

**EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE UN FLAVONOIDE EN EL COMPORTAMIENTO  
DE LA INTERFASE ADHESIVA RESINA-DENTINA**

**DIEGO ENRIQUE BETANCOURT CASTRO**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE  
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS  
BOGOTÁ DC - JUNIO - 2018**

## HOJA DE IDENTIFICACION

<b>Universidad</b>	El Bosque
<b>Facultad</b>	Odontología
<b>Programa</b>	Maestría en Ciencias Odontológicas
<b>Título:</b>	Efecto de la aplicación de un flavonoide en el comportamiento de la interfase adhesiva resina-dentina
<b>Institución(es) participante(s):</b>	Universidad Nacional de Colombia
<b>Director:</b>	Jaime Eduardo Castellanos Parra PhD
<b>Estudiante:</b>	Diego Enrique Betancourt Castro
<b>Codirectora:</b>	Paula Alejandra Baldión Elorza PhD

## **DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE**

<b>HERNANDO MATIZ CAMACHO</b>	Presidente del Claustro
<b>JUAN CARLOS LÓPEZ TRUJILLO</b>	Presidente Consejo Directivo
<b>MARIA CLARA RANGEL GALVIS</b>	Rectora
<b>RITA CECILIA PLATA</b>	Vicerrectora Académica
<b>FRANCISCO FALLA</b>	Vicerrector Administrativo
<b>MIGUEL OTERO CADENA</b>	Vicerrectoría de Investigaciones.
<b>LUIS ARTURO RODRÍGUEZ</b>	Secretario General
<b>JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS</b>	División Postgrados
<b>MARÍA ROSA BUENAHORA</b>	Decana Facultad de Odontología
<b>MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL</b>	Secretaria Académica
<b>DIANA ESCOBAR</b>	Directora Área Bioclínica
<b>MARIA CLARA GONZÁLEZ</b>	Director Área Comunitaria
<b>FRANCISCO PEREIRA</b>	Coordinador Área Psicosocial
<b>INGRID ISABEL MORA</b>	Coordinadora Investigación Facultad de Odontología
<b>IVÁN SANTA CRUZ</b>	Coordinador Postgrados Odontología
<b>LINA MILLÁN</b>	Coordinador(a) Programa de Maestría en Ciencias Odontológicas

**“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.**

## **DEDICATORIA**

### **A Dios...**

Como ser supremo y quien me ha colmado de bendiciones al darme la oportunidad de poder realizarme como persona y como profesional.

### **A mi esposa...**

Quien ha sido mi compañera de viaje por más de 20 años y me ha enseñado otra forma de ver y vivir la vida, demostrándome que no hay obstáculos insalvables para lograr lo que queremos. Su amor, ejemplo y dedicación son un faro de luz que ilumina mi vida.

### **A mis hijos...**

Nicolás y Sebastián, motores de mi existencia y a quienes quisiera dejar un legado que los ayude a crecer como personas, para que un día lleguen tan alto como quieran.

### **A mi familia...**

A mis hermanos Jaime, César, Patricia, Diana que ha sido una hermana más, Eloísa mi segunda madre. Gracias por ser incondicionales y siempre estar ahí.

## **AGRADECIMIENTOS**

Son muchas las personas por quienes tengo especial sentimiento de gratitud, y aunque no puedo mencionarlas a todas, quiero expresar mi agradecimiento:

A Jaime Castellanos, mi director, por creer en mí desde el principio y secundarme en este proyecto, aportándome todo lo necesario para poder sacarlo adelante.

A Paula Baldión, mi codirectora, inmejorable como persona y como académica, quien no se guardó nada para sí.

A Dairo Marín, Decano de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional, por apoyarme y alentarme para seguir adelante.

A todos los profesores de la Maestría en Ciencias Odontológicas de la Universidad El Bosque, sin excepción, quienes me enseñaron mucho, pero por encima de todo, hicieron que esta fuera una experiencia gratificante.

A Consuelo Niño, desde el laboratorio de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional, siempre tuvo la mejor disposición e interés para que las muestras pudieran ser obtenidas y almacenadas de la mejor manera.

Al ingeniero César Bacca, apoyo incondicional en el laboratorio interfacultades de ensayos mecánicos de la Universidad Nacional de Colombia.

## RESUMEN

### EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE UN FLAVONOIDE EN EL COMPORTAMIENTO DE LA INTERFASE ADHESIVA RESINA- DENTINA

**Antecedentes:** es bien sabido que los adhesivos hidrofílicos actuales producen una capa híbrida que es inestable con el tiempo, en parte por la activación de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) que degradan la red de colágeno expuesta por el acondicionamiento ácido y se infiltran parcialmente por los monómeros de resina.

**Objetivo:** El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de la aplicación de un flavonoide experimental (MRT-1) en la interfase adhesiva dentina-resina, en términos de actividad de MMP y resistencia de unión microtensil ( $\mu$ TBS).

**Métodos:** el ensayo de actividad MMP se realizó en bloques de dentina, que se obtuvieron de terceros molares bajo consentimiento informado. Todas las muestras se desmineralizaron con ácido fosfórico al 10% *overnight* y se distribuyeron aleatoriamente en los grupos de prueba. La actividad de MMP se midió con un kit genérico de ensayo de actividad MMP. Para la prueba  $\mu$ TBS, se eliminó el esmalte oclusal de 20 terceros molares repartidos aleatoriamente en 4 grupos de prueba (MRT-1 a 600  $\mu$ M, etanol al 100%, clorhexidina al 0.2% y control negativo, para el protocolo adhesivo grabado-enjuague). En cada grupo se aplicó el tratamiento adhesivo propuesto y se construyeron bloques de resina que, posteriormente, se seccionaron en barras de 1,0 mm<sup>2</sup> para hacer la prueba tensil inmediata y después de 6 meses de almacenamiento en saliva artificial.

**Resultados:** el ensayo de actividad de MMP mostró que MRT-1 al 600  $\mu$ M (120s) fue eficaz para disminuir la actividad de MMP en un 74% con respecto al grupo control. En la prueba  $\mu$ TBS, MRT-1 al 600  $\mu$ M, clorhexidina al 0.2% y etanol al 100%, aplicados de manera independiente después del grabado ácido de la dentina, no interfirieron con la adhesión. MRT-1 al igual que la clorhexidina mantuvo los mismos valores de resistencia de unión durante 6 meses, mientras que el control negativo disminuyó los valores de  $\mu$ TBS después del envejecimiento.

**Conclusiones:** el tratamiento con MRT-1, clorhexidina y etanol estabilizó la interfase dentina-resina durante 6 meses. El uso de un flavonoide experimental (MRT-1) durante 2 min sería útil en un protocolo clínico de adhesión para preservar la interfase dentina-resina.

**Palabras claves:** dentina, adhesión, flavonoides, metaloproteinasas de la matriz, interfase

## ABSTRACT

### EFFECTS OF FLAVONOID APPLICATION ON THE BEHAVIOR OF THE RESIN-DENTIN ADHESIVE INTERFACE

#### ABSTRACT

**Background:** It is well-known that conventional hydrophilic adhesives produce a hybrid layer that is unstable over time, in part because of the activation of extracellular matrix metalloproteinases (MMPs) that degrade the collagen network exposed by acid conditioning. In addition, the network can be partially infiltrated by resin monomers. **Objective:** The aim of this study is to evaluate the effects of the application of an experimental flavonoid (MRT-1) on the dentin-resin adhesive interface in terms of MMP activity and microtensile bond strength ( $\mu$ TBS). **Methods:** An MMP activity assay was performed on dentin beams obtained from third molars with informed consent. The specimens were demineralized with 10% phosphoric acid overnight and randomly divided into test groups. The MMP activity was measured with a generic MMP activity assay kit. For the  $\mu$ TBS test, occlusal enamel was removed from 20 third molars and divided randomly into 4 test groups (600  $\mu$ M MRT-1, 100% ethanol, 0.2% chlorhexidine, and negative control groups for etch-rinse adhesive protocol). Each group was subjected to the proposed adhesive treatment, and composite buildups were constructed and sectioned in sticks of 1.0 mm<sup>2</sup> for immediate tension tests and after 6 months of storage in artificial saliva. **Results:** The MMP activity assay showed that 600  $\mu$ M MRT-1 (120 s) effectively decreased the MMP activity by 74% compared to the control group. In the  $\mu$ TBS test, 600  $\mu$ M MRT-1, 2% chlorhexidine and 100% ethanol applied after acid etching did not interfere with the  $\mu$ TBS of the dentin. MRT-1, similar to chlorhexidine, maintained the same bond strength values over 6 months, while the negative control showed decreased  $\mu$ TBS values after aging. **Conclusions:** MRT-1, chlorhexidine, and ethanol treatments stabilized the dentin-resin interface over 6 months. Application of the experimental flavonoid MRT-1 for 2 min would be useful in a dentin-bonding clinical protocol to preserve the dentin-resin interface.

**Key words:** dentin, bonding, flavonoids, matrix metalloproteinases, interface

## CONTENIDO

	Pag
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>3</b>
2.1 La dentina como sustrato de adhesión	3
2.2 Metaloproteinasas de matriz: estructura y función	5
2.3 Degradación de la interfase adhesiva	7
2.4 Estrategias para la estabilización de la interfase adhesiva	11
2.5 Evaluación de la interfase adhesiva	13
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>15</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>17</b>
<b>5. OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
5.1 Objetivo general	18
5.2 Objetivos específicos	18
<b>6. METODOLOGÍA</b>	<b>19</b>
6.1 Ensayo genérico de actividad de MMP	19
6.2 Ensayo de actividad de MMP por microscopía de fluorescencia	20
6.3 Ensayo de resistencia de unión microtensil ( $\mu$ TBS)	21
6.4 Caracterización de la capa híbrida por microscopio electrónico de barrido (SEM)	23
6.5 Análisis estadístico	24
<b>7. CONSIDERACIONES ÉTICAS</b>	<b>25</b>
7.1 Impacto ambiental	25
7.2 Aval de comité de ética	27
7.3 Consentimiento informado	28
7.4 Folleto informativo	31
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>32</b>
8.1 MRT-1 inhibe eficientemente la actividad de MMP	32
8.2 MRT-1 disminuye la intensidad de fluorescencia como indicador de inhibición de las MMP en dentina desmineralizada	33
8.3 MRT-1 no afecta negativamente la resistencia de unión microtensil inmediata y la mantiene posterior a seis meses de almacenamiento	35

<b>8.4 MRT-1 posibilita la formación de una interfase adhesiva homogénea</b>	<b>37</b>
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>39</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>43</b>
<b>11. RECOMENDACIONES</b>	<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>45</b>

## INTRODUCCIÓN

La resina compuesta es uno de los materiales restauradores de más amplio uso en odontología, utilizado para la obturación de cavidades dentales, cementación de restauraciones indirectas y restauraciones estéticas [Van Landuyt *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011]. La unión resina-dentina depende de la infiltración del sistema adhesivo dentro de la matriz de colágeno de la dentina, que es expuesta por medio del acondicionamiento ácido, lo que conforma una zona de interdifusión resina-dentina denominada “capa híbrida”, que cumple una función fundamental en la retención micromecánica de la restauración [Nakabayashi *et al.*, 1991].

Se ha establecido que la infiltración del colágeno por parte del adhesivo es incompleta, ya que su capacidad de penetración es menor que la profundidad de acondicionamiento del agente grabador, además de la gran dificultad en el desplazamiento del agua residual en la matriz de dentina [Pashley *et al.*, 2011; Mazzoni *et al.*, 2013], razones por las cuales queda una porción de colágeno desprotegido, dando lugar a la activación de proteasas endógenas presentes en la dentina, denominadas metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP por su nombre en inglés). Las MMP como enzimas colagenolíticas, hidrolizan la matriz orgánica de la dentina desmineralizada, evento que desencadena la degradación de la capa híbrida (Pashley *et al.*, 2004; Nishitani *et al.*, 2006).

Esta degradación hidrolítica de la interfase adhesiva genera consecuencias clínicas adversas como hipersensibilidad dentinal, pigmentación marginal y posible caries secundaria, disminuyendo así, la longevidad de las restauraciones. Eventos que traen como consecuencia altos costos biológicos y económicos asociados a la necesidad de recambio de restauraciones [Pashley *et al.*, 2011].

Para contrarrestar el efecto de las MMP, se ha sugerido el uso de inhibidores sintéticos no específicos como la clorhexidina [Carrilho *et al.*, 2007 a,b], que aunque ha demostrado tener efectividad a corto y mediano plazo, su unión a la dentina es de naturaleza electrostática [Blackburn *et al.*, 2007], por lo que su capacidad inhibitoria disminuye antes de 2 años [Sadek *et al.*, 2010]. Recientemente, se ha propuesto como estrategia el uso experimental de agentes de reticulación que crean cadenas de entrecruzamiento con el colágeno, lo que lo hace más

resistente a la degradación enzimática, y a los que también, se les atribuye la capacidad de inhibición de la actividad de las MMP. Los compuestos polifenólicos tipo flavonoides, como las proantocianidinas, la quercitina y el curcumín, poseen una estructura química que favorece su acción como agente reticulante, sin embargo, no han demostrado sus beneficios en un protocolo que sea clínicamente relevante, ya que los tiempos de aplicación requeridos y la profundidad de penetración no los hace eficaces dentro del protocolo clínico [Bedran-Russo *et al.*, 2007; Seseogullari-Dirihan *et al.*, 2016; Hass *et al.*, 2016]. Es por esto que se ha planteado como objetivo del presente estudio, evaluar el efecto de un flavonoide (MRT-1) sobre el comportamiento mecano-biológico de la interfase adhesiva resina-dentina, en términos de la capacidad de inhibición de las enzimas MMP y de su influencia en el comportamiento de la resistencia de unión microtensil de la resina a la dentina desmineralizada, cuando se aplica por un tiempo que sea adecuado para un protocolo clínico. La significancia clínica es contribuir a la investigación de estrategias para mejorar la estabilidad de la interfase adhesiva, y, por ende, a la durabilidad de las restauraciones adhesivas.

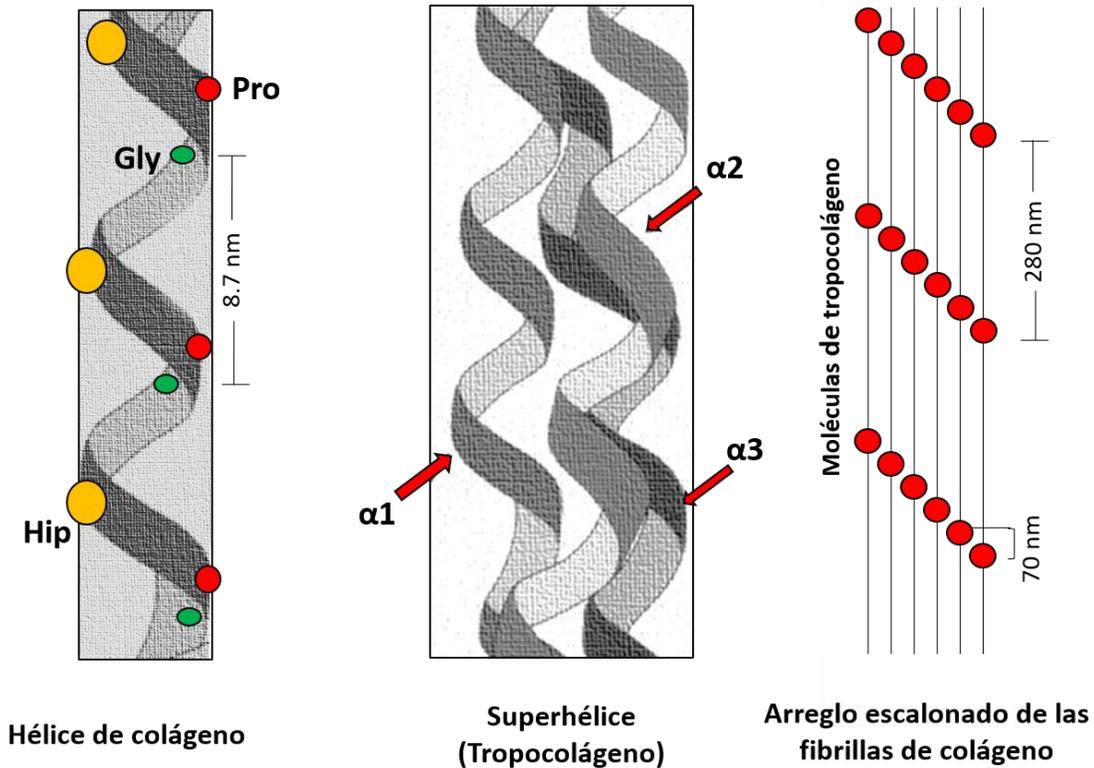
## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 La dentina como sustrato para la adhesión

La dentina es un tejido biológico, complejo y dinámico, que se encuentra subyacente al esmalte dental y está en relación histológica, embriológica y funcional con la pulpa dental. La dentina está compuesta en un 47% por cristales de hidroxiapatita, un 20% de agua y 33% de material orgánico, principalmente colágeno tipo I (90%) y el restante porcentaje de proteínas no colágenas [Linde, 1998; Butler *et al.*, 2003]. Estas proporciones varían según la región del diente y se ven afectadas por procesos fisiológicos, como el envejecimiento y procesos patológicos como la caries dental [Marshall *et al.*, 1997]. La técnica de acondicionamiento dentinal por grabado ácido altera la composición de la dentina, donde la cantidad de agua presente cambia de un 18% a un 50 a 70% en volumen, lo que tiene gran implicación en las características físicas del tejido [Carvalho *et al.*, 2012].

