

TESIS DOCTORAL



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

Facultad de Odontología

Comparación entre dentina bovina y humana sometidas a
proceso de desmineralización / remineralización y efectos de la
aplicación de nanohidroxiapatita funcionalizada con
proantocianidina sobre dentina humana

Tattiana Enrich Essvein

Director

Santiago González López

Granada, 2024.

Tesis dirigida por:

Prof. Santiago González López
Universidad de Granada

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Tattiana Enrich Essvein
ISBN: 978-84-1195-312-2
URI: <https://hdl.handle.net/10481/92446>

Índice

Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	5
1.1 Diente bovino como sustituto del diente humano	5
1.2 Modelos de caries <i>in vitro</i>	6
1.3 Composites dentales y degradación de la interfase adhesiva	9
1.4 Agentes remineralizantes	13
1.5 Agentes reticulantes	15
1.6 Nanotecnología	18
2. Hipótesis	21
3. Objetivos	23
3.1 Objetivo General	23
3.2 Objetivos Específicos	23
4. Metodología	25
4.1 Pruebas mecánicas	25
4.1.1 Ensayo de flexión en tres puntos	25
4.1.2 Resistencia de adhesión a la microtensión (μ TBS)	26
4.2 Análisis químicos	27
4.2.1 Análisis por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)	27
4.2.2 Termogravimetría (TGA)	29
4.3 Análisis microestructurales	31
4.3.1 Difracción de rayos X (DRX)	31
4.4 Análisis de la actividad enzimática - Zimografía	32
4.4.1 Zimografía en gel	33
4.4.2 Zimografía <i>in situ</i>	34
Capítulo I	
<i>Influencia del proceso de desmineralización / remineralización en las propiedades químicas, microestructurales y mecánicas de la dentina humana y bovina</i>	<i>27</i>
I.1 INTRODUCCIÓN	39
I.2 MATERIALES Y MÉTODOS	41
I.3 RESULTADOS	44
I.3 DISCUSIÓN	48
I.4 CONCLUSIONES	52

Capítulo II

<i>El uso de nanohidroxiapatita funcionalizada con proantocianidina como un biomodificador de la dentina.....</i>	<i>29</i>
II.1 INTRODUCCIÓN.....	55
II.2 MATERIALES Y MÉTODOS	57
II.3 RESULTADOS	61
II.4 DISCUSIÓN	65
II.5 CONCLUSIONES	70

Capítulo III

<i>El uso de nanohidroxiapatita funcionalizada con proantocianidina como un primer para la adhesión dentinaria.....</i>	<i>51</i>
III.1 INTRODUCCIÓN.....	73
III.2 MATERIALES Y MÉTODOS	74
III.3 RESULTADOS	79
III.4 DISCUSIÓN	86
III.5 CONCLUSIONES	90

5. Conclusiones.....	93
----------------------	----

6. Conclusions.....	95
---------------------	----

Bibliografía.....	97
-------------------	----

Financiación.....	117
-------------------	-----

Aportaciones científicas	119
--------------------------------	-----

Anexos	71
ANEXO I – Informe del Comité de Ética I.	125
ANEXO II – Informe del Comité de Ética II	126

Lista de figuras

Figura 1. Aspecto morfológico del sustrato dentinario sometido a diferentes métodos artificiales de producción de caries	8
Figura 2. Diseño esquemático de la capa híbrida inestable	10
Figura 3. Componentes de la matriz dentinaria de interés para la biomodificación	13
Figura 4. Imágenes de nanopartículas de hidroxiapatita obtenidas mediante TEM.....	14
Figura 5. Imagen obtenida mediante TEM que muestra el bandeo típico de las fibrillas de colágeno.....	16
Figura 6. Estructuras moleculares de las catequinas.....	17
Figura 7. Ensayo de flexión en tres puntos.....	26
Figura 8. Corte del diente en barras de 1mm ² por una Accuton 50	27
Figura 9. Barras fijadas en un soporte para el ensayo de microtensión.	27
Figura 10. Equipo ATR-FTIR y un espectro típico de dentina.....	29
Figura 11. Gráfico representativo de la curva termogravimétrica	30
Figura 12. Equipo TGA/DSC Mettler-Toledo	31
Figura 13. Espectro característico de hidroxiapatita medido con DRX.	32
Figura 14. Electroforesis con gel y escáner de luz ultravioleta de onda larga Chemi-Doc Universal Hood	34
Figura 15. Diagrama de la metodología empleada en la parte I de la tesis doctoral.....	42
Figura 16. Proceso de desmineralización/remineralización por ciclaje de pH.....	43
Figura 17. Ensayos mecánicos de flexión en tres puntos	45
Figura 18. Comparación de espectros de ATR-FTIR de dentina humana y bovina.....	46
Figura 19. Resultados de composición química de dentina humana y bovina obtenidos mediante análisis ATR-FTIR.....	46
Figura 20. nHAp_PA sintetizadas	58
Figura 21. Diagrama de la metodología empleada en la parte II de la tesis doctoral....	60
Figura 22. Espectros ATR-FTIR de las muestras de dentina tratadas con nHAp, nHAp_PA, PA y Sanos.....	62
Figura 23. Espectros de DRX de las nanopartículas de nHAp y nHAp_PA.....	64

Figura 24. Contenido mineral estimado por DRX.....	64
Figura 25. Resistencia a la flexión de las muestras de dentina	65
Figura 26. Diagrama de la metodología empleada en la parte III de la tesis doctoral...	76
Figura 27. Microscopio SEM Phenom XL G2	78
Figura 28. Resultados del ensayo de resistencia a la microtensión a las 24 h (T0) y tras 6 meses (T6).....	80
Figura 29. Porcentajes de los modos de fallo	81
Figura 30. Imágenes de SEM representativas de las superficies de dentina fracturadas en T0	82
Figura 31. Imágenes de SEM representativas de las superficies de dentina fracturadas en T6	83
Figura 32. Análisis de zimografía en gel	84
Figura 33. Interfases resina-dentina incubadas en gelatina conjugada con fluoresceína en T0 y T6 meses	85
Figura 34. Cuantificación de la actividad gelatinolítica en las interfases	86

Lista de tablas

Tabla 1. Medias y desviaciones estándar de las variables composicionales obtenidas en el análisis TGA de dentina humana y bovina.....	47
Tabla 2. Análisis de correlación de Spearman entre las propiedades mecánicas y químicas de la dentina humana y bovina.	48
Tabla 3. Medias y desviaciones estándar del tamaño de los cristalitos medidos por análisis DRX de dentina humana y bovina.....	48
Tabla 4. Composición química de la dentina determinados por ATR-FTIR	62
Tabla 5. Pérdidas de peso (%) de agua, materia orgánica (MO), CO ₃ y PO ₄ obtenidas a partir del análisis TGA.	63
Tabla 6. Materiales utilizados y su composición química, número de lote, fabricante y modo de aplicación.	77

Abreviaturas

μTBS	Fuerza de resistencia adhesiva a la microtracción
ACP	Fosfatos de Calcio Amorfo
ATR-FTIR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada
C	Catequina
CG	Catequingalato
CPP-ACP	Fosfopéptidos de caseína-fosfato de calcio amorfo
CT	Cisteínas catepsinas
D	Tamaño medio de cristalito
des-re	desmineralización/remineralización
DHLNL	Dihidroxisilina-norleucina
DPD	Deoxipiridinolina
DRX	Difracción de rayos X
E&R	Técnica de grabado-lavado
EC	Epicatequina
ECG	Epicatequingalato
EGC	Epigalocatequina
EGCG	Epigalocatequingalato
FWHM	Anchura a media altura
GC	Galocatequina
GCG	Galocatequingalato
HAp	Hidroxiapatita
HL	Capa híbrida
HLNL	Hidroxisilina-norleucina
Hyl	Hidroxisilina
IC	Índice de Cristalinidad Mineral
LKN	Enlaces cruzados de colágeno

Lys	Lisina
MMP	Metaloproteinasas de la Matriz Extracelular
MO	Materia orgánica
nHAp	Nanohidroxiapatita
NPs	Nanopartículas
OMI	Odontología de mínima intervención
PA	Proantocianidina
PYD	Piridinolina
Pyr	Pirroles
SE	Técnica de auto-grabado
TGA	Termogravimetría

Resumen

El primer paso para llevar a cabo las investigaciones sobre nuevas estrategias preventivas y terapéuticas dentales es conseguir simular las lesiones cariosas en laboratorio. Aunque los métodos *in vitro* tienen limitaciones, el modelo de ciclaje de pH es capaz de replicar la dinámica de pérdida y ganancia de los minerales de manera similar a la dentina afectada por caries. Por otro lado, con el progreso de los métodos de odontología conservadora, hoy en día, supone un gran desafío obtener una cantidad adecuada de dientes humanos en buen estado para el uso en investigaciones *in vitro*. Una alternativa utilizada en las investigaciones es el uso del diente bovino como sustituto del diente humano. No obstante, aún no existen estudios que analicen el comportamiento de la dentina bovina mediante el método de producción artificial de caries ni se han examinado las posibles diferencias en comparación con la dentina humana. Por lo tanto, es importante investigar las propiedades químicas, estructurales y la respuesta mecánica de la dentina bovina para evaluar su idoneidad como alternativa a los dientes humanos en las investigaciones en laboratorio.

Además de la importancia de encontrar un sustrato ideal para las investigaciones odontológicas *in vitro*, los estudios actuales siguen buscando un tratamiento que asegure la longevidad de las restauraciones dentales y el fortalecimiento de la dentina afectada por caries. Dada la creciente atención hacia enfoques más sostenibles, el uso de nanohidroxiapatita funcionalizada con proantocianidina se presenta como una alternativa prometedora para el tratamiento de la dentina, puesto que podría actuar tanto en la parte orgánica como inorgánica de la dentina debido a su mecanismo de acción dual como agente remineralizante y como agente reticulante del colágeno. Aunque ya se había confirmado la estabilidad de este nanomaterial, no se había evaluado aún su eficacia específicamente como un tratamiento en la dentina.

Teniendo en cuenta las consideraciones mencionadas anteriormente, la presente tesis doctoral está dividida en tres capítulos. En el primer capítulo se comparó la

composición química, microestructural y las propiedades mecánicas de la dentina humana y bovina sometidas a un proceso de desmineralización/remineralización por el método de ciclaje de pH. Como los resultados de esta primera parte mostraron que la dentina humana y bovina son diferentes en términos de microestructura, composición química, resistencia mecánica y en su respuesta al proceso de desmineralización/remineralización, decidimos utilizar el diente humano como sustrato para las siguientes fases del trabajo.

En el segundo capítulo de esta tesis doctoral, se sintetizaron y caracterizaron nanopartículas de hidroxiapatita (funcionalizadas o no) con proantocianidina y se evaluaron sus posibles efectos sobre la dentina humana desmineralizada por el método de ciclaje de pH. Dado que los resultados obtenidos mostraron que la nanohidroxiapatita funcionalizada con proantocianidina puede promover la remineralización al mismo tiempo que mejora la estabilidad del colágeno en dentina desmineralizada, decidimos utilizar esas nanopartículas en la tercera fase del trabajo.

En el tercer capítulo de esta tesis doctoral, se evaluó el efecto de la nanohidroxiapatita funcionalizada con proantocianidina utilizada como un *primer* en diferentes concentraciones sobre la resistencia a la microtensión y la actividad enzimática endógena en dentina humana sometidas a ciclaje de pH tras 24 h y 6 meses de envejecimiento en laboratorio. Para ello, se utilizó un sistema adhesivo de autograbado de dos pasos. Los resultados mostraron que el pretratamiento de la dentina con nanohidroxiapatita funcionalizada con proantocianidina aumentó la fuerza de adhesión y redujo las actividades de MMP-2 y MMP-9 después de 6 meses.

La presente tesis doctoral finaliza con un apartado de conclusiones donde se responden los objetivos planteados.

Abstract

The first step in the development of research for novel preventive and therapeutic dental strategies is to simulate carious lesions in laboratory. Although *in vitro* methods have limitations, the pH-cycling model can mimic the dynamics of mineral loss and gain similar to caries-affected dentin. On the other hand, with the progress of conservative dentistry methods, it is a great challenge to obtain an adequate amount of sound human teeth for use in *in vitro* research. An alternative is the use of the bovine tooth as a substitute for the human one. However, the behavior of bovine dentin by the artificial caries production method has not yet been analyzed, nor have the possible differences compared to human dentin been examined. Therefore, it is important to investigate the chemical and structural properties and mechanical response of bovine dentin to evaluate its suitability as an alternative to human teeth in *in vitro* investigations.

In addition to the importance of finding an ideal substrate for *in vitro* dental research, current studies are still looking for a treatment that ensures the longevity of dental restorations and the strengthening of caries-affected dentin. Given the increasing attention towards more sustainable approaches, the use of proanthocyanidin-functionalized nanohydroxyapatite is presented as a promising alternative for dentin treatment, as it could act on both organic and inorganic components of dentin due to its dual mechanism of action as a remineralizing agent and as a collagen cross-linking agent. Although the stability of this nanomaterial had already been confirmed, its efficacy as a dentin treatment had not yet been evaluated.

Based on the aforementioned issues, the present doctoral thesis is divided into 3 chapters. In the first chapter, the chemical composition, microstructural and mechanical properties of human and bovine dentin subjected to a demineralization/remineralization process by the pH-cycling method were compared. As the results of this first part showed that human and bovine dentin are different in terms of microstructure, chemical composition, mechanical strength and in their response to the

demineralization/remineralization process, we have decided to use the human tooth as a substrate for the following phases of the work.

In the second chapter of this doctoral thesis, hydroxyapatite nanoparticles functionalized or not with proanthocyanidin were synthesized and characterized and their possible effects on demineralized human dentin were evaluated by the pH-cycling method. Since the results obtained showed that proanthocyanidin-functionalized nanohydroxyapatite can promote remineralization while improving collagen stability in demineralized dentin, we decided to use these nanoparticles in the third phase of the work.

In the third chapter of this doctoral thesis, the effect of proanthocyanidin-functionalized nanohydroxyapatite used as a primer in different concentrations on microtensile strength and endogenous enzyme activity in human dentin subjected to pH-cycling after 24 h and 6 months of laboratory aging was evaluated. For this purpose, a two-step self-etch adhesive system was used. The results showed that pretreatment of dentin with proanthocyanidin-functionalized nanohydroxyapatite increased the bond strength and reduced MMP-2 and MMP-9 activities after 6 months.

This doctoral thesis ends with a conclusion section where the objectives are answered.

1. Introducción

1.1 Diente bovino como sustituto del diente humano

La odontología de mínima intervención (OMI) es una filosofía de tratamiento y control de la caries cuyo objetivo es preservar los tejidos a través de la detección precoz y de tratamientos no quirúrgicos combinados con procedimientos restauradores mínimamente invasivos [1]. Esta filosofía se basa en el concepto biológico de que la alteración en el entorno de la lesión de caries, aislándola, puede impedir su progresión [2]. Además, la OMI no solo se aplica a la cariología, sino también a otras áreas de la odontología como la endodoncia, periodoncia, cirugía oral e implantología [3]. Debido a estos protocolos actuales más conservadores y a un mayor acceso de la población a tratamientos odontológicos, las tasas de pérdida de dientes se han reducido notablemente pese al envejecimiento de las poblaciones [4].

Con el desarrollo de los enfoques de OMI, es cada vez más difícil conseguir muestras de dientes humanos en cantidad suficiente para las investigaciones *in vitro*. Por ese motivo, es muy común el uso de sustitutos del diente humano en los estudios en laboratorio. Aunque también se utilizan dientes de otros animales como porcinos, equinos, caprinos, ovinos, tiburones y camellos, los dientes bovinos son los más utilizados como alternativa a los humanos debido a sus características [5,6]. A pesar de que algunos estudios recomiendan el uso del diente bovino como un sustituto adecuado al diente humano por su similitud [5–8], otras investigaciones describen diferencias importantes entre los dos tipos de tejido principalmente en dentina [9–13].

