão pode ocorrer quimicamente por pontes de hidrogénio, ligações covalentes ou ligações de *Van Der Waals*, mecanicamente através de interligação estrutural ou através da combinação das mesmas (Anusavice et al., 2013).

Idealmente, a adesão à dentina consiste numa troca do conteúdo mineral por monómeros de resina, criando um biocompósito entre a resina composta e o colagénio da dentina, com a formação da chamada camada híbrida, que resulta numa união permanente entre os dois substratos (Tjäderhane, 2015). Esta troca é sempre incompleta, originando espaços e lacunas que não são preenchidos, não permitindo um tratamento restaurador perfeitamente biomimético. Os agentes de adesão dentária são desenvolvidos de forma a criar ligações fortes entre o material restaurador e a estrutura dentária remanescente para que possam resistir às forças mecânicas naturais. Estes agentes dependem da interligação micromecânica, adesão química dos diferentes substratos e da copolimerização entre a matriz orgânica de resina dos materiais restauradores (Anusavice et al., 2013).

A adesão à dentina é um processo que apresenta um desafio devido à sua estrutura, composição e heterogeneidade (Cardoso et al., 2011). A grande quantidade de água e matéria orgânica na dentina tornam-na num substrato intrinsecamente hidrofílico. Esta hidrofilicidade constitui um dos maiores desafios da adesão dentinária, assim como a camada de detritos que se forma após a instrumentação do dente, conhecida como *smear*

layer. Esta camada causa obstrução dos túbulos dentinários, criam-se *smear plugs*, o que torna a interdifusão de monómeros de resina na dentina mais complexa (Perdigão, 2010). A *smear layer* atua como uma barreira física e reduz substancialmente a permeabilidade dentinária. As estratégias adesivas atuais, focam-se na interação entre os sistemas adesivos e a *smear layer*, tendo duas ações possíveis, a dissolução ou permeabilização da mesma (Sezinando, 2014). A grande dificuldade de produzir uma adesão fiável e duradoura ao tecido dentinário levou ao desenvolvimento das diversas estratégias adesivas disponíveis atualmente (Cardoso et al., 2011).

2.2. Sistemas adesivos

O condicionamento ácido provoca uma dissolução do tecido duro superficial e cria microporosidades que são impregnadas por agentes adesivos (Buonocore, 1955).

A adesão à dentina pode ser realizada através da utilização de sistemas adesivos *etch-and-rinse* (E&R) (de dois e três passos), por sistemas *self-etch* (SE) (de um ou dois passos) ou sistemas adesivos universais. Todos os tipos de sistemas têm o mesmo objetivo de infiltração de resina adesiva na matriz de colagénio desmineralizada pelo condicionamento ácido (Tjäderhane, 2015; Vinagre & Ramos, 2016).

A utilização de um sistema *etch-and-rinse*, como o nome indica, pressupõe um passo de condicionamento ácido em separado, e respetiva lavagem, com o objetivo de remoção da *smear layer* provocada pela instrumentação do dente. Além da remoção da *smear layer*, o condicionamento ácido leva à desmineralização da superfície dentinária, numa profundidade que varia entre 4 e 6 micrómetros (Van Meerbeek et al., 1992; Eick et al., 1997; Sofan et al., 2017). Após a lavagem do agente condicionante a superfície dentária é secada com recurso a seringa de ar/água, sendo de seguida aplicado um *primer*, com o objetivo de promover a infiltração de uma resina fluida hidrofóbica, denominada de *bond*. Estes dois componentes podem ser encontrados num frasco só ou em frascos separados. Após a aplicação do sistema adesivo é crucial a sua fotopolimerização de modo a bloquear a entrada de água por osmose a partir da dentina subjacente (Van Meerbeek et al., 2020).

Os sistemas adesivos SE foram introduzidos para simplificar o processo clínico e facilitar a sensibilidade à técnica do operador no que concerne à humidade do substrato (Van

Meerbeek et al., 2011). Estes dispensam a lavagem após aplicação do ácido, já que este não se apresenta como um passo separado, mas sim em monómeros acídicos presentes numa solução que inclui o *primer* ou mesmo, o *primer* e o adesivo, agindo como agentes de condicionamento. A dentina é apenas parcialmente desmineralizada o que torna a microrretenção menos eficaz e penetra apenas a um micrómetro de profundidade. Os sistemas SE de um ou dois passos dispensam o ácido ortofosfórico e baseiam-se na aplicação de um *primer* acídico que modifica a camada de detritos, não a removendo na sua totalidade. Na técnica a dois passos, este infiltra-se no interior do substrato dentinário, sendo depois aplicado o agente adesivo. Os sistemas SE de um passo incorporam o *primer* acídico com o agente adesivo e são aplicados de uma só vez, pelo que clinicamente são os mais simples de utilizar (Sofan et al., 2017; Van Meerbeek et al., 2020).

Os sistemas adesivos universais ou multimodo (UA) são sistemas simplificados com diversas aplicações, podendo ser utilizados através das duas abordagens E&R e SE ou com uma técnica adicional que propõe o condicionamento ácido seletivo do esmalte (Perdigão & Loguercio, 2014). Os adesivos universais são fundamentalmente adesivos SE de um passo que podem ser utilizados através de várias estratégias diferentes. O que diferencia os SE de um passo e os adesivos universais é a incorporação do monómero 10-MDP na formulação da maior parte dos adesivos multimodo. O *primer* tem capacidade de se infiltrar devido à sua natureza hidrofílica, os monómeros acídicos incorporados não só condicionam como preparam o substrato dentinário para receber o agente adesivo. Este monómero liga-se através de adesão química à hidroxiapatite (Sezinando, 2014; Ritter, 2019). Outro fator a considerar é o facto dos adesivos simplificados atuarem como membranas semipermeáveis devido à sua hidrofiliabilidade, o que consequentemente leva a transudação de fluidos através da interface adesiva, ocorrendo degradação (Spencer et al., 2010; Perdigão & Loguercio, 2014). Os adesivos universais beneficiam quando é aplicada uma camada extra de resina hidrofóbica para aumentar a resistência adesiva imediata e a longo prazo (Sezinando, 2014). Após 12 meses de armazenamento em água estes adesivos demonstram degradação da resistência adesiva independentemente da estratégia utilizada (E&R ou SE); é provável que o padrão de degradação destes adesivos venha a ser o mesmo dos SE de um passo (Perdigão & Loguercio, 2014; Ritter, 2019).

3. Degradação da interface adesiva

3.1. Formação e características da camada híbrida

Em 1982, Nakabayashi definiu a camada híbrida como a estrutura formada por tecido duro dentário através da desmineralização da superfície, seguida da infiltração de monómeros e a sua polimerização (Nakabayashi et al., 1982).

Para a correta formação da camada híbrida, o condicionamento ácido não deverá ser extensivo ou agressivo em demasia, de modo a não expor o colagénio abaixo da camada híbrida, pois isto irá aumentar a probabilidade de degradação. O agente adesivo deve incluir grupos hidrofílicos e hidrofóbicos de maneira a penetrar e agregar-se na dentina. Por fim, a polimerização deve ser realizada na presença de oxigénio e água, sendo necessário um catalisador que permita a ocorrência deste fenómeno (Nakabayashi et al., 1991). A camada híbrida é essencialmente a interdifusão de monómeros de resina entre as fibras de colagénio da dentina expostas após o condicionamento (Frassetto et al., 2016; Betancourt et al., 2019).

3.2. Mecanismos de degradação da interface adesiva

As restaurações realizadas com resinas compostas têm rácios de sobrevivência aceitáveis e as suas causas maioritárias de falha são a ocorrência de cárie secundária e fratura (Demarco et al., 2012; Göstemeyer & Schwendicke, 2016).

Os sistemas adesivos contemporâneos incorporados com monómeros acídicos e hidrofílicos mostram uma adesão inicial ao substrato dentinário húmido mais eficaz. Ainda assim, existem vários estudos publicados que relatam problemas com as fórmulas hidrofílicas destes sistemas adesivos (Walter et al., 2012; Frassetto et al., 2016). A degradação hidrolítica da camada híbrida seja esta no colagénio, no adesivo ou em ambos é responsável pelo fracasso da adesão. A água é essencial para manter a arquitetura da rede de colagénio e expandi-la para que ocorra a penetração adequada dos monómeros de resina, mas quando ocorre humidade excessiva, os monómeros hidrofóbicos e hidrofílicos reagem separando-se, o que irá criar espaços vazios e bolhas na interface adesiva (Tjäderhane, 2015).

Independentemente da estratégia adesiva utilizada E&R ou SE, a incorporação de monómeros de resina iônicos e hidrofílicos no agente adesivo não formam uma camada de revestimento de resina hidrofóbica. Assim, as camadas híbridas criadas reagem como membranas semipermeáveis tendo água a movimentar-se ao longo da superfície mesmo após a polimerização (Breschi et al., 2008).

Os adesivos dentários são constituídos por monómeros como Bis-GMA (bisfenol glicidil metacrilato), TEGDMA (dimetacrilato de trietileno glicol), UDMA (dimetacrilato de uretano) e HEMA (2-hidroxietil metacrilato). Estes monómeros contêm grupos éster, carboxilo, hidroxilo, fosfato e uretano que são suscetíveis a degradação hidrolítica. Em ambiente aquoso, os polímeros dentários degradam-se através de dois mecanismos, por hidrólise passiva e por degradação enzimática (Palasuk, 2018; Van Meerbeek et al., 2020). A maior causa de degradação dos adesivos, e consequentemente da camada híbrida, aparenta ser um processo de hidrólise (Matos et al., 2017). Através deste processo químico ocorre desintegração das ligações entre polímeros do adesivo, pela sua interação com a molécula de água, seguida da lixiviação destes mesmos polímeros e consequentemente perda de peso do adesivo (Lukomska-Szymańska et al., 2017).

A degradação enzimática da matriz de colagénio, ocorre devido à presença de enzimas derivadas do hospedeiro responsáveis pela desintegração da interface adesiva (Montagner et al., 2014). As metaloproteinases (MMPs) e catepsinas de cisteína (CCs) representam duas famílias de enzimas endógenas associadas à degradação da matriz de colagénio e consequentemente da camada híbrida (Sabatini & Pashley, 2014). As MMPs clivam fibras de colagénio expostas que ancoram o material restaurador à dentina e consequentemente isto irá diminuir a resistência adesiva e irá aumentar a permeabilidade do substrato dentinário (Mazzoni et al., 2018). As CCs aumentam a potência proteolítica das MMPs libertando enzimas mais ativas. Este fenómeno pode ocorrer em ambas as estratégias adesivas E&R e SE (Bedran-Russo et al., 2017).

3.3. Estratégias de inibição da degradação da interface adesiva

O combate da degradação da camada híbrida e interface adesiva envolve o pré-tratamento da cavidade antes da colocação do adesivo. Estas estratégias podem diminuir o risco e

falhas de retenção de restaurações dentárias (Göstemeyer & Schwendicke, 2016; Matos et al., 2017).

Existem várias propostas de tratamento que envolvem a alteração do protocolo de adesão, tendo sido investigados o pré-tratamento da dentina após o condicionamento ácido, o qual inclui a utilização de inibidores de proteases como a clorhexidina (CHX), agentes quelantes como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e agentes de reticulação como o carbodiimida, aplicados individualmente ou combinados (Palasuk, 2018; de Moraes et al., 2020). O objetivo destas estratégias experimentais é aumentar a força e longevidade da resistência adesiva através da inibição da colagenólise, fortificando assim a matriz de colagénio da dentina para que esta não seja degradada (Frassetto et al., 2016).

Existem outras estratégias para impedir a degradação da interface adesiva como a técnica *ethanol wet bonding* (EWB) que consiste na desmineralização e desidratação da matriz dentinária, permitindo a impregnação de monómeros hidrofóbicos. Esta estratégia diminui assim a incorporação de água e solubilidade. Esta técnica permite a diminuição da hidrólise de colagénio ampliando a longevidade e resistência da adesão. Infelizmente, é uma técnica relativamente sensível e torna o tratamento excessivamente demorado, o que dificulta a sua utilização em ambiente clínico (Tjäderhane, 2015; Ayar, 2016; Guo et al., 2017a).

A remineralização do colagénio da camada híbrida através de adesivos com flúor também já foi sugerida, embora a capacidade de remineralização da matriz de colagénio feita pelo flúor seja questionada. Existe também a hipótese da remineralização biomimética que consiste em aumentar a resistência adesiva através da aplicação de resinas *flowable* “terapêuticas” que cobrem inteiramente o substrato dentinário (Kim et al., 2010; Tjäderhane et al., 2013).