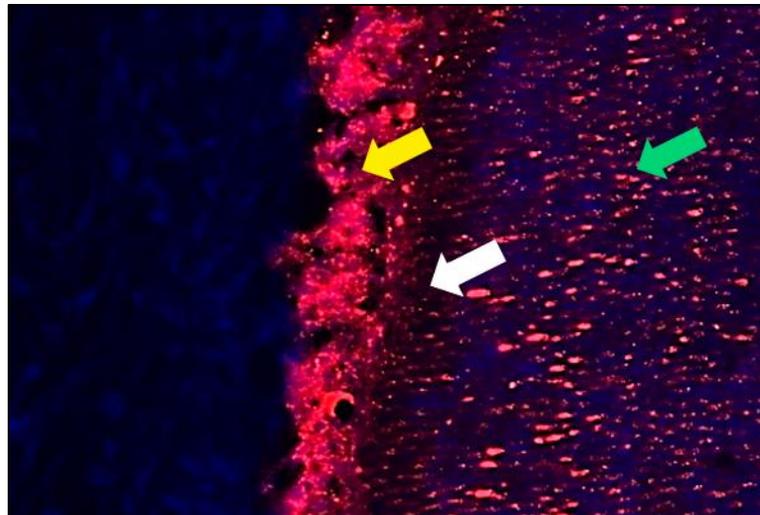
El colágeno es una proteína compuesta por una secuencia de los aminoácidos: glicina, lisina, prolina, y sus productos hidroxilados, hidroxiprolina e hidroxilisina, principalmente. Es sintetizado a partir de una molécula más grande, el tropocolágeno, que es clivada a nivel de los grupos carboxilo y amino terminales con una periodicidad de 67 a 69 nm, lo cual facilita su entrecruzamiento. El entrecruzamiento intrínseco del colágeno está dado por reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Las reacciones enzimáticas forman enlaces covalentes lisina-lisina, mediados por hidroxilación de la lisina, glicosilación y tasa de recambio molecular. La reticulación no enzimática involucra procesos de oxidación y glicación [Bedran-Russo *et al.*, 2014].

El colágeno en su estructura cuaternaria presenta una triple hélice en un arreglo que la hace muy estable y resistente a su degradación, exhibiendo en su porción externa los aminoácidos hidrofílicos y, en su porción interna, los aminoácidos hidrófobos. El colágeno es el responsable de la resistencia a la tracción, del módulo elástico de la dentina y de las propiedades bioquímicas de la misma; propiedades que son dependientes del grado de reticulación. (Figura 1).



**Figura 1. Estructura del colágeno.** Cada hélice del colágeno es denominada cadena  $\alpha$  que es una hebra levógira con alrededor de 3 residuos por vuelta de secuencias de glicina (Gly), prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hip). La estructura cuaternaria de la fibrilla de colágeno se forma con el superenrollamiento de tres cadenas  $\alpha$  para conformar una triple hélice dextrógira.

Las proteínas no colágenas, tales como proteoglicanos (p. ej. condroitin-4/6-sulfato, decorina, biglicano, lumicano, fibromodulina) [Embery *et al.*, 2001; Milan *et al.*, 2005] y pequeñas glicoproteínas de unión al ligando N de integrinas (SIBLINGs), como la sialoproteína ósea, osteopontina, proteína de matriz dentinal-1 y sialofosfoproteína dentinal, desempeñan una función importante en la dentinogénesis, incluyendo funciones de regulación y control del crecimiento de los cristales, la fibrillogénesis y la mineralización [Moses *et al.*, 2006] (Figura 2). Las fibrillas de colágeno y las proteínas no colágenas son sintetizadas y secretadas por los odontoblastos, que son las células principales que constituyen el tejido conectivo pulpar del diente [Linde & Goldberg, 1993, Lee *et al.*, 2013].



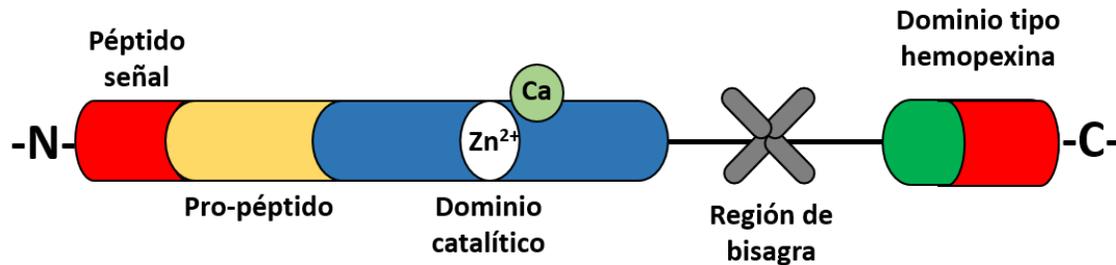
**Figura 2. Localización de proteínas SIBLING en dentina mineralizada.** Por técnica de inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo policlonal anti-DMP1 (Sigma-Aldrich) y marcaje con estreptavidina acoplada a Alexa Flúor 594 (color rojo), se observó bajo microscopio de fluorescencia, el análisis de los patrones de localización de la Proteína de matriz dentinal-1 (DMP-1). La DMP-1, se encuentra fuertemente expresada en la capa odontoblástica (flecha amarilla), y con menor intensidad en la zona de la pre-dentina (flecha blanca) y en el frente de mineralización de la dentina (flecha verde). La DMP-1 se encuentra en interacción con las fibras de colágeno (dentina mineralizada contra-teñida con Hoechst 33342 de color azul) en su forma fosforilada, y actúa como nucleadora de la formación de cristales de hidroxiapatita para la mineralización de la matriz dentinal. Cortesía de Baldión *et al.* [2018].

## 2.2 Metaloproteinasas de matriz: estructura y función

Las MMP constituyen una familia de enzimas dentro de la cual se han descrito 23 tipos en humanos, son dependientes del calcio y el zinc para poder realizar su actividad, todas ellas caracterizadas por tener en su composición cuatro dominios: el dominio péptido-señal, el dominio propéptido —donde hay una cisteína con sus grupos sulfhidrilo—, un dominio catalítico —donde hay un zinc en el sitio de actividad catalítica junto a residuos de histidina y calcio—, y un dominio tipo hemopexina —que le sirve para unirse al sustrato y que es el sitio en donde se unen los inhibidores tisulares específicos— [Bali *et al.*, 2016].

Estas enzimas son producidas por leucocitos y células similares a fibroblastos capaces de sintetizar matriz extracelular mineralizada incluidas, las células de la pulpa dental. Son secretadas en forma de proenzima (enzima inactiva), manteniéndose de forma zimógena hasta ser activadas. La proenzima se caracteriza por la unión de los grupos sulfhidrilo presentes en la cisteína del dominio propéptido, con el zinc presente en el dominio catalítico, de forma tal que no deja el zinc disponible para la actividad catalítica. El proceso de activación de la enzima está dado por el rompimiento de la interacción zinc-cisteína, lo cual se ha

denominado el *switch* de cisteína, proceso que es clave para el entendimiento del funcionamiento de estas enzimas y su posible inhibición [Zhang & Kern, 2009; Sulkala *et al.*, 2007; Visse & Nagase, 2003; Tjaderhane *et al.*, 1998] (Figura 3).



**Figura 3. Estructura básica de las MMP.** Constituida por cuatro dominios principales, el péptido-síñal que dirige la secreción de la proteína al exterior de la célula, una región propéptido que mantiene a la enzima inactiva hasta que es escindido proteolíticamente, un dominio catalítico que une el zinc y el calcio, y al cual se une la cisteína de la región propéptido para mantenerla inactiva (*switch* de cisteína) y un dominio tipo hemopexina que media en la especificidad del sustrato y las interacciones con inhibidores endógenos. Las MMP-2 y MMP-9 poseen un dominio tipo fibronectina para la unión a la matriz.

Durante el desarrollo dental se requiere una estrecha comunicación ecto-mesenquimal, y las MMP juegan un papel importante en esta interacción, la cual en estadios iniciales de la odontogénesis determina la morfogénesis dental y, en estadios tardíos, determina la diferenciación de los odontoblastos y ameloblastos [Smith, 2003; Fanchon *et al.*, 2004]. Las células mesenquimales expresan, al menos, las MMP 1, 2, 3, 8, 9, 14 y 20. Adicionalmente, se ha propuesto el papel de las MMP en el proceso de reabsorción de las proteínas de la matriz extracelular, mecanismo de regulación necesario para una correcta mineralización de la estructura dental [Palosaari *et al.*, 2004]. Algunas en forma de proenzima quedan atrapadas dentro de la matriz mineralizada de la dentina durante el desarrollo dentinal [Van Landuyt, *et al.*, 2005] y, por su actividad proteasa colagenolítica, tienen la capacidad de hidrolizar los componentes de la matriz extracelular en el momento en que se activen por estímulos físicos o químicos [Brinckerhoff & Matrisian, 2002]. Estas proteasas desempeñan un papel central en varios procesos fisiológicos, tales como el desarrollo, la remodelación tisular y la angiogénesis [Martin-De las Heras & Valenzuela, 2000].

Las MMP están implicadas en diferentes procesos patológicos como la enfermedad periodontal y la caries dental. Estudios recientes revelaron su papel en la ruptura de la matriz de colágeno en la patogénesis de la caries [Sulkala *et al.*, 2002; Van Strijp *et al.*, 2003], con

implicaciones potenciales y relevantes para la unión a dentina [Chaussain-Miller *et al.*, 2006]. Además, pueden estar presentes en la saliva [Sulkala *et al.*, 2001], en la dentina peritubular y, presumiblemente, en el fluido dentinal [Boushell *et al.*, 2008].

Dentro de las clasificaciones propuestas para nombrar las MMP, la más utilizada se hace con base en el sustrato sobre el cual tienen actividad, por ello se denominan como: colagenasas (MMP -1, -8, -13, -18), gelatinasas (MMP -2 y -9), estromalinas (MMP -3 y -10), matrilisinas (MMP-7 y -26) y MMP tipo membrana (MMP-14, -15, -16 y -24) (Bali *et al.*, 2016).

### **2.3 Degradación de la interfase adhesiva**

Las resinas compuestas, como material restaurador, basan su retención en un proceso adhesivo que las une a la estructura dental. La adhesión a la dentina constituye un desafío clínico, por tratarse de un tejido de composición heterogénea, con alto contenido orgánico y presencia de humedad [Van Landuyt *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2011]. La adhesión de los sistemas resinosos a la dentina, requiere la infiltración de las fibras colágenas que han sido expuestas por un acondicionamiento ácido previo, con los monómeros de resina presentes en el adhesivo, generando una zona de interdifusión resina-dentina, denominada capa híbrida [Nakabayashi *et al.*, 1991], necesaria para la retención micromecánica de la restauración.

Es ampliamente aceptado que, posterior al uso de los adhesivos dentales actuales, se produce una degradación de la interfase adhesiva dentina-resina [Pashley *et al.*, 2011]. Dentro de los factores que intervienen en la degradación de la interfase adhesiva, se han propuesto los siguientes:

#### **2.3.1 Degradación de la resina adhesiva**

La utilización de monómeros hidrofílicos en los sistemas adhesivos, como el 2-Hidroxiethyl metacrilato (HEMA), busca mejorar la infiltración de la red colágena expuesta, la cual es inherentemente húmeda, con lo cual se ha reportado un mejoramiento de la resistencia de unión inmediata [Loguercio *et al.*, 2008]; pero la longevidad de esta unión dentina-resina se ve comprometida con el uso de estos sistemas adhesivos [Hashimoto *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2003; Malacarne *et al.*, 2006].

La presencia de agua en la interfase adhesiva genera una capa híbrida débil, en la que se producen fenómenos de hidrólisis y lixiviación de los adhesivos de resina [Hashimoto, 2010; Kermanshahi *et al.*, 2010]. Los adhesivos actuales incluyen en su formulación componentes hidrofílicos (HEMA) y componentes hidrofóbicos como el bisfenol-glicidil metacrilato (BisGMA),

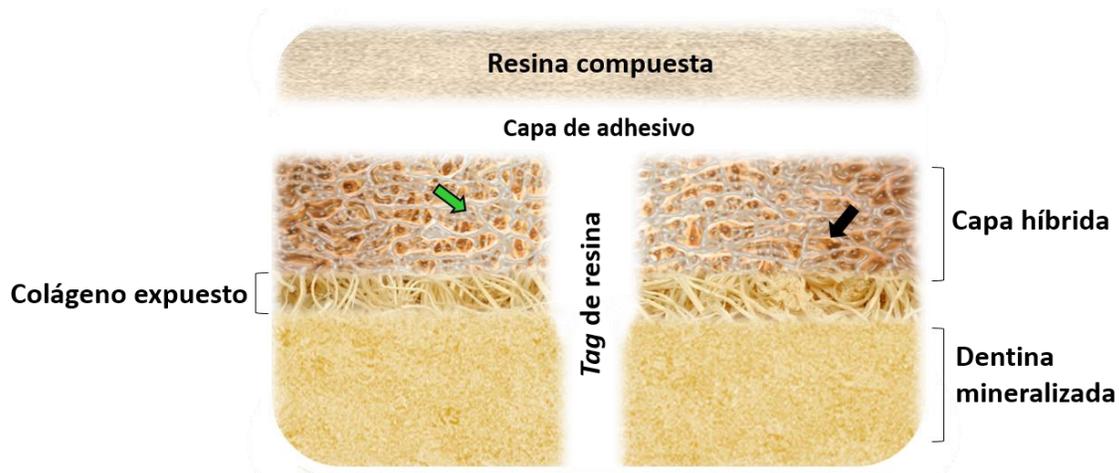
triethylenglicoldimetacrilato (TEGDMA) que, en solución acuosa, producen separación en nano fases de los adhesivos [Spencer & Wang, 2002]; los elementos hidrofílicos penetran hacia el interior de la capa híbrida, mientras que, los monómeros hidrófobos se quedan en la superficie. Las canforquinonas son hidrófobas por lo que no penetran. lo que conduce a una inadecuada polimerización en la zona más profunda de la capa híbrida.

La polimerización incompleta de la porción hidrofílica de los adhesivos y la sorción acuosa del material, permiten la movilización de agua, lo que forma grandes canales acuosos dentro de la capa híbrida [Breschi *et al.*, 2008]. Sumado a lo anterior, la acción de las enzimas esterases que provienen de la saliva, pulpa y bacterias [Shokati *et al.*, 2010], rompen los enlaces éster presentes en los monómeros de resina, lo que genera subproductos citotóxicos hidrofílicos como el etilenglicol e hidrofóbicos como el ácido metacrílico [Kostoryz *et al.*, 2009].