Nakamichi et al. [9] estudiaron el uso de dientes bovinos en pruebas de adhesión y encontraron que, aunque no había diferencia significativa en la capa superficial de la dentina, en profundidad, la fuerza de adhesión de la dentina bovina disminuyó considerablemente en comparación con la humana. A su vez, Dutra-Correa et al. [10] y

Lopes et al. [11], demostraron que la dentina bovina posee algunos aspectos estructurales diferentes a los de la dentina humana, principalmente relacionados al diámetro de los túbulos dentinarios y al espesor de la dentina peritubular a diferentes profundidades. Por otro lado, Tanaka et al. [12] y Fonseca et al. [13], concluyeron que la radiodensidad de la dentina coronal bovina es significativamente menor que la radiodensidad de la dentina coronal humana.

Por tanto, dado que los resultados de las comparaciones entre dentina humana y bovina son inconsistentes, debe considerarse todas las diferencias en la morfología, propiedades mecánicas y composición química para una correcta interpretación de los datos obtenidos en estudios que utilizan este sustituto al diente humano. Además, en la actualidad, siguen sin encontrarse estudios que comparen el comportamiento de la dentina humana y bovina en un proceso de desmineralización y remineralización.

1.2 Modelos de caries *in vitro*

La caries dental es una de las enfermedades más prevalentes a nivel mundial. Según la Base de datos de la Carga Mundial de Enfermedades, 3090 millones de personas presentaban caries no tratadas en dientes permanentes en el año 2019, una prevalencia de 46,07% de la población mundial [14]. Esta enfermedad es un problema de salud pública que además de tener un gran impacto económico, también genera un importante impacto psicosocial en los pacientes, ya que afecta a la calidad de vida de las personas. Por este motivo, se siguen buscando alternativas de prevención y tratamiento para la caries dental.

Con el fin de probar nuevos tratamientos y materiales en laboratorio, es necesario la creación *in vitro* un sustrato que se asemeje lo máximo posible a la caries natural. No obstante, la caries es una enfermedad compleja y difícil de reproducir porque depende de muchos factores. La definición actual de la caries dental es: “una enfermedad mediada por biopelículas, modulada por la dieta, multifactorial, no transmisible y dinámica que provoca una pérdida mineral neta de los tejidos dentales

duros y está condicionada por factores biológicos, de comportamiento, psicosociales y ambientales” [1].

En la interfase entre la biopelícula y la superficie del diente ocurren procesos de desmineralización cuando el pH de la biopelícula desciende y de remineralización con la reposición de minerales a través de la saliva cuando el pH aumenta. La caries se desarrolla cuando existe un desequilibrio fisiológico entre el contenido mineral dental y el fluido de la biopelícula, es decir, en el proceso de desmineralización/remineralización (des-re), generando una pérdida neta de los minerales [1,15]. Debido a esta complejidad de la enfermedad, existen diversos modelos de inducción de caries artificial para investigaciones *in vitro*.

Los modelos para producción de caries artificial *in vitro* pueden ser divididos en químicos y biológicos. En los modelos biológicos se utilizan biopelículas microbianas que inducen la desmineralización del sustrato dental y el microorganismo más utilizado es el *Streptococcus mutans* [16]. Por otra parte, en los modelos químicos la desmineralización es inducida por productos químicos que pueden ser geles ácidos, soluciones ácidas o simulaciones de ciclos de desmineralización y remineralización sin el uso de bacterias [16,17].

Una revisión reciente ha concluido que la gran mayoría de los ensayos *in vitro* publicados utilizan modelos químicos para la inducción de caries artificial [16]. Este resultado se debe a que el método biológico es más complejo y técnico-sensitivo, además de ser un desafío conseguir estandarizar las muestras y controlar ciertas condiciones como el pH y el contenido mineral [16,17]. Por el contrario, el método químico es más sencillo de ejecutar y fácilmente reproducible [17]. Marquezan et al. [18] y de Carvalho et al. [19] compararon métodos biológicos y métodos químicos y concluyeron que el método químico por ciclos de pH es el método más indicado para simular la capa de dentina afectada por caries mientras que el método biológico parece ser más indicado para simular la capa de dentina infectada por caries. La Figura 1 muestra la morfología del sustrato dentinario con caries natural y con métodos artificiales de producción de caries: gel ácido, ciclaje de pH y microbiológico.

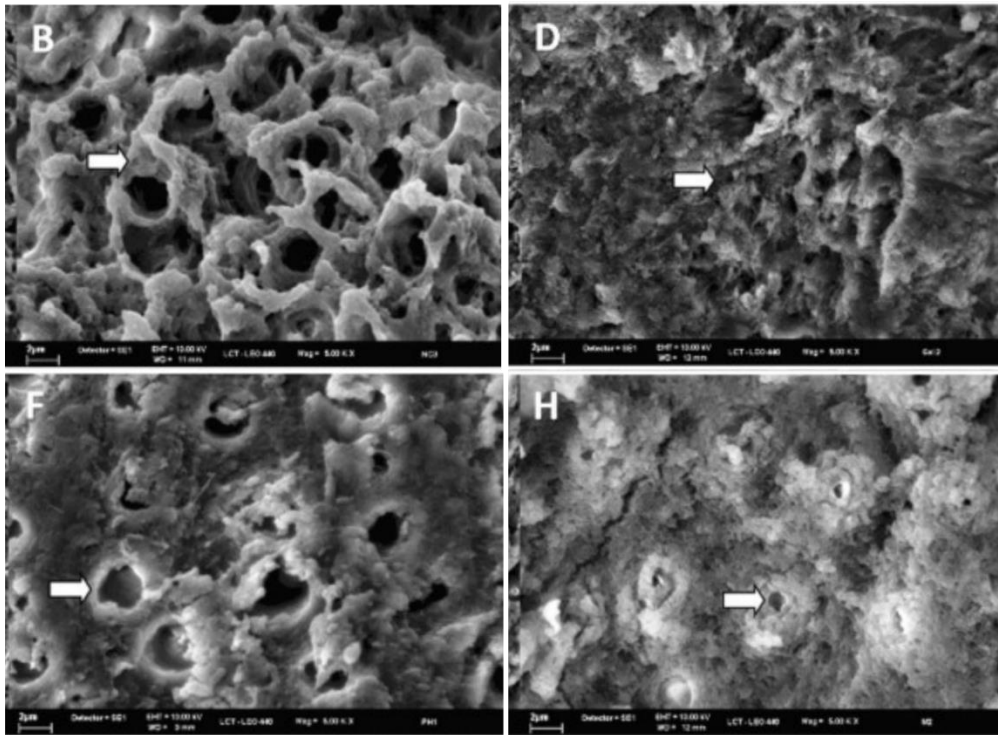


Figura 1. Aspecto morfológico del sustrato dentinario sometido a diferentes métodos artificiales de producción de caries. B) Caries natural con extensa desmineralización de la dentina intertubular (flecha), agotamiento de las fibrillas de colágeno y apertura de los túbulos dentinarios. D) Grupo ácido en gel con una desmineralización modesta de la dentina intertubular y apertura mínima de algunos túbulos dentinarios (flecha). F) Grupo ciclaje de pH con una desmineralización moderada de la dentina intertubular y abertura extensa de los túbulos dentinarios (flecha). H) Grupo microbiológico con una desmineralización extensa de la dentina intertubular, agotamiento de las fibrillas de colágeno y apertura discreta de los túbulos dentinarios (flecha). Figura tomada de: Marquezan, M. et al. Archives of oral biology. 2009.

La dentina afectada por caries es un tejido que ha estado expuesto a los ácidos pero que no está infectado por las bacterias cariogénicas [20]. Los protocolos de odontología mínimamente invasiva recomiendan preservar esta capa de dentina afectada porque es un sustrato posible de remineralización [21]. Debido a la importancia de la dentina afectada por caries en el proceso de remineralización y al no haber un consenso sobre un protocolo ideal de inducción de caries artificial, en la presente tesis optamos por la utilización del modelo químico de ciclaje de pH durante la fase experimental.

1.3 Composites dentales y degradación de la interfase adhesiva

En los últimos cuarenta años, debido a su color metálico antiestético, sus potenciales efectos tóxicos y su baja adhesividad, la amalgama como material restaurador dental viene siendo sustituida por las resinas compuestas [22]. Las resinas compuestas son materiales más estéticos, se adhieren al tejido dental por adhesión micromecánica y pueden ser utilizadas también en los dientes posteriores, puesto que poseen suficiente resistencia a las cargas oclusales [23].

A pesar de poseer estas ventajas anteriormente mencionadas, una de las dificultades que los odontólogos enfrentan en la clínica es el fallo de las restauraciones a largo plazo. Se estima que el 58% de las restauraciones colocadas en la clínica son reemplazo de antiguas [24]. El fallo a largo plazo ocurre debido a la dificultad de conseguir una completa y duradera adhesión entre diente y restauración, principalmente en dentina [25]. Mientras que la unión micromecánica del esmalte previamente grabado es bastante estable y adecuada, la unión a la dentina es mucho más compleja de conseguir.

Esta dificultad radica en la naturaleza orgánica y compleja de la dentina, este tejido es menos mineralizado que el esmalte y está compuesto por 45% en volumen o 70% en peso de contenido mineral, 33% en volumen o 20% en peso de matriz orgánica (de los cuales el 90% es colágeno tipo I y 10% son proteínas no colágenas) y la fracción restante es de agua [26]. Las proteínas no colágenas (proteoglicanos, glucoproteínas, enzimas, proteínas séricas y factores de crecimiento) se distribuyen entre las fibrillas de colágeno y se acumulan a lo largo de las paredes de los túbulos dentinarios, desempeñando importantes funciones en el proceso de mineralización de la dentina [27]. Es importante señalar también que la composición y la estructura de la dentina varían según las distintas partes del diente. Además, debido a su estructura tubular, la dentina es un tejido altamente permeable [26].

Una serie de procesos de degradación de la matriz extracelular de la dentina se produce cuando los adhesivos no son capaces de polimerizarse completamente en la

dentina y debido al pH ácido de los productos utilizados durante el protocolo adhesivo [28]. Una de las etapas principales en la adhesión dentinaria es la infiltración de los monómeros del adhesivo en la matriz de colágeno formando una zona de unión resina-dentina denominada capa híbrida [29]. Esta infiltración de los monómeros en la dentina se consigue a través de un condicionamiento ácido de la superficie que, al eliminar la parte mineral, ocasiona espacios que son ocupados por agua y posteriormente reemplazados por los monómeros polimerizados. La calidad de la capa híbrida es un factor fundamental para la longevidad de las restauraciones. Sin embargo, la dificultad de este proceso se debe a que no todo el agua es realmente sustituido por los monómeros, lo que genera una capa híbrida con regiones con agua y sin resina [29]. Además, enzimas endógenas como las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP), principalmente MMP-2 y MMP-9, activadas durante el condicionamiento ácido, degradan las fibrillas de colágeno y las convierten en solubles, provocando la pérdida de retención de la restauración a la dentina [29]. La Figura 2 muestra un esquema de la interfase adhesivo-dentina y la representación de una capa híbrida inestable.

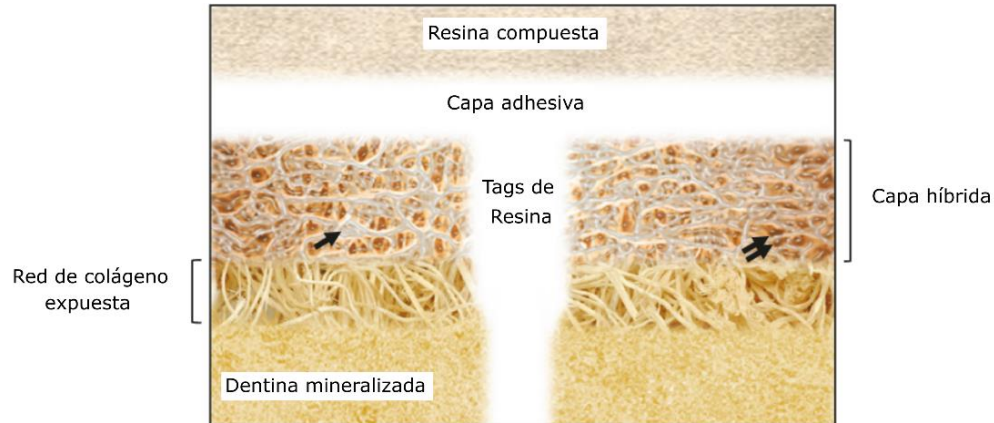


Figura 2. Diseño esquemático de la capa híbrida inestable. La flecha indica espacios interfibrilares ocupados por agua. Las flechas dobles indican los monómeros infiltrados de forma no homogénea en la red de colágeno. Figura tomada y modificada de: Betancourt, D.E., Baldión, P.A., & Castellanos, J.E. *International Journal of Biomaterials*. 2019.

Las MMP son una familia de enzimas dependientes de Zn y Ca que participan del desarrollo dental y se tornan inmóviles y no funcionales cuando son cubiertas por los cristales de apatita durante el proceso de mineralización [30]. Entre los diversos tipos de MMP que existen, en la dentina se pueden encontrar colagenasa MMP-8, gelatinasas

MMP-2 y -9, estromelisin MMP-3 y enamelin MMP- 20 [30]. Las metaloproteinasas están compuestas por un propéptido N-terminal, un dominio catalítico con una zona de unión al Zn rica en cisteínas, una región bisagra y un dominio hemopexina C-terminal [31]. Su activación se produce cuando ocurre una perturbación de la interacción cisteína-zinc, y, posteriormente, la colagenasa escinde las moléculas de colágeno, haciendo que pierdan la conformación en triple hélice, dando lugar a fragmentos que serán hidrolizados por las gelatinasas [31]. Las MMP presentes en la dentina son activadas en un medio ácido como el producido por las bacterias o incluso por el protocolo adhesivo previo a la restauración con resina [29]. Es importante tener en cuenta que ese proceso de activación de las MMP puede ser generado no solo con el uso de adhesivos de grabado-lavado sino también con los de auto-grabado [32].

La técnica de grabado-lavado (E&R) y la técnica de auto-grabado (SE) son las dos estrategias utilizadas en los procedimientos de adhesión a la dentina. La técnica E&R utiliza una fase de grabado ácido separada que puede tener 3 pasos (ácido + *primer* + adhesivo) o 2 pasos (ácido + *primer*/adhesivo). La técnica SE utiliza monómeros ácidos que simultáneamente impriman y graban la dentina y pueden ser de 1 paso (todo en uno) o 2 pasos (*primer* ácido + adhesivo). Los adhesivos SE pueden ser “fuertes” con un pH bajo (≤ 1), “suaves” con un pH alrededor de 2 o “ultrasuaves” con un pH > 2.5 [33].

Con la técnica E&R se elimina la capa de barrillo dentinario desmineralizando completamente 5-8 μm de la superficie de la matriz de dentina, lo que permite la total infiltración de los monómeros [28,29]. Sin embargo, se ha observado que éstos no llegan a infiltrarse hasta las capas más profundas, generando zonas de colágeno desnudo por falta de penetración de los adhesivos en dichas zonas [28]. En la técnica SE la capa de barrillo dentinario se mantiene como sustrato para la adhesión, ya que con esta estrategia se desmineraliza alrededor de 1 μm con los adhesivos “ultrasuaves”, entre 1-2 μm con los adhesivos “suaves” y varios micrómetros de profundidad con los adhesivos “fuertes” [28,33]. Esta desmineralización parcial de la dentina superficial puede ser un inconveniente al impedir la penetración de los monómeros y generar una adhesión débil [28]. Sin embargo, también puede ser una forma de mantener el colágeno protegido y

los cristales remanentes pueden ser una importante fuente de calcio para la unión con los monómeros [33].