Outra alternativa consiste na utilização de adesivos hidrofóbicos, mas isto pode requerer a síntese de novos monómeros (Moszner & Hirt, 2012). A combinação de agentes de reticulação com EWB ou com outros agentes como o dimetilsulfóxido (DMSO) apresenta uma alternativa mais exequível. Os agentes de reticulação podem prevenir a contração causada pela remoção da água, ao endurecer as fibras de colagénio expostas, possibilitando a penetração de monómeros hidrofóbicos. A combinação destes três componentes pode vir a prevenir a degradação da matriz de colagénio e

consequentemente da camada híbrida (Tjäderhane et al., 2013; Stape et al., 2015; Guo et al., 2017; Salim Al-Ani et al., 2018).

3.4. Investigação da degradação da camada híbrida

No que diz respeito à degradação enzimática, existem publicações com os diversos inibidores enzimáticos que podem ser utilizados durante o processo adesivo, assim como uma extensa investigação sobre o funcionamento e longevidade de cada um dos agentes inibitórios (Hebling et al., 2005; Tjäderhane et al., 2013). Apesar de existir um conhecimento geral de ambos os mecanismos, a maior parte dos estudos baseia-se na degradação enzimática e não na deterioração hidrolítica (Vaidyanathan & Vaidyanathan, 2009; Tjäderhane et al., 2013).

De forma a avaliar a resistência adesiva das estratégias de combate à degradação hidrolítica nos estudos *in vitro* são usados testes de microtração. A utilização deste teste, juntamente com análises morfológicas e espectroscópicas, apresenta resultados de medição de resistência adesiva mais fiáveis do que o teste tradicional de cisalhamento. O grande benefício da sua aplicação consiste na sua capacidade de analisar substratos clinicamente relevantes com superfícies tridimensionais, como dentes hígidos ou dentina afetada por cárie. A utilização generalizada deste tipo de testes à resistência adesiva permite o progresso científico com vista à melhoria da qualidade da adesão entre a resina e o substrato adesivo (Sano et al., 2020).

4. Objetivos

O objetivo desta revisão sistemática é avaliar a evidência científica publicada sobre a inibição da degradação da camada híbrida pelo no mecanismo de hidrólise passiva. Para a realização desta revisão sistemática, foram reunidos estudos *in vitro* relativos a estratégias de prevenção de degradação hidrolítica não enzimática da camada híbrida da dentina. Estes estudos comparam os resultados imediatos e a longo prazo de resistência adesiva. Pretende-se assim responder à questão: “Quais as melhores estratégias de prevenção da degradação hidrolítica da camada híbrida com base nos resultados de resistência adesiva na camada híbrida a curto e longo prazo?”.

II. Materiais e métodos

1. Pesquisa sistemática

A pesquisa sistemática foi realizada a partir de cinco bases de dados: *Medline/PubMed*, *Mednar*, *Web of Science*, *Scopus* e *Opengrey*. As palavras-chave escolhidas encontram-se na **Tabela 1**. Cada palavra-chave foi pesquisada individualmente, e foram feitas combinações das mesmas unidas por operadores booleanos, de maneira a tornar a pesquisa o mais abrangente possível e alcançar todos os estudos relevantes para a investigação (**Anexo 1**). O total de publicações identificadas em cada base de dados pode ser observado no **Anexo 1**.

Tabela 1. Palavras-chave utilizadas para pesquisa sistemática nas diferentes bases de dados

Dentin	Hybrid Layer	Degradation
Dentine	Adhesive Interface	Longevity
Collagen	Resin-Dentin	Durability
Hydrolytic	Resin-Dentine	Preservation
Water	Resin-Dentine interface	Stability
Hydrolysis	Bond Interface	Protection
		Inhibition
		Biodegradation
		Effectiveness

2. Critérios de inclusão e exclusão

Foram definidos critérios de inclusão e exclusão de maneira a realizar a pesquisa sistemática e responder à pergunta formulada. Encontram-se especificados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Critérios de inclusão e exclusão aplicados na pesquisa para revisão sistemática

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
Estudos <i>in vitro</i> Molares humanos permanentes Restaurações diretas Resultados de resistência adesiva imediatos e a longo prazo Técnicas de envelhecimento em água, saliva artificial e por termociclagem Estratégias intervencionais para prevenção de degradação hidrolítica Existência de grupo de controle	Estudos clínicos e revisões Estudos em animais Dentes decíduos Restaurações indiretas Estudos com apenas resultados imediatos de resistência adesiva Outros tipos de envelhecimento de amostras

3. Método PICO

Para responder à pergunta da investigação seguiu-se o método PICO abaixo indicado:

P – Molares humanos permanentes extraídos

I – Restauração *in vitro* com estratégia de combate à degradação hidrolítica

C – Restauração *in vitro* pela técnica tradicional

O – Resistência adesiva à microtração imediata e após envelhecimento *in vitro*

4. Seleção dos estudos e extração de dados

Depois de realizada a pesquisa, foi efetuada uma triagem criteriosa que incluiu apenas artigos que respeitavam os respectivos critérios de inclusão e exclusão definidos. Os artigos foram selecionados depois da revisão do título, *abstract* e leitura integral, tendo sido também realizada uma pesquisa manual nas bibliografias dos artigos selecionados para leitura completa. Foram apenas revistos artigos escritos em inglês, tendo a pesquisa ficado restrita a publicações dos últimos seis anos (2014-2020). Aqueles artigos que não se encontravam dentro dos critérios estipulados foram excluídos. Os dados obtidos dos estudos incluem a dimensão amostral, forma de envelhecimento das amostras, sistema adesivo, técnica adesiva e material restaurador utilizado, a estratégia de combate à degradação hidrolítica e os resultados de testes de microtração que avaliam a resistência adesiva imediata e a longo prazo.

De forma a avaliar o risco de viés, a ferramenta *the Cochrane Collaboration Risk of Bias Tool* foi adaptada consoante o estudo realizado por Isolan et al. (2017). Os parâmetros utilizados incluem aleatorização de amostra, existência de grupos controlo, utilização de dentes hígidos, utilização de materiais consoante as instruções do fabricante, descrição do cálculo da dimensão da amostra, sistemas adesivos utilizados pelo mesmo operador e mesmo operador na máquina de teste. De forma a visualizar o resultado e transformá-lo em figuras foi utilizado *The RobVis web visualization tool* (www.riskofbias.info/welcome/robvis-visualization-tool).

5. Análise estatística

Foram realizadas duas meta-análises multinível em rede (*random effects*) com estimação pelo método *Restricted Maximum Likelihood* para avaliar magnitudes de efeito estandardizadas de resistências adesivas médias, obtidas a partir dos resultados de testes de microtração (RTM) feitos a palitos dentários sujeitos anteriormente a tratamentos que incluíam como pré-tratamento o uso de potenciais inibidores da degradação hidrolítica da camada híbrida *versus* um controlo (sem pré-tratamento). A primeira meta-análise avaliou a média estandardizada da resistência adesiva associada a cada pré-tratamento, após subtração do controlo, durante as primeiras 24 horas. A segunda determinou, de forma relativa, o diferencial mensal médio de resistência adesiva conferido pelo pré-tratamento relativamente ao controlo, durante um período igual ou superior a 3 meses. Todos os procedimentos meta-analíticos foram realizados através da ferramenta “*metafor*” em ambiente de programação R (*RStudio versão 1.3.1073 em R versão 3.5.3*). Os gráficos de folhas (*forest plots*) foram produzidos no *software OpenMeta [Analyst]* com resultados segmentados nos seguintes subgrupos: etanol *versus* DMSO, e estratégias isoladas *versus* combinadas. A incerteza associada aos valores de magnitude de efeito médios estandardizados foi apresentada na forma de intervalos de confiança de 95%. A quantidade de heterogeneidade na rede foi avaliada através do índice I^2 (considerou-se significativa se superior a 50%), e as diferenças meta-analíticas encontradas foram consideradas significativas se o resultado do teste associado apresentasse $p < 0.05$. Os testes *post-hoc* (multi-comparação) foram realizados pelo método de *Tukey (Tukey's HSD test)* com ajuste de *Holm*.

5.1. Avaliação da resistência imediata

Inicialmente, os RTM's de cada tratamento foram subtraídos aos seus controles, resultando a magnitude de efeito *diferença de médias estandardizada* (SMD), e variâncias associadas. Por fim, as SMD e respectivas variâncias, permitiram ajustar um modelo multinível e multivariável que permitiu obter SMD's médios para cada um dos tratamentos em estudo, sendo posteriormente exibidos graficamente num *forest plot*. Neste gráfico, os valores médios mais elevados de SMD significam pré-tratamentos associados a uma maior resistência relativa à fratura por microtração.

5.2. Avaliação da inibição da degradação hidrolítica a longo prazo

Calculou-se a magnitude de efeito *diferença de médias estandardizada* (SMD) e respetiva variância, da mesma forma que na avaliação da resistência imediata, para os valores de RTM de *follow-up* (resistência a longo prazo). Também aqui se ajustou de seguida um modelo multinível e multivariável que permitiu obter SMD's médios para cada um dos tratamentos em estudo. Estes valores foram então subtraídos aos valores de magnitude estandardizada obtidos na resistência imediata e ajustados ao período de tempo do *follow-up*, dividindo cada SMD e variância pelo número de meses e pelo seu valor ao quadrado, respetivamente. Finalmente, estes resultados foram exibidos graficamente na forma de *forest plot*. Neste gráfico, os valores médios mais altos estão associados a pré-tratamentos que, em média, conferiram maior resiliência à degradação da camada híbrida ao longo do tempo.

5.3. Heterogeneidade e outliers

Para ilustrar a extensão da heterogeneidade entre os estudos selecionados para a meta-análise foram criados gráficos *Galbraith*. Cada estudo está representado por um único ponto. O eixo vertical (y) avalia a magnitude do efeito dividido pelo erro padrão (índice z) e o inverso do erro padrão está representado pelo eixo horizontal (x). No centro, encontra-se uma linha que percorre o gráfico, paralelamente à linha de regressão e que delimita o intervalo de confiança com uma amplitude de 2 desvios-padrão. Em caso de homogeneidade, o esperado é que os pontos se mantenham dentro do intervalo,

relativamente próximos da linha central contínua. Os pontos que se encontrarem fora do intervalo representam *outliers* (Bax et al., 2009).

III. Resultados

1. Estratégia de pesquisa

Foram identificadas um total de 12875 referências a partir das cinco bases de dados utilizadas. Posteriormente, as referências foram exportadas para o programa *Mendeley Desktop software* (v. 1.19.4), onde os duplicados foram removidos, restando 2527 artigos. Depois da leitura do título e *abstract* foram excluídas adicionalmente 2514 referências, incluídos 7 artigos após pesquisa manual, restando assim 21 artigos para leitura integral. Por fim, foram excluídos 9 artigos que não correspondiam aos critérios de inclusão estipulados, sobrando 11 artigos para realização da meta-análise. (Figura 1)

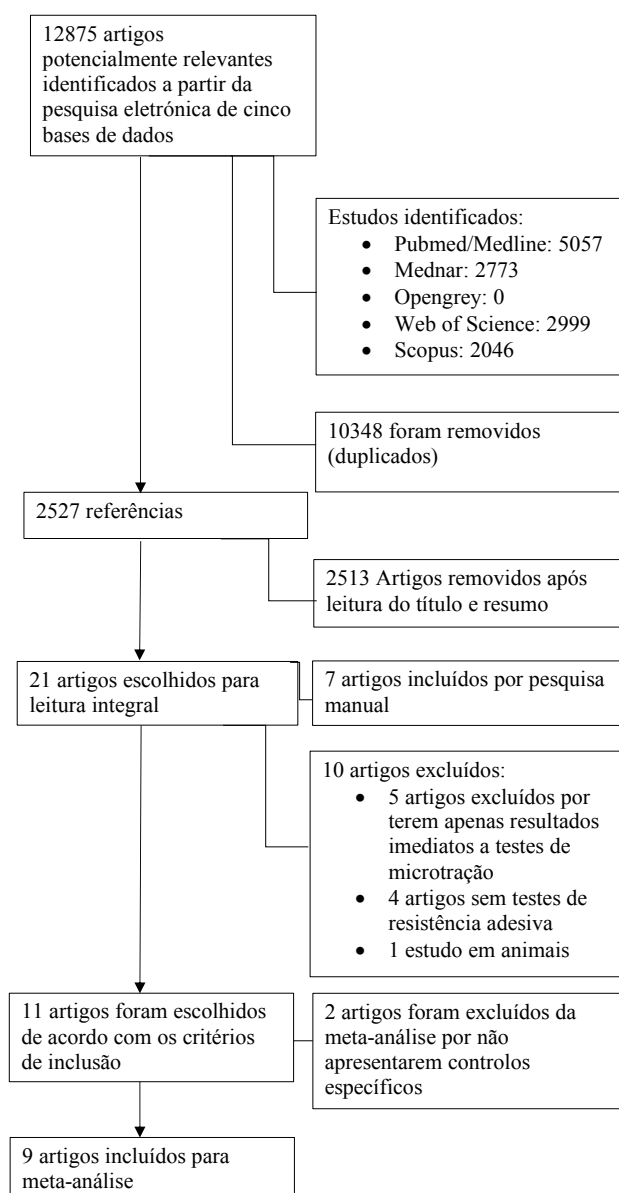


Figura 1. Fluxograma de acordo com o PRISMA.