Este fenómeno puede desencadenarse no sólo con los adhesivos de grabado-enjuague (E&R por su nombre en inglés, *etch-and-rinse*), sino también con los de autograbado (SE por sus siglas en inglés, *self etch*) [Lehman *et al.*, 2009; Zhang & Kern, 2009]. Varios estudios, como los de Nishitani *et al.* [2006], Mazonni *et al.* [2007] y Mazonni *et al.* [2013], establecieron que los sistemas monoméricos incorporados en los adhesivos de auto-grabado, también son susceptibles a la degradación hidrolítica y permiten la actividad colagenolítica y gelatinolítica dentro de la matriz de colágeno debido a su bajo pH.

### **2.3.2 Infiltración incompleta del adhesivo en la red de colágeno expuesta**

En la técnica de grabado-enjuague, la diferencia entre la penetración del adhesivo y la acción del agente ácido acondicionador, lleva a una hibridización incompleta de la red colágena expuesta, por lo que queda una porción de las fibras colágenas sin infiltrar, siendo más susceptibles a la degradación hidrolítica, lo que conlleva a nanoperculación [Baldión & Cortés, 2016] (Figura 4).



**Figura 4. Esquema de la inestabilidad de la capa híbrida.** Los cristales de hidroxiapatita se eliminan de los tejidos duros dentales con el acondicionamiento ácido y deberían ser reemplazados por monómeros de resina. Obsérvese la infiltración incompleta del adhesivo en la matriz de colágeno que permanece con espacios interfibrilares saturados con agua (flecha verde). Además, la posibilidad de discrepancia entre la profundidad de infiltración del adhesivo y la de dentina acondicionada quedando colágeno expuesto sin hibridizar. Los tags de resina sellan parcialmente los túbulos dentinarios y disminuyen la permeabilidad de la dentina. Los monómeros de resina no penetran de manera homogénea en la red colágena (flecha negra) [Baldión & Cortes, 2016] con permiso.

La incapacidad de los monómeros de resina de reemplazar el agua tanto libre como unida al colágeno, presente en los compartimentos inter e intrafibrilares, es una limitación para lograr una capa híbrida completa y estable [Kim *et al.*, 2010; Jee *et al.*, 2016].

Adicionalmente, en los espacios interfibrilares se encuentran hidrogeles de proteoglicanos altamente hidratados [Scott & Thomlinson, 1998], que actúan como un filtro que atrapa los monómeros de moléculas grandes, como el BisGMA, y sólo permite el paso de monómeros pequeños, como el HEMA, hacia la base de la capa híbrida. El HEMA produce cadenas lineales débiles que, al ser sometidas a esfuerzos, producen falla por fatiga cíclica de las cadenas de colágeno [Fung *et al.*, 2009].

### 2.3.3 Degradación del colágeno por endopeptidasas

Pashley *et al.* [2004] fueron los primeros en demostrar la degradación de las fibras colágenas en ausencia de bacterias, lo que sugiere actividad proteolítica dentro de la dentina. La dentina contiene una gran cantidad de MMP en forma inactiva, que quedan atrapadas en el tejido desde el proceso de mineralización y que pueden ser activadas por diferentes mecanismos químicos y físicos. La infiltración incompleta de la red colágena por los monómeros de resina, la hace especialmente vulnerable al proceso de degradación hidrolítica por acción de las MMP

[Seseogullari-Dirihan *et al.*, 2016]. Estas enzimas, tienen una gran capacidad de degradar casi todos los componentes de la matriz extracelular, actuando de manera sincrónica, de forma tal que, algunas MMP requieren de la activación previa de otras proteasas. Es así como, por ejemplo, las colagenasas (MMP-8) degradan la triple hélice del colágeno tipo I hacia péptidos más simples, permitiendo la posterior actividad de las gelatinasas (MMP-2 y -9) para la digestión de los residuos peptídicos [Bali *et al.*, 2016].

Las MMP pueden ser activadas *in vivo* por proteasas y otras MMP, *in vitro* por agentes químicos como agentes modificadores del grupo sulfhidrilo, agentes caotrópicos, oxígeno reactivo, y también, por agentes físicos como un bajo pH o por tratamiento térmico [Tjaderhane *et al.*, 1998; Brinckerhoff *et al.*, 2002; Bali *et al.*, 2016].

La degradación de las fibrillas de colágeno *in vivo* se ha correlacionado directamente con la activación de las MMP inducida por la aplicación de sistemas adhesivos dentinales [Tay *et al.*, 2003; Mazzoni *et al.*, 2006; De Munck *et al.*, 2009]. Inicialmente, se consideró que el procedimiento de acondicionamiento ácido favorecía la liberación y activación de las proenzimas atrapadas dentro de la dentina mineralizada [Mazzoni *et al.*, 2013], lo que induce una actividad colagenolítica dentro de la dentina hibridizada. Sin embargo, algunos autores afirman que el ácido fosfórico utilizado en la técnica de acondicionamiento tiene un pH muy bajo (0,7 a 1) y, por lo tanto, tiene la capacidad de desnaturalizar las MMP evitando su acción [Pashley *et al.*, 2004; Nishitani *et al.*, 2006; Mazzoni *et al.*, 2013]. En un estudio donde se mezcló polvo de dentina desmineralizada con adhesivos SE, se encontró que el pH inicialmente muy bajo, se neutralizó en poco tiempo y por microscopia electrónica de barrido (SEM) se evidenció la presencia de un precipitado denso insoluble sobre la superficie de la dentina [Iwasa *et al.*, 2011]. Se ha postulado que los grupos fosfato del ácido fosfórico puede unirse con los iones  $Ca^{+2}$  de la dentina generando sales que impiden la actividad de las MMP (Sabatini & Pashley, 2014).

Se ha confirmado la acción de las MMP-2 y MMP-9 por medio de ensayos específicos para los diferentes tipos de adhesivos dentinales. Lehmann *et al.* [2009] reportaron que la aplicación del adhesivo aumenta la síntesis de MMP-2 en odontoblastos humanos, lo que posiblemente incrementa su acción por migración a través de los túbulos dentinales hacia la capa híbrida. Con respecto a los adhesivos SE, Mazzoni *et al.* [2013], reportaron que hay evidencia que en la dentina parcialmente desmineralizada se encontró actividad de las MMP-2 y -9 en dentina humana, efecto que atribuyen al bajo pH por inducir apertura del *switch* de cisteína, activando

formas latentes de las enzimas al ejercer su efecto en el dominio catalítico y por disminución en la actividad inhibitoria de los inhibidores tisulares de MMP.

## **2.4 Estrategias para la estabilización de la interfase adhesiva**

Dentro de las estrategias para estabilizar la interfase adhesiva dentina–resina se ha propuesto utilizar:

### *2.4.1 Inhibidores no selectivos de las MMP*

Dentro de este grupo, la sustancia más utilizada es la clorhexidina (CHX), que ha demostrado ser eficiente en la inhibición de la actividad de las MMP por un tiempo corto, aún en concentraciones bajas como 0.2% [Carrilho *et al.*, 2007 a,b; Gendron *et al.*, 1999]. Se ha evidenciado que su efecto se mantiene durante 18 meses, momento en el que empieza la degradación de la interfase adhesiva. Aunque muy poco se ha publicado sobre cuál es el mecanismo de acción de la CHX, pareciera ser porque el cloro se comporta como una molécula anfifílica capaz de unirse al zinc del dominio catalítico de las MMP, impidiendo su actividad hidrolítica, sumado a que la CHX es una molécula catiónica que se une a las moléculas aniónicas de la dentina tanto mineralizada como desmineralizada [Carrilho *et al.*, 2010]. La unión de la CHX con la dentina es de tipo electrostático reversible, por lo que tiene poca sustentividad en los tejidos, y de ahí, su tiempo limitado de actividad [Carrilho *et al.*, 2007; Seseogullari-Dirihan *et al.*, 2016].

### *2.4.2 Biomodificación de la dentina*

Los avances en la ingeniería de tejidos tienen aplicación limitada en los tejidos duros dentales por su poca capacidad para regenerar, esto ha llevado a buscar diferentes estrategias en la dentina, donde la biomodificación busca mejorar sus propiedades físicas a través de modificar su bioquímica. Las estrategias para buscar biomodificación incluyen:

*2.4.2.1 Agentes físicos:* La utilización de técnicas foto-oxidativas por acción de la luz ultravioleta (UV), requiere la presencia de un singlete de oxígeno, que es la molécula más reactiva e inestable de las formas de oxígeno. La Vitamina B2 (riboflavina) ha demostrado ser una fuente importante de radicales libres de oxígeno, entre ellos de singletes de oxígeno. Esta vitamina activada por luz UV es capaz de inducir la formación de enlaces covalentes mediados por los singletes de oxígeno, entre el grupo amino de la glicina de una cadena del colágeno y los grupos carbonilo de la prolina e hidroxiprolina de las cadenas cercanas, lo que conduce a un efecto reticulante del colágeno [Bedran-Russo *et al.*, 2014].

**2.4.2.2 Agentes sintéticos inespecíficos de reticulación del colágeno:** Son sustancias capaces de entrecruzarse con el colágeno, a partir de enlaces cruzados con los grupos amino y carbonilo de los residuos de aminoácidos de esta proteína, lo que estabiliza su estructura, y la engloban para hacerla más resistente a la degradación enzimática. El glutaraldehído tiene gran afinidad por grupos amino terminales de los aminoácidos, principalmente los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de peptidil-lisina e hidroxilisina del colágeno [Tezvergil-Mutluay *et al.*, 2011]. La hidroclore-carbodiimida requiere la activación de los grupos carboxílicos de los ácidos glutámico y aspártico para formar un intermediario O-acilisourea, que luego reacciona con los grupos amino de la lisina e hidroxilisina para formar entrecruzamiento amino con el colágeno, con liberación de úrea. Aunque estas sustancias han demostrado ser efectivas en proveer mejor estabilidad de la interfase adhesiva [Tezvergil-Mutluay *et al.*, 2012], se ha cuestionado su biocompatibilidad [Al-Amar *et al.*, 2009; Bedran-Russo *et al.*, 2014].

**2.4.2.3 Agentes reticulantes de origen natural:** Son sustancias antioxidantes capaces de favorecer el entrecruzamiento con el colágeno, y, además, con capacidad de inhibir la actividad de las MMP. El entrecruzamiento de las sustancias bioactivas con el colágeno es de tipo no enzimático. Dentro de este grupo, se han estudiado las antocianidinas, principalmente la proantocianidina oligomérica, que se deriva de las semillas de uva, y con la cual se ha evidenciado un mejoramiento de las propiedades mecánicas de la dentina previamente desmineralizada, como la tenacidad y el módulo elástico [Sabatini & Pashley, 2014]. Sumado a esto, se demostró un aumento en el ángulo de contacto del agua y disminución de la permeabilidad al vapor de agua [Green *et al.*, 2010]. Sin embargo, los efectos con estas sustancias se han logrado con tiempos aplicación muy prolongados (10 min – 1 h), situación que no las hace clínicamente aplicables [Hass *et al.*, 2016]. Adicionalmente, se ha reportado disminución del grado de conversión por inhibición de la polimerización de los monómeros de resina [Greene *et al.*, 2010] y pigmentación de color café en la dentina [Frassetto *et al.*, 2015].

**2.4.2.4 Remineralización biomimética.** La utilización de nanoprecusores de fosfato de calcio amorfo, busca reproducir los mecanismos naturales de biomineralización de la dentina [Tay & Pashley, 2008; Niu *et al.*, 2014]. Aunque *in vitro* se ha logrado la incorporación de cristales en la dentina desmineralizada por mecanismos de difusión lateral, este proceso no parece ser aún útil en la clínica [Maravic *et al.*, 2017].

**2.4.3 Remoción del agua residual no unida al colágeno en la capa híbrida**

La mayoría de los metacrilatos son hidrófobos e insolubles en agua por lo que muchos fabricantes utilizan como solvente el etanol para asegurar mantenerlos en solución en una fase. La aplicación de estos adhesivos en una dentina saturada de agua posterior al acondicionamiento ácido, genera separación en nanofases de los adhesivos [Spencer & Wang, 2002]. Pashley *et al.* [2007] proponen un cambio en la técnica de adhesión húmeda donde se reemplaza el agua residual por etanol, con lo cual se logra una mejor penetración de los monómeros de resina en la red colágena y se evita la separación en nanofases del adhesivo [Breschi *et al.*, 2018]. El agua se puede encontrar unida al colágeno en una disposición de tres capas o puede encontrarse libre. El etanol es capaz de remover el agua libre y la mitad de la tercera capa del agua unida [Jee *et al.*, 2016], lo que disminuye la separación entre la matriz de colágeno y los monómeros de resina, y a su vez, la posibilidad de acción de las enzimas colagenolíticas.

Otra aproximación a la remoción del agua residual es la utilización de adhesivos SE con una concentración incrementada del monómero 10- ácido fosfórico metacril oloxidecaetilen metacrílico (10-MDP) a un 25% en volumen, con el que se crea un frente de desmineralización para la hibridación de la interfase adhesiva [Breschi *et al.*, 2018].

## **2.5 Evaluación de la interfase adhesiva**

Hay diferentes tipos de pruebas para evaluar la adhesión a la estructura dental, como son las pruebas de resistencia de unión tensil o de cizalla, pruebas de microfiltración, microscopia electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy, SEM*, por su nombre en inglés), entre otras. Para este estudio es de especial interés las pruebas de resistencia de unión microtensil (*microtensil bond strength,  $\mu$ TBS*, por su nombre en inglés).

Durante muchos años se han hecho pruebas de resistencia de unión, con lo que se pretende poder determinar cómo es el comportamiento clínico de un adhesivo, además de obtener información acerca de las variables del sustrato de adhesión y dar guías para los procedimientos adhesivos [Braga *et al.*, 2010]. Hasta los años 90 se realizaban pruebas macrotensiles con muestras de 3 a 6 mm de diámetro (6-28 mm<sup>2</sup>), sin embargo, los resultados de estas pruebas fueron cuestionados por no poder discriminar la heterogeneidad de la distribución de esfuerzos en la interfase [Van Noort *et al.*, 1991].

Sano *et al.* [1994] introdujeron las pruebas microtensiles a la odontología, utilizando especímenes de hasta 2 mm<sup>2</sup> de área, con las que se tienen ventajas como, diferenciar el valor de adhesión según la zona del diente, evaluar diferencias intra e interdiente, obtener

valores de adhesión más altos, disminuir el número de dientes que se requieren y capacidad de evaluación del tipo de falla por SEM [Armstrong *et al.*, 2010]. Así mismo, se han descrito algunas limitaciones como la dificultad técnica de la prueba, se requiere equipo especializado, las muestras se deshidratan, se averían y se extravían fácilmente [Armstrong *et al.*, 2010].

Se puede concluir que las pruebas de adhesión en odontología son muy sensibles a la técnica, sumado a que no se pueden estandarizar los sustratos biológicos utilizados, con gran influencia de las destrezas y motivación del operador, pues pequeñas variaciones en el paso a paso generan cambios en los resultados; es por esto que se debe reportar en detalle la forma de recolectar y procesar las muestras, las condiciones de almacenamiento de los materiales y el protocolo usado para realizar la prueba [Salz & Bock, 2010].

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resina compuesta es uno de los materiales restauradores de más amplio uso en odontología. Por su versatilidad, es utilizado para la obturación de cavidades dentales, cementación de restauraciones indirectas y restauraciones estéticas [Van Landuyt *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011].

La unión resina-dentina depende de la infiltración del sistema adhesivo entre la matriz de colágeno de la dentina que es expuesta por acondicionamiento ácido, lo que conforma una zona de interdifusión, denominada “capa híbrida”, que cumple una función fundamental en la retención micromecánica de la restauración [Nakabayashi *et al.*, 1991]

Se ha reportado que la infiltración del adhesivo en la red de colágeno es incompleta, ya que su capacidad de penetración es menor que la profundidad de acondicionamiento del agente grabador, esto, sumado a la gran dificultad de desplazar el agua residual de la matriz de dentina [Pashley *et al.*, 2011; Mazzoni *et al.*, 2013], lo que da lugar a que se inicie un proceso de degradación de las fibras colágenas desprotegidas, por la activación de proteasas endógenas presentes en la dentina, denominadas metaloproteinasas de matriz (MMP). Las MMP son producidas por los odontoblastos durante el proceso de formación dental y quedan inmersas dentro de la estructura en forma de zimógeno, éstas pueden ser activadas por diferentes mecanismos como disminución del pH, aumento de la temperatura o presencia de oxígeno reactivo, y así, hidrolizar las fibras colágenas de la dentina desmineralizada, evento que desencadena junto con la posible hidrólisis del sistema adhesivo, la degradación de la capa híbrida [Nishitani *et al.*, 2006; Bali *et al.*, 2016].