Conseguir una completa infiltración y polimerización de la resina en la matriz de colágeno y formar una capa híbrida de alta calidad es el principal factor que contribuye a la longevidad de las restauraciones y sigue suponiendo un desafío [34]. Además, la degradación de la interfase resina-dentina puede causar hipersensibilidad y facilitar la formación de caries secundarias [29]. A pesar de los avances en las prácticas de prevención de caries y los desarrollos tecnológicos en biomateriales, todavía se buscan tratamientos alternativos que sean capaces de reforzar la unión adhesiva entre diente y restauración. Una de las estrategias estudiadas actualmente es la biomodificación de la superficie dentinaria con la aplicación de agentes remineralizantes y agentes de reticulación previos al protocolo adhesivo.

La biomodificación de la dentina es una alternativa utilizada para estabilizar el colágeno y mejorar la interacción entre los materiales y el tejido dentinario. Como es bien sabido, las fibrillas de colágeno están compuestas de tres cadenas de aminoácidos que forman la estructura de triple hélice del colágeno. El entrecruzamiento de las fibrillas, que resulta en la estabilización del colágeno, se forman tanto intra como intermolecularmente y ocurre mediante procesos enzimáticos y no enzimáticos [35]. Asimismo, el grado de entrecruzamiento del colágeno está directamente relacionado con la resistencia mecánica, resistencia enzimática y estabilidad térmica del tejido [36]. Por ende, tanto el grado de enlaces cruzados del colágeno como los componentes de la matriz extracelular son relevantes en el proceso de biomodificación de la dentina [37]. La Figura 3 explica la estructura y algunos componentes de la matriz extracelular dentinaria relevantes para la biomodificación de la dentina.

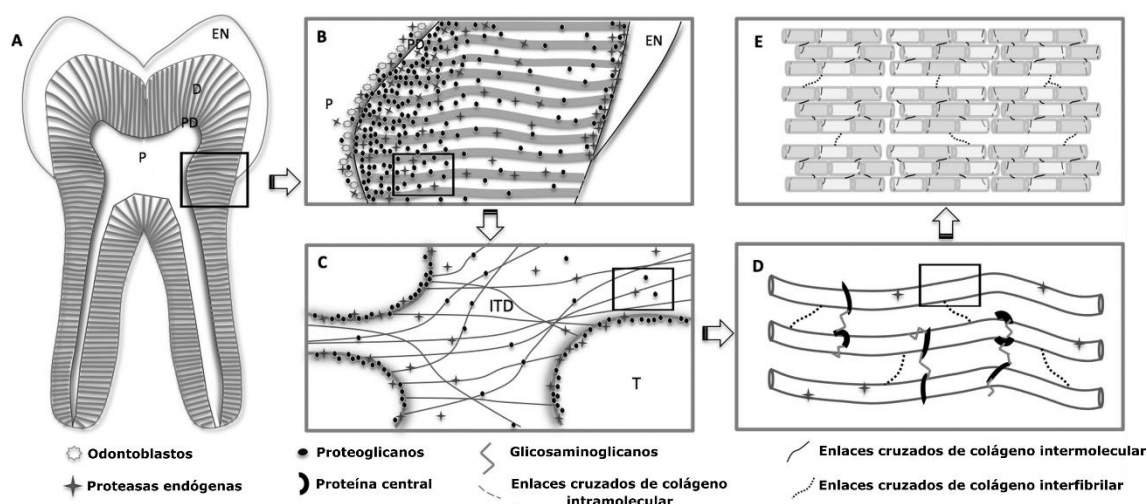


Figura 3. Componentes de la matriz dentinaria de interés para la biomodificación de la dentina. A) Estructura del diente. B) Proteoglicanos y proteasas endógenas (MMP y cisteína-catepsinas) en dentina coronal. C) Proteoglicanos concentrados en dentina peritubular, MMP localizadas en la dentina intertubular. D) Interacción de las fibrillas de colágeno con proteínas no colágenas. E) Enlaces cruzados del colágeno estabilizando la matriz. Figura tomada y modificada de: Bedran-Russo, A. K., et al. *Dental materials*. 2014.

1.4 Agentes remineralizantes

La remineralización es definida como “la ganancia neta de mineral en un tejido previamente desmineralizado sin que ese proceso implique que la lesión recupere su contenido mineral original” [1]. Los agentes remineralizantes son productos externos al diente capaces de generar la deposición de minerales (calcio y fósforo) en la superficie dental desmineralizada [38]. Existen dos tipos de estrategias para la remineralización de los tejidos dentales: la vía clásica o cristalización, basada en iones, y la vía no-clásica o remineralización biomimética [39]. La vía clásica se fundamenta en la deposición epitaxial de iones de calcio y fósforo sobre los cristallitos de hidroxiapatita (HAp) remanentes [39,40]. Por su parte, la vía no-clásica está mediada por moléculas análogas biomiméticas de proteínas no colágenas de la matriz que inducen la formación de fosfatos de calcio amorfo (ACP) precursores de HAp sin la necesidad de que hayan cristallitos remanentes [39,40].

El agente remineralizante estándar utilizado en odontología que posee suficientes evidencias científicas acerca de su eficacia es el fluoruro [41]. Este es ampliamente utilizado como tratamiento y como prevención debido a su capacidad de

disminuir la tasa de desmineralización y promover la remineralización [42]. Esto es posible porque el fluoruro es capaz de reaccionar con los cristales de hidroxiapatita formando cristales de fluorapatita que son más resistentes a los ataques ácidos bacterianos [43]. Sin embargo, como el fluoruro solo es capaz de remineralizar la capa superficial de las lesiones, se siguen investigando productos que sean capaces de remineralizar y penetrar en las capas más profundas de las lesiones de caries [38,44].

Entre los agentes remineralizantes más investigados en odontología se encuentran: los fosfopéptidos de caseína-fosfato de calcio amorfo (CPP-ACP), los vidrios bioactivos y las nanohidroxiapatitas [38,45]. La nanohidroxiapatita (nHAp) sintética es química y biológicamente similar a la hidroxiapatita humana y puede ser producida como un material cerámico denso, como polvo, como recubrimiento cerámico o como cerámica porosa, según la afinidad de su aplicación [46]. Existen varios métodos de síntesis de nHAp, los más comúnmente utilizados son sol-gel, co-precipitación, precipitación química húmeda, reacción en estado sólido y reacción hidrotérmica [47,48]. La Figura 4 muestra imágenes de nanopartículas de hidroxiapatita sintetizadas a través de un método de descomposición térmica.

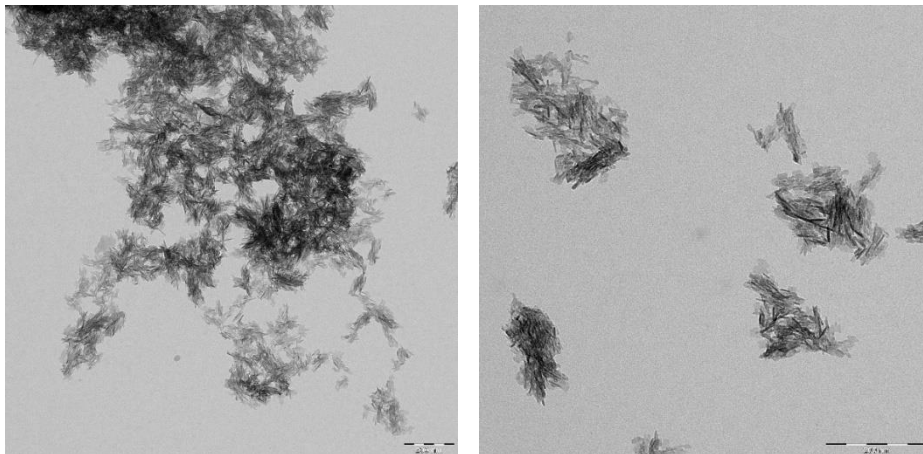


Figura 4. Imágenes de nanopartículas de hidroxiapatita obtenidas mediante TEM (barra de escala: 200 nm). Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Las nHAp son utilizadas en investigaciones de diversas áreas de la medicina y de la odontología debido a sus propiedades en ingeniería tisular como regenerador óseo [47]. En odontología, las nHAp se aplican en restauraciones de defectos periodontales y

óseos, aumento de crestas, recubrimientos en implantes, recubrimiento pulpares, rellenos para refuerzo de cementos de ionómeros de vidrio y de resinas compuestas, como agente desensibilizante y como agente remineralizante [46,47]. La nHAp ha demostrado tener un gran potencial para actuar en procesos de remineralización en capas profundas de lesiones de caries, estabilización de la matriz de colágeno, aumento de la fuerza de adhesión dentina-resina, aumento de la microdureza dentinaria superficial y profunda, además de disminuir la sensibilidad dental por oclusión de los túbulos dentinarios y ser un material biocompatible [49–54]. El proceso de remineralización con nHAp ocurre mediante la precipitación de cristales hasta las capas más profundas de la lesión y por facilitar los enlaces entre iones P y Ca^{2+} presentes en el fluido oral y la matriz dentinaria desmineralizada [49,55].

1.5 Agentes reticulantes

Una molécula de colágeno consta de dos cadenas $\alpha 1$ y una cadena $\alpha 2$ entrelazadas en una triple hélice. Estas moléculas de colágeno se agregan en paralelo, con un espacio de 67 nm entre ellas, formando las fibrillas de colágeno [56]. La formación natural de los enlaces cruzados de colágeno se produce mediante procesos enzimáticos y no enzimáticos para estabilizar las fibrillas de colágeno [35]. El primer paso en la formación de los enlaces cruzados enzimáticos es la hidroxilación intracelular de la lisina (Lys) dentro de la triple hélice, que conduce a la formación de hidroxilisina (Hyl) [57]. En el espacio extracelular, la Lys y la Hyl se convierten en aldehídos Lysald e Hylald que sufren una serie de reacciones de condensación para formar enlaces cruzados bivalentes inmaduros (dihidroxilisina-norleucina - DHLNL - e hidroxilisina-norleucina - HLNL -) y enlaces cruzados trivalentes maduros (piridinolina - PYD -, deoxipiridinolina - DPD -, y pirroles - Pyr -) [58]. Esta estructura de las fibrillas de colágeno forma un patrón de bandas regulares muy característico que puede verse en la Figura 5.

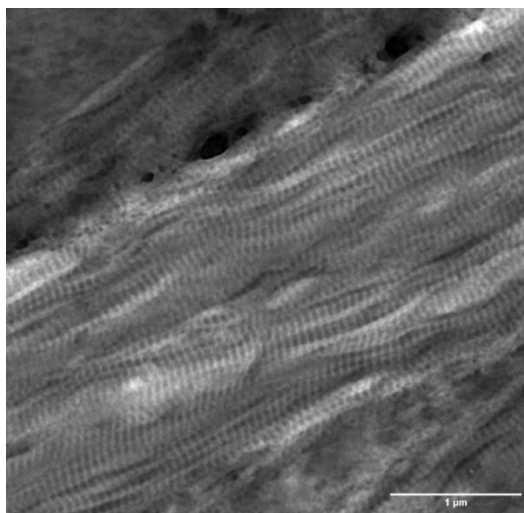


Figura 5. Imagen obtenida mediante TEM que muestra el bandeo típico de las fibrillas de colágeno (Barra de escala: 1μm). Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Los agentes reticulantes aplicados en la dentina son compuestos capaces de aumentar el grado de enlaces cruzados del colágeno, estabilizando la matriz dentinaria y, como consecuencia, mejorando sus propiedades mecánicas e inhibiendo su biodegradación [59]. Estos compuestos pueden ser naturales, como los polifenoles, o sintéticos, como el glutaraldehído. A pesar de que el glutaraldehído presenta capacidad para reaccionar químicamente con el colágeno y mejorar las propiedades de la dentina, tiene una alta citotoxicidad, lo que limita su uso [31]. De esta manera, los agentes naturales parecen ser más idóneos para el uso en tejidos humanos, puesto que presentan una mejor biocompatibilidad [59]. Entre los agentes naturales, las proantocianidinas son uno de los compuestos más estudiados [37].

La Proantocianidina (PA), también conocida como tanino condensado, es un polifenol que se encuentra en frutas, verduras, nueces, semillas y flores. Sus compuestos monoméricos flavan-3-ol más abundantes son la catequina (C) y la epicatequina (EC), pero también se pueden encontrar galocatequina (GC), catequina galato (CG), epigalocatequina (EG), epicatequina galato (ECG), galocatequina galato (GCG) y galato de epigalocatequina (EGCG) [37]. La Figura 6 ilustra las diferencias entre estas subclases conforme la estructura específica del monómero flavan-3-ol. Su mecanismo de acción se basa en que el complejo catequina puede interactuar con el colágeno de la dentina a través de enlaces covalentes, iónicos, de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas [59].

Estos enlaces se forman debido a que los grupos hidroxilos de la PA interaccionan con los grupos hidroxilo, carboxilo, amino y amida del colágeno [60]. Además, cuanto más grupos hidroxilos tiene la molécula del tanino, más enlaces se forman con el colágeno [60]. Esta formación adicional de enlaces de cruzados de colágeno inter e intramoleculares resultan en un refuerzo de la matriz colágena [59].

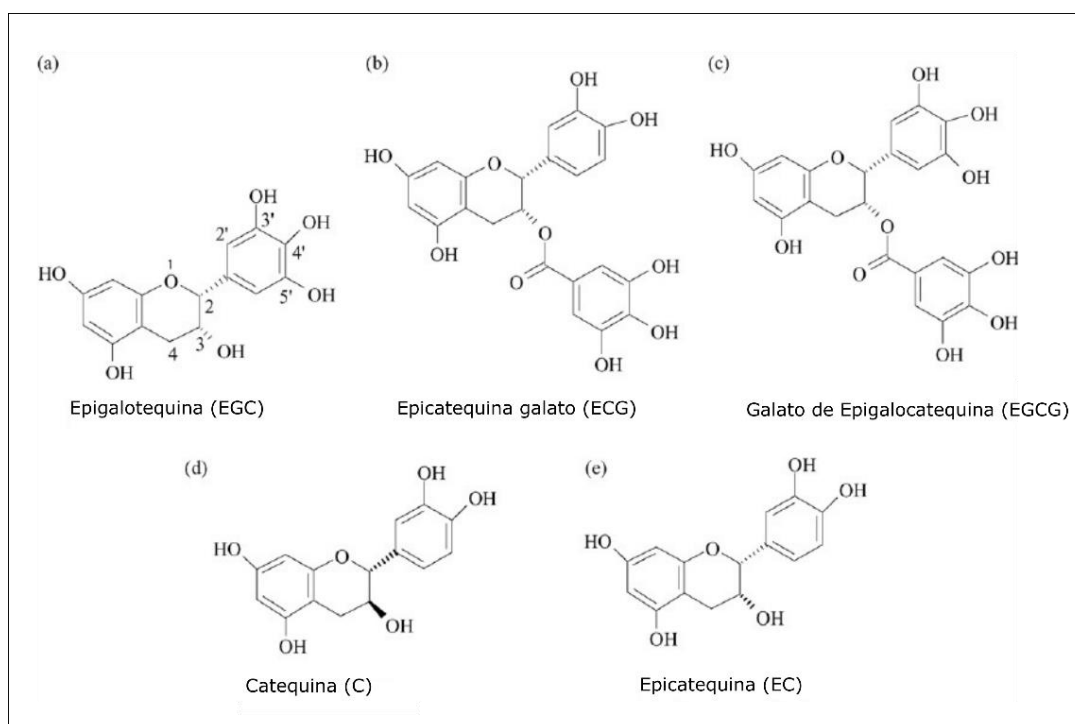


Figura 6. Estructuras moleculares de a) epigallocatequina (EGC), b) epicatequina galato (ECG), c) galato de epigallocatequina (EGCG), d) catequina (C) y e) epicatequina (EC). Figura tomada y modificada de: Song, J.M., Lee, K.H., Seong, B.L. *Antiviral research*. 2005.

