

REVISION DE LITERATURA: INFLUENCIA DE LA CLORHEXIDINA SOBRE LA RESISTENCIA ADHESIVA
EN LA INTERFASE DENTINA-RESINA

MARIA JIMENA ARANGO GOMEZ
JULIANA MARIA MARTINEZ LOPEZ
MATEO POSADA CASTANO
ANGELICA MERCEDES RAMIREZ SAYAGO
JULIANA RICAURTE VELEZ
CAMILA ROJAS DIAZ

ASESORES:
MAURICIO NARANJO
PATRICIA ORTIZ

FACULTAD DE ODONTOLOGIA
GIB CES-EAFIT
MEDELLIN
2012

RESUMEN:

La adhesión en dentina crea problemas complejos debido a la existencia de un mayor componente orgánico que inorgánico que en el esmalte. La unión se efectúa por medio de un adhesivo, que se une tanto a la dentina como al esmalte. La adhesión desarrollada sobre la dentina es menor y la calidad de la unión disminuye a largo plazo, ya que no se da una infiltración favorable del adhesivo en la dentina desmineralizada para tener una capa híbrida perfecta y estable. Estos espacios que quedan en la dentina desmineralizada no infiltrada por el adhesivo, se convierten en sitios de hidrólisis del colágeno debido a la presencia de metaloproteinasas de la matriz (MMPs); enzimas no colagénicas que regulan el metabolismo fisiológico y patológico de los tejidos a base de colágeno.

Conocido el efecto de estas enzimas y su acción en dentina, estudios clínicos y de laboratorio han demostrado que el uso de una solución acuosa de clorhexidina es capaz de retardar la degradación de las fibras colágenas en la capa híbrida, ya que inhiben las MMPs 2, 8 y 9.

Este artículo realiza una revisión en estudios de la literatura científica, acerca de la unión resina-dentina y el papel de la clorhexidina en la longevidad de estas restauraciones actuando en la actividad de las MMPs.

PALABRAS CLAVES: Adhesión, clorhexidina, metaloproteinasas de la matriz, dentina, capa híbrida.

ABSTRACT:

The Dentin adhesion creates problems because of the existence of a higher organic component than inorganic compared with enamel. The union is made with an adhesive, which attaches itself both to the dentin and the enamel. The adhesion to the dentin is weaker and the quality of the joint decreases in the long term due to the lack of a favorable infiltration of the adhesive into the demineralized dentin, preventing a defect-free and stable hybrid layer. These voids left by the adhesive on the demineralized dentin become the sites of hydrolysis collagen due to the presence of metalloproteinase in the matrix (MMPs). These MMPs are non-collagenous enzymes that regulate the physiological and pathological metabolism of collagen-based tissues.

Knowing the effect of these enzymes and their action on the dentin, clinic and laboratory studies have demonstrated that the use of an aqueous solution of chlorhexidine is capable of retarding the degradation of the collagen fibers in the hybrid layer, as they inhibit MMPs 2, 8 and 9.

This article reviews studies reported in the scientific literature of the resin-dentin union and the role of the chlorhexidine in the longevity of restorations in the presence of the MMP activity.

KEYWORDS: Adhesion, chlorhexidine (Mesh Term), matrix metalloproteinases (Mesh Term), dentin (Mesh Term), hybrid layer.

INTRODUCCION

Con el pasar de los años y la influencia de los medios de comunicación, la restauración de los dientes se ha convertido para los pacientes en una necesidad principalmente estética más que funcional. Es por esto que la resina compuesta es considerada como primera alternativa en la odontología moderna, debido a sus propiedades, relativa durabilidad y apariencia dada por las partículas de relleno inorgánico y agentes de conexión. Recientes estudios muestran que mejorando la adhesión de este material a la dentina se obtendrán mejores resultados a largo plazo y así, superar las expectativas del paciente en cuanto a longevidad del material (4,9). En la búsqueda de cómo mejorar la adhesión entre dentina y resina, es necesario tener en cuenta tres objetivos claves a la hora de hacer una restauración buena y duradera como son: conservar estructura sana del diente, conseguir una retención óptima y evitar microfiltraciones.