La degradación hidrolítica de la interfase adhesiva genera consecuencias clínicas adversas como hipersensibilidad dentinal, pigmentación marginal y posible caries secundaria, lo que disminuye la longevidad de las restauraciones, lo que trae como consecuencia altos costos biológicos y económicos asociados a la necesidad de recambio de restauraciones [Pashley *et al.*, 2004].

Para mejorar la durabilidad de las restauraciones y preservar la integridad de la interfase adhesiva, se ha sugerido el uso de inhibidores de las MMP como la clorhexidina [Carrilho *et al.*, 2007 a,b; Breschi *et al.*, 2008] que, aunque ha demostrado tener efectividad a corto y

mediano plazo, su unión a la dentina es de naturaleza electrostática, por lo que su capacidad inhibitoria disminuye antes de 18 meses [Sadek *et al.*, 2010].

En los últimos años, se ha propuesto como estrategia, el uso experimental de agentes de reticulación que crean cadenas de entrecruzamiento con el colágeno haciéndolo más resistente a la degradación enzimática, y a los que también, se atribuye la capacidad de inhibición de la actividad de las MMP. Hay compuestos sintéticos de capacidad reticulante comprobada como el glutaraldehído y la carbodiimida, sin embargo, se ha evidenciado que pueden tener efecto citotóxico, lo que limita su uso clínico [Al-Ammar *et al.*, 2009]

Especial interés han tomado los agentes de reticulación de origen natural como los polifenoles, dentro de los cuales se han estudiado las proantocianidinas, la quercitina y el curcumín, cuya estructura química les confiere propiedades tanto antioxidantes como de reticulación [Tezvergil-Mutluay *et al.*, 2012]. Sin embargo, no se han demostrado sus beneficios en un protocolo que sea clínicamente relevante, ya que los tiempos de aplicación requeridos y la profundidad de penetración no son adecuados (Sabatini & Pashley, 2014; Tezvergil-Mutluay *et al.*, 2012).

#### 4. JUSTIFICACION

Las restauraciones adhesivas basan su retención en la infiltración de los monómeros de resina en la red de fibras colágenas de la dentina, conformando la capa híbrida [Nakabayashi *et al.* 1991]. Aunque los adhesivos actuales han incorporado monómeros hidrofílicos que mejoran la adhesión inmediata, está reportado que esta interfase adhesiva se deteriora con el tiempo, por diferentes mecanismos de degradación, que ya han sido mencionados anteriormente [Malacarne *et al.*, 2006].

El envejecimiento de la capa híbrida trae como consecuencia la posibilidad de caries secundaria, sensibilidad dental, fractura o desalajo de la restauración [Pashley *et al.*, 2011], lo que se traduce en la necesidad de recambio frecuente de restauraciones.

El plan estratégico 2013-2017 del Instituto Nacional de Investigación Dental y Craneo-facial de Estados Unidos (NIDCR) reportó que el tiempo promedio de reemplazo de las restauraciones en resina compuesta es de sólo 5,7 años (NIDCR, 2013). Esta situación obliga a asumir costos por sustitución de obturaciones dentales de alrededor de cinco mil millones de dólares al año sólo en los Estados Unidos [Jokstad *et al.*, 2001].

Es imperativo establecer nuevas prioridades frente al manejo de la promoción y prevención en salud oral; la concientización y el cambio de mentalidad—de odontología restauradora a preventiva—supone una gran inversión de esfuerzo y tiempo para la conciliación de propósitos cuyos resultados se verán reflejados en el futuro. Por lo pronto, es necesario proveer nuevas técnicas y materiales que garanticen el mantenimiento adecuado de la salud oral de los pacientes con el fin de evitar, en lo posible, el reemplazo de restauraciones, puesto que esto implica mayor pérdida de estructura dental, tiempo, contaminación ambiental y altos costos económicos.

Para esto, se hace necesario desarrollar materiales y procedimientos que permitan lograr restauraciones adhesivas con máxima preservación de la estructura dental que perduren de manera exitosa por tiempo prolongado, y así, evitar que los dientes entren en la espiral de la restauración. Por lo tanto, es importante probar nuevas sustancias con las que se inhiba la activación de las MMP para, de esta manera, disminuir su impacto en la degradación de la interfase de unión, manteniendo mayor estabilidad a largo plazo de las restauraciones adhesivas.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto de un flavonoide (MRT-1) sobre el comportamiento mecano-biológico de la interfase adhesiva resina-dentina.

### **5.2 Objetivos específicos**

**5.2.1** Evaluar la influencia de la aplicación de MRT-1 sobre la actividad de las MMP en la interfase adhesiva resina-dentina.

**5.2.2** Determinar el comportamiento de la resistencia de unión microtensil en la interfase adhesiva con la aplicación de MRT-1.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio experimental cuantitativo *in vitro* para el cual se utilizaron 60 terceros molares humanos recién extraídos por indicación terapéutica, que cumplieran con los criterios de inclusión como: estar sanos, sin restauraciones previas, ni defectos del desarrollo del esmalte, con formación radicular completa y de dimensiones semejantes, donados previo consentimiento informado con aval del comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional de Colombia, acta N° 09-17. Los especímenes fueron almacenados en solución de NaCl 0.9% con NaN<sub>3</sub> 0.02% a 4°C por un tiempo no mayor a 3 meses [Pashley *et al.*, 2004].

### 6.1 Ensayo genérico de actividad de MMP

Veintidos molares fueron seccionados a nivel coronal, a baja velocidad bajo refrigeración, con el uso del Isomet (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EE.UU.), para eliminar el esmalte oclusal y exponer la dentina del tercio medio coronal. De cada especimen se obtuvieron bloques de dentina de 3.5 x 3.5 x 1.0 mm, los cuales fueron repartidos aleatoriamente dentro de los 8 grupos de prueba (Tabla 1) con 6 bloques por grupo. Para este ensayo se utilizó el kit fluorométrico de actividad de MMP (Cat N° ab 112146, Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.). La prueba se realizó en una microplaca oscura de 96 pozos, colocando 100 µL de cada sustancia, control o tratamiento, en cada pozo por separado, para garantizar el cubrimiento completo de los bloques de dentina. Los bloques de dentina mineralizada fueron utilizados como línea de base para evaluar la actividad MMP inicial, los bloques de dentina desmineralizada se utilizaron para evaluar el efecto del ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) al 10% (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) por 16 h sobre la actividad enzimática. Los bloques de dentina desmineralizada y activada con 4-Acetato Aminofenilmercúrico (APMA) a 1 mM, al igual que el grupo tratado con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 1 mM, se utilizaron como control positivo de activación de MMP. Como grupos de control de inhibición se utilizó ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) a 5 mM y un extracto que contiene proantocinidina (PA). Para el grupo experimental 1 mg del flavonoide (sustancia MRT-1) fue disuelto en 100 µL de etanol al 100%, para obtener una concentración de 1% equivalente a 31.4 mM. A partir de esta solución se obtuvo la dilución de 600 µM. En todos los grupos de prueba, los bloques de dentina fueron desmineralizados con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 10% *overnight*, y posteriormente fueron lavados con agua destilada 5 veces consecutivas durante 5 min.

**Tabla 1. Grupos de prueba para la evaluación de la actividad de MMP.**

Tratamiento Grupo	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 10% (16h)	APMA 1 mM (2h)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 mM (2h)	EDTA 5 mM (15 min)	Etanol 100% (120 s)	PA Extra cto (6 min)	MRT-1 600 µM (120 s)	Substrato fluorogénico
Dentina mineralizada DM	X								X
Dentina desmineralizada DD		X							X
Control de activación APMA		X	X						X
Control de activación H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		X		X					X
Control del vehículo Etanol		X				X			X
Control de inhibición EDTA		X			X				X
Control de Inhibición PA		X					X		X
Experimental MRT-1		X	X					X	X

Las placas fueron leídas por espectrofluorimetría a una longitud de onda de 490<sub>ex</sub> /515<sub>ems</sub> nm en un lector de placas (Infinite M200, Tecan; Männedorf, Suiza). Con la medida de la intensidad de fluorescencia en unidades relativas de fluorescencia (*Relative Fluorescence Units, RFU*, por su nombre en inglés) se calculó el porcentaje de reducción de la actividad de MMP de los grupos tratados con respecto al control de activación con APMA, el cual fue tomado como el 100% de actividad de MMP. Se analizaron seis réplicas por condición (n=6).

## 6.2 Ensayo de actividad de MMP por microscopía de fluorescencia

Para hacer una valoración cualitativa de la actividad de MMP, se obtuvieron 8 bloques de dentina de 4.0 mm x 4.0 mm x 0.3 mm (uno por diente), los cuales fueron repartidos aleatoriamente en 4 grupos de ensayo (Tabla 2). Los bloques fueron desmineralizados con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 10% durante 16 h, se lavaron abundantemente con agua destilada durante 15 min, y posteriormente, se aplicó el tratamiento propuesto en cada grupo. Para la activación de las

MMP se utilizó APMA a 1 mM durante 2 h, posteriormente se colocaron los bloques de dentina activada sobre una laminilla para ser evaluados por microscopía de fluorescencia y se aplicó el sustrato fluorogénico del kit fluorométrico de actividad de MMP (Cat N° ab 112146, Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.), para luego hacer la lectura en el microscopio de fluorescencia (Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss, EE.UU.) a los 20, 30 y 40 min de tiempo de incubación. Las condiciones para la toma de las micrografías fueron estandarizadas para todas las muestras con un contraste de 5000, gama de 1.03, brillo de 14335 y un tiempo de exposición de 86.4 ms.

**Tabla 2. Grupos de ensayo para evaluación cualitativa de la actividad MMP por microscopía de fluorescencia.**

Grupo de ensayo	Tratamiento
Control de <i>background</i>	Dentina desmineralizada + sustrato fluorogénico
Control de activación	Dentina desmineralizada + APMA (2 h) + Substrato
Control del vehículo	Dentina desmineralizada + APMA (2 h) + Etanol (60 s) + Substrato
Grupo experimental	Dentina desmineralizada + APMA (2 h) + MRT-1 600 $\mu$ M (120 s) + Substrato

### 6.3 Ensayo de resistencia de unión microtensil ( $\mu$ TBS)

Se utilizaron 20 molares humanos recién extraídos que se asignaron aleatoriamente en los diferentes grupos de prueba (Tabla 3). Como control negativo, se realizó la técnica de adhesión convencional; como control positivo, se utilizó un tratamiento previo al adhesivo con clorhexidina (CHX) al 0.2%; el control del solvente fue etanol al 100% y el grupo de prueba con la sustancia MRT-1 a 600  $\mu$ M. En todos los grupos se eliminó el esmalte oclusal, a baja velocidad y bajo refrigeración en el Isomet (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EE.UU.). El *smear layer* fue homogenizado con lijas #600 y #1200 por 60 s cada una, a una presión constante. El proceso adhesivo fue realizado utilizando el sistema adhesivo Adper Single Bond 2 (3M-ESPE) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, la dentina fue acondicionada con ácido fosfórico al 37% (3M – ESPE, St. Paul, MN, EE. UU.) durante 10 s, y lavado durante 20 s. Se

aplicaron dos capas de adhesivo frotando 20 s, el cual fue aireado y polimerizado durante 20 s con una lámpara de fotocurado Blue phase 2 con una intensidad de 800 mWatt/cm<sup>2</sup> en el programa *soft start*. Se construyeron bloques de resina de 4 mm de altura utilizando la resina Filtek Z-350 XT color B-2 (3M- ESPE) haciendo incrementos de máximo 2mm, los cuales fueron polimerizados con el mismo programa de curado durante 20 s por incremento. Posterior al proceso adhesivo, los molares se almacenaron 24 h en el medio de conservación a 37°C en el Hygro bath (Whip-Mix, Louisville KY, EE.UU.).

**Tabla 3. Grupos de prueba para evaluación de la resistencia de unión microtensil ( $\mu$ TBS) resina-dentina.**

Grupo de ensayo	Tratamiento
1. Control negativo	Ácido fosfórico 37% (10 s) – Adhesivo (20 s) - Resina
2. Control positivo	Ácido fosfórico 37% (10 s)– Clorhexidina 0.2% (60 s) -Adhesivo (20 s)- Resina
3. Control vehículo	Ácido fosfórico 37% (10 s) – Etanol 100% (120 s) - Adhesivo (20 s) - Resina
4. Experimental	Ácido fosfórico 37% (10 s) – MRT-1 600 $\mu$ M (120 s) – Adhesivo (20 s) - Resina

Posteriormente, en el isomet se hicieron cortes tanto en el eje X como en el eje Y con menos de 1mm de distancia. Después, se realizó un corte en el eje Z para obtener microbarras de 1.0 x 1.0 x 8.0 mm. Se obtuvieron 30 microbarras por grupo que se repartieron aleatoriamente en 2 subgrupos, 15 microbarras para la evaluación de la  $\mu$ TBS inmediata y las otras 15 microbarras para ser almacenadas en saliva artificial en el hygro bath a 37 °C durante 6 meses, para luego realizar la prueba de  $\mu$ TBS. Para realizar la prueba de  $\mu$ TBS, cada microbarra se fijó en un portamuestra con cianoacrilato y resina fluida. El portamuestra se ensambló en el dispositivo diseñado para tal fin [Prieto, 2015] que se llevó a la máquina de ensayos universal Shimadzu AG-IS 5kN (Shimadzu, Tokio, Japón) para aplicar la prueba a una velocidad de 0.5 mm /min, y posterior lectura con el software Trapezium2 (Microsoft Corp. Redmond, WA. EE.UU.). Se incluyeron las fallas prematuras en la evaluación de resultados.

Cada una de las muestras fue revisada en el estereomicroscopio Nikon SMZ 800 (Nikon, Tokyo, Japón) a 50X de aumento, para determinar el tipo de falla. Las fallas fueron clasificadas como: adhesivas, cohesivas (de la dentina o de la resina) y mixtas.

#### 6.4 Caracterización de la capa híbrida por microscopio electrónico de barrido (SEM)

A ocho molares se les retiró el esmalte oclusal a baja velocidad y bajo refrigeración con el Isomet (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EE.UU.), para obtener dentina de profundidad media. Posteriormente los especímenes se asignaron aleatoriamente en 4 grupos de prueba (Tabla 4).

En la dentina expuesta se homogenizó el *smear layer* con lija de agua #600 y #1200 por 60 s cada una. En cada grupo se aplicó el tratamiento propuesto a la dentina, para luego hacer el proceso adhesivo con Adper Single Bond 2 (3M-ESPE) y realizar un bloque de resina de 2 mm de altura, utilizando resina B2 de Filtek 350 XT (3M-ESPE), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Posteriormente, se hicieron cortes en los ejes X, Y y Z que expusieron la interfase adhesiva, para obtener bloques de 6.0 x 3.0 x 3.0 mm.

**Tabla 4. Grupos de prueba para la caracterización de la capa híbrida por SEM.**

Grupo de ensayo	Tratamiento
Control (-)	Ácido fosfórico 37% (10s) – Adhesivo (20s) - Resina
CHX	Ácido fosfórico 37% (10s) –CHX 0.2% (60s) - Adhesivo (20s) - Resina
Experimental	Ácido fosfórico 37% (10s) – MRT-1 600 µM (120s) - Adhesivo (20s) - Resina

Para la preparación de las muestras para SEM, se hizo una modificación al protocolo utilizado por Lafuente [2012]. Brevemente, se aplicó ácido fosfórico al 37% durante 5 s, seguido de lavado abundante con agua destilada durante 10 min, aplicación de hipoclorito de sodio al 5% por 30 s, y enjuague con agua destilada por 10 minutos. Posteriormente las muestras se deshidrataron secuencialmente con etanol al 70% - 80% - 90% - 95% y 100% (3 veces), dejando cada muestra 10 min en cada concentración.