Diversos estudios han evidenciado mejoras en las propiedades mecánicas de la dentina, inhibición de MMP y cisteínas catepsinas, remineralización de lesiones de caries artificial y estimulación de la formación de hueso *in vivo*, con el uso de PA [61–67]. Los mecanismos que explican cómo la PA favorece la remineralización e impide la desmineralización son: su capacidad de estabilización de la matriz orgánica que sirve como base para la deposición de minerales y como barrera contra la pérdida de minerales y su capacidad de formar complejos PA-calcio [37,59,65]. Adicionalmente, la PA puede estabilizar la matriz dentinaria y enmascarar los sitios de clivaje de las enzimas endógenas en el colágeno, actuando como inhibidor de MMP [68,69].

1.6 Nanotecnología

La nanotecnología, definida como la manipulación de la materia a nivel molecular y atómico, tiene aplicaciones en diversos campos tales como la medicina (diagnostico, administración de fármacos, ingeniería de tejidos, sensores, robots), la química y medio ambiente (catálisis, filtración), la energía (reducción del consumo de energía, aumento de la eficiencia de la producción de energía, reciclaje de pilas), la información y comunicación (ordenadores, pantallas, dispositivos semiconductores y optoelectrónicos) y en la industria pesada (aeroespacial, refinerías, fabricantes de vehículos, bienes de consumo, alimentación) [70].

Según la definición de la UE (2011/696/EU), el término nanomaterial designa un material natural, accidental o fabricado que contiene partículas, en estado no aglomerado o como agregado o aglomerado y en el que, para el 50% o más de las partículas de la distribución de tamaño numérico, una o más dimensiones externas se encuentra en el intervalo de tamaño 1 nm-100 nm.

En los últimos 20 años, las investigaciones se han centrado en el desarrollo de nanopartículas (NPs), aumentando el interés por la nanotecnología y por la calidad de los materiales a estas escalas [71]. La gran ventaja de las NPs es su capacidad de interacción a nivel molecular, lo que aumenta la eficacia en comparación con los materiales a mayor escala [72]. Además, las NPs pueden disponerse en una serie de configuraciones debido a su elevada relación superficie/volumen, lo que facilita su manipulación y utilización en diversas aplicaciones [72]. No obstante, esta elevada relación superficie/volumen puede ser un inconveniente, puesto que puede penetrar más fácilmente en los tejidos biológicos y liberar más cantidad de sustancias tóxicas. En cualquier caso, los conocimientos sobre las interacciones entre las NPs y los tejidos biológicos siguen siendo en gran medida incompletos, ya que los resultados de los estudios *in vivo* e *in vitro* siguen siendo muy limitados, principalmente en odontología [71]. A su vez, los efectos biológicos de las NPs dependen de muchos factores como el tamaño de la superficie expuesta, la naturaleza y cantidad de sustancias liberadas y las condiciones físicas y químicas tanto de la superficie biológica como de las NPs.

Actualmente, la nanotecnología forma parte de múltiples áreas de la odontología, proporcionando diferentes alternativas a los tratamientos convencionales. Debido a su pequeño tamaño y a su elevada relación superficie-volumen, las nanopartículas presentan propiedades físico-químicas y biológicas superiores a las de otros materiales utilizados en las terapias dentales convencionales [73]. En odontología, las NPs son utilizadas principalmente como rellenos de composites aunque también son aplicadas como materiales antimicrobianos, nanoadhesivos, en nanomineralización, nanorecubrimientos, materiales nanotransportadores de fármacos, cerámicas nanocristalinas, nanomateriales para implantología, nanomateriales basados en grafeno, soluciones nanoesterilizantes, etc [70,71].

Existen varias formas de sintetizar NPs: por rayos gamma, irradiación UV, calentamiento y por reducción química o electroquímica [74]. Sin embargo, existe una preocupación por parte de la comunidad científica acerca del uso de estos métodos porque se utilizan productos químicos tóxicos en la superficie de las NPs y disolventes no polares que limitan sus aplicaciones en la clínica [75]. Este problema incentivó el desarrollo de la nanotecnología verde, cuyo principal objetivo es la aplicación de los principios de la química verde en el diseño de productos a nanoescala. De esta manera, se han desarrollado métodos de producción de nanomateriales con menor generación de residuos peligrosos y aplicaciones más seguras [71].

La síntesis verde de NPs implica tres pasos principales basados en las perspectivas de la química verde [75]:

- 1: la selección de un medio disolvente biocompatible y no tóxico,
- 2: la selección de agentes reductores benignos para el medio ambiente,
- 3: la selección de sustancias no tóxicas para la estabilización de las NPs.

El método biosintético que utiliza extractos vegetales es una alternativa viable para disminuir los efectos adversos del uso de productos químicos. La biosíntesis vegetal conlleva un bajo uso de energía, menor impacto ambiental, menor coste y un amplio margen de seguridad con respecto a los métodos convencionales de síntesis química

[76]. Además, la alta especificidad de las biomoléculas vegetales implicadas en el proceso de biosíntesis puede permitir un control eficaz del tamaño y de la forma de las NPs [77]. Por su parte, las plantas medicinales presentan interesantes características médicas y fisicoquímicas. El uso de plantas y agentes naturales en la producción de NPs mejoran la biocompatibilidad de estos materiales, principalmente de las nanopartículas metálicas [78,79].

2. Hipótesis

La hipótesis de la presente tesis doctoral es que existen diferencias entre la dentina humana y bovina sometidas a un proceso de caries artificial y que el tratamiento de ese sustrato con nanohidroxiapatita funcionalizada con proantocianidina es capaz de mejorar las propiedades mecánicas de la dentina e inhibir la actividad de las MMP.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Comparar la dentina humana y bovina sometidas a un proceso de caries artificial y evaluar el tratamiento de ese sustrato con nanohidroxiapatita funcionalizada con proantocianidina.

3.2 Objetivos Específicos

1. Ejecutar un proceso de desmineralización/remineralización en dentina humana y bovina utilizando el método de ciclaje de pH con diferentes tiempos de exposición y comparar sus propiedades generales mediante diversas pruebas fisicoquímicas.
2. Evaluar el efecto del tratamiento con nanohidroxiapatita, ya sea combinada o no con proantocianidina, en las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de la dentina desmineralizada.
3. Evaluar el efecto de la nHAp_PA, utilizada en diferentes concentraciones, como un *primer*, en la resistencia a la microtensión y en la actividad enzimática endógena después de 24 horas y 6 meses de almacenamiento en laboratorio.

4. Metodología

Las técnicas utilizadas en la presente tesis doctoral para el análisis y la caracterización de las muestras son descritas en los siguientes apartados.

4.1 Pruebas mecánicas

El estudio de las propiedades mecánicas de la dentina es esencial para comprender los efectos de los materiales utilizados en la clínica, los tipos de tratamientos que se realizan sobre este sustrato y los cambios microestructurales que afectan a las características de este tejido. En las investigaciones *in vitro* de odontología es muy común el uso de pruebas mecánicas como la resistencia a la microtensión, resistencia a la compresión, resistencia a la fatiga, resistencia a la flexión y pruebas de dureza [80]. Puesto que cada tipo de ensayo tiene sus características específicas, su elección se basa en el tipo de respuesta que se desea evaluar.

4.1.1 Ensayo de flexión en tres puntos

La resistencia a la flexión mide la capacidad que el material tiene para flexionarse antes de romperse. Este tipo de ensayo es muy utilizado debido a que las fuerzas generadas en situaciones clínicas, como la tensión masticatoria, generan fuerzas de flexión [80]. El ensayo de flexión en tres puntos es uno de los métodos más utilizados para la caracterización mecánica de los materiales dentales. En esta prueba, se suelen utilizar muestras rectangulares que se apoyan en dos puntos y la fuerza se aplica en el centro.

En la presente tesis doctoral, la resistencia a la flexión se determinó mediante un ensayo mecánico con una Instron 3345 (Instron Co., Canton, Massachusetts, EE. UU.) utilizando una célula de carga de 500 N sobre un soporte de dos puntos con una longitud

de 4,0 mm entre puntos (Figura 7). Las dimensiones de las barras de dentina utilizadas son 6 x 1 x 1 mm³. Los ensayos se realizaron a una velocidad de carga de 1 mm/min hasta que las muestras se fracturaron. Para caracterizar las propiedades mecánicas de las muestras, se determinó la resistencia a la flexión (MPa) mediante la fórmula $\sigma = 3PL / 2wt^2$, donde σ es la resistencia a la flexión, P es la carga a la fractura, L es la distancia entre apoyos, w es la anchura y t es el grosor de la muestra [81].



Figura 7. Ensayo de flexión en tres puntos. Instron 3345 disponible en el laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada.

4.1.2 Resistencia de adhesión a la microtensión (μ TBS)

La resistencia a la tensión se mide sometiendo un material a fuerzas axiales en línea recta y en sentidos opuestos [80]. El ensayo de resistencia de adhesión a la microtensión (μ TBS) es la prueba estándar para evaluar la retención de la restauración de composite dental [82].

En la presente tesis doctoral, para el ensayo de resistencia a la microtensión, los dientes se seccionaron en las direcciones "x" e "y" perpendiculares a la interfase de adhesión para obtener barras con un área de sección transversal de aproximadamente 1 mm² utilizando un disco de corte de diamante (MOD 13, Struers, Ballerup, Dinamarca) en una máquina de corte Accutom 50 (Struers, Ballerup, Dinamarca) con refrigeración

por agua (Figura 8). El área transversal de la interfase de adhesión de cada barrita se midió con un micrómetro digital (IP67, Mahr GmbH, Gottingen, Alemania) y las barritas se fijaron en una probeta específica para test de microtensión utilizando cianoacrilato (Cofan Cyanoacrylate, Cofan la Mancha, Ciudad Real, España). La resistencia a la microtensión se determinó con una máquina Instron 3345 (Instron Co., Massachusetts, EE. UU.) con una célula de carga de 500 N a una velocidad de 1 mm/min hasta la fractura (Figura 9). La μ TBS se expresó en MPa.

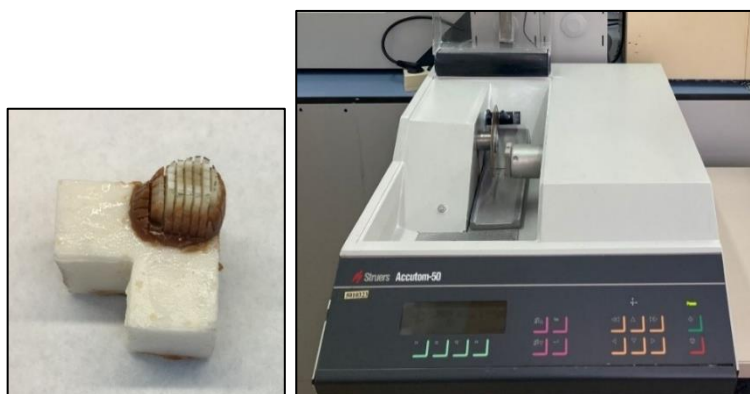


Figura 8. Corte del diente en barritas de 1mm² (a la izquierda) por una Accuton 50 (a la derecha) disponible en el laboratorio de investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada.

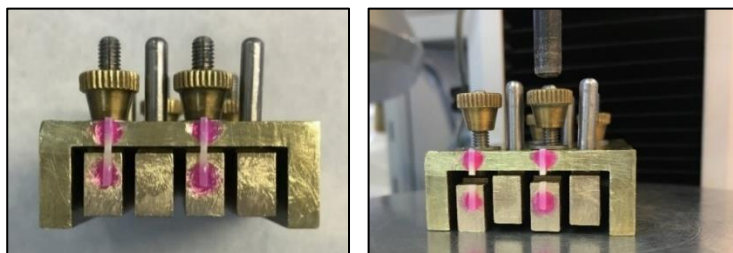


Figura 9. Barritas fijadas en un soporte (a la izquierda) para el ensayo de microtensión (a la derecha).

4.2 Análisis químicos

4.2.1 Análisis por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

La espectroscopía infrarroja es una técnica de espectroscopía vibracional muy utilizada para el análisis de tejidos biológicos. En esta técnica, las moléculas de

componentes inorgánicos y orgánicos absorben la radiación infrarroja (energía) generando un estado de excitación [83]. Esta excitación produce vibraciones de los enlaces moleculares en distintas frecuencias de onda. Es decir, la frecuencia de onda de cada pico de absorbancia del espectro infrarrojo viene determinado por las propiedades fisicoquímicas intrínsecas de la molécula correspondiente [83]. Así, los espectros proporcionan información sobre la estructura, la dinámica y el entorno molecular de la muestra [84].

En la presente tesis doctoral, las muestras se analizaron utilizando un espectrómetro FTIR JASCO 6600 equipado con un accesorio ATR de punta de diamante (ATR Pro ONE, JASCO Inc, Maryland, EE. UU.). Los espectros se registraron a una resolución de 2 cm^{-1} con 32 acumulaciones utilizando un rango espectral de $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ en modo de absorción. Las cantidades relativas a grupos moleculares de proteínas (principalmente colágeno), fosfatos y carbonatos en las muestras de dentina se determinaron a partir del área de pico de las bandas de absorción asociadas a cada componente químico (Figura 10) [83,85,86]. Se resolvió el solapamiento de los picos y se midieron sus áreas integradas utilizando un software de ajuste de curvas (Peakfit v4.12, Systat Software, San Jose, California, EE. UU.). Se utilizó el método de la segunda derivada para resolver los cálculos de los picos dentro de la región del espectro. Se permitió una variación de la amplitud y posición máximas del 5% y $\pm 2\text{ cm}^{-1}$, respectivamente. El grado de suavizado se ajustó al 10% (algoritmo Savitzky-Golay) y se utilizó una función mixta Gaussiana-Lorentziana para adaptar los contornos de las bandas dentro de la región. El ajuste de la curva se aceptó cuando r^2 alcanzó valores superiores a 0,995.

A partir de las mediciones del área de los picos, se determinaron los siguientes parámetros de composición para definir las propiedades químicas de la dentina: la cantidad relativa de mineral respecto a la matriz orgánica ($\text{PO}_4/\text{AmidaI}$) determinada como la relación entre el fosfato principal ($\nu_1, \nu_3\text{ PO}_4$; $900\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$) y la relación del área de la banda de la Amida I ($1590\text{--}1710\text{ cm}^{-1}$). El carbonato sustituido en el contenido mineral (CO_3/PO_4) determinado como la relación entre el carbonato sustituido ($\nu_3\text{ CO}_3$; $1390\text{--}1440\text{ cm}^{-1}$, sustitución de tipo B) y el área de la banda del fosfato principal (900--

1200 cm^{-1}). La cantidad de carbonato ($\nu_3 \text{CO}_3$) respecto a la matriz orgánica ($\text{CO}_3/\text{AmidaI}$). El Índice de Cristalinidad Mineral (IC) determinado como la relación entre las áreas de las sub-bandas de fosfato a 1030 cm^{-1} (fosfatos de apatita altamente cristalinos) y a 1020 cm^{-1} (fosfatos de apatita pobremente cristalinos) [83,87]. La cantidad de enlaces cruzados de colágeno (LKN) se determinó como la relación entre las áreas de las sub-bandas de amida I en 1660 y a 1690 cm^{-1} [57].