La longevidad de dichas restauraciones se ha visto afectada por presencia de enzimas llamadas metaloproteinasas (MMP) implicadas en la degradación de la matriz extracelular afectando la adhesión dentina resina, y por lo tanto conllevan al fracaso de la restauración(2,3,5,10). Según datos de la NIDCR (National Institute of Dental and Craniofacial Research) las restauraciones en resina tienen un promedio de duración de 5.7 años.(9)

En dentina, la adhesión es compleja, menor a la del esmalte y la calidad de la unión disminuye a largo plazo, ya que es un tejido vivo y presenta un mayor componente orgánico que inorgánico(11).

La literatura reporta que la mayoría de los problemas asociados a la unión de las superficies dentarias, es la contaminación de agua, saliva(12), sangre(13) y la inadecuada eliminación de los restos de grabado ácido; método usado para producir poros diminutos y otras irregularidades en la superficie del esmalte(14), favoreciendo la retención mecánica de la restauración, lo que reduce la posibilidad que se produzca filtración interfacial (11,15).

Debido a la composición histológica de la dentina no se puede lograr una correcta infiltración de las fibras colágenas expuestas por parte de los monómeros a lo largo de la capa híbrida, lo cual permite que la matriz de dentina infiltrada por la resina quede susceptible al ataque de las metaloproteinasas, afectando esta capa y la fuerza adhesiva en el tiempo(10,16).

Muchos métodos se han sugerido para lograr una mejor infiltración de los monómeros, inhibir la degradación de las fibras colágenas y reducir envejecimiento por absorción de agua. Por ejemplo, el manejo del adhesivo (aplicar múltiples capas, alargamiento en el tiempo de curado)(17-20). También se pueden usar acondicionadores adicionales como inhibidores de las MMPs las cuales pueden suprimir la actividad colagenolítica y gelatinolítica de la dentina(2,10). Entre estos se encuentran reportados el EDTA (21), cloruro de benzalconio(22) y la clorhexidina(3,8,23).

Estudios clínicos y de laboratorio han demostrado que el uso de una solución acuosa de clorhexidina (Antiséptico reconocido como inhibidor de las MMPs) en el tratamiento de la dentina, después del grabado ácido y antes de la aplicación del adhesivo, es capaz de retardar la degradación de las fibras colágenas en la capa híbrida(7,23).

ESTRATEGIA DE BUSQUEDA

Se realizó una búsqueda manual y electrónica de estudios relacionados con metaloproteinasas de la matriz, su influencia en la adhesión en dentina y la clorhexidina como potencial inhibidor de las MMPs.

Se usaron operadores booleanos AND y OR de la siguiente manera: "matrix metalloproteinases"[MeSH] AND clorhexidine"[MeSH], (adhesión OR hybrid layer) AND dentin [MeSH], matrix metalloproteinases [MeSH] AND dentin [MeSH], (adhesión OR hybrid layer) AND matrix metalloproteinases [MeSH] (limits activated: MetaAnalysis, Randomized Controlled Trial, Review, English).

CAPA HIBRIDA Y SU COMPLEJIDAD EN LA ADHESION EN DENTINA

La adhesión se efectúa por medio de un adhesivo, que se une tanto a la dentina como al esmalte previamente grabado por ácido ortofosfórico al 37%; creando una capa de infiltración o capa híbrida que está compuesta por dentina (fibras de colágeno tipo I de la dentina desmineralizada) y por las resinas hidrofílicas que la infiltran(11,24).