Las muestras fueron metalizadas para luego ser observadas en el microscopio Coxem EM-30AX Plus (Daejeon, Corea del Sur) a 1000X - 2000X- 4000X - 5000X y 14000X.

## 6.5 Análisis estadístico

Se construyó una base de datos en una hoja de Excel con los resultados obtenidos en las diferentes pruebas. Para el análisis estadístico de los resultados se aplicó una prueba de Shapiro Wilk, bajo la presunción de normalidad se hizo un análisis de varianza ANOVA de 1 vía y una prueba post hoc de Scheffe para los resultados de la prueba de actividad de MMP. Para la prueba  $\mu TBS$  se hizo test de normalidad, un ANOVA de una vía y prueba post hoc. El análisis de falla se evaluó por la prueba de chi cuadrado. Para todas las pruebas se utilizó el paquete estadístico StataSE 10 (College station Texas, EE.UU.).

## 7. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Para la ejecución del proyecto, se siguieron las normas establecidas según la **RESOLUCION N° 8430 de 1993** (4 de Octubre) del Ministerio de Salud, República de Colombia: —Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud. En el presente estudio siempre prevalecieron el criterio del respeto a la dignidad y la protección de los derechos y el bienestar de la comunidad. Se ajustó a los principios científicos y éticos que la justifican, y fue realizada por profesionales con conocimiento y experiencia sobre el área de investigación. Esta investigación se clasificó como de riesgo mínimo, ya que se trabajó con dientes extraídos por razones terapéuticas, en un laboratorio certificado, siguiendo los Principios de Buenas Prácticas de Laboratorio plasmados en la **RESOLUCIÓN N° 2378 de 2008**. La investigación respetó los principios éticos y respondió a los principios de pertinencia, factibilidad e idoneidad, en particular del investigador principal, del co-investigador y del estudiante. Ver documentos anexos de consideraciones éticas (Aval de Comité de ética, consentimiento informado, folleto informativo para pacientes donadores).

### 7.1 Impacto ambiental

El impacto ambiental de las actividades experimentales realizadas, poseen un riesgo mínimo para el ambiente según la **Resolución 2400 de 1979** (estatuto de seguridad industrial), la **Ley 142 de 1994** (Ley de servicios públicos domiciliarios), la **Ley 430 de 1998** (referente a desechos peligrosos), el **decreto número 2676 de 2000** (diciembre 22) por el cual se reglamenta la gestión integral de los residuos biológicos y modificaciones de marzo del 2002; la **resolución 01164 de 2002** del Ministerio del Medio Ambiente (septiembre 6), por la cual se adopta el manual de procedimientos para la gestión Integral de los residuos hospitalarios y similares del Ministerio del Medio Ambiente y el Ministerio de Salud; el **decreto 4741 de 2005** (por el cual se reglamenta parcialmente la prevención y manejo de los residuos y desechos peligrosos en el marco de la gestión integral); la **resolución 1362 de 2007** (por la cual se establecen los requisitos y el procedimiento para el registro de generadores de residuos o desechos peligrosos, a que hacen referencia los artículos 27 y 28 del **Decreto 4741 del 30 de diciembre de 2005**.

Se tuvieron específicamente en cuenta los siguientes aspectos con el manejo de los desechos. Los residuos de riesgo biológico que se utilizaron fueron de tipo biosanitario y se tomaron en cuenta para su manipulación, recolección y desecho todos aquellos elementos o instrumentos

utilizados durante la ejecución de los procedimientos que tienen contacto con materia orgánica como: recipientes de recolección, aplicadores, guantes, material de laboratorio como tubos de ensayo, frascos y placas de cultivo, láminas porta objetos, laminillas, entre otros. Después de ser almacenados en su respectivo empaque fueron entregados a la ruta hospitalaria facilitada por ASEO CAPITAL para su disposición final. Allí fueron depositados en una celda especial para continuar su proceso de desnaturalización mediante la aplicación de técnicas apropiadas que evite, de igual manera, la contaminación ambiental. Las muestras y sustancias químicas fueron manipuladas por personal capacitado cumpliendo con las normas de bioseguridad recomendadas para la manipulación de muestras clínicas y material de laboratorio.

Los desechos de los solventes fueron descartados en recipientes adecuados dentro del laboratorio, los cuales fueron recogidos por una firma especializada en el manejo de desechos por incineración, el cual se realiza en dos cámaras sucesivas de combustión y post-combustión (a 1000 y 1200 °C respectivamente), que generarán vapores finales de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O, NO<sub>3</sub> y NO<sub>2</sub>.

## 7.2 Aval del comité de ética

Centro de Investigación y Desarrollo  
Facultad de Odontología  
Sede Bogotá



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE COLOMBIA

Bogotá D.C., 20 de Junio de 2017.

- IB.CIEFO-101-17]

Doctor

**DIEGO ENRIQUE BETANCOURT CASTRO**

Docente

Facultad de Odontología - Sede Bogotá

Universidad Nacional de Colombia

Ciudad

Asunto: Concepto Comité de Ética y Metodología de la Investigación.

Respetado Profesor:

Cordialmente le informo que el Comité de Ética y Metodología en Investigación de la Facultad, en su sesión del día 08 de Junio, Acta 09-17, luego de revisar el trabajo titulado "EFECTO DE LA APLICACIÓN DE UN FLAVONOIDE EN EL COMPORTAMIENTO DE LA INTERFASE ADHESIVA RESINA-DENTINA", presentado por usted, realizó las observaciones y recomendaciones pertinentes, y emitió el concepto de **APROBADO**, dado que el proyecto cumple con todos los requerimientos éticos y metodológicos.

Con un cordial saludo,

**MARTHA ESTHER HERRERA RUIZ**

Directora Centro de Investigación y Extensión

SESQUICENTENARIO  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA



[Página 1 de 1]  
Elibre 1.0.10

Ciudad 11160-41-01  
Edificio 210, Oficina 311  
Correos: (57-1) 316 5000 Fax: 10011-10013  
Bogotá D.C., Colombia  
cmiefo@fobog@unad.edu.co

Participando  
de todas  
las colombianas

### 7.3 Consentimiento informado

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA RECOLECCIÓN DE DIENTES HUMANOS  
PARA EL ESTUDIO TITULADO “EFECTO DE LA APLICACIÓN DE UN FLAVONOIDE EN  
EL COMPORTAMIENTO DE LA INTERFASE ADHESIVA RESINA-DENTINA”

DIEGO BETANCOURT CASTRO

Docente Universidad Nacional

Estudiante de Maestría en Ciencias Odontológicas

Universidad El Bosque

(Otorgado en cumplimiento de la ley 35 de 1989)

NOMBRE DEL PACIENTE \_\_\_\_\_

EDAD: \_\_\_\_\_

SEXO: F\_\_ M\_\_ DIENTE (S) N° \_\_\_\_\_ FECHA \_\_/\_\_/\_\_\_\_ CIUDAD:

\_\_\_\_\_

Yo, \_\_\_\_\_ identificado como aparece al pie de mi firma, en mi calidad de paciente por medio del presente documento, y en pleno uso de mis facultades mentales, otorgo en forma libre mi consentimiento a DIEGO ENRIQUE BETANCOURT CASTRO, para que haga uso de él (los) diente(s) que me serán extraídos por extracción indicada para obtener tejido dentinal con fines académicos.

Autorizo con la condición que no se mencione mi nombre, que los resultados del estudio puedan ser utilizados con fines de enseñanza, investigación y divulgación científica. Certifico que se me ha informado que la participación en este estudio es voluntaria, respetándose la voluntad de aceptación a rehusar la donación de mis dientes sin que esto afecte la calidad en la atención que se me está prestando en el momento. Certifico que se me ha explicado que no estaré expuesto a ningún riesgo en el proceso de recolección de la muestra, aparte de lo inherente a la cirugía que no hace parte de la investigación y será aclarado por el profesional respectivo. Doy fe de que se me ha explicado claramente que no recibiré ningún beneficio económico derivado de mi participación, sin embargo, se me explicó que es probable que mi participación ayude a encontrar una respuesta a la pregunta de investigación, siendo esto un beneficio para la sociedad. El presente documento ha sido leído, entendido por mí en su totalidad y se ha resuelto cualquier inquietud que yo presente respecto a este documento.

---

FIRMA DEL PACIENTE

C.C// T.I \_\_\_\_\_

Huella

Yo \_\_\_\_\_ como \_\_\_\_\_ acudiente  
de \_\_\_\_\_ en su condición de \_\_\_\_\_

(menor de edad, analfabeta, discapacitado) otorgo en forma libre el consentimiento a DIEGO ENRIQUE BETANCOURT CASTRO, para que haga uso de él (los) diente(s) que serán extraídos, entendiendo lo anteriormente dicho.

---

FIRMA DEL ACUDIENTE

C.C.

Huella

Como testigo certifico que se hizo la lectura exacta del documento de consentimiento para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado consentimiento libremente.

---

FIRMA DEL TESTIGO

C.C.

Huella

Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de Consentimiento Informado.

---

FIRMA DEL INVESTIGADOR

C.C.

Huella

## 7.4 Folleto informativo

GRACIAS por su colaboración en nuestro proyecto de investigación



Los resultados pueden ayudar a mejorar la salud oral de los colombianos



Si usted tiene alguna duda sobre el manejo de las muestras o el proyecto de investigación, usted puede contactar a

DIEGO E. BETANCOURT  
Tel 3165000 Ext 16015  
Cel 3002252033  
debetancourt@unal.edu.c  
o



FOLLETO INFORMATIVO

CONSENTIMIENTO INFORMADO

EFFECTO DE LA APLICACIÓN DE UN FLAVONOIDE SOBRE LA INTERFASE ADHESIVA RESINA-DENTINA

DIEGO E. BETANCOURT CASTRO  
JAIME CASTELLANOS P  
PAULA A. BALDIÓN ELORZA

Bogotá  
2016 - 2018

1. El diente extraído se limpia



2. Se retira el esmalte de la corona para exponer la dentina



3. Se aplica una sustancia experimental y se hace una restauración en resina



4. Se harán cortes para medir la fuerza de unión de la resina con el diente



5. Sobre otras muestras se evaluará la actividad biológica del diente



El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de una sustancia experimental sobre la estabilidad de la unión entre el diente y la resina

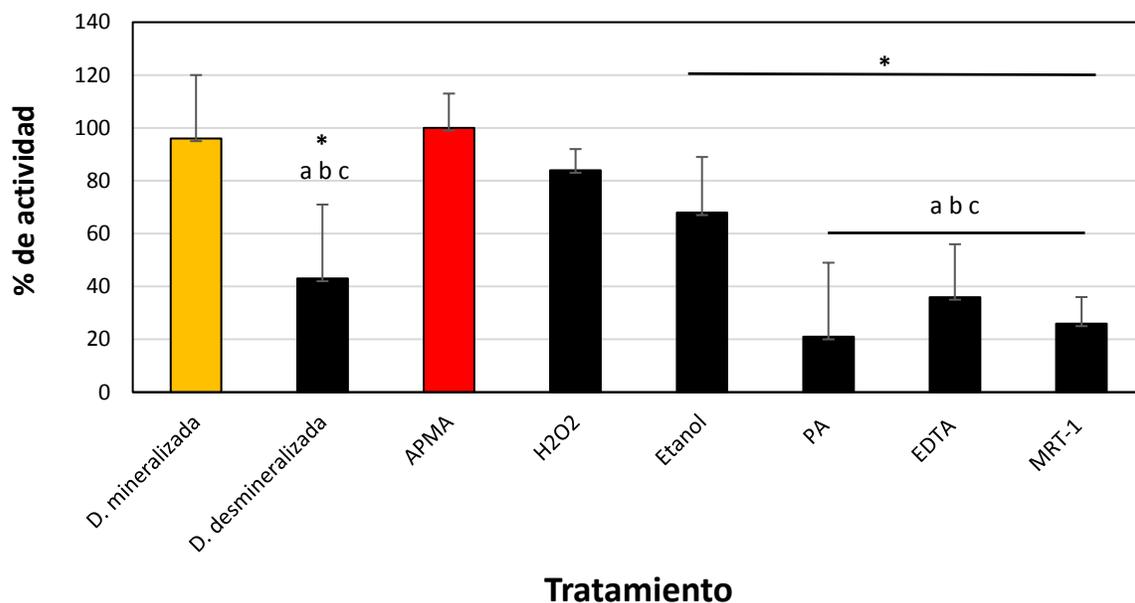


Se espera mejorar la durabilidad de las restauraciones de resina

## 8. RESULTADOS

### 8.1 MRT-1 inhibe eficientemente la actividad de MMP

Los resultados de la prueba de actividad de MMP se muestran en la Figura 5. El APMA y el  $H_2O_2$  indujeron la mayor intensidad de fluorescencia en las muestras de dentina, lo que significa que ambas sustancias fueron eficientes en activar las MMP de la matriz desmineralizada. El grupo de control de activación tratado con APMA tuvo el valor más alto de fluorescencia por lo que se tomó como el 100% de actividad. Tanto la sustancia de prueba MRT-1 como los controles de inhibición EDTA y PA mostraron una disminución significativa de la intensidad de fluorescencia correspondiente con una inhibición de la actividad de MMP con respecto al grupo control de activación ( $p < 0.05$ ). Se demostró una actividad de MMP del 26% para la MRT-1 con una disminución del 74% con respecto al grupo control de activación APMA; mientras que el EDTA mostró una disminución del 64% de la actividad de MMP. El extracto de PA aplicado por 6 min tuvo una reducción de actividad del 79%. Con respecto al vehículo, el etanol tuvo una disminución de la intensidad de fluorescencia del 68% comparado al grupo control de activación con APMA. Igualmente, MRT-1 mostró menor actividad de MMP con diferencia significativa con respecto al grupo etanol ( $p < 0.05$ ). No se encontraron diferencias entre los grupos de inhibición del EDTA y PA con respecto al MRT-1 ( $p > 0.05$ ). (Figura 5).