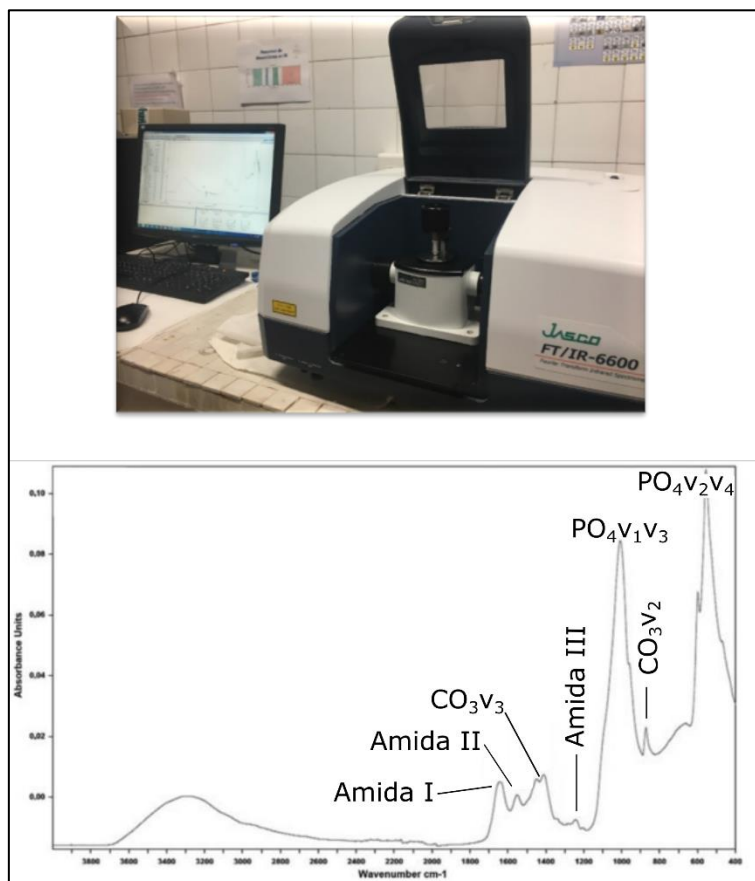


Figura 10. Equipo ATR-FTIR y un espectro típico de dentina resultante del análisis con ATR-FTIR en el cual se pueden ver los picos característicos de cada grupo molecular. ATR-FTIR JASCO 6600 disponible en el Departamento de Mineralogía y Petrología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada.

4.2.2 Termogravimetría (TGA)

La termogravimetría es una técnica en la que la masa de la muestra se mide de forma continua mientras la temperatura aumenta o disminuye. De esta forma, se pueden determinar los componentes de la muestra en función de la descomposición térmica. En la presente tesis doctoral, el contenido de agua, materia orgánica y minerales

de la dentina se determinó calentando las muestras de dentina a diferentes temperaturas utilizando un horno Carbolite (CWF 1100) (Capítulo I de la tesis) y un equipo TGA/DSC1 Mettler-Toledo (Capítulo II de la tesis).

Con el Carbolite las pérdidas de peso se midieron a diferentes rangos de temperatura: 25-200°C para el contenido de agua; 200-600°C para el contenido de materia orgánica (MO); y hasta 600°C para el contenido mineral (%Mineral) (Figura 11) [88–90]. Con el TGA/DSC (Figura 12) el calentamiento se realizó desde una temperatura ambiente hasta 950 °C en flujo de aire (50 ml/min), utilizando un portamuestras de alúmina, con una velocidad de calentamiento de 20 °C/min. Para cada portamuestra se utilizaron aproximadamente 20 mg de muestra. Los porcentajes de pérdida de peso se midieron a diferentes rangos de temperatura: 25-200 °C para el contenido de agua; 200-600 °C para el contenido de materia orgánica (MO); y de 600-950 °C para determinar la cantidad de carbonato en el mineral (%CO₃). El peso restante corresponde a la cantidad de fosfato en el mineral (%PO₄) [90].

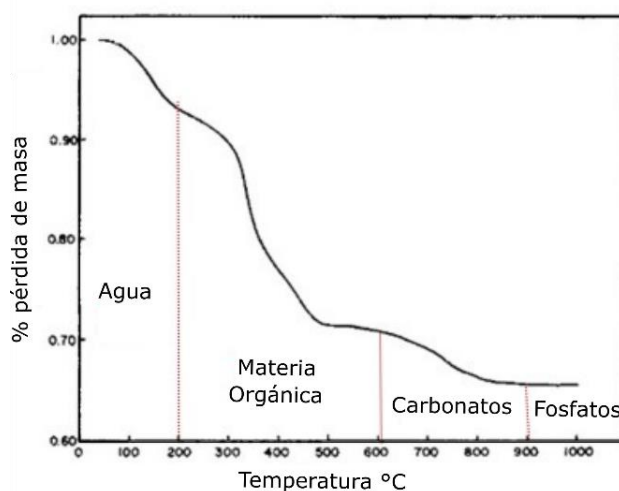


Figura 11. Gráfico representativo de la curva termogravimétrica. 25-200°C pérdida de agua, 200-600°C pérdida de materia orgánica, 600-900°C pérdida de carbonatos, >900°C pérdida de fosfatos.



Figura 12. Equipo TGA/DSC Mettler-Toledo disponible en el Departamento de Mineralogía y Petrología de la Facultad de Ciencias.

4.3 Análisis microestructurales

4.3.1 Difracción de rayos X (DRX)

La difracción de rayos X (DRX) es una técnica analítica que define la composición y la estructura de las muestras cristalinas. La DRX se produce cuando un haz de ondas electromagnéticas generados por fuentes de rayos X interactúa con las moléculas de un cristal [91]. Las posiciones de los haces difractados se rigen por las posiciones de los átomos del cristal [91]. De esta manera, cada muestra genera un patrón de difracción característico. Además de la composición, la DRX puede determinar el tamaño y la forma de las partículas.

En la presente tesis doctoral, el patrón de difracción de rayos X de las muestras en polvo se obtuvo con un difractómetro X'Pert Pro (PANalytical, Almelo, Países Bajos) utilizando radiación $\text{CuK}\alpha$ producida a 40 mA y 45 kV. Los barridos se adquirieron entre 20° y 75° (valores 2θ) con un paso de $0,0042^\circ$ y un tiempo/paso de conteo de 5,08 s. El tamaño medio de cristalito (D) de los cristales de apatito se calculó utilizando el software X PowderX (Martín-Ramos, 2004) con la ecuación de Scherrer (Schreiner y Jenkins, 1983): $D(002) = K \lambda / (B \cos \theta)$; donde K es una constante que varía con el hábito cristalino y se

elige como 0,9 para cristales alargados de apatito (Klug y Alexander, 1959), λ es la longitud de onda de la radiación $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), B es la anchura a media altura (FWHM) del pico de difracción 002 del apatito, y θ es el ángulo de difracción correspondiente para esta reflexión. La anchura de una línea de DRX representa una medida del tamaño medio del cristalito a lo largo de una dirección cristalina específica (es decir, el eje c del apatito) y también puede utilizarse como índice de cristalinidad de los materiales [83,87,92,93]. La Figura 13 ilustra un espectro de DRX característico de hidroxiapatita.

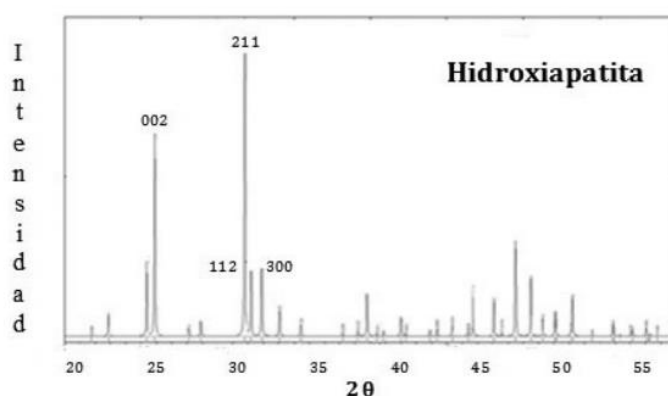


Figura 13. Espectro característico de hidroxiapatita medido con DRX.

Para definir el contenido mineral a partir de la intensidad total de las reflexiones de la apatita, las muestras (barritas de 1x1 mm de sección transversal) se analizaron con un difractómetro de cristal único (D8 Venture, Bruker, Alemania) equipado con un detector de área PHOTON 100-SC utilizando radiación Mo ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$) en modo de transmisión y 20 segundos para la adquisición del patrón 2D-DRX. La cantidad de mineral se determinó con el área integrada de los picos de difracción mostrados en los barridos 2Theta calculados integrando radialmente las intensidades de los patrones 2D-DRX utilizando el software DRX2DScan versión 7.0 (PANalytical, Países Bajos).

4.4 Análisis de la actividad enzimática - Zimografía

Una de las maneras de evaluar la actividad enzimática en muestras biológicas es realizando una técnica de zimografía. En odontología, esta es una valiosa herramienta

para estudiar la actividad de las MMP. Existen diversos tipos de la técnica, la zimografía en gel se centra en la separación de las bandas de actividad enzimática mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) [94]. La zimografía *in situ* se realiza directamente en el tejido biológico, permitiendo la visualización de la actividad enzimática en su localidad exacta y en su contexto fisiológico natural [94]. Aunque pueden ser técnicas complementarias, la zimografía en gel es el tipo de zimografía más utilizado en las investigaciones en odontología.

4.4.1 Zimografía en gel

En la presente tesis doctoral, la zimografía en gel se realizó según el método empleado por Mazzoni et. al., 2013 [30]. Se eliminó el esmalte, el cemento y el tejido pulpar de 10 dientes humanos sanos extraídos por razones ortodóncicas. Los dientes se pulverizaron con un molino Retsch (Modelo MM400, Retsch GmbH, Haan, Alemania) en cantidades suficientes para los cinco grupos (Capítulo III de la tesis). Los tratamientos con soluciones que contenían nHAp_PA se realizaron durante 30 min a 4 °C protegidos de la luz. Tras lavar y sonicar, los polvos de dentina se suspendieron en un tampón de extracción durante toda la noche a 4 °C. A continuación, las muestras se sonicaron durante 10 min y se centrifugaron durante 20 min. Los sobrenadantes se recogieron y se concentraron utilizando un concentrador centrífugo Vivaspin (10.000 kDa de corte; Vivaspin Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Alemania) y la concentración total de proteínas en la dentina se determinó mediante el ensayo de Bradford. Las alícuotas de proteína de la dentina se diluyeron con tampón de muestra Laemmli. La electroforesis se realizó en condiciones no reductoras utilizando un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico al 10% (SDS-PAGE) que contenía 1 mg/mL de gelatina marcada con fluorescencia (Figura 14). Tras la electroforesis, los geles se lavaron y se incubaron en un tampón de activación zimográfica durante 48 h a 37 °C. La actividad proteolítica se evaluó y se registró con un escáner de luz ultravioleta de onda larga (Chemi-Doc Universal Hood, Bio-Rad) (Figura 14).

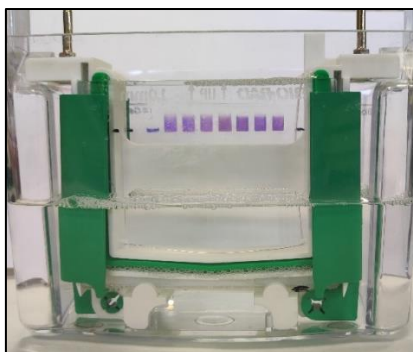


Figura 14. Electroforesis con gel y escáner de luz ultravioleta de onda larga Chemi-Doc Universal Hood disponible en la Universidad de Bologna.

4.4.2 Zimografía *in situ*

En la presente tesis doctoral, la zimografía *in situ* en las interfaces resina-dentina se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Mazzoni et. al., 2012, utilizando gelatina conjugada con fluoresceína como sustrato de las MMP. Los especímenes se pegaron a un portaobjetos de microscopio, se pulieron progresivamente con papel de carburo de silicio húmedo (tamaños de grano: 600, 1200, 4000) hasta un grosor de $\sim 50 \mu\text{m}$, se recubrieron con una mezcla de gelatina fluorescente (E-12055; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) y se cubrieron con un cubreobjetos. Las muestras se colocaron en una cámara húmeda y se mantuvieron toda la noche en la oscuridad a 37°C . Tras la incubación, se examinaron los portaobjetos con un microscopio confocal láser de barrido (Leica SP8, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania; longitud de onda de excitación/emisión: 488/530 nm). Un investigador ajeno realizó dos imágenes para cada muestra. La cuantificación de la densidad integrada de la señal de fluorescencia se realizó

al mismo nivel para cada imagen mediante un software de análisis de imágenes (ImageJ; National Institutes of Health, Maryland, EE. UU.). En todas las imágenes se utilizó un área seleccionada rectangular normalizada. Se analizaron estadísticamente las diferencias en el nivel de fluorescencia entre los grupos analizados, expresadas como densidad integrada (píxeles/ μm^2).

Capítulo I

Influencia del proceso de desmineralización / remineralización
en las propiedades químicas, microestructurales y mecánicas
de la dentina humana y bovina

**Influencia del proceso de desmineralización / remineralización
en las propiedades químicas, microestructurales y mecánicas
de la dentina humana y bovina**

Este trabajo se encuentra publicado y se puede encontrar con la siguiente referencia: Enrich-Essvein, Tattiana; Benavides-Reyes, Cristina; Álvarez-Lloret, Pedro; Victoria Bolaños-Carmona, María; Rodríguez-Navarro, Alejandro B.; González-López, Santiago. Influence of de-remineralization process on chemical, microstructural, and mechanical properties of human and bovine dentin. *Clinical Oral Investigations*. 2021.

I.1 INTRODUCCIÓN

El diente humano es el sustrato ideal para los estudios *in vitro* en investigación odontológica [5,7]. Sin embargo, debido al avance de los enfoques mínimamente invasivos en odontología conservadora, cada vez es más difícil obtener un número suficiente de dientes humanos sanos. Además de la dificultad de obtener grandes cantidades de muestras dentales humanas, existen cuestiones éticas que impiden su uso con fines experimentales [5,9,12,95]. Debido a todas estas cuestiones, se han propuesto y utilizado sustratos alternativos en la investigación dental.

El sustrato más utilizado como sustituto del diente humano es el diente bovino y su empleo ha aumentado considerablemente en los últimos años [5]. Las principales razones que motivan su utilización son la facilidad para obtener un gran número de muestras de calidad adecuada y la posibilidad de estandarizar la edad, la dieta y otras condiciones ambientales imposibles de controlar en los dientes humanos [5,7]. No obstante, a pesar de estas ventajas, la composición química y las características estructurales y morfológicas de los dientes bovinos no son totalmente comparables a las de los dientes humanos [9–13].

Las evidencias científicas relacionadas al uso de dientes bovinos en pruebas de adhesión no son contundentes, varios estudios muestran conclusiones diferentes

I.1 INTRODUCCIÓN

[5,7,9]. Los resultados de uno de estos estudios muestran una fuerza de adhesión considerablemente menor en comparación con los dientes humanos, particularmente en la dentina profunda [9]. Esta diferencia en el comportamiento mecánico entre la dentina bovina y la humana se debe probablemente a propiedades estructurales relacionadas con la densidad y el diámetro de los túbulos dentinarios a diferentes profundidades [10,11]. Además, la radiodensidad de la dentina coronal bovina es significativamente menor en comparación con la dentina coronal humana [12,13] debido a la diferencia en la composición mineral de ambos sustratos. Por lo tanto, deben considerarse todas estas características entre ambos tipos de tejidos para poder interpretar correctamente los resultados en los experimentos.

La inducción artificial de lesiones de caries en dentina humana es un procedimiento clave en la investigación para el desarrollo de estrategias preventivas y terapéuticas. Aunque se han desarrollado diferentes metodologías para simular lesiones cariosas, los protocolos *in vitro* tienen importantes limitaciones, puesto que no pueden reproducir completamente las complejas condiciones intraorales implicadas en el proceso natural como las biopelículas bacterianas, la saliva y la degradación del colágeno [18,96,97]. No obstante, el modelo de ciclaje de pH es capaz de simular la dinámica de pérdida y ganancia de minerales presentando valores de dureza similares a los de la capa de dentina afectada por caries, a diferencia del método microbiológico que presenta valores de dureza inferiores a los de las lesiones naturales [18,97]. De todas formas, en la actualidad, siguen sin encontrarse estudios que comparen el comportamiento de la dentina coronal bovina utilizando el método de ciclaje de pH y sus posibles diferencias en comparación con la dentina humana. Por lo tanto, es necesario investigar sus propiedades químicas y estructurales, así como su respuesta mecánica, para extrapolar los resultados a los dientes humanos y determinar su idoneidad como alternativa.