2. Sumário dos estudos - Revisão sistemática

Os 11 artigos que se encontravam de acordo com os critérios de inclusão foram selecionados para a revisão sistemática. Dois artigos foram retirados (Foscaldo et al., 2016; Yamauchi et al., 2020), por não apresentarem controlos específicos deixando a meta-análise com 9 estudos no total. Os estudos e as suas características encontram-se especificados na **Tabela 3**. Dos resultados obtidos surgiram dois grupos de intervenções identificados como estratégias de combate à degradação hidrolítica:

- Métodos de desidratação, como a técnica de *ethanol wet bonding* (EWB) e DMSO-*wet bonding* e pré-tratamento com dimetilsulfóxido (DMSO) em diferentes concentrações.
- A síntese de novos monómeros resistentes à hidrólise (HTMAF, HEMA-P e TEG-DVBE) incluídos na formulação de adesivos experimentais.

2.1. Métodos de envelhecimento

A grande maioria dos estudos utiliza saliva artificial como meio de envelhecimento das amostras (Ekambaram et al., 2014; Foscaldo et al., 2016), três dos estudos recorrem ao envelhecimento artificial através de termociclagem (10 000 ciclos) (Guo et al., 2017b; Yamauchi et al., 2020). Talungchit et al. (2014) descreve a utilização de um tampão fosfato com 0,1% de azida sódica, Yi et al. (2019) adiciona colagenase às suas amostras durante 1 mês.

2.2. Risco de viés - Resultados

O risco de viés pode ser visualizado através de uma tabela em formato *traffic light plot*-**Figura 2**. Três estudos apresentaram risco de viés elevado devido a falta de informação dos parâmetros avaliados. Outros quatro estudos apresentaram risco de viés intermédio, e os quatro estudos restantes demonstraram ser de baixo risco. Nenhum dos estudos relata qual o cálculo do tamanho da amostra e apenas dois estudos referem se é o mesmo operador que utiliza a máquina de teste (Ekambaram et al., 2014; Yi et al., 2019).

Tabela 3. Resumo dos estudos incluídos na revisão sistemática

Autor	Dimensão amostral	Forma de envelhecimento	Teste de resistência adesiva/ Tempo	Estratégia de combate à degradação hidrolítica	Sistema adesivo	Material Restaurador	Técnica adesiva	Conclusões
1. (Talungchit et al., 2014)	128 Molares Humanos 4 Grupos (n=32)	Solução tampão fosfato com 0,1% de azida de sódio a 37°	<i>Microtensile Bond Strength</i> (MPa) -24h - 1 ano	Pré-tratamento: - 2% CHX	E&R (70% Bis-GMA/28.75%TE G-DMA)	Filtek Z100, (3M ESPE; St Paul, MN, USA)	1. EWB 2. WWB	A técnica “EWB” facilita a infiltração de resina adesiva hidrofóbica no substrato, aumentando a resistência adesiva. A combinação de diacetato de CHX a 2% e “EWB” prolonga a longevidade da adesão.
2. (Ekambaram et al., 2014)	48 Molares Humanos 4 grupos (n=16)	Saliva artificial com azida de sódio Tampão HEPES 37° renovada semanalmente	<i>Microtensile Bond Strength</i> (MPa) -24h - 1 ano	Pré-tratamento: - CHX	E&R com <i>primer</i> modificado (70% Bis-GMA/28,75% TEGDMA/0,25 N,N-dimetil-4-aminobenzoato de etilo misturado com 50% de resina e 50% etanol)	Filtek Z250, (3M ESPE, ST Paul, MN, USA)	1. EWB 2. EWB + CHX 3. WWB 4. WWB + CHX	Aplicação conjunta de CHX com a técnica de EWB preserva a resistência adesiva quando utilizado um adesivo hidrofóbico, tanto em dentina saudável como cariada mesmo após 12 meses.
3. (Venigalla et al., 2016)	80 Molares Humanos 8 Grupos (n=100)	Saliva artificial a 37°	<i>Microtensile Bond Strength</i> (MPa) -24h - 6 meses	Pré-tratamento: - Riboflavina 0,1% - Carbodiimida - Proantociadinas	(Adper Single Bond) E&R	Filtek Z350, (3M ESPE)	1. Sem pré-tratamento 2. Riboflavina (0,1%) + WWB 3. Carbodiimida + WWB 4. Proantociadinas + WWB 5. EWB 6. Riboflavina + EWB 7. Carbodiimida + WWB 8. Proantociadinas + WWB	EWB pode ser uma estratégia promissora para melhorar a resistência adesiva. A riboflavina demonstrou melhores resultados no aumento de resistência e durabilidade adesiva comparativamente com outros agentes de reticulação química.

4. (Stape et al., 2016) ^a	40 Molares Humanos 4 grupos (n=60)	Solução de saliva artificial tampão HEPES (pH 7.1). Renovada todas as semanas durante 2 anos	<i>Microtensile Bond Strength</i> (MPa) - 6 meses - 1 ano - 2 anos	50% DMSO	E&R (Adper Scotchbond Multi-Purpose, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA) SE (Clearfil SE Bond, Kuraray, Osaka, Japan)	Filtek Z250, A2, (3M ESPE)	1. E&R sem pré-tratamento 2. E&R + DMSO 3. SE sem pré-tratamento 4. SE + DMSO	A técnica <i>DMSO-wet bonding</i> pode melhorar a resistência adesiva de ambos os sistemas adesivos.
5. (Stape et al., 2016) ^b	40 Molares Humanos 4 grupos n= [102,105]	Saliva artificial a 37°	<i>Microtensile Bond Strength</i> (MPa) - 24h - 2 anos	- DMSO 0% -DMSO 2% - DMSO 4% - DMSO 10%	Adesivos experimentais	Filtek Z250, (3M ESPE)	1. Controlo 0% DMSO 2. 2% DMSO 3. 4% DMSO 4. 10% DMSO	A concentração de 2% DMSO no adesivo experimental superou as outras estratégias relativamente à durabilidade da resistência adesiva.
6. (Salim Al-Ani et al., 2018)	48 Molares Humanos 8 grupos (n=6)	Saliva artificial a 37°	<i>Microtensile Bond Strength</i> (MPa) - 24h - 6 meses	DMSO - 0,001% -0,01% - 0,1% - 1% - 5% - 10% - 20%	E&R Single Bond Plus, 3M ESPE, ST.Paul, MN, USA)	Filtek (Supreme XTE 3M ESPE)	1. Controlo sem pré-tratamento 2. DMSO 0,001% 3. DMSO 0,01% 4. DMSO 0,1% 5. DMSO 1% 6. DMSO 5% 7. DMSO 10% 8. DMSO 20%	O pré-tratamento da dentina com concentrações entre 1 e 5% de DMSO mostrou-se eficaz em prolongar a durabilidade entre as interfaces adesivas.
7. (Li et al., 2018)	(n=30)	Saliva artificial a 37° até 3 e 6 meses	<i>Microtensile Bond Strength</i> (MPa) -24h -3 meses - 6 meses	- BAI - DMSO 1% - Glutaraldéido 5%	E&R (Adper Single Bond 2, 3M ESPE; St Paul, MN, USA)	Filtek Z250, (3M ESPE)	1. Controlo sem pré-tratamento 2. Pré-tratamento c/ DMSO 1% 3. Pré-tratamento c / GD 5% 4. Pré-tratamento c/ BAI 2.5	O pré-tratamento com BAI mostrou resultados promissores quando combinado com sistemas adesivos E&R relativamente ao aumento da resistência adesiva.

8. (Foscaldo et al., 2016)	20 Molares Humanos 2 grupos (n=10)	Saliva artificial a 37°	<i>Microtensile Bond Strength</i> (MPa) - 24h - 3 meses	Monómero HEMA Phosphate HEMA-P	E&R (Adper Single Bond 2, 3M ESPE; St Paul, MN, USA)	Filtek Z100, 3M ESPE	- HEMA-P em substituição de ácido ortofosfórico - Ácido fosfórico 37%	O monómero HEMA-P pode representar um protocolo alternativo ao condicionamento da dentina convencional.
9. (Yi et al., 2019)	60 Molares Humanos 4 grupos (n=30)	Saliva artificial a 37° com 0,1mg/ml de collagenase dissolvida e renovado a cada 3 dias. 10 000 ciclos de termociclagem	<i>Microtensile Bond Strength</i> (MPa) -24h - 1 mês	- 0,01 %BAI c/etanol - 0,05% BAI c/etanol - 0,1% BAI c/etanol	Single Bond Universal (3M ESPE, St. Paul, MN, USA)	Charisma, Kulzer, Germany	1. 100% etanol (controle); 2. 0.01% BAI c/ etanol (0.01%) 3. 0.05% BAI c/ etanol (0.05%) 4. 0.1% BAI c/ etanol (0.1%)	A combinação de balcaleína e EWB podem fortalecer a resistência adesiva e durabilidade das restaurações
10. (Yamauchi et al., 2020)	Dentes Humanos (n=5)	Água destilada a 37° Termociclagem (10 000 ciclos)	<i>Microtensile Bond Strength</i> (MPa) - 24h - Termociclagem 10 000 ciclos	Monómero TEG-DVBE	Scotchbond multi-purpose 3M ESPE) St.Paul, MN, USA),	Filtek Z250 (3M ESPE)	1: SE 2: Bis-GMA/HEMA 3: PMGDM/TEG 4: UDMA/TEG	A estabilidade de ambos os adesivos experimentais excedeu os controlos após o envelhecimento artificial. O BS é comparável aos adesivos comerciais.
11. (Guo et al., 2017a)	30 Molares Humanos 3 grupos (n=30)	Água destilada a 37° Termociclagem (10 000 ciclos)	<i>Microtensile Bond Strength</i> (MPa) - 24h - Termociclagem 10 000 ciclos	- WWB -EWB -DW (DMSO a 50%)	Single Bond 2 Universal (3M ESPE, St. Paul, MN, USA)	Charisma, Kulzer, Germany	1: WWB 2: EWB 3: DWB (DMSO 50%)	A técnica DMSO Wet bonding tem a capacidade de diminuir a exposição de colagénio e de reduzir a degradação da camada híbrida.

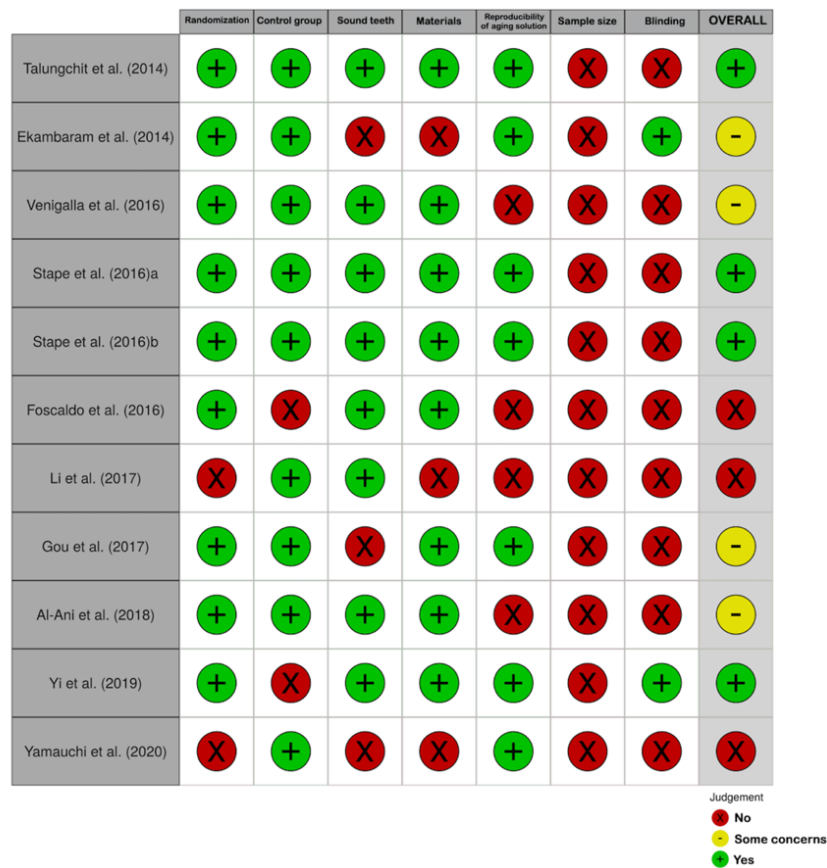


Figura 2. *Traffic light plot (RobVis tool)* para análise de risco de viés construído com resposta SIM/NÃO a sete domínios.