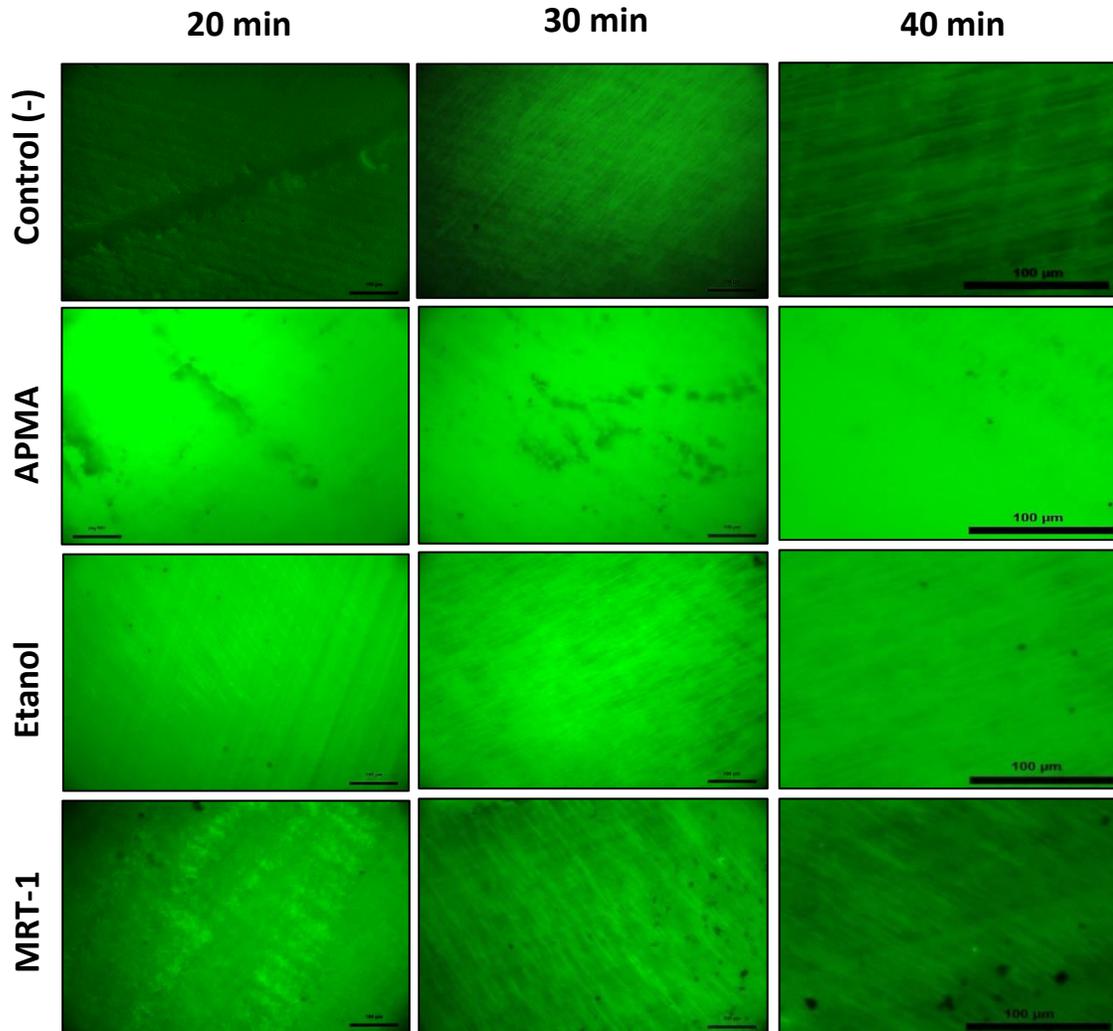


**Figura 5. Actividad de MMP.** Los bloques de dentina se distribuyeron aleatoriamente en los grupos de prueba, la dentina desmineralizada muestra el efecto del ácido fosfórico al 10% por 16 h sobre la actividad de las MMP. Se muestran los valores de fluorescencia relativa (RFU) de los controles de activación: 4-Acetato Aminofenilmercúrico (APMA) y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ambos a 1mM por 2 h; control de vehículo: etanol al 100% por 120 s, y los controles de inhibición: ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) a 5mM durante 15 min y un extracto de proantocianidina (PA) por 6 min; y, por último, la sustancia experimental MRT-1 a 600 μM por 120 s. Las muestras fueron sometidas a cada tratamiento en placa oscura de 96 pozos para luego ser incubadas con el sustrato fluorogénico por 30 min del kit fluorométrico de actividad de MMP (Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.). La intensidad de fluorescencia fue medida a una longitud de onda 495<sub>em</sub>/515<sub>exc</sub> en un lector de placas (Infinite M200, Tecan; Männedorf, Suiza). El control de activación tratado con APMA tuvo la mayor actividad de MMP y fue tomada como el 100%. La sustancia MRT-1 fue eficaz en inhibir la actividad de MMP con diferencia significativa con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el control activado con APMA son indicados por medio de asteriscos ( $p < 0.05$ ). Las letras minúsculas (a, b y c) muestran diferencias significativas entre grupos de prueba ( $p < 0.05$ ).

## 8.2 MRT-1 disminuye la intensidad de fluorescencia como indicador de inhibición de las MMP en dentina desmineralizada

Para corroborar los resultados de actividad de MMP se realizó una evaluación cualitativa por microscopia de fluorescencia. La fluorescencia de la dentina desmineralizada fue considerada como la fluorescencia basal (*background*). La aplicación del APMA produjo un aumento de la fluorescencia de las muestras, intensidad que se mantuvo en todos los tiempos de evaluación (20 – 30 - 40 min). El grupo tratado con etanol tuvo una intensidad de fluorescencia elevada a los 20 min, y posteriormente, una leve disminución a los 40 min. El grupo tratado con MRT-1 presentó una menor intensidad de fluorescencia comparada con los grupos APMA y Etanol a

lo largo de todos los tiempos de incubación con el sustrato fluorogénico, la cual fue ligeramente superior a la intensidad de fluorescencia basal de la dentina desmineralizada (Figura 6).



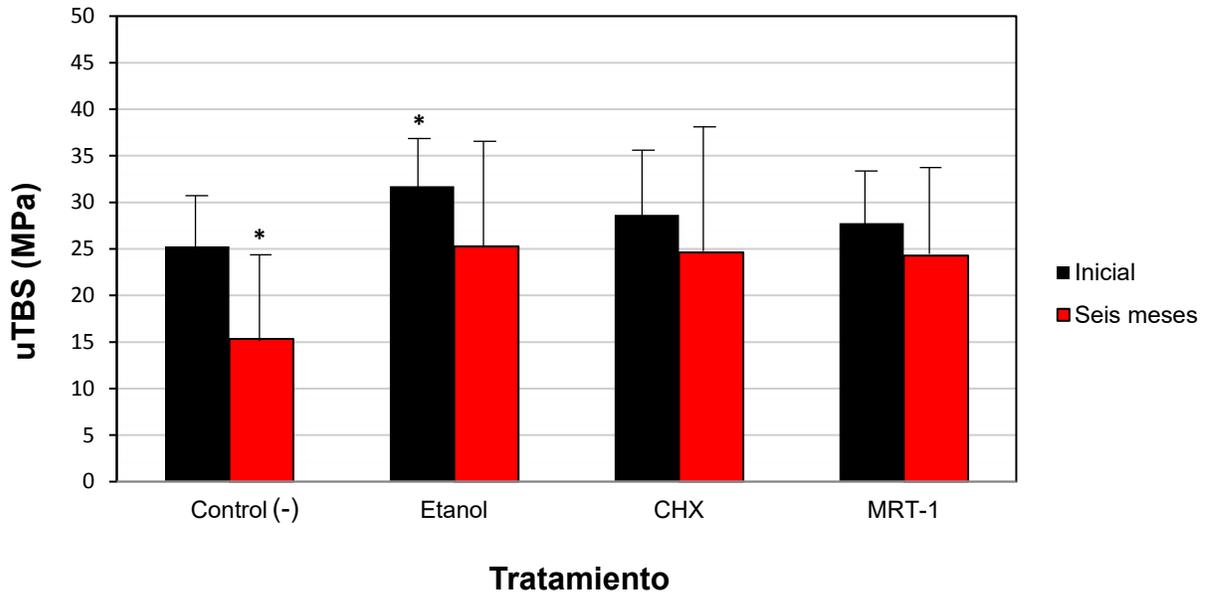
**Figura 6. Evaluación de la actividad de MMP por microscopia de fluorescencia.** Utilizando el kit fluorométrico de actividad de MMP (Cat N° ab 112146, Abcam) se realizó la evaluación por microscopia de fluorescencia de la actividad de MMP. Bloques de dentina desmineralizados con  $H_3PO_4$  al 10 % durante 16 h se distribuyeron aleatoriamente entre los grupos experimentales y los grupos control (negativo: agua destilada y positivo: APMA a 1mM x 2 h). La dentina tratada en los grupos experimentales fue activada previamente con el APMA, para posteriormente ser tratada con etanol al 100 % ó MRT-1 a 600  $\mu$ M, ambos durante 120 s. Todos los grupos fueron expuestos al sustrato fluorogénico específico para MMP y la fluorescencia de cada muestra fue registrada con el uso del microscopio (Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss, EE.UU.) a los 20, 30 y 40 min de tiempo de incubación. El grupo control negativo mostró la fluorescencia basal de la dentina desmineralizada. El control positivo activado con AMPA mostró los mayores niveles de fluorescencia, señal que disminuyó comparativamente con el grupo tratado con MRT-1, el cual a su vez presentó menor fluorescencia que la registrada para el grupo tratado con etanol durante los tiempos de la prueba (n=3).

### 8.3 MRT-1 no afecta negativamente la resistencia de unión microtensil inmediata y la mantiene posterior a seis meses de almacenamiento

Los resultados de la prueba  $\mu TBS$  se muestran en la Tabla 5 y Figura 7. A los 6 meses de almacenamiento el grupo control negativo (sin ningún tratamiento) tuvo una disminución del 39% de los valores de resistencia de unión, con diferencia significativa con respecto al valor obtenido en la prueba inmediata ( $p=0.004$ ). Los otros grupos de tratamiento tuvieron una disminución de  $\mu TBS$  a los 6 meses menor del 20% que no fue significativa con respecto a los valores de la prueba inmediata ( $p>0.05$ ). El grupo que menos variación tuvo a los 6 meses de almacenamiento fue MRT-1 con un 12.5% menos de valor de  $\mu TBS$  con respecto a la prueba inmediata. Al comparar los grupos entre sí, se encontró que en la prueba de  $\mu TBS$  inmediata el valor más bajo se observó en las microbarras del grupo control negativo con una media de 25.24 MPa ( $DE\pm 6.34$ ) y el valor más alto lo obtuvo el etanol con una media de 31.75 MPa ( $DE\pm 5.52$ ) con diferencia significativa ( $p=0.005$ ). CHX y MRT-1 no tuvieron diferencias significativas entre ellos ni con los demás grupos de prueba ( $p>0.05$ ). Al comparar todos los grupos entre sí, en los momentos de evaluación, no se encontraron diferencias significativas a los 6 meses entre los grupos ( $p>0.008$ ).

**Tabla 5. Valores de resistencia de unión microtensil resina-dentina.**

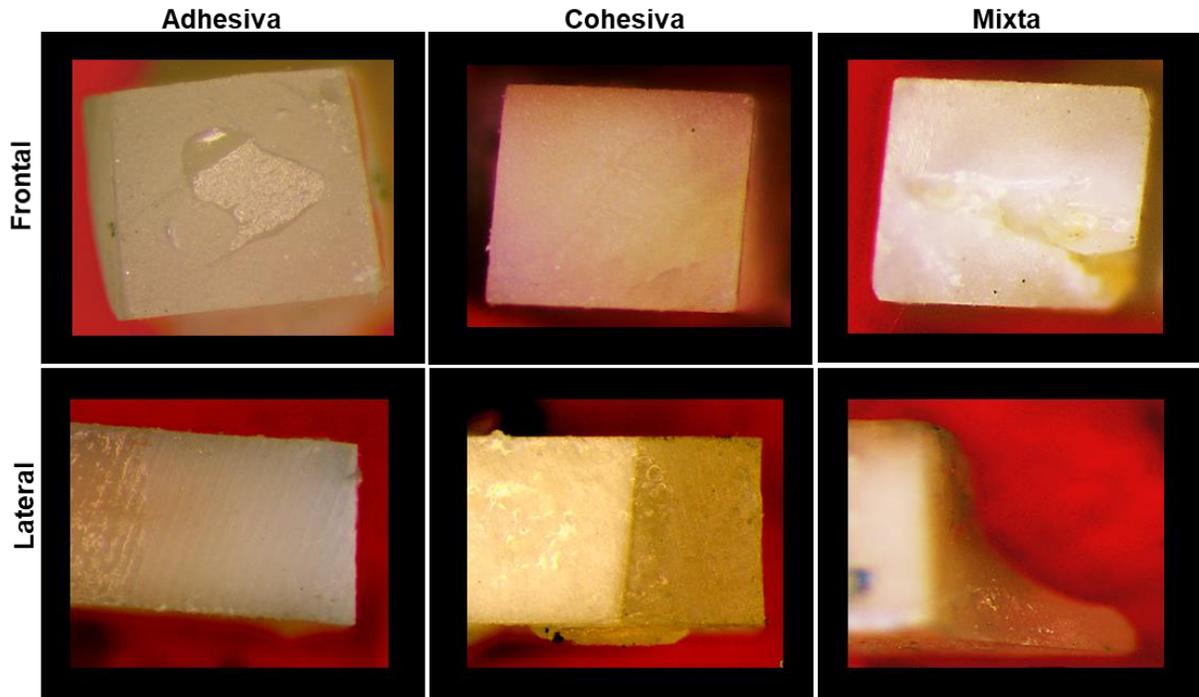
Tratamiento	Tiempo	Promedio	DE	IC 95 %	Diferencia	p (t pareada)
Control (-)	Inicial	25.27	6.3	22.06 – 28.48	9.94	0.004
	6 meses	15.33	9.7	10.42 – 20.24	39% -	
Etanol	Inicial	31.75	5.5	28.96 – 34.54	6.48	0.119
	6 meses	25.27	12.2	19.0 – 31.46	20% -	
CHX	Inicial	28.67	7.6	24.78 – 32.56	4.06	0.346
	6 meses	24.61	13.9	17.61 – 31.61	14% -	
MRT-1	Inicial	27.76	6	24.76 – 30.76	3.47	0.273
	6 meses	24.29	9.1	19.64 – 28.94	12.5% -	



**Figura 7. Valores de resistencia de unión microtensil.** Para la prueba microtensil se obtuvieron microbarras de 1.0 mm<sup>2</sup> de los grupos control, y de las muestras tratadas con etanol al 100% durante 120 s, clorhexidina al 0.2% durante 60 s y con el flavonoide experimental MRT-1 a 600 µM por 120 s, todos aplicados posterior al acondicionamiento dentinal con ácido fosfórico al 37% durante 10 s y previo a la aplicación del sistema adhesivo Adper Single Bond 2 (3M). Se realizó el ensayo inmediato y después de 6 meses de almacenamiento, evaluando cada condición en 15 muestras por grupo (n=15). Los resultados fueron expresados como la media ± DE de la resistencia de unión microtensil dentina-resina. En todos los grupos hubo disminución de la resistencia de unión adhesiva a los 6 meses con diferencia significativa para el grupo control negativo (-) (p=0.004). Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el control negativo son indicados por medio de asteriscos (p < 0,008).

El análisis del tipo de falla se presenta en la Figura 8. El tipo de falla predominante en todos los grupos fue la falla adhesiva, que correspondió al 58.4% del total de las fallas. 40.8% fueron fallas mixtas. Sólo hubo una falla cohesiva en resina (0.8%) que se presentó en el grupo MRT-1 inicial.

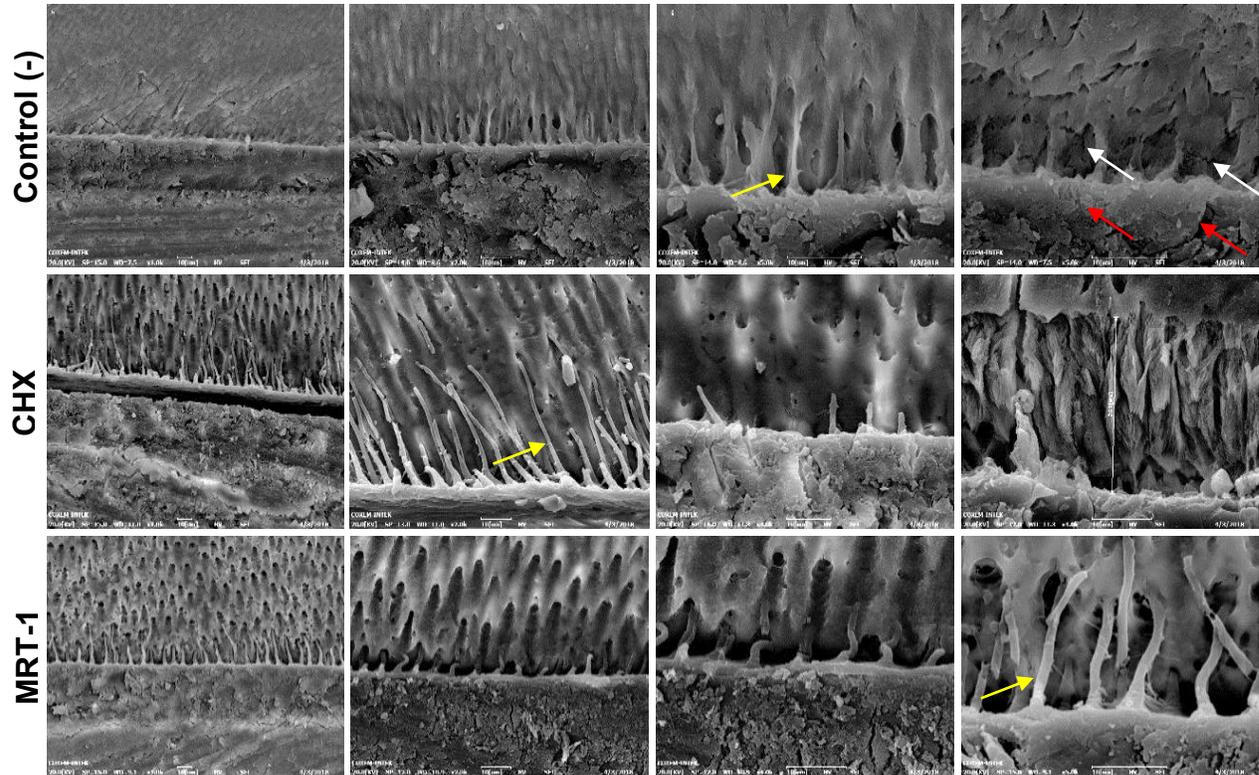
Las fallas adhesivas aumentaron en las muestras evaluadas después de seis meses de almacenamiento. En el grupo control (-) pasaron del 53.8% en las muestras inmediatas al 62.5% en las muestras envejecidas. MRT-1 pasó del 53.8% al 58.8%.