El objetivo de la primera parte de la presente tesis doctoral fue inducir un proceso de desmineralización/remineralización (des-re) en dentina humana y bovina mediante el método de ciclaje de pH con diferentes tiempos de exposición y comparar sus propiedades generales con diferentes medidas fisicoquímicas. Para ello, las muestras de dentina se caracterizaron mediante análisis químicos (ATR-FTIR y termogravimétrico),

microestructurales (DRX) y mecánicos (ensayo de flexión en tres puntos). La hipótesis nula propuesta fue que no existen diferencias (propiedades mecánicas, microestructurales y/o químicas) entre la dentina humana y la bovina y que el tiempo de ciclaje de pH no influye en estas diferencias.

I.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las muestras

La presente investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Universidad de Granada, España (#1006-2019). Diez incisivos superiores humanos sanos (de pacientes adultos entre 50-70 años), extraídos por razones periodontales, y ocho incisivos inferiores bovinos sanos, extraídos inmediatamente después del sacrificio de los animales (a los 1-2 años) en un matadero local, fueron limpiados y almacenados en solución de timol al 0,1% hasta la preparación de las muestras.

Los incisivos se fijaron con cera natural en moldes de resina acrílica para seccionarlos a 2 mm por debajo de la unión amelocementaria cortando la raíz con un micrótopo de precisión de baja velocidad IsoMet 11/1180 (Buehler, Coventry, Reino Unido) y un disco de diamante XL 12205 (Benetec Limited, Londres, Reino Unido). El esmalte y la dentina superficial se eliminaron con una fresa cilíndrica de diamante (Komet #6881-314-016, Komet-Brasseler, Lemgo, Alemania) en una pieza de mano de alta velocidad (Kavo Supertorque Lux 660B. Kaltenbach & Voigt GmbH, Biberach, Alemania) bajo irrigación constante de agua. Las fresas de diamante se sustituyeron cada cinco usos. La eliminación completa del esmalte y la presencia de dentina en toda la superficie se comprobaron con un estereomicroscopio SZ-TP (Olympus, Tokio, Japón). Posteriormente, la dentina coronal media de las muestras se seccionó con un disco de diamante en una máquina de corte Accutom 50 (Struers A/S, Ballerup, Alemania), bajo irrigación constante, para obtener barritas de dentina de 6 x 1 x 1 mm³. Se obtuvieron sesenta barritas de dentina humana y bovina. Las muestras se asignaron aleatoriamente a dos grupos experimentales según el tipo de sustrato (dentina humana o bovina) y a cuatro subgrupos (n = 15) según el tiempo de tratamiento con ciclos de pH: #0= control; #1= ciclaje de pH durante 3 días; #2= ciclaje de pH durante 7 días; y #3= ciclaje de pH

I.2 MATERIALES Y MÉTODOS

durante 14 días (Figura 15). El grupo control se almacenó en agua destilada hasta su evaluación y el resto de los especímenes fueron sometidos al proceso de des-re por ciclos de pH.

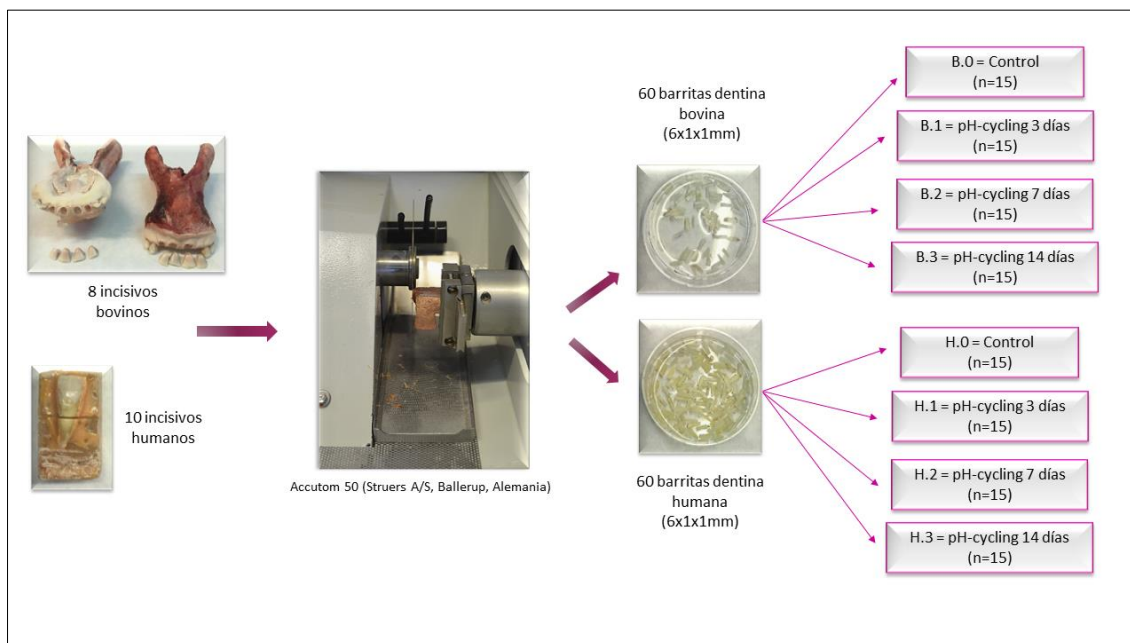


Figura 15. Diagrama de la metodología empleada en la parte I de la tesis doctoral. Accutom 50 disponible en el laboratorio de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada.

Ciclaje de pH

El proceso de des-re se realizó mediante un método de ciclaje de pH modificado por Marquezan et al. [18]. Las muestras se sumergieron en 1 ml de una solución desmineralizante que contenía 2,2 mM CaCl_2 , 2 mM NaH_2PO_4 y 50 mM de ácido acético ajustado a un pH de 4,8 durante 8 horas. Posteriormente, las muestras se sumergieron en una solución remineralizante de 1 ml formulada a base de 1,5 mM CaCl_2 , 0,9 mM NaH_2PO_4 , y 0,15 M KCl ajustada a un pH de 7,0 durante 16 horas. Este procedimiento se realizó durante 3, 7 y 14 días, dependiendo del grupo, renovando las soluciones diariamente, sin agitación y a temperatura ambiente (Figura 16).

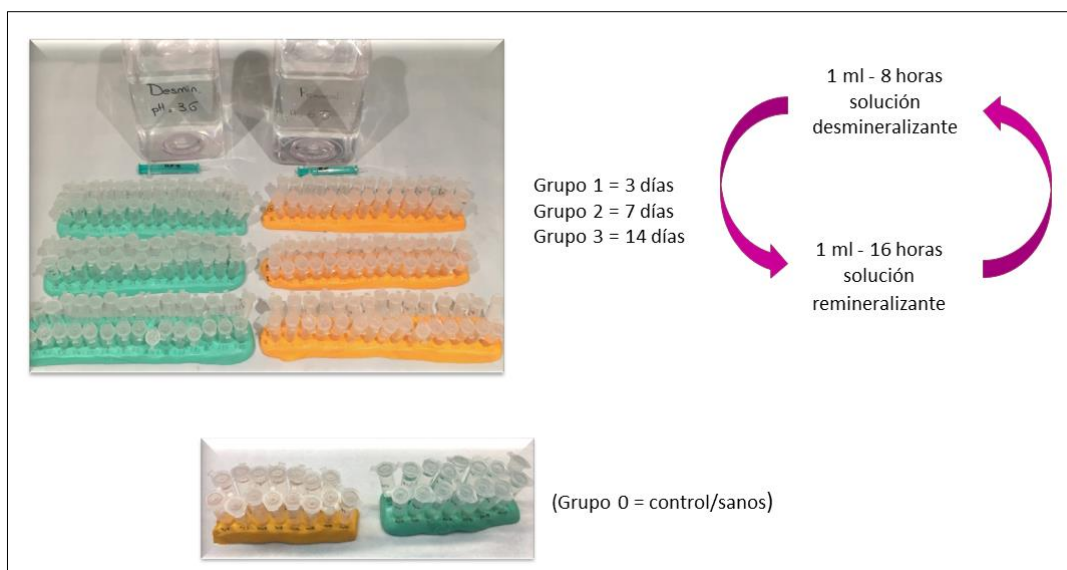


Figura 16. Proceso de desmineralización/remineralización por ciclaje de pH.

Análisis de las muestras

Ensayo de flexión en tres puntos: Las muestras se inspeccionaron al microscopio para confirmar la ausencia de microfisuras o fracturas y sus dimensiones fueron medidas (longitud, anchura y espesor). Posteriormente, se determinó la resistencia a la flexión mediante un ensayo mecánico (como se describe en la sección 4.1.1 de Metodología, página 25). Para caracterizar las propiedades mecánicas de las muestras de dentina, se determinaron la resistencia a la flexión (MPa) y la extensión por compresión (mm).

Análisis por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier con reflectancia total atenuada (ATR-FTIR): Las muestras se analizaron utilizando un espectrómetro ATR-FTIR (como se describe en la sección 4.2.1 de la Metodología, página 27) y se determinaron los siguientes parámetros: la cantidad relativa de mineral respecto a la matriz orgánica ($\text{PO}_4/\text{Amidal}$), el carbonato sustituido en el contenido mineral (CO_3/PO_4), la cantidad de carbonato ($\nu_3 \text{CO}_3$) respecto a la matriz orgánica ($\text{CO}_3/\text{Amidal}$), el Índice de Cristalinidad Mineral (IC) y la cantidad de enlaces cruzados de colágeno.

Análisis termogravimétrico (TGA): El contenido de agua, materia orgánica y minerales de la dentina se determinó calentando las muestras de dentina a diferentes temperaturas utilizando un horno Carbolite (como se describe en la sección 4.2.2 de la Metodología, página 29).

I.3 RESULTADOS

Análisis por difracción de rayos X (DRX): El patrón de difracción de rayos X de las muestras en polvo se obtuvo con un difractómetro X'Pert Pro (como se describe en la sección 4.3.1 de la Metodología, página 31). Se calculó el tamaño medio de cristalito (D) de los cristales de apatito, lo cual también puede utilizarse como índice de cristalinidad de los materiales.

Análisis estadístico: Se calcularon las medias y las desviaciones estándar de cada uno de los parámetros analizados. La distribución normal de los datos para todas las variables se verificó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para las pruebas en las que los datos no se ajustaban a una distribución normal se realizaron comparaciones por pares mediante la prueba U de Mann Whitney. Cuando los datos seguían una distribución normal, la comparación entre grupos dentro de un mismo tipo de diente se realizó mediante la prueba ANOVA unidireccional y la comparación entre los dos tipos de dientes mediante la prueba T-Student. Se utilizó el análisis de correlación de Spearman para estudiar las relaciones entre las distintas propiedades químicas y mecánicas de la dentina. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS 24.0 (SPSS Inc., Chicago, EE. UU.) y OriginPro (OriginLab Corporation, Massachusetts, EE. UU.). Se estableció un nivel de significación de $p < 0,05$.

I.3 RESULTADOS

Ensayo de flexión en tres puntos

La resistencia a la flexión (MPa) no mostró diferencias significativas entre los grupos de tratamiento (control y ciclaje de pH) ni en los tipos de dentina (Figura 17A). La medida de extensión por compresión (mm) aumentó con el tiempo de exposición al ciclaje de pH en ambos sustratos (Figura 17B) mostrando diferencias estadísticamente significativas entre la dentina humana y bovina en todos los tratamientos ($p < 0,001$ en todos los casos) con la dentina bovina obteniendo los valores más altos.

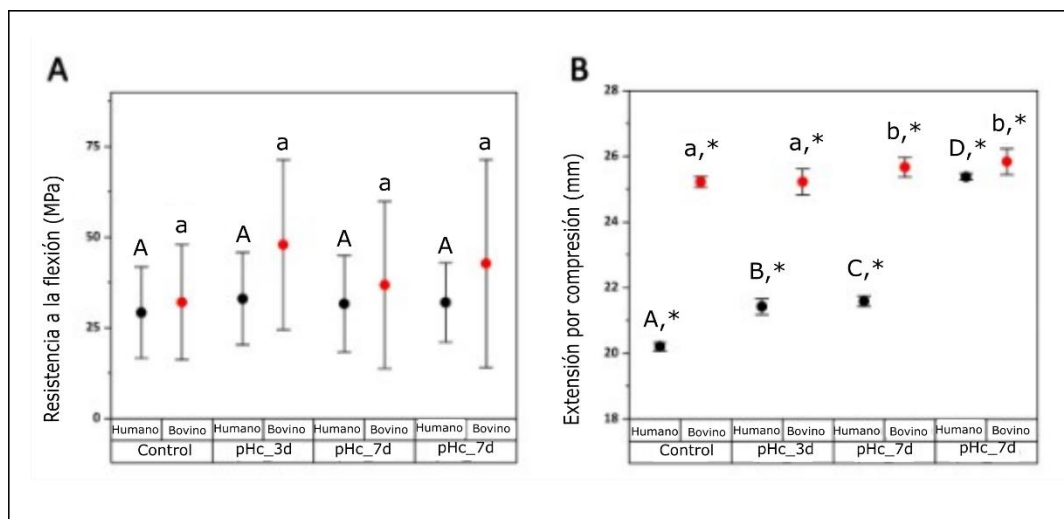


Figura 17. Ensayos mecánicos de flexión en tres puntos. Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre los grupos de dentina humana. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre los grupos de dentina bovina. * indican diferencias significativas entre los tipos de dentina (humana y bovina) en cada tiempo de ciclaje de pH (significación $p < 0,001$).

Análisis ATR-FTIR

La Figura 18 muestra la comparación de los espectros de ATR-FTIR entre la dentina humana y bovina del grupo de control y a los 14 días de ciclaje de pH. En los resultados obtenidos con los cálculos del área de los picos para ambos tipos de dentina, el contenido de fosfato asociado a la matriz orgánica ($\text{PO}_4/\text{Amidal}$) (Figura 19A) y el contenido de carbonatos sustituidos (tipo B) asociado a la matriz orgánica ($\text{CO}_3/\text{Amidal}$) (Figura 19B) disminuyeron significativamente desde el grupo control hasta el grupo de 14 días de ciclaje de pH ($p < 0,001$ para ambos casos). La dentina humana mostró un mayor contenido de $\text{PO}_4/\text{Amidal}$ a los 7 días ($p = 0,007$) y de $\text{CO}_3/\text{Amidal}$ en el grupo control ($p = 0,026$) y a los 7 días ($p = 0,001$) en comparación con la dentina bovina. La Figura 19C muestra que el carbonato sustituido (sustitución de tipo B) en el mineral (CO_3/PO_4) aumentó al final del ciclo de pH en ambos tipos de dentina y bovina obtuvo valores inferiores y estadísticamente significativos que la humana en el grupo control ($p = 0,002$). El Índice de Cristalinidad (IC) (Figura 19D) aumentó del grupo control al grupo de 14 días, tanto en la dentina humana como en la bovina ($p = 0,001$ humana, $p < 0,001$ bovina). Se observó un mayor IC en la dentina humana que en la bovina a los 7 días del ciclaje de pH con diferencias significativas ($p = 0,024$). Los enlaces cruzados de colágeno (Figura 19E) disminuyeron desde el grupo control hasta el grupo de 14 días sin diferencias

I.3 RESULTADOS

significativas. Se observó un mayor grado de enlaces cruzados del colágeno en la dentina humana que en la bovina en el grupo control ($p=0,002$).

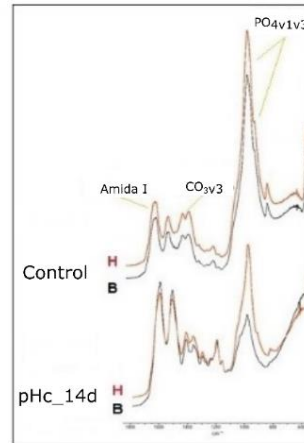


Figura 18. Comparación de espectros de ATR-FTIR entre la dentina humana y bovina del grupo control y a los 14 días del ciclaje de pH. Línea roja = dentina humana (H), línea negra = dentina bovina (B).