3. Meta-análise

3.1. Meta-análise da resistência adesiva no imediato

Dos 11 estudos incluídos na revisão sistemática, 9 foram selecionados para meta-análise. A primeira meta-análise realizada avalia o diferencial de resistência adesiva conferida pelos pré-tratamentos nas primeiras 24 horas considerando as diferenças médias estandardizadas ajustadas aos controlos. Os resultados encontram-se representados na forma de gráfico de folhas (*forest plot*) na **Figura 3**.

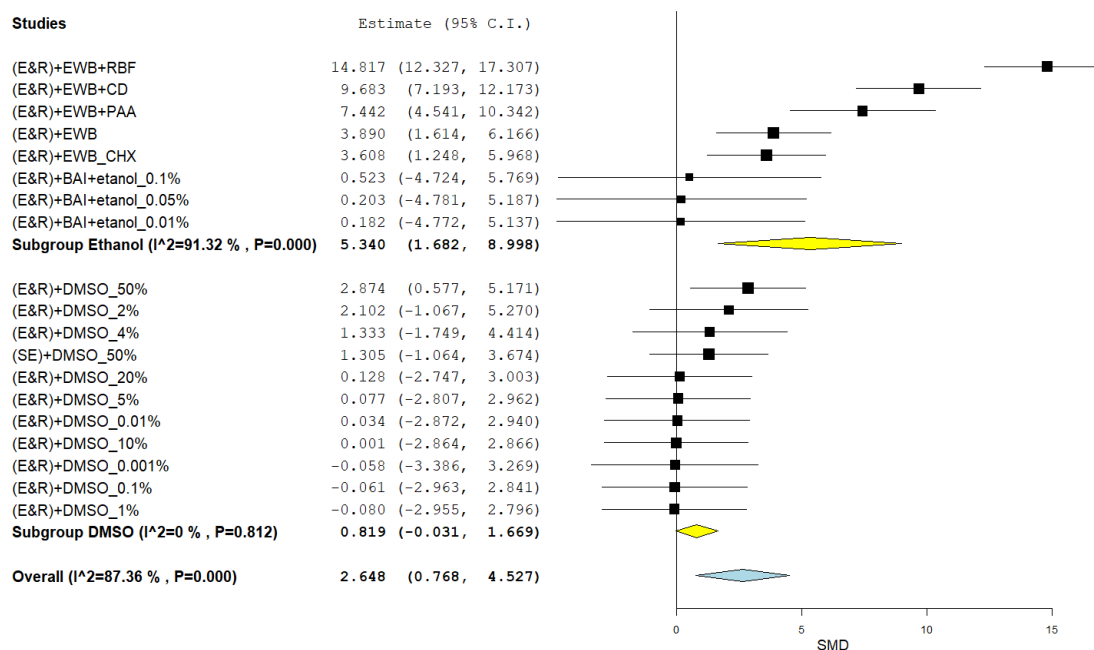


Figura 3. Gráfico de folha (*forest plot*). de resistência adesiva imediata (24h) consoante as diferenças médias standardizadas.

Os resultados estão classificados consoante a estratégia, da mais favorável para a menos favorável, consoante a resistência adesiva e encontram-se divididos em dois subgrupos (EWB/DMSO).

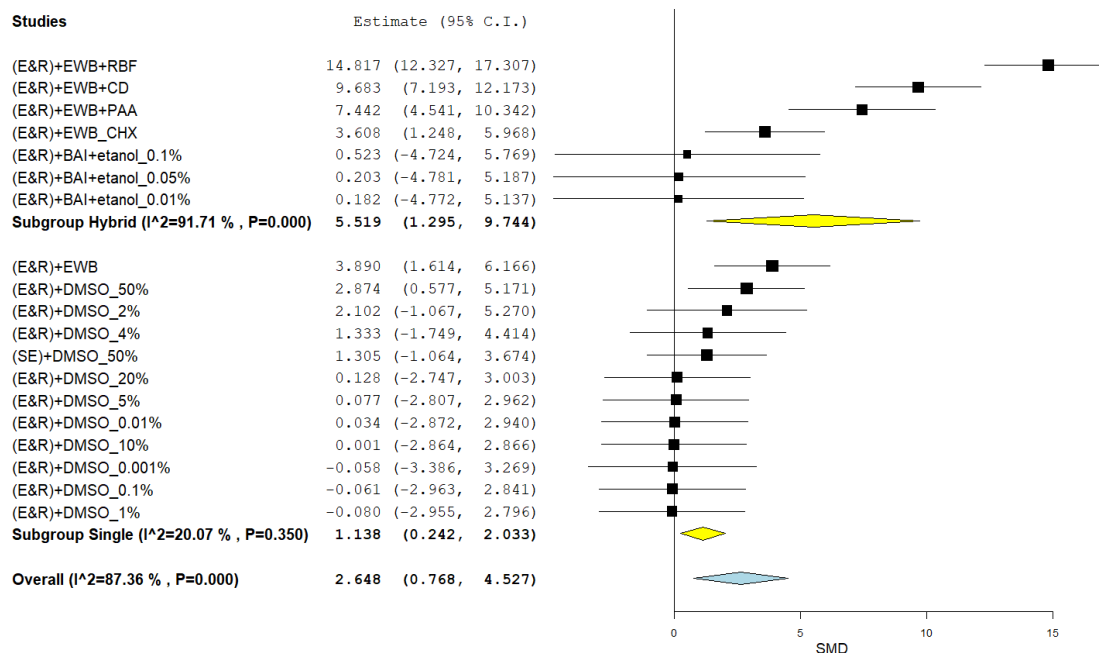


Figura 4. Gráfico de folha (*forest plot*) de subgrupo para estratégia isolada (*Single*) versus combinada (*Hybrid*) da resistência adesiva imediata (24h).

3.1.1. Comparação com controle

A meta-análise dos resultados imediatos de resistência adesiva demonstrou um melhor desempenho da técnica *ethanol wet bonding* quando utilizada em combinação com o inibidor enzimático riboflavina ($p<0.001$), outros inibidores como, CD ($p<0.001$), PAA ($p<0.001$) e CHX (0.0027). Individualmente a técnica EWB ($p<0.001$) apresenta melhores resultados quando comparado com os grupos de controle. O DMSO com concentração de 50% aplicado juntamente com a estratégia de *etch-and-rinse* apresentou-se também estatisticamente diferente do controle ($p=0.014$). O resultado da heterogeneidade foi $I^2=87.36\%$. As diferenças mais próximas de zero indicam que os inibidores de degradação têm efeitos semelhantes aos controles. Ou seja, nenhum dos pré-tratamentos incluídos afetou os resultados imediatos da resistência adesiva.

3.1.2. Comparação entre intervenções

Os testes *post-hoc* revelam diferenças estatisticamente significantes entre o tratamento com EWB e RBF e todas as outras estratégias ($p<0.01$), entre EWB-CD e DMSO a 0.001%, 0.01% e 0.1%, 1%, 5%, 10%, 20% e 50% ($p<0.001$), entre EWB-CD e DMSO a 4% ($p<0.01$), entre EWB-CD e EWB utilizado individualmente, e entre EWB-CD e EWB-CHX ($p<0.001$).

3.2. Meta-análise da resistência adesiva a longo prazo

Foi realizada uma segunda análise, para avaliar os resultados a longo prazo do diferencial de resistência adesiva conferida pelos pré-tratamentos realizados. Para o efeito calculou-se a diferença mensal média entre os diferenciais médios estandardizados finais (longo prazo) e os iniciais. Os resultados obtidos estão ilustrados na **Figura 5**.

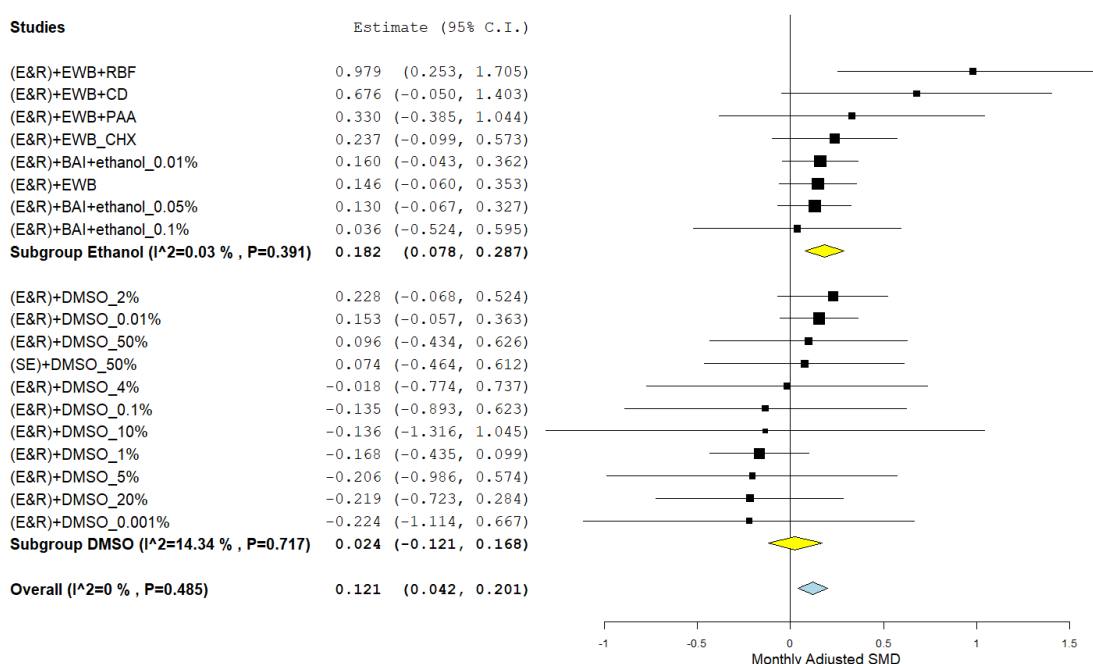


Figura 5. Gráfico de folha (*forest plot*) de resistência adesiva a longo prazo consoante as médias estandardizadas.

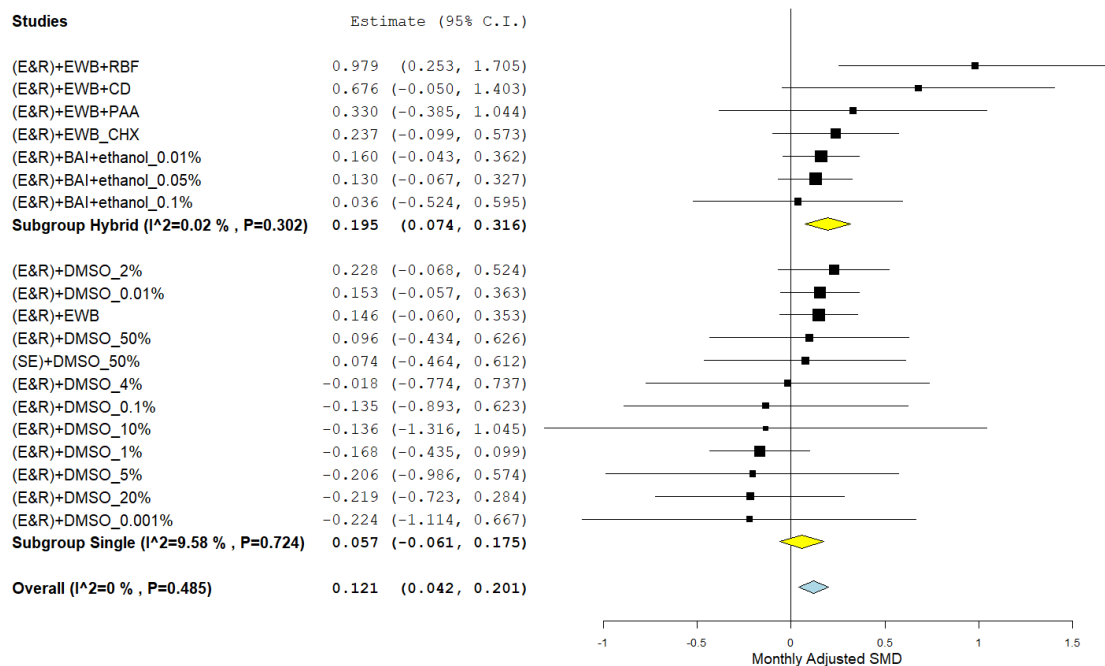


Figura 6. Gráfico de folha (*forest plot*) de subgrupo para estratégia isolada (*Single*) versus combinada (*Hybrid*) da resistência adesiva ao longo do tempo.

3.2.1. Comparação com controle

A segunda análise demonstrou resultados estatisticamente significantes relativamente à combinação de EWB com RBF quando comparados com o grupo de controlo ($p<0.001$).

3.2.2. Comparação entre as intervenções

Os testes *post-hoc* (testes multi-comparação) revelaram diferenças entre EWB-CD, DMSO 1% e DMSO 20% ($p<0.01$), e entre EWB-RBF e todas as estratégias exceto DMSO 2%, 10%, 50%, EWB-CHX, EWB-CD e EWB-PAA ($p>0.05$). O índice $I^2=0\%$.