**Figura 8. Análisis del tipo de falla.** Cada microbarra fue analizada por estereomicroscopía (Nikon SMZ800) a 50X de la zona de la ruptura después de la prueba microtensil, tanto inmediata como después de seis meses de almacenamiento, para los cuatro grupos de prueba (control negativo, etanol al 100%, clorhexidina (CHX) al 0.2% y MRT-1 a 600  $\mu$ M). Las fallas fueron clasificadas en la categoría de adhesivas, mixtas o cohesivas. En todos los grupos de evaluación hubo predominio de fallas adhesivas en los dos momentos de prueba.

#### 8.4 MRT-1 posibilita la formación de una interfase adhesiva homogénea

La Figura 9 muestra el análisis por SEM. Las micrografías a 1000 – 2000 – 4000 y 5000 X que se obtuvieron de la interfase adhesiva a los 150 días de envejecimiento. En todos los grupos se aprecia la formación de *tags* de resina y una adecuada infiltración del adhesivo en la capa híbrida. Se evidenció una interfase adhesiva regular y continua para el grupo MRT-1 sin signos de envejecimiento, al igual que la CHX que presentó una capa híbrida estable, mientras que el grupo de control negativo mostró zonas de degradación de la interfase con formación de canales de agua en el adhesivo y pérdida del colágeno de la capa híbrida.



**Figura 9. Caracterización de la interfase adhesiva.** Imágenes de SEM de la interfase adhesiva a los 150 días de almacenamiento en saliva artificial (Salivar, Farpag). En el grupo control negativo la dentina fue acondicionada con ácido fosfórico al 37% e infiltrada con adhesivo Adper Single Bond 2 (3M). En el grupo tratado con clorhexidina (CHX) al 0.2%, ésta fue aplicada por 60 s posterior al acondicionamiento con ácido fosfórico al 37% por 19 s; y en el grupo de prueba, la dentina fue infiltrada con el flavonoide experimental (MRT-1) a 600  $\mu$ M durante 120 s después del acondicionamiento ácido. Micrografías a 1000X, 2000X, 4000X y 5000X. Se observa la estabilidad de la interfase adhesiva en el grupo MRT-1. Hay formación de *tags* de resina (flechas amarillas) en todos los grupos. En el grupo control negativo se evidencia degradación del colágeno (flechas blancas) y formación de canales de agua en el adhesivo (flechas rojas).

## 9. DISCUSIÓN

Se ha reportado que algunos polifenoles estabilizan la interfase adhesiva entre la resina y la dentina, ya sea por la biomodificación de la dentina, la reticulación del colágeno o por la inhibición de la actividad de las enzimas colagenolíticas (MMP y catepsinas cisteína) [Bedran-Russo *et al.*, 2014]. En este estudio se evaluó el efecto de un flavonoide (sustancia MRT-1) sobre la estabilidad de la interfase adhesiva, en función de la actividad de las MMP y la resistencia de unión microtensil ( $\mu$ TBS).

La sustancia MRT-1 en concentración de 600  $\mu$ M aplicada durante 120 s mostró ser eficaz en reducir la actividad de las MMP, con el mismo nivel de significancia ( $p < 0.05$ ) que los controles de inhibición utilizados en este estudio y que han sido reportados previamente: EDTA (5mM por 15 min) [Osorio *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2012] y extractos de proantocianidinas (PA por 6 min) [Castellan *et al.*, 2010; Seseogullari-Dirihan *et al.*, 2016].

La sustancia MRT-1 viene en presentación cristalina de alta pureza (96%) y es soluble en etanol. La concentración utilizada fue de 600  $\mu$ M, lo cual está en concordancia con las concentraciones reportadas en los estudios que utilizan polifenoles puros y no en extracto, para estabilizar la interfase adhesiva dentina-resina [Yang *et al.*, 2017]. Aunque no fue un objetivo del presente estudio, evaluar los cambios de color en la interfase adhesiva por la acción antioxidante de MRT-1, fue evidente que la solución utilizada a esta concentración tiene un leve color amarillo que no tiene la capacidad de producir pigmentación del tejido, como ha sido reportado con el uso de otros extractos de polifenoles [Tjäderhane *et al.*, 2013; Frassetto *et al.*, 2015].

La estructura química de MRT-1 con su alto contenido de grupos OH en las posiciones de sustitución y su bajo peso molecular, se presume, le pueden conferir una gran capacidad antioxidante y de penetración, lo que permite obtener resultados adecuados de inhibición de actividad de MMP en tiempos de aplicación cortos, lo cual sería útil en un protocolo clínico relevante.

Las MMP están en forma de zimógeno como proenzimas en el tejido y requieren ser activadas por clivaje, donde inicialmente las enzimas colagenolíticas MMP-8 rompen la triple hélice del colágeno, para luego terminar la digestión del colágeno las gelatinasas MMP-2 y MMP-9 [Visse & Nagase, 2002]. En este estudio se evaluó la actividad de las MMP utilizando el kit actividad de MMP (abcam) incubando el sustrato fluorogénico entre 30 y 45 min, lo que permitió

detectar la actividad de MMP-9 y MMP-2, lo cual llevó implícita la actividad de MMP-8 como un paso previo.

En este estudio se evidenció que el  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 10% aplicado durante 16 h, redujo la actividad de las MMP, lo cual está de acuerdo con lo previamente reportado [Pashley *et al.*, 2004; Mazzoni *et al.*, 2006]. Aunque no es claro el mecanismo, actualmente se ha descartado que el  $\text{H}_3\text{PO}_4$  con  $\text{pH} < 1$  desnaturalice las MMP, ya que es evidente que después de aplicar algún activador, aumenta la actividad de las mismas. Dentro de las posibles explicaciones de este fenómeno de inhibición de MMP con  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , Iwasa *et al.* [2011] reportaron la formación de un precipitado denso insoluble sobre polvo de dentina desmineralizada, cuando se aplicaron adhesivos SE. Sabatini & Pashley [2014] sugieren que el  $\text{H}_3\text{PO}_4$  contiene alto porcentaje de grupos fosfato que reaccionan con el calcio proveniente de la dentina, formando una capa de  $\text{CaHPO}_4$  que cubre la dentina acondicionada. Este estudio propone que adicionalmente a lo reportado, al desmineralizarse la dentina por acción del agente acondicionador, se disminuye la disponibilidad de iones  $\text{Ca}^{2+}$  que son necesarios para la estabilidad y actividad de las MMP, que son dependientes de  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$  [Visse & Nagase, 2003].

Los resultados de este estudio sugieren que las MMP no se activan por el pH ácido del acondicionamiento dentinal, sino que podrían activarse por los radicales libres de oxígeno que se liberan por la polimerización de los monómeros de resina de los agentes adhesivos [Krifka *et al.*, 2013], ya que en la prueba de actividad de MMP se observó una activación del 84% en el grupo tratado con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , con respecto al control negativo.

Se ha reportado que el etanol puede tener algún efecto inhibitorio sobre la actividad de MMP [Tezvergil-Mutluay *et al.*, 2011], lo cual pudo evidenciarse en el presente estudio. Sin embargo, los resultados mostraron una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre MRT-1 y etanol, lo cual permite concluir que el principal efecto de inhibición en el grupo experimental fue dado por MRT-1 y no por su vehículo. No obstante, es interesante que la sustancia MRT-1 sea soluble en etanol, ya que la mayoría de los adhesivos actuales utilizan el etanol como solvente, lo que por un lado, aumenta la posibilidad de formular un adhesivo donde pueda incluirse esta sustancia para el control de la actividad de MMP y, por otro lado, resulta conveniente tener el efecto sumatorio de dos sustancias que pueden contribuir a la estabilización de la interfase adhesiva resina-dentina, ya sea por inhibir la actividad de las MMP (MRT-1) o mejorar la infiltración del adhesivo por parte de los monómeros de resina (etanol), potenciándose así, los beneficios.

Los resultados que se obtuvieron por ensayos cuantitativos de actividad de MMP, fueron corroborados en una evaluación cualitativa por microscopía de fluorescencia. En esta evaluación, se presentó un incremento en la intensidad de fluorescencia con la aplicación de un activador conocido (APMA) en dentina desmineralizada, el grupo de etanol tuvo una intensidad de fluorescencia alta, ligeramente inferior que el grupo del APMA, mientras que MRT-1 mostró tener la menor intensidad de fluorescencia en todos los tiempos de evaluación. Estos resultados están acordes con los resultados cuantitativos de actividad de MMP, donde se puede comprobar que MRT-1 es eficaz en inhibir la actividad de las MMP, mientras que el etanol tiene un efecto muy limitado sobre las MMP.

La prueba  $\mu$ TBS se realizó a las microbarras a las 24 h (inmediata) y a los seis meses de envejecimiento. La prueba inmediata mostró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el grupo control negativo que tuvo los valores más bajos y el etanol los más altos, lo que se puede explicar gracias a lo reportado por Sadek *et al.* [2007], quienes propusieron la utilización de etanol como pretratamiento de la dentina, en una técnica denominada adhesión húmeda con alcohol, donde se remueve el agua residual del tejido y se satura con etanol, esto permite una mejor infiltración de los monómeros del adhesivo en la red colágena y previene la separación en nanofases del adhesivo, por lo que se genera una capa híbrida de mejores propiedades.

El grupo tratado con MRT-1 no tuvo diferencia con los demás grupos de prueba ( $p > 0.05$ ), lo que significa que MRT-1 no afectó de manera negativa el proceso adhesivo inmediato, y por el contrario, muestra una tendencia a mejorar los valores de resistencia de unión con respecto al grupo control negativo, similar al comportamiento de los grupos tratados con CHX al 0.2% y etanol 100%, que tampoco afectaron la adhesión, lo cual está de acuerdo con lo reportado previamente [Carrilho *et al.*, 2007; Sabatini & Pashley, 2014].

La Norma ISO para ensayos de adhesión a la estructura dental recomienda almacenar las muestras en agua [ISO/TS, 2015], sin embargo, en este estudio se utilizó como medio de almacenamiento de las microbarras saliva artificial en el HygroBath a 37 °C, ya que se ha discutido que el agua puede afectar los resultados del envejecimiento subestimando el efecto, por no contener iones de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , necesarios para una mejor actividad de las MMP [Tezvergil-Mutluay *et al.*, 2010].

La prueba de  $\mu$ TBS en especímenes con 6 meses de almacenamiento evidenció un aumento de fallas prematuras en todos los grupos, las cuales fueron incluidas en el análisis estadístico.

El grupo que más fallas prematuras mostró fue el control negativo, lo que permite concluir que este grupo fue donde más se presentó degradación y envejecimiento de la interfase adhesiva.

La  $\mu$ TBS realizada después del envejecimiento por 6 meses mostró que el control negativo tuvo una disminución significativa ( $p=0.004$ ) de los valores de resistencia de unión con respecto a los valores de la prueba inmediata (39% menos), lo cual está de acuerdo con lo reportado por Hashimoto [2010], quien encontró que con diferentes adhesivos dentinales hubo disminución de resistencia de unión adhesiva hasta del 50% a los 6 meses de envejecimiento. En todos los grupos de prueba hubo disminución en algún porcentaje de los valores de resistencia de unión, pero sin presentar diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los valores inmediatos y a los 6 meses de almacenamiento. El grupo que menos cambio tuvo a los 6 meses de almacenamiento fue el tratado con MRT-1 con una disminución del 12.5%, lo que muestra que MRT-1 fue eficaz en estabilizar la interfase adhesiva resina-dentina. El grupo tratado con etanol mostró una disminución del 20% en los valores de resistencia de unión adhesiva a los 6 meses de envejecimiento, por lo que se evidencia una tendencia hacia la degradación de la interfase adhesiva, que puede entenderse por el hecho de que el etanol no tiene un efecto inhibitorio marcado sobre la actividad de las MMP, según lo reportado previamente [Tezvergil-Mutluay *et al.*, 2011]. Estos autores, evaluaron el efecto de diferentes tipos de alcoholes sobre la actividad de MMP y se encontró que el etanol tiene un efecto inhibitor leve frente a otros alcoholes, dentro de los cuales el HEMA mostró ser más efectivo en reducir la actividad de las MMP.

Estos hallazgos son consistentes con el aumento de fallas adhesivas que se encontró en el estudio, a los 6 meses de envejecimiento de las muestras, en los cuales el grupo control pasó del 53.8% al 62.5%. Los otros grupos tuvieron un menor incremento de la proporción de fallas adhesivas a los seis meses, lo que significa que estabilizaron la interfase adhesiva a lo largo del tiempo del estudio.

El tratamiento con CHX al 0.2% demostró que mantiene la estabilidad de la resistencia de unión adhesiva durante 6 meses de almacenamiento con una disminución del 14%. Estos resultados corroboran lo reportado previamente [Breschi *et al.*, 2010; Carrilho *et al.*, 2007] donde se estableció que la CHX preserva la interfase adhesiva por un tiempo hasta de 18 meses. Esta característica que está bien definida para la CHX fue lo que motivó que en este estudio fuera utilizada como control positivo.

## 10. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este estudio:

El flavonoide (MRT-1) demostró un efecto positivo sobre el comportamiento mecano-biológico de la interfase adhesiva resina-dentina. Con respecto a la actividad de las MMP, MRT-1 a 600  $\mu\text{M}$  por 120 s tuvo un efecto inhibitorio que fue igualmente efectivo que el extracto de proantocianidina, en menor tiempo de aplicación.

El etanol como vehículo de MRT-1, puede contribuir a mejorar la infiltración de los monómeros de resina y por ende la resistencia de unión adhesiva, sin embargo, no tiene efecto inhibitorio de la actividad de las MMP, por lo que por sí mismo, no puede prevenir la degradación de la interfase adhesiva.

La aplicación de MRT-1 no afectó la resistencia de unión inmediata de la resina compuesta a la dentina desmineralizada, y además, preservó los valores de resistencia de unión resina-dentina por un periodo de seis meses. Nuestros hallazgos corroboraron que la interfase adhesiva sufre un proceso de envejecimiento asociado a la degradación de la capa híbrida por actividad de las MMP, proceso que fue atenuado por el uso de inhibidores de la actividad proteasa como la CHX, y de manera novedosa, MRT-1.

## 11. RECOMENDACIONES

1. Determinar el efecto de MRT-1 sobre la resistencia de unión de la interfase adhesiva a tiempos más prolongados, 12, 18 y 24 meses.
2. Evaluar la respuesta citotóxica de células pulpaes a la aplicación de MRT-1 en concentración y tiempo recomendados.
3. Determinar el potencial reticulante de la sustancia experimental sobre el colágeno, por medio de la medición de residuos de hidroxiprolina en dentina desmineralizada tratada con MRT-1.
4. Evaluar el efecto de biomodificación de MRT-1 sobre dentina desmineralizada, mediante la determinación de las propiedades biomecánicas del tejido.