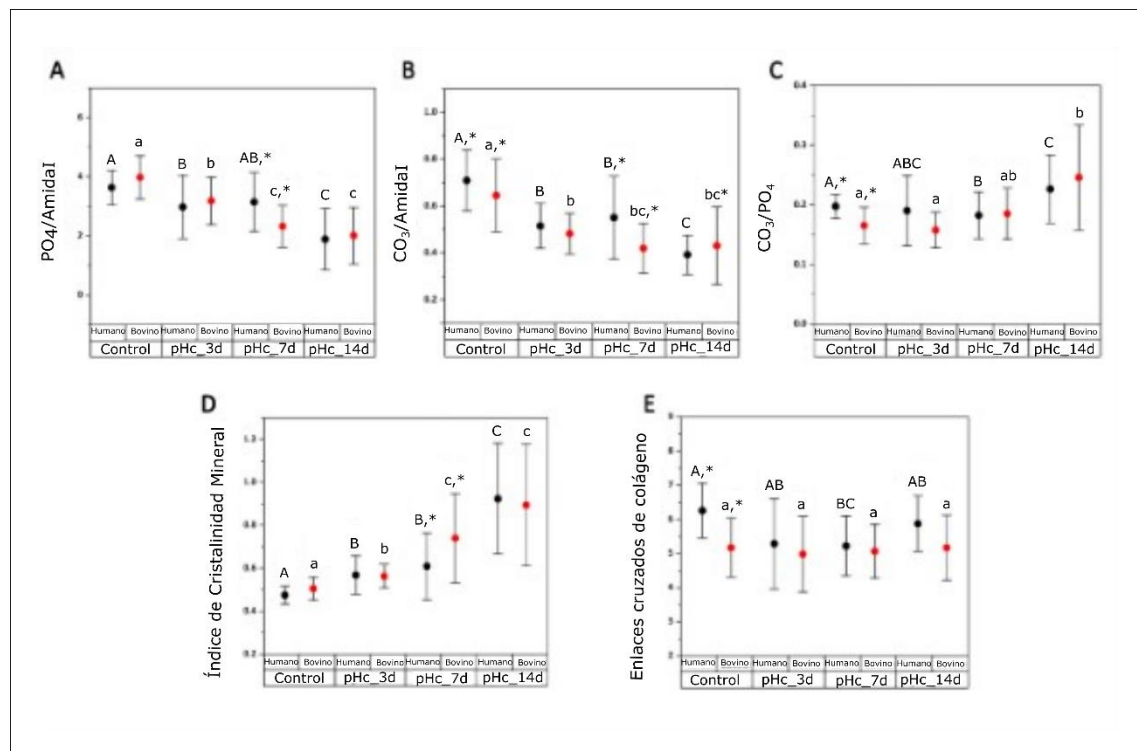


Figura 19. Resultados de composición química obtenidos mediante análisis ATR-FTIR. Letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas entre los grupos de dentina humana. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre los grupos de dentina bovina. * indican diferencias significativas entre los tipos de dentina (humana y bovina) en cada tiempo de ciclaje de pH (significación $p<0,001$).

Análisis termogravimétricos

Las mediciones termogravimétricas (Tabla 1) muestran que no hubo diferencias entre los grupos ni entre los tipos de dentina en cuanto al contenido de agua. En ambos tipos de dentina el porcentaje de materia orgánica (MO) fue aumentando entre el control y los 14 días de ciclado (humana $p=0,001$, bovina $p<0,001$) y la dentina humana presentó valores superiores a la bovina a los 3 días ($p=0,010$). Además, la dentina humana no mostró diferencias entre los grupos con respecto al contenido mineral, mientras que la dentina bovina presentó un porcentaje menor ($p<0,001$) a los 14 días de ciclaje de pH que el grupo control. Además, hubo diferencias en el contenido mineral entre la dentina humana y la bovina a los 14 días ($p=0,039$).

Tabla 1. Medias y desviaciones estándar de las variables composicionales obtenidas en el análisis TGA de dentina humana y bovina en los grupos control y ciclaje de pH durante 3, 7 y 14 días. Letras distintas indican diferencias significativas entre los mismos grupos de tipos de dentina en la fila. * indican diferencias significativas entre los tipos de dentina (H = humana y B = bovina) de cada variable en las columnas (significación $p < 0,001$).

		<i>Control</i>	<i>pHc_3días</i>	<i>pHc_7días</i>	<i>pHc_14días</i>
Agua (%)	H	11.59 ± 4.07 ^a	10.15 ± 0.74 ^a	9.57 ± 1.26 ^a	10.45 ± 0.54 ^a
	B	10.92 ± 1.92 ^a	11.13 ± 1.08 ^a	11.67 ± 2.30 ^a	13.09 ± 1.47 ^a
MO (%)	H	18.94 ± 1.18 ^a	20.52 ± 0.80 ^{ab,*}	20.34 ± 2.38 ^{ab}	21.99 ± 1.34 ^b
	B	18.14 ± 1.90 ^a	18.98 ± 1.88 ^{a,*}	20.58 ± 1.57 ^{ab}	23.12 ± 3.10 ^b
Mineral (%)	H	69.47 ± 3.35 ^a	69.33 ± 1.09 ^a	70.09 ± 3.63 ^a	67.57 ± 1.49 ^{a,*}
	B	70.94 ± 3.55 ^a	69.89 ± 2.60 ^a	67.75 ± 3.12 ^{ab}	63.79 ± 3.58 ^{b,*}

Correlaciones entre variables químicas y mecánicas

La Tabla 2 muestra las correlaciones entre algunas variables químicas y las propiedades mecánicas de la dentina humana y bovina.

I.3 DISCUSIÓN

Tabla 2. Análisis de correlación de Spearman entre las propiedades mecánicas (extensión por compresión) y químicas de la dentina humana y bovina.

Extensión por compresión (mm)	DENTINA HUMANA		DENTINA BOVINA	
	<i>P (Spearman)</i>	<i>p</i>	<i>P (Spearman)</i>	<i>p</i>
PO ₄ / Amidal	-0.533	<0.001	-0.493	<0.001
IC	0.694	<0.001	0.520	<0.001
%Mineral	-0.448	0.005	-0.332	0.044

Análisis DRX

En la Tabla 3 se resumen las medidas del tamaño de los cristalitos (obtenidos a partir del pico de difracción (002)) de los cristales de apatita. Aunque se observó una tendencia al aumento de la cristalinidad mineral a lo largo del tratamiento de ciclaje de pH, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para cada tipo de dentina. La dentina humana mostró un mayor tamaño de cristalitos de apatita que la bovina a los 7 ($p=0,003$) y 14 días ($p=0,009$) de ciclaje de pH. No se observaron correlaciones entre el tamaño de los cristalitos y la composición química o las variables mecánicas.

Tabla 3. Medias y desviaciones estándar del tamaño de los cristalitos medidos por análisis DRX de dentina humana y bovina en los grupos control y ciclaje de pH durante 3, 7 y 14 días. No hubo diferencias significativas entre los grupos en las filas. * indican diferencias significativas entre los tipos de dentina (H = Humana y B = Bovina) de cada variable en las columnas (significación $p < 0,001$). Los valores se expresan en nm.

	Control	pHc_3días	pHc_7días	pHc_14días
H	14.60 ± 1.66	15.31 ± 0.44	16.73 ± 0.74 *	16.93 ± 0.95 *
B	12.48 ± 0.78	13.97 ± 1.02	13.04 ± 0.49 *	13.64 ± 0.73 *

I.3 DISCUSIÓN

Las características de los tejidos mineralizados de los dientes determinan la respuesta a tratamientos específicos utilizados en la clínica dental. Además, la composición química y las propiedades microestructurales y mecánicas de estos tejidos pueden variar de una especie a otra. El estudio comparativo de las propiedades de los

dientes de distintas especies es fundamental para la investigación dental *in vitro* y la extrapolación de sus resultados a los dientes humanos. Nuestra investigación se centró en analizar las diferencias entre la dentina humana y la bovina en un proceso de desmineralización-remineralización (des-re) mediante ciclaje de pH en distintos tiempos de exposición.

En el presente trabajo, la composición química a nivel molecular del grupo control de dentina bovina mostró valores significativamente inferiores a los humanos con respecto a los componentes minerales (fosfatos y carbonatos) y enlaces cruzados de colágeno (Figura 18 y Figura 19). Durante los experimentos de ciclaje de pH, el contenido mineral de la dentina (medido como las relaciones $\text{PO}_4/\text{Amidal}$ y $\text{CO}_3/\text{Amidal}$) disminuyó, mientras que su índice de cristalinidad mineral (IC) aumentó (Figura 19). Al final del ciclaje de pH (14 días), el % de contenido mineral (TGA, Tabla 1; para dentina bovina) también fue significativamente menor en comparación con el grupo control. Por otra parte, las propiedades mecánicas de la dentina, determinadas mediante ensayos de flexión en tres puntos, mostraron notables diferencias entre la dentina humana y la bovina en las medidas de extensión por compresión Figura 17. Durante el ciclaje de pH, estos valores de la dentina bovina permanecen casi constantes, mientras que los de la dentina humana aumentan gradualmente (Figura 17B). También hemos observado algunas correlaciones entre las propiedades mecánicas (medidas de extensión por compresión) y parámetros composicionales de la dentina ($\text{PO}_4/\text{Amida I}$, IC y %Mineral), corroborando que los cambios en la composición química de la dentina afectan a sus propiedades mecánicas (Tabla 2).

Investigaciones anteriores han demostrado que la dentina humana está más mineralizada que la de otras especies animales [98,99]. Sin embargo, algunos estudios que compararon distintos tipos de dentina animal no encontraron diferencias significativas en su composición química (Ca (%) y P (%) o relación Ca/P) [100,101]. En el presente estudio, la dentina bovina mostró un menor contenido mineral asociado a grupos moleculares (carbonatos y fosfatos) que la dentina humana (Figura 19B-C). Un estudio previo utilizando el análisis FT-Raman también mostró diferencias significativas entre la dentina humana y bovina con respecto a la cantidad de componentes

I.3 DISCUSIÓN

inorgánicos y orgánicos [102]. Asimismo, Soares et al. observaron que las muestras de dentina humana no tratadas mostraban un mayor contenido de ν_4 PO₄, ν_1 CO₃, amida III, CH₂ y amida I que las bovinas [26].

En nuestro estudio, al final del proceso de des-re (es decir, 14 días de ciclaje de pH), el grado de mineralización medido como la relación PO₄/AmidaI (en ATR-FTIR) y el % de mineral (en TGA) fueron significativamente menores en comparación con el grupo control (Figura 19A y Tabla 1). Además, hay un aumento progresivo de la sustitución de carbonatos a fosfatos (CO₃/PO₄; Figura 19C) con el ciclaje de pH. Se sabe que la solubilidad de los grupos fosfato aumenta en un ambiente más ácido [103], mientras que los carbonatos, preferiblemente en posiciones cristalinas tipo B, disminuyen su solubilidad a un pH más bajo [104]. Además, los iones carbonato están reemplazando (sustitución tipo B) los iones fosfato en la estructura cristalina de la apatita en el proceso de desmineralización [105,106]. En consecuencia, la proporción de carbonato sustituido en el mineral parece aumentar a medida que el mineral madura [107,108]. Estos cambios de composición podrían estar relacionados con el aumento observado en la cristalinidad del mineral de la dentina.

Estos resultados previos explican cómo el proceso de desmineralización afectó principalmente al componente inorgánico de los tejidos dentinarios. Con respecto al contenido de la matriz orgánica, la cantidad relativa de Amida I (Figura 18) y MO (Tabla 1) aumenta durante el proceso de des-re [109,110]. Por otro lado, no se encontraron diferencias entre los dos tipos de dentina con respecto a los enlaces cruzados del colágeno con el proceso de ciclaje de pH (Figura 19E). Estos resultados confirman cómo el proceso afecta principalmente a la composición mineral del tejido sin alterar las propiedades relacionadas con la materia orgánica, principalmente colágeno, en la dentina.

Debemos tener en cuenta que las técnicas DRX y FTIR caracterizan diferentes propiedades asociadas a la cristalinidad mineral. Los análisis con DRX están relacionados con la orientación de la estructura cristalina de la apatita (es decir, dominios cristalinos en la dirección del eje c) y los análisis con FTIR están relacionados con los grupos

moleculares de fosfato correspondientes a entornos cristalinos altos y bajos [83,92]. Una comparación entre diferentes especies (humana, bovina, porcina y ovina) concluyó que la dentina humana está compuesta de apatita con tamaños de cristalitos más grandes [105]. En nuestros resultados, la cristalinidad mineral medida por ATR-FTIR y DRX (IC y Tamaño de Cristalito, respectivamente) aumentó durante el tiempo de exposición al ciclaje de pH (Figura 19D y Tabla 3) aunque esta tendencia no es estadísticamente significativa para los análisis de DRX. Estas diferencias pueden explicarse por las mayores tasas de solubilidad de los fosfatos de menor cristalinidad durante el proceso de des-re [111,112].

Hasta el momento, ningún estudio ha evaluado la resistencia a la flexión de la dentina coronal bovina y la ha comparado con la dentina coronal humana en el proceso des-re. En nuestro estudio, la dentina bovina y la dentina humana mostraron diferencias en sus propiedades mecánicas (medidas de extensión por compresión) y la dentina bovina presentó valores más altos que la humana (Figura 17). Esto podría explicarse por el mayor contenido mineral de la dentina humana que resulta en una menor flexibilidad. Además, el ciclaje de pH afectó a estas propiedades de forma diferente para cada tipo de dentina, con variaciones más notables en la dentina humana (Figura 17B). Corroborando que las propiedades mecánicas de la dentina son fuertemente influenciadas por sus características químicas y microestructurales [113], observamos una fuerte correlación entre la extensión por compresión y varios parámetros composicionales (Tabla 2). Como era de esperar, a medida que disminuye el grado de mineralización (medido como PO_4 /Amidal y %Mineral) debido a la pérdida de minerales, la flexibilidad de la dentina aumenta (medida como extensión por compresión). También observamos que la extensión por compresión y la cristalinidad mineral (medida como IC por ATR-FTIR) covarían ($p < 0,001$, para dentina humana y bovina). Durante el ciclaje de pH, se produce una eliminación preferencial de minerales de fosfato menos cristalinos, de modo que el mineral restante tiene una mayor cristalinidad (Figura 19D) [112]. Por otra parte, existen diferencias morfológicas y microestructurales entre la dentina bovina y la humana, expresadas en la disimilitud del número y tamaño de los túbulos dentinarios y de la dentina intertubular [10,13,114,115], que pueden influir en el

comportamiento químico durante el proceso de des-re y, al mismo tiempo, explicar las diferencias observadas en las propiedades mecánicas entre estos tipos de dentina.

Algunos metaanálisis, revisiones sistemáticas y revisiones bibliográficas [5,7,8] concluyen que la dentina bovina puede ser una alternativa adecuada para sustituir los dientes humanos en las investigaciones odontológicas. Sin embargo, para la correcta interpretación de los datos obtenidos en los estudios que utilizan dientes bovinos como modelo de materiales dentales humanos, deben considerarse también las investigaciones sobre la morfología, la composición química y las características estructurales, así como las posibles diferencias en las propiedades físicas (respuesta mecánica) además de tener en cuenta la edad de los pacientes y de los animales.

Por lo tanto, con nuestros resultados, la hipótesis nula se debe rechazar en parte, teniendo en cuenta que hemos observado algunas diferencias en las propiedades mecánicas, microestructurales y de composición química entre la dentina humana y la bovina. Además, el proceso de ciclaje de pH influye en la composición química a nivel molecular, cristalinidad mineral y propiedades mecánicas de forma bastante diferente en estos dos tipos de dentina.

I.4 CONCLUSIONES

Encontramos algunas diferencias relevantes entre la dentina humana y bovina relacionadas con la composición química y las características estructurales, las cuales determinan su diferente respuesta mecánica frente al proceso de desmineralización/remineralización mediante ciclos de pH a los 3, 7 y 14 días. Estas discrepancias pueden ser una posible limitación a la hora de sustituir dientes humanos por bovinos en estudios *in vitro*.