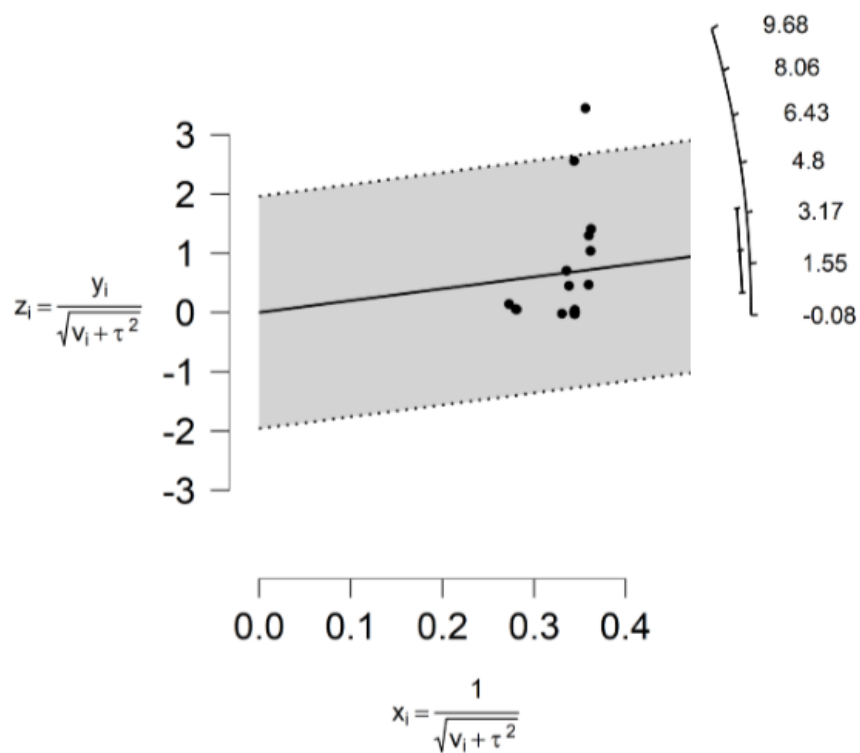


Figura 7. Gráfico de *Galbraith* relativo à heterogeneidade dos resultados imediatos (24h) da resistência adesiva.

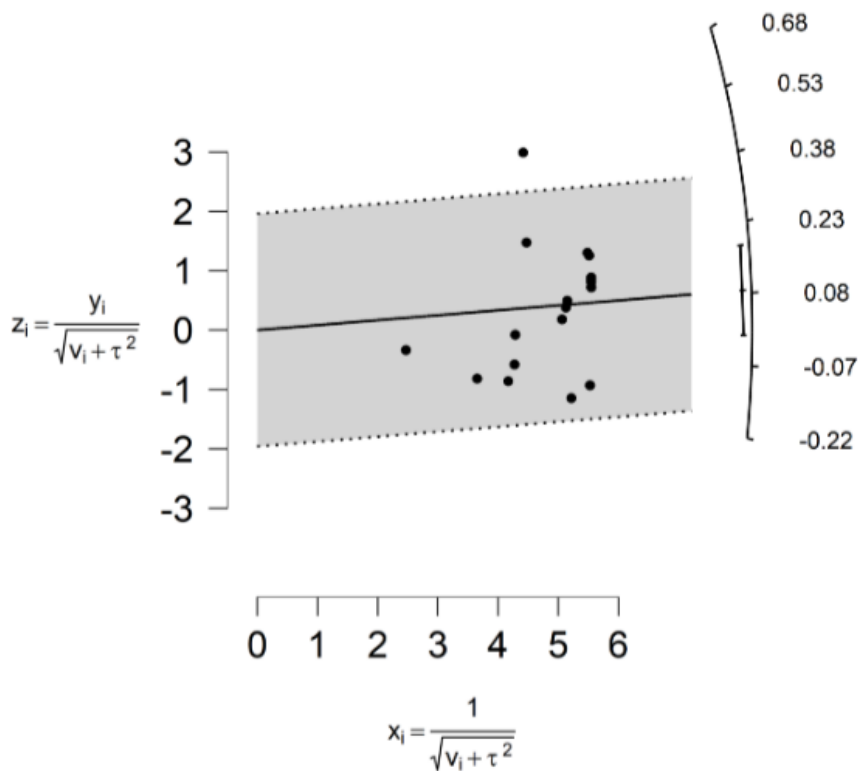


Figura 8. Gráfico de *Galbraith* relativo à heterogeneidade dos resultados a longo prazo da resistência adesiva.

Através da observação dos gráficos de *Galbraith* representados pelas **Figuras 7 e 8** é possível constatar que os estudos, representados pelos pontos, encontram-se dentro do intervalo de confiança que determina a homogeneidade dos parâmetros avaliados em cada estudo. Existe apenas um *outlier* para cada meta-análise efetuada, no que toca à magnitude de efeito.

IV. Discussão

A adesão à dentina é mais difícil de alcançar e a sua previsibilidade é menor, quando comparada com a adesão a um tecido duro mineralizado e inorgânico como o esmalte (Hashimoto et al., 2011; Tezvergil-Mutluay et al., 2015). A matriz orgânica é formada essencialmente por fibras de colagénio tipo I; quando saturada de água para infiltrar o substrato, é necessária uma resina hidrofílica solvatada. Por este motivo, os adesivos dentários são criados através de uma combinação de monómeros hidrofóbicos e hidrofílicos e desempenham diferentes papéis. A química adesiva demonstra-se imperfeita quando ocorrem separações da mistura devido à hidrofílicidade, a conversão incompleta de monómeros e a plastificação de resina (Tezvergil-Mutluay et al., 2015).

De modo a combater o excesso de água no substrato, e a hidrofílicidade dos monómeros de resina surgem várias estratégias. O *ethanol wet bonding* (EWB) pretende a substituição de água presente entre os espaços interfibrilares e intrafibrilares na matriz de colagénio desmineralizada por etanol em concentrações crescentes. O etanol é utilizado de forma a desidratar quimicamente a rede de colagénio desmineralizada, para que ocorra a infiltração de monómeros resinosos hidrofóbicos (Nagpal et al., 2015). Existem dois protocolos estabelecidos para aplicação desta técnica, com concentrações de etanol que variam de 50% a 100%. O primeiro tem como objetivo a substituição progressiva de água através de concentrações incrementais (50%, 70%, 80%, 95% e 100%) que promovem a saturação do etanol na dentina. Cada concentração é aplicada três vezes por 30 segundos e tem uma duração total de 3 a 4 minutos. O segundo é simplificado, e o etanol é aplicado numa concentração de 100% durante 1 minuto. É uma técnica extremamente sensível devido à volatilidade do etanol, todavia o etanol não tem a capacidade de remover totalmente a água presente na superfície dentinária, o que por si só irá dificultar a penetração de adesivos hidrofóbicos (Ayar et al., 2016; de Souza et al., 2019). No presente estudo, a técnica de EWB isolada mostrou-se estatisticamente significativa quando comparada com o controlo.

Nagpal et al., (2015), avaliaram os efeitos imediatos e após 6 meses da resistência adesiva de restaurações realizadas com o pré-tratamento de etanol a 100% e restaurações realizadas com o método convencional *water wet bonding* (WWB) e sistemas adesivos

E&R simplificados. Concluiu-se neste estudo que a técnica de EWB diminui efetivamente a degradação da resistência adesiva de ambos os sistemas adesivos E&R utilizados após 6 meses (Nagpal et al., 2015).

Venigalla et al., (2016), utilizaram agentes de reticulação no pré-tratamento da dentina associados à técnica de EWB e sistemas adesivos E&R de maneira a comparar a sua resistência adesiva imediata (24h) e a longo prazo (6 meses). Os agentes de reticulação utilizados incluíam 0,1% de riboflavina (reticulador foto-oxidativo) aplicada por 2 minutos, 1 M de carbodiimida (reticulador químico sintético) aplicado por 2 minutos e 6,5% de proantocianidinas (reticulador natural) por dois minutos. Os resultados deste estudo demonstram que a combinação de agentes de reticulação e a técnica EWB aumentaram substancialmente a resistência adesiva nos dois períodos de tempo comparativamente com o grupo controlo, composto pela técnica de EWB sem agentes de reticulação adicionados. A riboflavina foi o agente de reticulação que demonstrou maior aumento de resistência adesiva especialmente após 24 horas, através da foto-oxidação formam-se de imediato radicais livres que induzem uma reticulação mais acelerada, isto vai permitir uma rigidez da matriz de colagénio melhorada num curto espaço de tempo e consequentemente a uma penetração de resina mais eficaz. A combinação de EWB e agentes de reticulação demonstra um efeito sinérgico relativamente à manutenção da resistência adesiva quando comparada com as estratégias individuais (Venigalla et al., 2016). Nesta meta-análise confirmou-se que existem melhorias significativas quando se utiliza o inibidor enzimático riboflavina em combinação com a técnica EWB. Este pré-tratamento, em média, mostrou melhores resultados que as outras intervenções. Os inibidores carbodiimida e proantocianidinas também se destacaram estatisticamente apresentando melhores resultados quando comparadas com a técnica tradicional e com outras intervenções.

Para além da substituição de água, quando se visa uma estratégia anti-enzimática, podem ser investigados inibidores tais como a clorhexidina. Um estudo realizado em 2014, demonstra que a combinação de 2% diacetato de clorhexidina com a técnica de EWB promove a infiltração de adesivos hidrofóbicos na dentina aumentando a longevidade da resistência adesiva. Foram comparados 4 grupos, dois utilizavam a técnica EWB com e sem a ação combinada de clorhexidina (2% diacetato de clorhexidina ou 2% digluconato de clorhexidina) e os dois restantes aplicavam a técnica de WWB com e

sem o inibidor. Após condicionamento ácido foi aplicado 100% etanol durante 15 segundos, 3 vezes. Anteriormente à aplicação do *primer* foi utilizado 2% de digluconato de clorhexidina ou 2% de diacetato de clorhexidina por 30 segundos. O diacetato de clorhexidina apresenta uma baixa solubilidade em água, o que permite que esta se mantenha na camada híbrida durante um longo período de tempo e seja capaz de inibir a atividade enzimática, principalmente criada pelas MMPs. Neste estudo concluiu-se que a combinação de EWB com clorhexidina não apresentava redução de resistência adesiva ao contrário da utilização da técnica EWB individual que apresentava uma redução significativa. Segundo os resultados a combinação de clorhexidina e da técnica de EWB parece atuar sinergicamente na manutenção de resistência adesiva ao longo do tempo (Talungchit et al., 2014).

Os efeitos da clorhexidina e do etanol relativamente à longevidade da resistência adesiva no substrato dentinário, têm vindo a ser investigados em separado, a sua combinação representa uma nova possibilidade de técnica adesiva. O digluconato de clorhexidina em concentrações entre 0,002-0,2% aplicado em curtos espaços de tempo (15-30 s), demonstra a capacidade de inibição da degradação da interface adesiva. É necessária mais investigação sobre este tema e a formulação de um protocolo que possibilite a aplicação clínica desta combinação (Manso et al., 2014).

A técnica de EWB apresenta bons resultados quando aplicado com adesivos hidrofóbicos experimentais em concentrações incrementais, porém é uma estratégia demorada e inviável na prática clínica (Guo et al., 2017a).

Uma meta-análise sobre pré-tratamentos realizados nas preparações dentárias antes da aplicação de sistemas adesivos, com objetivo de inibição da degradação da camada híbrida concluiu que a evidência científica atual ainda é insuficiente. Para se obter resultados robustos serão necessários “*follow up's*” mais longos. Por este motivo os pré-tratamentos existentes não podem ser recomendados nem refutados na prática clínica (Göstemeyer & Schwendicke, 2016).

A utilização de dimetilsulfóxido (DMSO) é outro método de desidratação passível de ser utilizado. O DMSO é um solvente utilizada nas ciências biológicas, demonstra uma grande versatilidade e apresenta uma característica única de biomodificação de colagénio

desmineralizado, auxiliando assim o aumento de resistência adesiva no substrato dentinário (Stape et al., 2018). Como solvente, tem a capacidade de dissolução total da maioria dos monómeros existentes nos adesivos dentários (Geurtsen et al., 1998).