La dentina es un tejido conectivo intersticial húmedo, atravesado por túbulos llenos de fluidos que contienen el proceso odontoblástico. Esta presenta mayor obstáculos a la adhesión que el esmalte, debido a que es un tejido vivo heterogéneo y presenta un mayor componente orgánico en comparación con el esmalte.. está compuesta por un 50% vl de material inorgánico (cristales de hidroxiapatita) , un 30% de vl de materia orgánica (colágeno tipo I en un 90% y proteínas colagenasas en un 20%) y un 20% vl de fluidos(11,25). Por este motivo, no se da una infiltración favorable del adhesivo en la dentina desmineralizada para tener una capa híbrida perfecta y estable(1).

La infiltración de la dentina empieza con la difusión de monómeros líquidos a través de los espacios entre las fibras de colágeno. Las fibras están embebidas en una matriz de proteoglicanos, que juegan un papel fundamental en el mantenimiento y estabilización del nivel de dentina desmineralizada(26-28). Se ha demostrado, que la difusión de monómero dentro de la matriz de dentina desmineralizada tiene un gradiente de concentración deficiente(29), dando como resultado una imperfecta impregnación de las fibras colágenas expuestas, una zona de dentina desmineralizada debajo de la capa híbrida y, generando nanofiltración, hidrólisis y disminución de la adherencia a largo plazo(2,4,6,24,30-32).

La mayoría de los adhesivos tienen propiedades que son lo suficientemente buenas para contrarrestar la contracción de polimerización y producir altas fuerzas de unión en el momento de realizada la restauración, sin embargo, la durabilidad en el tiempo de la unión entre los adhesivos y la dentina todavía es una preocupación(4,33).

Recientes estudios muestran que mejorando la adhesión de este material a la dentina se obtendrán mejores resultados a largo plazo y así, superar las expectativas del paciente en cuanto a longevidad del material (4)

MMPs y su función en la adhesión dental

Las MMPs son enzimas no colagénicas, que regulan el metabolismo fisiológico y patológico de los tejidos a base de colágeno(4). Estas son sintetizadas y liberadas por los odontoblastos en forma de proenzimas (34), las cuales requieren activación para degradar componentes de la matriz extracelular a través de un llamado interruptor de cisteína, sitio de unión activa dependiente de zinc. Desafortunadamente pueden ser activadas por adhesivos autograbadores y adhesivos de grabado-lavado(4,16,35,36).

Estas enzimas son dependientes de calcio y zinc, y constituyen parte de la matriz extracelular de la dentina(37,38), donde juegan un papel central en muchos procesos fisiológicos como el desarrollo (dentinogénesis), el remodelado normal del tejido y la angiogénesis(21,34,38). También parecen estar involucradas en diferentes procesos patológicos y en la progresión de tumores(37,39). Estudios recientes revelaron la contribución de las MMPs en la descomposición de la matriz colágena en la patogénesis de la caries dentinal(21,40-42), y enfermedad periodontal(43). Pero también puede ocurrir en ausencia de estas con el uso de adhesivos autograbadores y adhesivos de grabado-lavado(2).

Cuando es realizado el acondicionamiento ácido de la dentina ocurre una desmineralización de la hidroxiapatita dejando expuesta la red de colágeno. La difusión de monómero dentro de la matriz desmineralizada tiene un gradiente de concentración deficiente(29), dando como resultado una imperfecta impregnación de las fibras colágenas expuestas quedando una zona de dentina desmineralizada sin infiltración debajo de la capa híbrida.(2,4-6,10,30-32). Estos espacios no infiltrados por el adhesivo se convierten en sitios de hidrólisis del colágeno debido a la presencia de metaloproteinasas de la matriz (MMPs)(2,3); propiciando que las uniones dentina-resina presenten degradación con el tiempo tanto por hidrólisis del adhesivo, como de las fibras colágenas por la acción proteolítica de las MMPs. (2,4). Esta degradación extrínseca del adhesivo y la degradación del colágeno intrínseco por Metaloproteinasas (MMPs) ocurren simultáneamente en la interfase resina dentina(4).