## REFERENCIAS

- Al-Ammar A, Drummond JL, Bedran-Russo AK. The use of collagen cross-linking agents to enhance dentin bond strength. *Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;91:419-424.
- Armstrong S, Geraldeli S, Maia R, Raposo LHA, Soares CJ, Yamagawa J. Adhesion to tooth structure: a critical review of “micro” bond strength test methods. *Dent Mater* 2010;26(2):e50–62.
- Baldión PA, Cortés CJ. Mathematical models of polymer-dentin physicochemical interactions and their biological effects. *Scientific Journal of Review*. 2016;5:319-330.
- Baldion PA, Velandia-Romero M, Castellanos JE. Odontoblast-Like Cells Differentiated from Dental Pulp Stem Cells Retain Their Phenotype after Subcultivation. *Int J Cell Biol* 2018;doi.org/10.1155/2018/6853189.
- Bali PK, Kalaivanan D, Divater V, Logarani A. Matrix metalloproteinases: A double edge sword. *Dent Med Res* 2016;4:3-8.
- Bedran-Russo AK, Pereira PN, Duarte WR, Drummond JL, Yamauchi M. Application of crosslinkers to dentin collagen enhances the ultimate tensile strength. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;80:268–272.
- Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen S-N, McAlpine J, Castellan CS, Phansalkar RS, Aguiar TR, Vidal CM, Napotilano JG, Nam JW, Leme AA. Dentin Biomodification: Strategies, Renewable Resources and Clinical Applications. *Dent Mater* 2014;30(1):62-76.
- Blackburn RS, Harvey A, Kettle LL, Manian AP, Payne JD, Russell SJ. Sorption of chlorhexidine on cellulose: mechanism of binding and molecular recognition. *J Phys Chem B*. 2007;111(30):8775-84.
- Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Bagnell R, Yamauchi, M. Immunohistochemical localization of matrixmetalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Arch Oral Biol*. 2008;53:109-116.
- Braga R, Meira JBC, Boaro LCC, Xavier TA. Adhesion to tooth structure: A critical review of “macro” test methods. *Dent Mater* 2010;26:e38-e49.

Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, Ruggeri A, Tay FR, De Stefano Dorigo E, Pashley D. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: A 2-year in vitro study. *Dent Mater* 2010;26:320-325.

Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater* 2008;24:90-101.

Breschi L, Maravic T, Ribeiro S. Dentin bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. *Dent Mater* 2018;34:78-96.

Brinckerhoff CE, Matrisian LM. Matrix metallo- proteinases: a tail of a frog that became a prince. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:207-214.

Butler WT, Brunn JC, Qin C. Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis. *Connect Tissue Res* 2003;44(Suppl 1):171-178.

Carrilho MRO, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L. Chlorhexidine Preserves Dentin Bond in vitro. *J Dent Res* 2007;86(1):90-94.

Carrilho M, Geraldeli S, Tay F, de Goes M, Carvalho R, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, Pashley DH. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J Dent Res* 2007;86:529–533.

Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A, Tjäderhane L, Tay FR, Agee K, Pashley DH. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater* 2010;26:779–785.

Carvalho R, Tjäderhane L, Manso A, Carrilho M, Carvalho CA. Dentin as a bonding substrate. *Endod Topics* 2012;21:62-88.

Castellan C, Nobrega Pereira P, Miranda Grande RH, and Bedran-Russo AK. Mechanical characterization of proanthocyanidin-dentin matrix interaction. *Dent Mater* 2010;26(10):968–973.

Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res* 2006;85:22-32.

Chaussain C, Boukpepsi T, Khaddam M, Tjaderhane L, George A, Menashi S. Dentin matrix degradation by host matrix metalloproteinases: inhibition and clinical perspectives toward regeneration. *Front Physiol* 2013;4:1-8.

De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interface. *J Dent Res* 2009;88:1101-1106.

Embery G, Hall R, Waddington R, Septier D, Goldberg M. Proteoglycans in dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2001;12:331-349.

Fanchon S, Bourd K, Septier D, Everts V, Beertsen W, Menashi S, Goldberg M. Involvement of matrix metalloproteinases in the onset of dentin mineralization. *Eur J Oral Sci* 2004;112:171-176.

Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley D, Cadenaro M. Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability—A literature review. *Dent Mater* 2016;32:41-53.

Fung DT, Wang VM, Laudier DM, Shine JH, Basta-Pljakic J, Jepsen KJ, Schaffler MB, Flatow EL. Subrupture tendon fatigue damage. *J Orthop Res* 2009;27: 264-273.

Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:437-439.

Green B, Yao X, Ganguly A, Xu C, Dusevich V, Walker MP, Wang Y. Grape seed proanthocyanidins increase collagen biodegradation resistance in the dentin/adhesive interface when included in an adhesive. *J Dent* 2010;38:908-915.

Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Tay FR, Kaga M, Kudou Y, Oguchia H, Van Meerbeek B, Pashley DH. Micromorphological changes in resin-dentin bonds after 1 year of water storage. *J Biomed Mater Res* 2002;63:306-311.

Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomater* 2003;24:3795-3803.

Hashimoto M, Fujita S, Endo K, Ohno H. Effect of dentinal water on bonding of self-etching adhesives. *Dent Mater* 2009;28:634-641.

Hashimoto M. A review: micromorphological evidence of degradation in resin-dentin bonds and potential preventional solutions. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* 2010;92:268-280.

Hass V, Luque-Martinez I V, Gutierrez MF, Moreira CG, Gottie VB, Feitosa VP, Kollerg G, Otukia MF, Loguercio AD, Reis A. Collagen cross-linkers on dentin bonding: Stability of the adhesive interfaces, degree of conversion of the adhesive, cytotoxicity and in situ MMP inhibition. *Dent Mater* 2016;32:732-741.

ISO/TS 11405 Dentistry — Testing of adhesion to tooth structure. 2015;3ed. Switzerland.

Iwasa M, Tsubota K, Shimamura Y, Ando S, Miyazaki M, Platt JA. pH changes upon mixing of single-step self-etching adhesives with powdered dentin. *J Adhes Dent* 2011;13:207-212.

Jee SE, Zhou J, Tan J, Breschi L, Tay FR, Grégoire G, Pashley DH, Jang SS. Investigation of ethanol infiltration into demineralized dentin collagen fibrils using molecular dynamics simulations. *Acta Biomater* 2016;36:175-85.

Jokstad A, Bayne S, Blunck U, Tyas M, Wilson N. Quality of dental restorations. FDI Commission Projects 2-95. *Int Dent J* 2001; 51:117-158.

Kermanshahi S, Santerre JP, Cvitkovitch DG, Finer Y. Biodegradation of resin-dentin interfaces increases bacterial microleakage. *J Dent Res.* 2010;89:996-1001.

Kim YK, Gu LS, Bryan TE, Kim JR, Chen L, Liu Y, Yoon JC, Breschi L, Pashley DH, Tay FR. Mineralisation of reconstituted collagen using polyvinylphosphonic acid/polyacrylic acid templating matrix protein analogues in the presence of calcium, phosphate and hydroxyl ions. *Biomaterials* 2010;31:6618-6627.

Kostoryz EL, Dharmala K, Ye Q, Wang Y, Huber J, Park JG, Snider G, Katz JL, Spencer P. Enzymatic biodegradation of HEMA/bisGMA adhesives formulated with different water content. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;88:394-401.

Krifka S, Spagnuolo G, Schmalz G, Schweikl H. A review of adaptive mechanisms in cell responses towards oxidative stress caused by dental resin monomers. *Biomaterials* 2013;34:4555-4563.

Lafuente D. SEM analysis of hybrid layer and bonding interface after chlorhexidine use. *Oper Dent* 2012;37(2):172-180.

Lee DS, Li B, Kim KS, Jeong GS, Kim EC, Kim YC. Butein protects human dental pulp cells from hydrogen peroxide-induced oxidative toxicity via Nrf2 pathway-dependent heme oxygenase-1 expressions. *Toxicology in vitro* 2013;27:874-888.

Lehmann N, Debret R, Roméas A, Magloire H, Degrange M, Bleicher F, Sommer P, Seux D. Self-etching increases matrix metalloproteinase expression in the dentin-pulp complex. *J Dent Res* 2009;88:77-82.

Linde A. Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. *Anat Rec* 1989;224:154-166.

Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:679-728.

Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, Pashley DH, Tay FR. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res* 2011;90(8):953–968.

Liu RR, Fang M, Zhang L, Tang CF, Dou Q, Chen JH. Anti-proteolytic capacity and bonding durability of proanthocyanidin-biomodified demineralized dentin matrix. *Int J of Oral Sci* 2014;6:168-174.

Loguercio AD, Moura SK, Pellizzaro A, Dal-Bianco K, Patzlaff RT, Grande RH, Reis A. Durability of enamel bonding using two-step self-etch systems on ground and unground enamel. *Oper Dent* 2008;33:79-88.

Malacarne J, Carvalho RM, de Goes MF, Svizero N, Pashley DH, Tay FR, Kiu CK, Carrilho M. Water sorption/solubility of dental adhesive resins. *Dent Mater* 2006;22:973-980.

Maravic T, Mazzoni A, Comba A, Scotti N, Checchi V, Breschi L. How Stable is Dentin As a Substrate for Bonding? *Curr Oral Health Rep* 2017;4:248-257.

Marshall, G.W., Marshall, S.J., Kinney, J.H., Balooch, M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent* 1997;25:441-458.

Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Arch Oral Biol* 2000;45:757-765.

Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM y Tuñón JM. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp* 2002;6:271-278.

Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, Toledano M, Pashley EL, Tay FR. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials* 2006;27:4470-4476.

Mazzoni A, Scaffa P, Carrilho M, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Polimeni A, Tezvergil-Mutluay A, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res* 2013;92(1):82-86.

Milan AM, Sugars RV, Embery G, Waddington RJ. Modulation of collagen fibrillogenesis by dentinal proteoglycans. *Calcif Tissue Int* 2005;76:127-135.

Moses KD, Butler WT, Qin C. Immunohistochemical study of small integrin-binding ligand, N-linked glycoproteins in reactionary dentin of rat molars at different ages. *Eur J Oral Sci* 2006;114:216-222.

Nakabayashi N, Nakamura M, Yasuda, N. Hybrid layer as a dentin-bonding mechanism. *J Esthet and Res Dent* 1991;3:133-138.

NIDCR. Strategic Plan 2013-2017. [en línea] [fecha de acceso 10-07-2016] URL disponible en <http://www.nidcr.nih.gov/Research/ResearchPriorities/StrategicPlan>.

Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjäderhane L, Tay FR, Pashley DH. Activation of gelatinolytic collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci* 2006;114(2):160-166.

Niu LH, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen J, Tay FR. Biomimetic remineralization of dentin. *Dent Mater* 2014;30:1-28.

Osorio R, Erhardt MCG, Pimenta LAF, Osorio E, Toledano M. EDTA treatment improves resin-dentin bonds resistance to degradation. *J Dent Res* 2005;84(8):736-740.

Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci* 2003;111:117- 127.

Pashley DH, Agee KA, Wataha JC, Rueggeberg F, Ceballos L, Itou K, Yoshiyama M, Carvalho RM, Tay FR. Viscoelastic properties of demineralized dentin matrix. *Dent Mater* 2003;19:700-706.

Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. Collagen degradation by host derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004;83(3):216-221.

Pashley D, Tay F, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho R, Carrilho M, Tezvergil A. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater* 2011;27:1-16.

Prieto ML. *Microtensión en Tejidos Dentarios Duros: Desarrollo Tecnológico (tesis de especialidad)* 2015; Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

Sabatini C, Pashley D. Mechanisms Regulating the Degradation of Dentin Matrices by Endogenous Dentin Proteases and their Role in Dental Adhesion. A Review. *Am J Dent* 2014;27(4):203–214.

Sadek FT, Castillan CS, Braga RR, Mai S, Tjäderhane L, Pashley DH, Tay FR. One-year stability of resin–dentin bonds created with a hydrophobic ethanol-wet bonding technique. *Dent Mater* 2010;26:380-386.

Salz U, Bock T. Testing Adhesion of Direct Restoratives to Dental Hard Tissue - A Review. *J Adhes Dent* 2010;12(5):343-371.

Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, Pashley D. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength – evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater* 1994;10:236-240.

Scott JE, Thomlinson AM. The structure of interfibrillar proteoglycan bridges ('shape modules') in extracellular matrix of fibrous connective tissues and their stability in various chemical environments. *J Anat* 1998;192(Pt 3):391-405.

Seseogullari-Dirihan R, Apollonio F, Mazzoni A, Tjaderhane L, Pashley D, Breschi L, Tezvergil-Mutluay A. Use of crosslinkers to inactivate dentin MMPs. *Dent Mater* 2016;32:423-432.

Shokati B, Tam LE, Santerre JP, Finer Y. Effect of salivary esterase on the integrity and fracture toughness of the dentin-resin interface. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010;94:230-237.

Smith AJ. Vitality of the dentin- pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ* 2003;67:678- 689.

Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *Wiley Periodicals Inc* 2002:447-456.

Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, Tjäderhane L. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res* 2001;80:1545-1549.

Sulkala M, Larmas M, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The localization of matrix metalloproteinase -20 (MMP-20, enamelysin) in mature human teeth. *J Dent Res* 2002;81:603-607.

Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Arch Oral Biol* 2007;52:121-127.

Tay FR, Pashley DH. Water treeing a potential mechanism for degradation of dentin adhesives. *Am J Dent* 2003;16:6-12.

Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? *J Can Dent Assoc* 2003 69:726-731.

Tay, F.R., Pashley, D.H. Guided tissue remineralisation of partially demineralised human dentine. *Biomaterials* 2008;29:1127-1137.

Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Carrilho M, Breschi L, Tjäderhane L, Nishitani Y, Carvalho RM, Looney S, Tay FR, Pashley D. The requirement of zinc and calcium ions for functional MMP activity in demineralized dentin matrices. *Dent Mater* 2010;26:1059-1067.

Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Uchiyama T, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni, A, Thompson JM, McCracken CE, Looney SW, Tay FR, Pashley DH. Inhibition of MMPs by alcohols. *Dent Mater* 2011;27(9):926-933.

Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Uchiyama T, Imazato S, Mutluay MM, Cadenaro M, Breschi L, Nishitani Y, Tay FR, Pashley DH. The inhibitory effects of quaternary ammonium methacrylates on soluble and matrix-bound MMPs. *J Dent Res* 2011;90(4):535-540.

Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Agee KA, Seseogullari-Dirihan R, Hoshika T, Cadenaro M, Breschi L, Vallittu P, Tay FR, Pashley DH. Carbodiimide cross-linking inactivates soluble and matrix-bound MMPs, *in vitro*. *J Dent Res* 2012;91:192–196.

Thompson JM, Agee K, Sidow SJ, McNally K, Lindsey K, Borke J, ... Pashley D. Inhibition of endogenous dentin matrix metalloproteinases by ethylenediamine tetraacetic acid. *J Endod* 2012;38:62–65.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res* 1998;77:1622-1629.

Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol I, Geraldeli S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho M., Carvalho R.M., Tay F.R., Pashley DH. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer- A review. *Dent Mater* 2013;29(10):999–1011.

Vaidyanathan TK, Vaidyanathan J. Recent advances in the theory and mechanism of adhesive resin bonding to dentin: a critical review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;88:558-578.

Van Landuyt KL, De Munck J, Snauwaert J, Coutinho E, Poitevin A, Yoshida Y, et al. Monomer-solvent phase separation in one-step self-etch adhesives. *J Dent Res* 2005;84:183-188.

Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumansa M, Yoshidac Y, Poitevin A, Coutinho E, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* 2007;28:3757-3785.

Van Meerbeek B, Peumans M, Poitevin A, Mine A, Van Ende A, Neves A, De Munck J. Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dent Mater* 2010;26:e100-e121.

Van Noort R, Noroozi S, Howard IC, Cardew G. A critique of bond strength measurements. *J Dent* 1989;17:61-67.

Van Strijp AJ, Jansen DC, DeGroot J, ten Cate JM, Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen *in situ*. *Caries Res* 2003;37:58-65.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003;92:827–839.

Yang H, Li K, Yan H, Liu S, Wang Y, Huang C. High-performance therapeutic quercetin-doped adhesive for adhesive–dentin interfaces. *Sci Rep* 2017;7:81-89.

Zhang SC, Kern M. The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *Int J Oral Sci* 2009;1:163-176.