Segundo Tjaderhane et al. (2013), o DMSO pode ser aplicado em pré-tratamento da dentina, e neste estudo foi utilizado em concentrações de 0,004% durante 30 segundos após condicionamento ácido. Comparou-se a resistência adesiva imediata e a longo prazo (6 meses) de dentes restaurados com aplicação de pré-tratamento com DMSO. Verificou-se um aumento da resistência adesiva a longo prazo relativamente ao controlo (sem pré-tratamento), este facto pode dever-se à capacidade do DMSO de intensificar a molhabilidade do colagénio, o que promove a impregnação do agente adesivo na matriz exposta e retém o colagénio na matriz polimerizada. O DMSO pode levar à redução em número de moléculas de água que se encontrem entre as cadeias poliméricas, o que se deve à sua capacidade de quebrar a tendência associativa da água (Tjäderhane et al., 2013). Já Stape et al. (2016), incorporaram DMSO em adesivos experimentais predominantemente hidrofóbicos, com o objetivo de avaliar se esta alteração pode aumentar a longevidade da resistência adesiva. Foram produzidas seis resinas adesivas hidrofóbicas com os monómeros Bis-GMA e HEMA e etanol (20%), o etanol foi sendo substituído por concentrações incrementais de DMSO (0%, 0,5%, 1%, 2%, 4%, 10%). O DMSO a 2% apresentou uma diminuição de falhas adesivas que pode indicar um reforço da interface adesiva. Em concentrações mais altas (4%-10%) ocorreu uma maior inibição de collagenases; porém, houve um aumento de solubilidade, absorção de água e redução de propriedades mecânicas dos polímeros, o que levou a uma diminuição drástica de resistência adesiva. A incorporação de DMSO nas resinas adesivas precisa em simultâneo de uma concentração suficientemente elevada para reduzir a viscosidade dos comonomeros e ter capacidade de deslocar a água presente na dentina e suficientemente baixa para não permitir aumento da solubilidade e sorção de água, evitando a redução das propriedades mecânicas dos polímeros (Stape et al., 2016).

Assim, devido à sua natureza anfifílica, dipolar e aprótica, o DMSO demonstra ser um intensificador de infiltração ideal para utilização médica. A degradação hidrolítica de colagénio exposto da camada híbrida pode ser prevenida devido à sua capacidade de inibir gelatinases humanas e outras enzimas endógenas (a concentrações iguais ou superiores a 5%) (Guo et al., 2017a). Estudos recentes indicam que o pré-tratamento com este

solvente, seja este com concentrações altas (50%) ou com concentrações muito baixas (0,004%), pode levar a melhorias da resistência adesiva à dentina, imediatas e a longo prazo. Porém estes estudos apresentam concentrações muito díspares e ainda não existem estudos sistemáticos que abordem os efeitos e concentrações ideais para aplicação clínica (Salim Al-Ani et al., 2018). No presente estudo verificou-se que o pré-tratamento com DMSO a 50% apresentou melhores resultados com diferenças estatisticamente significativas quando comparada com o controlo.

Tendo em conta estes resultados, se o objetivo é atingir a maior longevidade possível, é aconselhável não só a utilização de uma estratégia que seja capaz de remover água e facilitar a infiltração de monómeros, mas que também inclua um inibidor enzimático. Ambas as soluções podem ajudar na preservação da interface adesiva ao combater os dois principais mecanismos de degradação (Van Meerbeek et al., 2020).

A necessidade de prevenção da hidrólise levou ao desenvolvimento de adesivos e resinas compostas essencialmente mais hidrofóbicas do que as suas antecessoras. Isto por sua vez reduz a sorção de água assim como a microinfiltração e nanoinfiltração a longo prazo. Zhang et al. (2020), avaliaram um novo adesivo hidrofóbico de poliuretano e concluiu que não só apresentava características de biocompatibilidade, assim como reduzida sorção de água e solubilidade. As suas propriedades mecânicas são comparáveis ou até melhores do que as alternativas existentes (Zhang et al., 2020). Outros estudos apresentam monómeros alternativos como o HMTAF, que se demonstram estáveis em meio ácido e resistentes à hidrólise (Decha et al., 2019).

São necessários mais estudos que visem a viabilidade destes monómeros e é de extrema importância investigar se existe possibilidade de produzir estas formulações comercialmente e massivamente. Estes estudos não foram incluídos na meta-análise devido ao seu desenho do estudo e aos critérios de inclusão. Embora não tenham sido selecionados, merecem ser destacados, pois apresentaram resultados promissores quando comparados com as opções comerciais contemporâneas (Decha et al., 2019; Yamauchi et al., 2020; Zhang et al., 2020). Isto significa que o desenvolvimento de novos materiais dentários é a resposta ao problema clínico apresentado. Revisões sistemáticas anteriores demonstram heterogeneidade relativamente aos métodos de envelhecimento das

amostras, especialmente quando é utilizado o protocolo de água como forma de envelhecimento (Montagner et al., 2014). A evidência científica demonstra que cada método de envelhecimento envolve um mecanismo diferenciado e um impacto individualizado na degradação da interface adesiva (Deng et al., 2014). De maneira a replicar o complexo ambiente oral, foram propostos vários métodos de envelhecimento sendo a água o mais comum. A presença de água tem um efeito conhecido de aceleração mais pronunciado da diminuição da resistência adesiva comparativamente com o efeito da saliva artificial (Garcia-Godoy et al., 2010; El-Deeb et al., 2016).

É necessária a padronização de testes *in vitro*, visto que vários fatores desempenham um papel nos resultados do estudo da resistência adesiva (Faggion, 2012; Fernández-Estevan et al., 2017). O tratamento estatístico das amostras dos testes de microtração é sensível, os detalhes do mesmo devem ser divulgados, assim como deve ser realizada a demonstração do cálculo do tamanho amostral (Armstrong et al., 2017; Sano et al., 2020). Estes detalhes nem sempre foram observados nos estudos incluídos nesta revisão sistemática. Outros fatores como, ensaios cegos para o operador de teste, raramente são realizados neste tipo de pesquisa, o que aumenta a propensão de risco de viés nos resultados.

V. Conclusão

O uso de protocolos de desidratação para prevenir a hidrólise e auxiliar na molhabilidade dos adesivos na dentina, combinado com inibidores enzimáticos, mostra capacidade sinérgica nos resultados de resistência adesiva. Este aspeto foi especialmente observado com a combinação de EWB com riboflavina. As estratégias atuais não prejudicam os resultados da resistência adesiva imediata, mas a sua aplicação clínica ainda se encontra limitada. A técnica de pré-tratamento com DMSO é uma alternativa válida ao EWB, embora o seu efeito a longo prazo seja menos eficaz e dependente da concentração.

Há uma necessidade urgente de novos estudos que avaliem estratégias para combater a degradação hidrolítica espontânea na camada híbrida. Os resultados deste estudo apresentaram incertezas que devem ser clarificadas em publicações futuras. Existem incertezas associadas à combinação do inibidor enzimático balcaleína e a técnica de EWB, assim como à eficácia do DMSO em concentrações de 0,001%, 0,1%, 5% e 10%. É também essencial, a padronização metodológica dos estudos realizados para se superar a heterogeneidade em protocolos de envelhecimento de amostras, testes de resistência adesiva e tratamento de dados.

.

VI. Bibliografia

- Anusavice, K., Shen, C., & Rawls, R. (2013). Phillips' science of dental materials. In *Elsevier* (Vol. 91). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Armstrong, S., Breschi, L., Özcan, M., Pfefferkorn, F., Ferrari, M., & Van Meerbeek, B. (2017). Academy of Dental Materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength (μ TBS) approach. *Dental Materials*, 33(2), 133–143. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.11.015>
- Ayar, M. K. (2016). A review of ethanol wet-bonding: Principles and techniques. *European Journal of Dentistry*, 10(1), 155–159. <https://doi.org/10.4103/1305-7456.175687>
- Ayar, M. K., Yildirim, T., & Yesilyurt, C. (2016). Nanoleakage within adhesive-dentin interfaces made with simplified ethanol-wet bonding. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 30(22), 2511–2521. <https://doi.org/10.1080/01694243.2016.1185824>
- Bax, L., Ikeda, N., Fukui, N., Yaju, Y., Tsuruta, H., & Moons, K. G. M. (2009). More than numbers: The power of graphs in meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*, 169(2), 249–255. <https://doi.org/10.1093/aje/kwn340>
- Bedran-Russo, A., Leme-Kraus, A. A., Vidal, C. M. P., & Teixeira, E. C. (2017). An Overview of Dental Adhesive Systems and the Dynamic Tooth–Adhesive Interface. *Dental Clinics of North America*, 61(4), 713–731. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2017.06.001>
- Betancourt, D. E., Baldion, P. A., & Castellanos, J. E. (2019). Resin-dentin bonding interface: Mechanisms of degradation and strategies for stabilization of the hybrid layer. In *International Journal of Biomaterials* (Vol. 2019). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/5268342>
- Breschi, L., Maravic, T., Cunha, S. R., Comba, A., Cadenaro, M., Tjäderhane, L., Pashley, D. H., Tay, F. R., & Mazzoni, A. (2018). Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. In *Dental Materials* (Vol. 34, Issue 1, pp. 78–96). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.11.005>
- 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>
- Cardoso, M., de Almeida Neves, A., Mine, A., Coutinho, E., Van Landuyt, K., De Munck, J., & Van Meerbeek, B. (2011). Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. *Australian Dental Journal*, 56(SUPPL. 1), 31–44.
<https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2011.01294.x>
- de Moraes, I. Q. S., do Nascimento, T. G., da Silva, A. T., de Lira, L. M. S. S., Parolia, A., & Porto, I. C. C. de M. (2020). Inhibition of matrix metalloproteinases: a troubleshooting for dentin adhesion. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 45(3).
<https://doi.org/10.5395/rde.2020.45.e31>
- de Souza, M. Y., Jurema, A. L. B., Caneppele, T. M. F., & Bresciani, E. (2019). Six-month performance of restorations produced with the ethanol-wet-bonding technique: A randomized trial. *Brazilian Oral Research*, 33(52), 1–10.
<https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2019.VOL33.0052>
- Decha, N., Talungchit, S., Iawsipo, P., Pikulngam, A., Saiprasert, P., & Tansakul, C. (2019). Synthesis and characterization of new hydrolytic-resistant dental resin adhesive monomer HMTAF. *Designed Monomers and Polymers*, 22(1), 106–113.
<https://doi.org/10.1080/15685551.2019.1615789>
- Demarco, F. F., Corrêa, M. B., Cenci, M. S., Moraes, R. R., & Opdam, N. J. M. (2012). Longevity of posterior composite restorations: Not only a matter of materials. *Dental Materials*, 28(1), 87–101. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2011.09.003>
- Deng, D., Yang, H., Guo, J., Chen, X., Zhang, W., & Huang, C. (2014). Effects of different artificial ageing methods on the degradation of adhesive-dentine interfaces. *Journal of Dentistry*, 42(12), 1577–1585.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.09.010>
- Eick, J. D., Gwinnett, A. J., Pashley, D. H., & Robinson, S. J. (1997). Current concepts on adhesion to dentin. In *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* (Vol. 8, Issue 3, pp. 306–335). <https://doi.org/10.1177/10454411970080030501>
- Ekambaram, M., Yiu, C. K. Y., Matinlinna, J. P., King, N. M., & Tay, F. R. (2014). Adjunctive application of chlorhexidine and ethanol-wet bonding on durability of bonds to sound and caries-affected dentine. *Journal of Dentistry*, 42(6), 709–719.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.04.001>

- El-Deeb, H. A., Daifalla, L. E., Badran, O. I., & Mobarak, E. H. (2016). Bond strength durability of different adhesives to dentin after aging in two different solutions. *Journal of Adhesive Dentistry*, 18(4), 303–309. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a36153>
- Faggion, C. M. (2012). Guidelines for reporting pre-clinical in vitro studies on dental materials. *Journal of Evidence-Based Dental Practice*, 12(4), 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.jebdp.2012.10.001>
- Fernández-Estevan, L., Millan-Martínez, D., Fons-Font, A., Agustín-Panadero, R., & Román-Rodríguez, J. L. (2017). Methodology in specimen fabrication for in vitro dental studies: Standardization of extracted tooth preparation. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 9(7), e897–e900. <https://doi.org/10.4317/jced.54020>
- Foscaldo, T., dos Santos, G. B., Miragaya, L. M., Garcia, M., Hass, V., & da Silva, E. M. (2016). Effect of HEMA phosphate as an alternative to phosphoric acid for dentin treatment prior to hybridization with etch-and-rinse adhesive systems. *Journal of Adhesive Dentistry*, 18(5), 425–434. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a36891>
- Frassetto, A., Breschi, L., Turco, G., Marchesi, G., Di Lenarda, R., Tay, F. R., Pashley, D. H., & Cadenaro, M. (2016). Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability - A literature review. *Dental Materials*, 32(2), e41–e53. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.11.007>
- Garcia-Godoy, F., Krämer, N., Feilzer, A. J., & Frankenberger, R. (2010). Long-term degradation of enamel and dentin bonds: 6-year results in vitro vs. in vivo. *Dental Materials*, 26(11), 1113–1118. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.07.012>
- Geurtsen, W., Lehmann, F., Spahl, W., & Leyhausen, G. (1998). Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *Journal of Biomedical Materials Research*, 41(3), 474–480. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19980905\)41:3<474::AID-JBM18>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19980905)41:3<474::AID-JBM18>3.0.CO;2-I)
- Ghazali, F. B. C. (2003). Permeability of dentine. *The Malaysian Journal of Medical Sciences : MJMS*, 10(1), 27–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23365497>
- Goldberg, M., Kulkarni, A. B., Young, M., & Boskey, A. (2011). Dentin: Structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience - Elite*, 3 E(2), 711–735. <https://doi.org/10.2741/e281>
- Göstemeyer, G., & Schwendicke, F. (2016). Inhibition of hybrid layer degradation by cavity pretreatment: Meta- and trial sequential analysis. In *Journal of Dentistry* (Vol. 49, pp. 14–21). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.04.007>