Cuando se graba la dentina con ácido fuerte (pH de 0.17), las enzimas colagenolíticas como las MMPs son desnaturalizadas y por lo tanto no se activan. Si se graba la dentina con ácidos débiles, las MMPs latentes en la matriz de colágeno se activan, generando hidrólisis de las cadenas de

colágeno a lo largo de la capa híbrida (44). Los adhesivos comerciales simplificados contienen monómeros ácidos con un pH entre 1 y 2 lo cual desmineraliza la dentina pero no son suficientemente ácidos para desnaturalizar las MMPs, contribuyendo así a la degradación del colágeno en la interfase adhesiva y reduciendo la fuerza de unión resina-dentina a largo plazo(16).

Las MMPs y su acción en la adhesión dentinal genera un desafío para la odontología moderna ya que se requiere de la infiltración favorable de la matriz de la dentina desmineralizada con el adhesivo para formar una capa híbrida perfecta y estable(1).

CLORHEXIDINA COMO INHIBIDOR DE LAS METALOPROTEINASAS

La clorhexidina es un potente antiséptico del grupo de la biguanidas que actúa alterando la permeabilidad de la membrana de la célula bacteriana. Es un eficaz y rápido agente bactericida sobre microorganismos gram positivos y gram negativos pero poco eficaz sobre bacterias ácido resistentes, hongos o virus(45). Su efecto prolongado facilita el mantenimiento de la acción antibacteriana puesto que un porcentaje alto de la dosis persiste en la piel hasta por 30 horas. El alcohol incrementa su actividad y la presencia de materia orgánica (sangre) la disminuye. Su uso continuo en enjuagues bucales puede producir manchas en los dientes, alteraciones del gusto y aumento de depósitos calcificados. Dada su importante acción antiplaca bacteriana en cavidad oral, existen numerosas presentaciones para uso bucal (solución, gel, crema dental) con diversas indicaciones (enfermedad periodontal, gingivitis, úlceras aftosas, etc.) y en concentraciones que varían desde el 0.2 al 4% (46).

Estudios clínicos y de laboratorio han demostrado que el uso de una solución acuosa de clorhexidina, es capaz de retardar la degradación de las fibras colágenas en la capa híbrida (48,23,47) ya que tiene características deseables en la inhibición de las MMPs 2, 8 y 9 incluso a bajas concentraciones. Esta se aplica para el tratamiento de la dentina después del grabado ácido y antes de la aplicación del adhesivo(23,48), para reducir la destrucción de las fibras colágenas expuestas debajo de la capa híbrida. La concentración mínima que da la inhibición completa de la MMPs 9 parece ser al 0.002%, sin embargo, la acción de las MMPs 2 es más sensible siendo inhibida por clorhexidina al 0.0001%, la MMPs 8 se puede inhibir en una concentración del 0.02% (7,49,50).

Otras investigaciones in vitro, demostraron que la actividad colagenolítica de polvo dentinal puede ser inhibida con clorhexidina al 0.2% durante 60 segundos. Haciendo que la fibrilla de colágeno de la capa híbrida conserve su estructura normal, pero sin la clorhexidina se muestra la degradación de esta capa(51).

La gran sustantividad de la clorhexidina, es decir, la capacidad de unirse a la matriz dentinaria para producir un mecanismo de liberación sostenida, puede explicar el porqué de su acción prolongando la durabilidad de la uniones(52).

CONCLUSIONES:

- La degradación de las fibras colágenas por parte de las MMPs, asociada a una capa híbrida infiltrada incompletamente, ha mostrado que afecta la fuerza adhesiva de la unión dentina-resina en el tiempo.
- La aplicación de clorhexidina después del grabado ácido es capaz de retardar la degradación de las fibras colágenas de la capa , pudiendo aumentar la longevidad de las uniones resina-dentina.
- Se han reportado en la literatura pocos estudios que establezcan un protocolo clínico universal para el uso de la clorhexidina como inhibidor de las MMPs, a la hora de realizar procedimientos adhesivos en dentina, ya que las investigaciones existentes no son concluyentes sobre qué porcentaje ni que protocolo de aplicación se debe seguir para que el uso de la clorhexidina sea efectivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lecture. Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. *Oper Dent.* 2003 jun;28(3):215-35.
2. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J. Dent. Res.* 2004 mar;83(3):216-21.
3. Carrilho MRO, Geraldini S, Tay F, de Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, et al. In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *J. Dent. Res.* 2007 jun;86(6):529-33.
4. Zhang S, Kern M. The role of host-derived dentinal matrix metalloproteinases in reducing dentin bonding of resin adhesives. *Int J Oral Sci.* 2009 dic;1(4):163-76.
5. Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S, et al. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. *Oper Dent.* 2009 ago;34(4):379-83.
6. Brackett WW, Tay FR, Brackett MG, Dib A, Sword RJ, Pashley DH. The effect of chlorhexidine on dentin hybrid layers in vivo. *Oper Dent.* 2007 abr;32(2):107-11.
7. 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 may;6(3):437-9.
8. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J. Dent. Res.* 2005 ago;84(8):741-6.
9. Goal One [Internet]. [citado 2012 oct 18]. Available a partir de:
<http://www.nidcr.nih.gov/Research/ResearchPriorities/StrategicPlan/goal1.htm>
10. De Munck J, Van den Steen PE, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, et al. Inhibition of enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces. *J. Dent. Res.* 2009 dic;88(12):1101-6.

11. Anusavice KJ. Phillips, Ciencia de los materiales dentales. Undecima Edicion. Elsevier; 2003.
12. Xie J, Powers JM, McGuckin RS. In vitro bond strength of two adhesives to enamel and dentin under normal and contaminated conditions. Dent Mater. 1993 sep;9(5):295-9.
13. Takefu H, Shimoji S, Sugaya T, Kawanami M. Influence of blood contamination before or after surface treatment on adhesion of 4-META/MMA-TBB resin to root dentin. Dent Mater J. 2012 feb 3;31(1):131-8.
14. BUONOCORE MG. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. J. Dent. Res. 1955 dic;34(6):849-53.
15. Sturdevant CM, Roberson TM, Heymann HP, Sturdevant JR. The art and Science of Operative Dentistry. 3rd ed. Mosby; 1995.
16. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, et al. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. Eur. J. Oral Sci. 2006 abr;114(2):160-6.
17. Pashley EL, Agee KA, Pashley DH, Tay FR. Effects of one versus two applications of an unfilled, all-in-one adhesive on dentine bonding. J Dent. 2002 mar;30(2-3):83-90.
18. Hashimoto M, Tay FR, Ito S, Sano H, Kaga M, Pashley DH. Permeability of adhesive resin films. J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. 2005 ago;74(2):699-705.
19. Cadenaro M, Antonioli F, Sauro S, Tay FR, Di Lenarda R, Prati C, et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. Eur. J. Oral Sci. 2005 dic;113(6):525-30.
20. Cadenaro M, Breschi L, Antonioli F, Mazzoni A, Di Lenarda R. Influence of whitening on the degree of conversion of dental adhesives on dentin. Eur. J. Oral Sci. 2006 jun;114(3):257-62.
21. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM. The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. Arch. Oral Biol. 2000 sep;45(9):757-65.
22. Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Gu L-S, Zhang K, Agee KA, Carvalho RM, et al. The anti-MMP activity of benzalkonium chloride. J Dent. 2011 ene;39(1):57-64.