- Guo, J., Lei, W., Yang, H., Zhang, Y., Zhao, S., & Huang, C. (2017a). Dimethyl Sulfoxide Wet-bonding Technique May Improve the Quality of Dentin Bonding. *The Journal of Adhesive Dentistry*, 19(3), 229–237. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a38438>
- Guo, J., Lei, W., Yang, H., Zhang, Y., Zhao, S., & Huang, C. (2017b). Dimethyl sulfoxide wet-bonding technique may improve the quality of dentin bonding. *Journal of Adhesive Dentistry*, 19(3), 229–237. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a38438>
- Hashimoto, M., Nagano, F., Endo, K., & Ohno, H. (2011). A review: Biodegradation of resin-dentin bonds. *Japanese Dental Science Review*, 47(1), 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2010.02.001>
- 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>
- Kim, J., Gu, L., Breschi, L., Tjäderhane, L., Choi, K. K., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2010). Implication of ethanol wet-bonding in hybrid layer remineralization. *Journal of Dental Research*, 89(6), 575–580. <https://doi.org/10.1177/0022034510363380>
- Li, J., Chen, B., Hong, N., Wu, S., & Li, Y. (2018). Effect of baicalein on matrix metalloproteinases and durability of resin-dentin bonding. *Operative Dentistry*, 43(4), 426–436. <https://doi.org/10.2341/17-097-L>
- Lukomska-Szymańska, M., Sokołowski, J., & Łapińska, B. (2017). Degradation of a hybrid layer – Review of literature. In *Journal of Stomatology* (Vol. 70, Issue 1, pp. 88–94). Polskie Towarzystwo Stomatologiczne. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.1775>
- Manso, A. P., Grande, R. H. M., Bedran-Russo, A. K., Reis, A., Loguercio, A. D., Pashley, D. H., & Carvalho, R. M. (2014). Can 1% chlorhexidine diacetate and ethanol stabilize resin-dentin bonds? *Dental Materials*, 30(7), 735–741. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.04.003>
- Matos, A. B., Trevelin, L. T., da Silva, B. T. F., Francisconi-Dos-Rios, L. F., Siriani, L. K., & Cardoso, M. V. (2017). Bonding efficiency and durability: Current possibilities. In *Brazilian Oral Research* (Vol. 31, pp. 3–22). Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0057>
- Mazzoni, A., Angeloni, V., Comba, A., Maravic, T., Cadenaro, M., Tezvergil-Mutluay, A., Pashley, D. H., Tay, F. R., & Breschi, L. (2018). Cross-linking effect on dentin bond strength and MMPs activity. *Dental Materials*, 34(2), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.11.009>

- Mjör, I. A. (2009). Dentin permeability: The basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Brazilian Dental Journal*, 20(1), 3–16. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402009000100001>
- Montagner, A. F., Sarkis-Onofre, R., Pereira-Cenci, T., & Cenci, M. S. (2014). MMP inhibitors on dentin stability: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dental Research*, 93(8), 733–743. <https://doi.org/10.1177/0022034514538046>
- Moszner, N., & Hirt, T. (2012). New polymer-chemical developments in clinical dental polymer materials: Enamel-dentin adhesives and restorative composites. In *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* (Vol. 50, Issue 21, pp. 4369–4402). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/pola.26260>
- Nagpal, R., Manuja, N., & Pandit, I. K. (2015). Effect of ethanol wet bonding technique on the durability of resin- dentin bond with contemporary adhesive systems. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 39(2), 133–142. <https://doi.org/10.17796/jcpd.39.2.p14u4x3q14272452>
- Nakabayashi, N., Kojima, K., & Matsuhara, E. (1982). Promotion of adhesion by infiltration monomers into tooth substrates. *J Biomed Mat Res.*, 16, 265–273.
- Nakabayashi, Nobuo, Nakamura, M., & Yasuda, N. (1991). Hybrid Layer as a Dentin-Bonding Mechanism. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*, 3(4), 133–138. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8240.1991.tb00985.x>
- Nanci, A. (2017). *Oral histology: Development, structure, and function* (ed 9). 48(1), 98–99. [https://doi.org/10.1016/0278-2391\(90\)90217-p](https://doi.org/10.1016/0278-2391(90)90217-p)
- Palasuk, J. (2018). Degradation of resin-dentin bonded interface: A review. *Journal of International Dental and Medical Research*, 11(2), 537–542.
- Perdigão, J. (2010). Dentin bonding-Variables related to the clinical situation and the substrate treatment. *Dental Materials*, 26(2), 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2009.11.149>
- Perdigão, J., & Loguercio, A. D. (2014). Universal or Multi-mode Adhesives: Why and How? *The Journal of Adhesive Dentistry*, 16(2), 193–194. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a31871>
- Ritter, A. (2019). Art And Science Of Operative Dentistry. In *Elsevier*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Sabatini, C., & Pashley, D. H. (2014). Mechanisms regulating the degradation of dentin matrices by endogenous dentin proteases and their role in dental adhesion. A review.

- In *American Journal of Dentistry* (Vol. 27, Issue 4, pp. 203–214). Mosher and Linder, Inc.
- Salim Al-Ani, A. A., Mutluay, M., Stape, T. H. S., Tjäderhane, L., & Tezvergil-Mutluay, A. (2018). Effect of various dimethyl sulfoxide concentrations on the durability of dentin bonding and hybrid layer quality. *Dental Materials Journal*, 37(3), 501–505. <https://doi.org/10.4012/dmj.2017-213>
- Sano, H., Chowdhury, A. F. M. A., Saikaew, P., Matsumoto, M., Hoshika, S., & Yamauti, M. (2020). The microtensile bond strength test: Its historical background and application to bond testing. *Japanese Dental Science Review*, 56(1), 24–31. <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2019.10.001>
- Sezinando, A. (2014). Looking for the ideal adhesive - A review. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentaria e Cirurgia Maxilofacial*, 55(4), 194–206. <https://doi.org/10.1016/j.rpemd.2014.07.004>
- Sofan, E., Sofan, A., Palaia, G., Tenore, G., Romeo, H., & Migliau, G. (2017). Classification review of dental adhesive systems: from the IV generation to the universal type. *Annali Di Stomatologia, VIII (1)*, 1–17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2966.2012.21196.x>
- Spencer, P., Ye, Q., Park, J., Topp, E. M., Misra, A., Marangos, O., Wang, Y., Bohaty, B. S., Singh, V., Sene, F., Eslick, J., Camarda, K., & Katz, J. L. (2010). Adhesive/dentin interface: The weak link in the composite restoration. *Annals of Biomedical Engineering*, 38(6), 1989–2003. <https://doi.org/10.1007/s10439-010-9969-6>
- Stape, T. H. S., Tezvergil-Mutluay, A., Mutluay, M. M., Martins, L. R. M., do Prado, R. L., Pizi, E. C. G., & Tjäderhane, L. (2016). Influence of dimethyl sulfoxide used as a solvent on the physical properties and long-term dentin bonding of hydrophilic resins. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 64(July 2019), 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2016.07.003>
- Stape, T. H. S., Tjäderhane, L., Abuna, G., Sinhoreti, M. A. C., Martins, L. R. M., & Tezvergil-Mutluay, A. (2018). Optimization of the etch-and-rinse technique: New perspectives to improve resin–dentin bonding and hybrid layer integrity by reducing residual water using dimethyl sulfoxide pretreatments. *Dental Materials*, 34(7), 967–977. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.010>
- Stape, T. H. S., Tjäderhane, L., Marques, M. R., Aguiar, F. H. B., & Martins, L. R. M. (2015). Effect of dimethyl sulfoxide wet-bonding technique on hybrid layer quality and dentin bond strength. *Dental Materials*, 31(6), 676–683. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.03.008>

- Stape, T. H. S., Tjäderhane, L., Tezvergil-Mutluay, A., Yanikian, C. R. F., Szesz, A. L., Loguercio, A. D., & Martins, L. R. M. (2016). Dentin bond optimization using the dimethyl sulfoxide-wet bonding strategy: A 2-year in vitro study. *Dental Materials*, 32(12), 1472–1481. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.09.015>
- Talungchit, S., Jessop, J. L. P., Cobb, D. S., Qian, F., Geraldeli, S., Pashley, D. H., & Armstrong, S. R. (2014). Ethanol-wet bonding and chlorhexidine improve resin-dentin bond durability: Quantitative analysis using Raman spectroscopy. *Journal of Adhesive Dentistry*, 16(5), 441–450. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a32695>
- Tezvergil-Mutluay, A., Agee, K. A., Mazzoni, A., Carvalho, R. M., Carrilho, M., Tersariol, I. L., Nascimento, F. D., Imazato, S., Tjäderhane, L., Breschi, L., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2015). Can quaternary ammonium methacrylates inhibit matrix MMPs and cathepsins? *Dental Materials*, 31(2), e25–e32. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.10.006>
- Tjäderhane, L. (2015). Dentin Bonding: Can We Make it Last? *Operative Dentistry*, 40(1), 4–18. <https://doi.org/10.2341/14-095-BL>
- Tjäderhane, L., Mehtälä, P., Scaffa, P., Vidal, C., Pääkkönen, V., Breschi, L., Hebling, J., Tay, F. R., Nascimento, F. D., Pashley, D. H., & Carrilho, M. R. (2013). The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on dentin bonding and nanoleakage of etch-and-rinse adhesives. *Dental Materials*, 29(10), 1055–1062. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.07.014>
- Tjäderhane, L., Nascimento, F. D., Breschi, L., Mazzoni, A., Tersariol, I. L. S., Geraldeli, S., Tezvergil-Mutluay, A., Carrilho, M., Carvalho, R. M., Tay, F. R., & Pashley, D. H. (2013). Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer - A review. In *Dental Materials* (Vol. 29, Issue 10, pp. 999–1011). <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.07.016>
- Vaidyanathan, T. K., & Vaidyanathan, J. (2009). Recent advances in the theory and mechanism of adhesive resin bonding to dentin: A critical review. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 88(2), 558–578. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31253>
- Van Meerbeek, B., Inokoshi, S., Braem, M., Lambrechts, P., & Vanherle, G. (1992). Morphological Aspects of the Resin-Dentin Interdiffusion Zone with Different Dentin Adhesive Systems. *Journal of Dental Research*, 71(8), 1530–1540. <https://doi.org/10.1177/00220345920710081301>
- Van Meerbeek, B., Yoshihara, K., Yoshida, Y., Mine, A., De Munck, J., & Van Landuyt, K. 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>

- Van Meerbeek, Bart, Yoshihara, K., van Landuyt, K., Yoshida, Y., & Peumans, M. (2020). From buonocore's pioneering acid-etch technique to self-adhering restoratives. A status perspective of rapidly advancing dental adhesive technology. *Journal of Adhesive Dentistry*, 22(1), 7–34. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a43994>
- Venigalla, B. S., Jyothi, P., Kamishetty, S., Reddy, S., Cherukupalli, R. C., & Reddy, D. A. (2016). Resin bond strength to water versus ethanol-saturated human dentin pretreated with three different cross-linking agents. *Journal of Conservative Dentistry*, 19(6), 555–559. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.194019>
- Vinagre, A., & Ramos, J. (2016). Adhesion in Restorative Dentistry. In *Adhesives - Applications and Properties*. InTech. <https://doi.org/10.5772/65605>
- Walter, R., Swift, E. J., Nagaoka, H., Chung, Y., Bartholomew, W., Braswell, K. M., & Pereira, P. N. R. (2012). Two-year bond strengths of “all-in-one” adhesives to dentine. *Journal of Dentistry*, 40(7), 549–555. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.03.003>
- Yamauchi, S., Wang, X., Egusa, H., & Sun, J. (2020). High-Performance Dental Adhesives Containing an Ether-Based Monomer. *Journal of Dental Research*, 99(2), 189–195. <https://doi.org/10.1177/0022034519895269>
- Yi, L., Yu, J., Han, L., Li, T., Yang, H., & Huang, C. (2019). Combination of baicalein and ethanol-wet-bonding improves dentin bonding durability. *Journal of Dentistry*, 90. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2019.103207>
- Zhang, J., Guo, X., Zhang, X., Wang, H., Zhu, J., Shi, Z., Zhu, S., & Cui, Z. (2020). Hydrolysis-resistant and stress-buffering bifunctional polyurethane adhesive for durable dental composite restoration. *Royal Society Open Science*, 7(7), 200457. <https://doi.org/10.1098/rsos.200457>