23. Carrilho MRO, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J. Dent. Res.* 2007 ene;86(1):90-4.
24. Wang Y, Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J. Dent. Res.* 2003 feb;82(2):141-5.
25. Linde A. Dentin matrix proteins: composition and possible functions in calcification. *Anat. Rec.* 1989 jun;224(2):154-66.
26. Breschi L, Perdigão J, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Lopes M. Immunocytochemical identification of type I collagen in acid-etched dentin. *J Biomed Mater Res A.* 2003 sep 15;66(4):764-9.
27. Breschi L, Lopes M, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Perdigão J. Dentin proteoglycans: an immunocytochemical FESEM study. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002 jul;61(1):40-6.
28. Breschi L, Prati C, Gobbi P, Pashley D, Mazzotti G, Teti G, et al. Immunohistochemical analysis of collagen fibrils within the hybrid layer: a FESEM study. *Oper Dent.* 2004 oct;29(5):538-46.
29. Wang Y, Spencer P. Quantifying adhesive penetration in adhesive/dentin interface using confocal Raman microspectroscopy. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002 ene;59(1):46-55.
30. Armstrong SR, Keller JC, Boyer DB. Mode of failure in the dentin-adhesive resin-resin composite bonded joint as determined by strength-based (μ TBS) and fracture-based (CNSB) mechanical testing. *Dent Mater.* 2001 may;17(3):201-10.
31. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Tay FR, Kaga M, Kudou Y, et al. Micromorphological changes in resin-dentin bonds after 1 year of water storage. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002;63(3):306-11.
32. Yang B, Adlung R, Ludwig K, Bössmann K, Pashley DH, Kern M. Effect of structural change of collagen fibrils on the durability of dentin bonding. *Biomaterials.* 2005 ago;26(24):5021-31.
33. De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, et al. Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J. Dent. Res.* 2003 feb;82(2):136-40.

34. Tjäderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Adv. Dent. Res.* 2001 ago;15:55-8.
35. Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. *J Endod.* 2006 sep;32(9):862-8.
36. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials.* 2006 sep;27(25):4470-6.
37. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* 2003 may 2;92(8):827-39.
38. Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Bagnell R, Yamauchi M. Immunohistochemical localization of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *Arch. Oral Biol.* 2008 feb;53(2):109-16.
39. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J. Dent. Res.* 2006 ene;85(1):22-32.
40. 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 ago;77(8):1622-9.
41. 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 sep;81(9):603-7.
42. van Strijp AJP, Jansen DC, DeGroot J, ten Cate JM, Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Res.* 2003 feb;37(1):58-65.
43. Lee W, Aitken S, Sodek J, McCulloch CA. Evidence of a direct relationship between neutrophil collagenase activity and periodontal tissue destruction in vivo: role of active enzyme in human periodontitis. *J. Periodont. Res.* 1995 ene;30(1):23-33.

44. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, et al. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur. J. Oral Sci.* 2006 abr;114(2):160-6.
45. Stanley A, Wilson M, Newman HN. The in vitro effects of chlorhexidine on subgingival plaque bacteria. *J. Clin. Periodontol.* 1989 abr;16(4):259-64.
46. Campos EA de, Correr GM, Leonardi DP, Pizzatto E, Morais EC. Influence of chlorhexidine concentration on microtensile bond strength of contemporary adhesive systems. *Braz Oral Res.* 2009 sep;23(3):340-5.
47. Gürgen S, Bolay S, Kiremitçi A. Effect of disinfectant application methods on the bond strength of composite to dentin. *J Oral Rehabil.* 1999 oct;26(10):836-40.
48. Shafiei F, Memarpour M. Effect of chlorhexidine application on long-term shear bond strength of resin cements to dentin. *J Prosthodont Res.* 2010 oct;54(4):153-8.
49. Zhou J, Tan J, Yang X, Xu X, Li D, Chen L. MMP-inhibitory effect of chlorhexidine applied in a self-etching adhesive. *J Adhes Dent.* 2011 abr;13(2):111-5.
50. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Carrilho M, Breschi L, Tjäderhane L, et al. The requirement of zinc and calcium ions for functional MMP activity in demineralized dentin matrices. *Dent Mater.* 2010 nov;26(11):1059-67.
51. Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. *J Adhes Dent.* 2009 jun;11(3):191-8.
52. Carrilho MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A, et al. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater.* 2010 ago;26(8):779-85.