ANEXOS

Anexo I

	PUBMED	Pesquisa Total	Pesquisa Parcial
1.	Dentin	34031	6208
2.	Dentine	36823	6984
3.	Collagen	2200201	44710
4.	Hydrolytic	18312	4092
5.	Water	1014190	286219
6.	Hydrolysis	154279	24598
7.	Hybrid Layer	6923	3315
8.	Adhesive interface	3830	1146
9.	Resin-Dentin	782	229
10.	Resin-Dentine	97	25
11.	Resin-Dentine interface	53	12
12.	Bond Interface	6417	1894
13.	Degradation	8044092	1293244
14.	Longevity	45357	13434
15.	Durability	19763	8463
16.	Preservation	167591	35268
17.	Stability	463964	153571
18.	Protection	375408	1009009
19.	Inhibition	886630	188174
20.	Biodegradation	7512826	1173865
21.	Effectiveness	446576	147797
	1 AND 7 AND 13.	142	54
	1 AND 7 AND 16.	20	7
	1 AND 7 AND 8	358	75
	1 AND 3 AND 7	228	53
	1 AND 4 AND 7	18	6
	1 AND 5 AND 7	298	58
	1 AND 6 AND 7	33	7
	7 AND 11 AND 13	38	16
	7 AND 12 AND 14	15	9
	7 AND 8 AND 15	42	15
	7 AND 8 AND 17	25	11
	7 AND 8 AND 20	30	12
	7 AND 13 AND 21	17	7
	1 AND 7 AND 20	71	22
	1 AND 3 AND 4	53	13
	3 AND 4 AND 5	25	6
	3 AND 5 AND 6	134	35
	14 AND 11 AND 7	1	1

11 AND 12 AND 13	11	4
11 AND 12 AND 16	1	1
11 AND 12 AND 17	2	0
11 AND 7 AND 18	0	0
7 AND 9 AND 14	13	8
7 AND 1	864	159
7 AND 10	35	10
7 AND 11	23	8
7 AND 12	340	76
7 AND 13	1218	438
7 AND 14	43	25
7 AND 15	145	83
7 AND 16	42	17
7 AND 17	812	561
7 AND 18	89	59
7 AND 19	106	57
7 AND 2	872	162
7 AND 20	830	224
7 AND 21	103	48
7 AND 3	319	90
7 AND 5	321	66
7 AND 6	35	7
7 AND 8	396	78
7 AND 9	243	56
2 AND 7 AND 13	143	55
2 AND 7 AND 16	20	7
2 AND 3 AND 8	196	68
2 AND 3 AND 7	228	53
2 AND 4 AND 7	0	0
2 AND 5 AND 7	25	4
2 AND 6 AND 7	2	1
2 AND 7 AND 20	71	22
8 AND 1	1484	392
8 AND 2	1510	400
8 AND 3	283	96
8 AND 4	10	3
8 AND 5	191	46
8 AND 6	16	4
8 AND 9	333	104
8 AND 10	39	11
8 AND 11	39	11
8 AND 12	1807	515
8 AND 13	615	194

8 AND 14	70	32
8 AND 15	193	78
8 AND 16	23	10
8 AND 17	213	101
8 AND 18	28	17
8 AND 19	74	35
8 AND 20	423	116
8 AND 21	107	38
TOTAL		5057

MEDNAR	Pesquisa Total	Pesquisa Parcial
1. Dentin	68	21
2. Dentine	434	121
3. Collagen	307	60
4. Hydrolitic	3	0
5. Water	961	77
6. Hydrolysis	151	9
7. Hybrid Layer	67	22
8. Adhesive interface	143	18
9. Resin-Dentin	27	0
10. Resin-Dentine	16	0
11. Resin-Dentine interface	81	12
12. Bond Interface	118	13
13. Degradation	763	139
14. Longevity	1037	190
15. Durability	1409	341
16. Preservation	1550	413
17. Stability	1505	317
18. Protection	2029	528
19. Inhibition	1394	304
20. Biodegradation	722	181
21. Effectiveness	2065	555
1 AND 7 AND 13.	367	35
1 AND 7 AND 16.	534	99
1 AND 7 AND 8	491	25
1 AND 3 AND 7	135	35
1 AND 4 AND 7	147	7
1 AND 5 AND 7	380	44
1 AND 6 AND 7	240	42
7 AND 11 AND 13	390	1
7 AND 12 AND 14	375	21
7 AND 8 AND 15	423	8

7 AND 8 AND 17	542	71
7 AND 8 AND 20	396	0
7 AND 13 AND 21	548	95
1 AND 7 AND 20	380	30
1 AND 3 AND 4	136	8
3 AND 4 AND 5	241	18
3 AND 5 AND 6	342	55
14 AND 11 AND 7	380	15
11 AND 12 AND 13	0	0
11 AND 12 AND 16	0	0
11 AND 12 AND 17	0	0
11 AND 7 AND 18	0	0
7 AND 9 AND 14	0	0
7 AND 1	380	31
7 AND 10	346	11
7 AND 11	432	25
7 AND 12	395	37
7 AND 13	486	80
7 AND 14	431	21
7 AND 15	424	47
7 AND 16	542	9
7 AND 17	631	63
7 AND 18	570	6
7 AND 19	423	36
7 AND 2	520	71
7 AND 20	426	66
7 AND 21	457	0
7 AND 3	382	0
7 AND 5	208	39
7 AND 6	164	11
7 AND 8	485	59
7 AND 9	361	26
2 AND 7 AND 13	340	3
2 AND 7 AND 16	155	2
2 AND 3 AND 8	326	2
2 AND 3 AND 7	433	104
2 AND 4 AND 7	407	59
2 AND 5 AND 7	376	4
2 AND 6 AND 7	139	1
2 AND 7 AND 20	374	47
8 AND 1	564	244
8 AND 2	327	45
8 AND 3	499	88

8 AND 4	161	6
8 AND 5	264	56
8 AND 6	227	8
8 AND 9	507	83
8 AND 10	329	2
8 AND 11	358	11
8 AND 12	353	1
8 AND 13	486	99
8 AND 14	476	11
8 AND 15	392	40
8 AND 16	556	115
8 AND 17	575	0
8 AND 18	551	4
8 AND 19	581	138
8 AND 20	397	52
8 AND 21	706	141
TOTAL		2773

WEOFSCIENCE	Pesquisa Total	Pesquisa Parcial
1. Dentin	26237	7588
2. Dentine	6777	1992
3. Collagen	232097	67310
4. Metalloproteinases	45638	14234
5. Cysteine-cathepsins	901	502
6. MMP	56888	22030
7. Hybrid Layer	1585	550
8. Adhesive interface	1114	395
9. Resin-Dentin	877	304
10. Resin-Dentine	101	36
11. Resin-Dentine interface	34	11
12. Bond Interface	617	211
13. Degradation	773197	302374
14. Longevity	57692	21314
15. Durability	88670	44233
16. Preservation	178011	67417
17. Stability	1604526	655480
18. Protection	612366	230401
19. Inhibition	1134581	337479
20. Biodegradation	61047	22117
21. Effectiveness	956512	448857

1 AND 7 AND 13.	328	162
1 AND 7 AND 16.	38	23
1 AND 7 AND 8	131	41
1 AND 3 AND 7	344	138
1 AND 4 AND 7	120	68
1 AND 5 AND 7	33	26
1 AND 6 AND 7	78	51
7 AND 11 AND 13	6	3
7 AND 12 AND 14	1	1
7 AND 8 AND 15	47	14
7 AND 8 AND 17	21	9
7 AND 8 AND 20	3	1
7 AND 13 AND 21	22	11
1 AND 7 AND 20	20	7
1 AND 3 AND 4	238	146
3 AND 4 AND 5	76	58
3 AND 5 AND 6	47	36
14 AND 11 AND 7	1	1
11 AND 12 AND 13	0	0
11 AND 12 AND 16	0	0
11 AND 12 AND 17	0	0
11 AND 7 AND 18	0	
7 AND 9 AND 14	21	11
7 AND 1	1043	317
7 AND 10	47	18
7 AND 11	16	7
7 AND 12	7	5
7 AND 13	377	191
7 AND 14	54	32
7 AND 15	302	141
7 AND 16	41	24
7 AND 17	165	106
7 AND 18	21	9
7 AND 19	79	41
7 AND 2	1043	317
7 AND 20	24	10
7 AND 21	66	26
7 AND 3	370	150
7 AND 5	36	29
7 AND 6	84	55
7 AND 8	135	43
7 AND 9	341	118
2 AND 7 AND 13	44	16

2 AND 7 AND 16	5	4
2 AND 3 AND 8	10	2
2 AND 3 AND 7	51	24
2 AND 4 AND 7	24	12
2 AND 5 AND 7	5	4
2 AND 6 AND 7	15	10
2 AND 7 AND 20	2	1
8 AND 1	401	135
8 AND 2	40	13
8 AND 3	90	38
8 AND 4	37	22
8 AND 5	9	9
8 AND 6	14	10
8 AND 9	79	25
8 AND 10	5	2
8 AND 11	2	0
8 AND 12	8	3
8 AND 13	146	80
8 AND 14	22	14
8 AND 15	146	58
8 AND 16	10	7
8 AND 17	71	37
8 AND 18	8	3
8 AND 19	32	10
8 AND 20	8	2
8 AND 21	31	12
TOTAL		2999

	SCOPUS	Pesquisa Total	Pesquisa Parcial
1.	Dentin	38904	9398
2.	Dentine	10104	2299
3.	Collagen	287224	75611
4.	Metalloproteinases	35646	9929
5.	Cysteine-cathepsins	440	197
6.	MMP	59045	22727
7.	Hybrid Layer	1754	582
8.	Adhesive interface	1593	581
9.	Resin-Dentin	865	319
10.	Resin-Dentine	109	38
11.	Resin-Dentine interface	53	17
12.	Bond Interface	1051	299
13.	Degradation	918854	308873
14.	Longevity	25179	77008

15.	Durability	122421	49518
16.	Preservation	122421	49518
17.	Stability	1950257	686961
18.	Protection	1118828	355158
19.	Inhibition	1375177	347096
20.	Biodegradation	122613	38876
21.	Effectiveness	1589258	666045
	1 AND 7 AND 13.	169	71
	1 AND 7 AND 16.	26	14
	1 AND 7 AND 8	136	51
	1 AND 3 AND 7	284	88
	1 AND 4 AND 7	78	38
	1 AND 5 AND 7	13	9
	1 AND 6 AND 7	64	33
	7 AND 11 AND 13	7	3
	7 AND 12 AND 14	2	1
	7 AND 8 AND 15	20	11
	7 AND 8 AND 17	21	12
	7 AND 8 AND 20	2	0
	7 AND 13 AND 21	9	5
	1 AND 7 AND 20	16	4
	1 AND 3 AND 4	189	97
	3 AND 4 AND 5	38	27
	3 AND 5 AND 6	28	20
	14 AND 11 AND 7	2	2
	11 AND 12 AND 13	0	0
	11 AND 12 AND 16	0	0
	11 AND 12 AND 17	0	0
	11 AND 7 AND 18	0	0
	7 AND 9 AND 14	23	10
	7 AND 1	1005	257
	7 AND 10	25	10
	7 AND 11	25	10
	7 AND 12	10	5
	7 AND 13	199	94
	7 AND 14	53	27
	7 AND 15	142	70
	7 AND 16	26	15
	7 AND 17	130	77
	7 AND 18	27	11
	7 AND 19	48	29
	7 AND 2	147	35
	7 AND 20	18	6

7 AND 21	65	26
7 AND 3	295	97
7 AND 5	13	9
7 AND 6	65	35
7 AND 8	139	52
7 AND 9	300	96
2 AND 7 AND 13	23	8
2 AND 7 AND 16	2	2
2 AND 3 AND 8	5	2
2 AND 3 AND 7	40	15
2 AND 4 AND 7	12	3
2 AND 5 AND 7	1	0
2 AND 6 AND 7	11	4
2 AND 7 AND 20	3	1
8 AND 1	483	172
8 AND 2	62	19
8 AND 3	92	36
8 AND 4	25	17
8 AND 5	5	4
8 AND 6	22	16
8 AND 9	89	35
8 AND 10	9	3
8 AND 11	6	2
8 AND 12	13	4
8 AND 13	139	68
8 AND 14	27	19
8 AND 15	124	60
8 AND 16	17	12
8 AND 17	84	44
8 AND 18	13	6
8 AND 19	27	13
8 AND 20	12	5
8 AND 21	51	19
TOTAL		2046