Capítulo II

El uso de nanohidroxiapatita funcionalizada con proantocianidina
como un biomodificador de la dentina

El uso de nanohidroxiapatita funcionalizada con proantocianidina como un biomodificador de la dentina

Este trabajo se encuentra publicado y se puede encontrar con la siguiente referencia: Enrich-Essvein, Tattiana; Rodríguez-Navarro, Alejandro B.; Álvarez-Lloret, Pedro; Cifuentes-Jiménez, Carolina; Bolaños-Carmona, María, V; González-López, Santiago. Proanthocyanidin-functionalized hydroxyapatite nanoparticles as dentin biomodifier. *Dental Materials*. 2021.

II.1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bucodentales constituyen un importante problema de salud pública mundial y, entre ellas, la caries dental es la más prevalente [116]. Para tratar eficazmente esta enfermedad aún son necesarias investigaciones de terapias centradas en la prevención y reducción de la progresión de la caries. El desarrollo de nanomateriales biocompatibles constituye una tecnología innovadora en odontología [71] que se está expandiendo especialmente en el campo de la prevención de la caries, la reparación biomimética y la adhesión dental de restauraciones de composite [117]. La biomodificación de materiales es una estrategia que emplea principios nanotecnológicos para simular y modificar la composición/estructura química de la dentina humana a través de mediadores bioactivos [37]. Los biomodificadores de la dentina interactúan con varios componentes de la matriz extracelular promoviendo la mineralización, la bioestabilidad y mejorando las propiedades mecánicas de la estructura dentinaria [65,118,119]. Teniendo en cuenta que el colágeno fibrilar de tipo I representa aproximadamente el 90% de la matriz orgánica de la dentina y actúa como soporte para la biomineralización de la apatita, la biomodificación de la dentina mediante compuestos orgánicos es un enfoque prometedor para terapias preventivas y restauradoras dentales.

La aplicación de compuestos reticuladores de colágeno como la proantocianidina sobre la materia orgánica de la dentina, es una de las principales estrategias utilizadas para la biomodificación composicional. La proantocianidina (PA), un agente rico en

II.1 INTRODUCCIÓN

polifenoles bioflavonoides presentes en frutas, verduras, frutos secos, semillas y flores, está mostrando una bioactividad prometedora en la dentina [59,68]. El extracto de semilla de uva fue identificado como uno de los agentes ricos en PA más eficientes porque contiene fracciones galloil, un componente bioactivo que ofrece más grupos hidroxilo para la reticulación del colágeno [120,121]. Se sugiere que la PA interactúa con el colágeno dentinario mediante la inducción de enlaces cruzados moleculares inter e intracolágeno [37,120] promoviendo resistencia a la degradación y mejorando tanto las propiedades mecánicas [121,122] como la bioestabilidad química [123,124] con tratamientos clínicos de hasta 1 minuto. Además, investigaciones previas han demostrado la eficacia de la PA en la inhibición de metaloproteinasas y catepsinas [125,126], así como en la promoción de la formación ósea *in vivo* [67,127] y en la remineralización de lesiones de caries artificiales [65,66,128,129]. Asimismo, como es un producto natural, presenta una ventaja considerable debido a su baja toxicidad y altas tasas de absorción [130–132].

Los materiales inorgánicos bioactivos como la nanohidroxiapatita sintética (nHAp) se utilizan ampliamente en nanotecnología debido a su similitud química y microestructural con la hidroxiapatita humana (HAp), el principal componente mineral dental [45,117,118,133]. Por lo tanto, la nanohidroxiapatita (nHAp) constituye el sustituto mineral biocompatible y bioactivo ideal para su uso en tejidos dentales desmineralizados. De esta forma, se espera que la combinación inorgánico-orgánica de nHAp y PA podría dar lugar a una estrategia eficaz para reforzar la matriz de colágeno, puesto que las nanopartículas de hidroxiapatita funcionalizadas con proantocianidina (nHAp_PA) tendrían un efecto sinérgico que promovería la remineralización y al mismo tiempo mejoraría la estabilidad del colágeno en la dentina. Aunque se haya confirmado la estabilidad del nanomaterial nHAp_PA [134], en la actualidad, no se ha evaluado su efectividad en la estructura dentinaria. Teniendo en cuenta el interés actual por enfoques más sostenibles con el uso de materiales más naturales y biológicamente compatibles en odontología [71], el uso de nHAp_PA puede ser una alternativa prometedora para tratamiento en la dentina.

De esta manera, el presente capítulo de la tesis doctoral tuvo como objetivo evaluar el efecto del tratamiento con nanohidroxiapatita combinada o no con proantocianidina en las propiedades fisicoquímicas y mecánicas de la dentina desmineralizada. Para evaluar la eficacia de este tratamiento, las muestras se analizaron mediante técnicas complementarias para determinar su composición química (espectroscopia infrarroja - ATR-FTIR y termogravimetría - TGA), sus características mineralógicas (difracción de rayos X - DRX) y su respuesta mecánica (ensayo de flexión de tres puntos). La hipótesis nula propuesta fue que no existen diferencias entre los tratamientos con nHAp, PA, ni nHAp_PA en las propiedades de la dentina desmineralizada.

II.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de las soluciones

Proantocianidina (PA): El extracto de semilla de uva producido a partir de *Vitis vinifera* L. (95% proantocianidina) fue proporcionado por Infisa - Instituto Fitológico s.l. (Barcelona, España, lote nº 200938). La solución de tratamiento con PA se preparó al 6,5% p/v disolviendo el extracto en una solución de agua destilada al 95% y etanol al 5% [135,136]. El pH final de la solución fue de 4,85.

Nanohidroxiapatita (nHAp): La nHAp se sintetizó mediante un método de descomposición térmica por etapas [137]. La solución de tratamiento se preparó con la nHAp resultante al 15% p/v diluida en una solución 50:50 de agua destilada y acetona [133]. El pH final de la solución fue de 8,35.

Nanohidroxiapatita funcionalizada con proantocianidina (nHAp_PA): La nHAp_PA se sintetizó según Zhou et al. [134] mediante el método de precipitación química. Una solución acuosa de cloruro de calcio anhidro [CaCl₂] disuelto en agua desionizada (0,1 mol/L, 100 ml) se vertió en la solución de extracto de semilla de uva (0,5%, m/m, disuelto en 340 ml de agua desionizada) a temperatura ambiente bajo agitación durante 30 minutos. Una solución acuosa de hidrogenofosfato disódico dodecahidratado [Na₂HPO₄·12H₂O] disuelto en agua desionizada (0,1 mol/L, 60 ml) se añadió gota a gota

II.2 MATERIALES Y MÉTODOS

(1 ml/min) a la solución del complejo de quelato formado por los iones de calcio y la solución de semilla de uva. El pH de las soluciones se mantuvo en 9 mediante la adición de amoníaco $[\text{NH}_3\text{-H}_2\text{O}]$. A continuación, la suspensión se agitó durante 2 h a 60 °C. Posteriormente, la suspensión resultante se envejeció a 37 °C durante 72 h. Tras el envejecimiento, la suspensión se centrifugó y se lavó cinco veces con agua desionizada. Posteriormente, las NPs se secaron a 37 °C por 24h (Figura 20). La cantidad de productos químicos se calculó para preparar aproximadamente 1 g de nHAp. La solución de tratamiento se preparó al 15% p/v disolviéndola en agua destilada (resultando un 5% p/v de nHAp). El pH final de la solución fue de 8,80.



Figura 20. nHAp_PA sintetizadas.

Ciclaje de pH: El proceso de desmineralización se realizó mediante el método de ciclaje de pH modificado por Marquezan et al. [18] de manera similar a la empleada en la Parte I (Figura 16) de esta tesis doctoral. Los especímenes se sumergieron en 1 ml de una solución desmineralizante (2,2 mM CaCl_2 , 2 mM NaH_2PO_4 , y 50 mM de ácido acético ajustado a un pH de 4,8) durante 8 horas y, posteriormente, en 1 ml de una solución remineralizante (1,5 mM CaCl_2 , 0,9 mM NaH_2PO_4 , y 0,15 M KCl y ajustada a un pH de 7,0) durante 16 horas. Este procedimiento se llevó a cabo durante 14 días renovando las soluciones diariamente, sin agitación, y a temperatura ambiente.

Todos los reactivos para la preparación de las soluciones fueron suministrados por Sigma-Aldrich (>99,0% de pureza) y se utilizó agua ultrapura (MilliQ, Millipore). Las soluciones de tratamiento se realizaron a temperatura ambiente (23 °C).

Preparación de las muestras de dentina y diseño experimental

La presente investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Universidad de Granada (nº 1896-2020). Se limpiaron veinticinco dientes anteriores sanos extraídos por razones periodontales y se almacenaron en solución de timol al 0,1% hasta la preparación de las muestras. Se obtuvieron setenta y cinco especímenes en forma de barritas de dentina ($6 \times 1 \times 1 \text{ mm}^3$) de la dentina coronal media utilizando un disco de diamante en una máquina de corte Accutom 50 (Struers A/S, Ballerup, Alemania) bajo refrigeración por agua. La eliminación completa del esmalte, la presencia de dentina en toda la superficie y la ausencia de microfisuras se comprobaron con un estereomicroscopio SZ-TP (Olympus, Tokio, Japón) a un aumento de 20 X. Las muestras se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos experimentales ($n = 15$) según el tipo de tratamiento: Sano (sin tratamiento), Control (ciclaje de pH), nHAp, nHAp_PA y PA. Los especímenes correspondientes al grupo sano (control negativo) se sumergieron en agua destilada durante todo el periodo experimental. Los grupos restantes fueron sometidos al proceso de ciclaje de pH durante 14 días. Tras el proceso de des-re, los especímenes correspondientes al grupo control (control positivo) se sumergieron en agua destilada. Cada barrita de los grupos restantes se sumergió en 1 ml de la solución de tratamiento respectiva (es decir, solución nHAp, solución nHAp_PA o solución PA) en un tubo de plástico (Eppendorf®) durante 1 minuto bajo agitación continua.

En el presente estudio se siguieron las especificaciones ISO 11405 para el almacenamiento y la manipulación de las muestras. Tras 1 minuto de inmersión en la solución, los especímenes se lavaron con agua ultrapura durante 1 minuto y se sometieron inmediatamente al ensayo de flexión en tres puntos, así como los de los grupos sano y control. Tras el ensayo, cada espécimen se almacenó en un tubo de plástico con agua ultrapura hasta su análisis mediante ATR-FTIR y DRX. Para los análisis termogravimétricos, los especímenes se secaron y pulverizaron utilizando un mortero de ágata. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (23 °C). El diseño experimental completo se ilustra en la Figura 21.

II.2 MATERIALES Y MÉTODOS

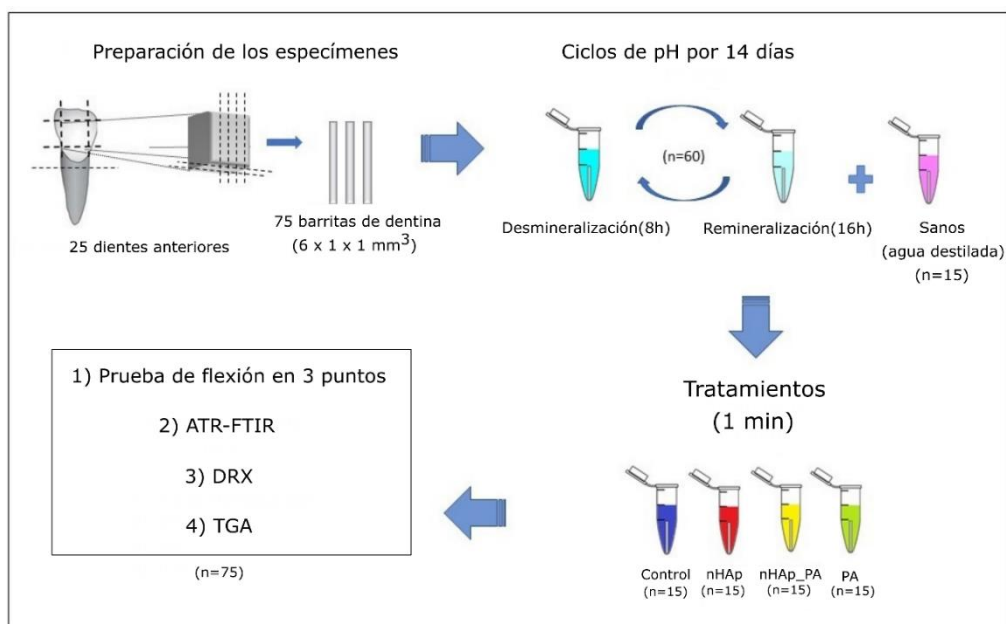


Figura 21. Diagrama de la metodología empleada en la parte II de la tesis doctoral.

Prueba mecánica

Para evaluar las propiedades mecánicas de las quince barritas incluidas en cada grupo, se determinó la resistencia a la flexión (MPa) mediante ensayo de flexión en tres puntos (como se describe en la sección 4.1.1 de la Metodología, página 25).

Reflectancia total atenuada - Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (ATR-FTIR)

Tras el ensayo mecánico, todas las muestras de dentina se analizaron utilizando un espectrómetro ATR-FTIR (como se describe en la sección 4.2.1 de la Metodología, página 2727). A partir de las mediciones del área de los picos, se determinaron los siguientes parámetros: la cantidad relativa de mineral respecto a la matriz orgánica ($\text{PO}_4/\text{Amidal}$), la cantidad de carbonato en el mineral (CO_3/PO_4), el Índice de cristalinidad (IC) y la cantidad de enlaces cruzados del colágeno (LKN).

Difracción de rayos X (DRX)

Tras evaluar la composición química mediante ATR-FTIR, dos muestras (barritas de 1x1 mm de sección transversal) de cada grupo se analizaron mediante DRX para definir el contenido mineral a partir de la intensidad total de las reflexiones de la apatita con un difractómetro de cristal único equipado con un detector de área PHOTON 100-

SC. La mineralogía y el tamaño de los cristallitos de las nanopartículas nHAp y nHAp_PA se caracterizaron utilizando un difractómetro de rayos X X'Pert Pro. Ambas técnicas se describen en la sección 4.3.1 de la Metodología, página 31.

Termogravimetría (TGA)

Finalmente, para determinar cuantitativamente la cantidad de componentes minerales de la dentina, dos especímenes de cada grupo se analizaron por Termogravimetría utilizando un equipo TGA/DSC1 Mettler-Toledo (como se describe en la sección 4.2.2 de la Metodología, página 29).

Análisis estadísticos

Se calcularon la media y la desviación estándar para la prueba de flexión en tres puntos y los datos del ATR-FTIR. La homogeneidad de las varianzas y la normalidad de la distribución se comprobaron mediante las pruebas de Levene y Shapiro-Wilk, respectivamente. Como los resultados mecánicos no presentaron homogeneidad y los datos ATR-FTIR no se ajustaron a una distribución normal, las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante las pruebas de Kruskal-Wallis y U de Mann Whitney. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS 24.0 (SPSS Inc., Chicago, EE. UU.). Se estableció un nivel de significación de $p < 0,05$.

II.3 RESULTADOS

Análisis mediante ATR-FTIR

La Figura 22 muestra espectros de ATR-FTIR representativos de muestras de la dentina de todos los grupos experimentales y demuestra que los grupos sometidos a ciclaje de pH perdieron una cantidad notable de mineral. Las muestras tratadas mostraron un aumento en los componentes orgánicos (amidas) y una disminución en los componentes minerales (carbonatos y fosfatos) así como un desplazamiento de la banda principal de fosfato ν_3 PO₄. Además, observamos una mayor señal ν_4 PO₄ en la dentina tratada con nHAp y nHAp_PA. Los tratamientos con proantocianidina (grupos nHAp_PA y PA) mostraron la aparición de un hombro en torno a $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$, un aumento de los picos en $1284\text{ cm}^{-1}/1205\text{ cm}^{-1}$ y en la banda CH₂.

II.3 RESULTADOS

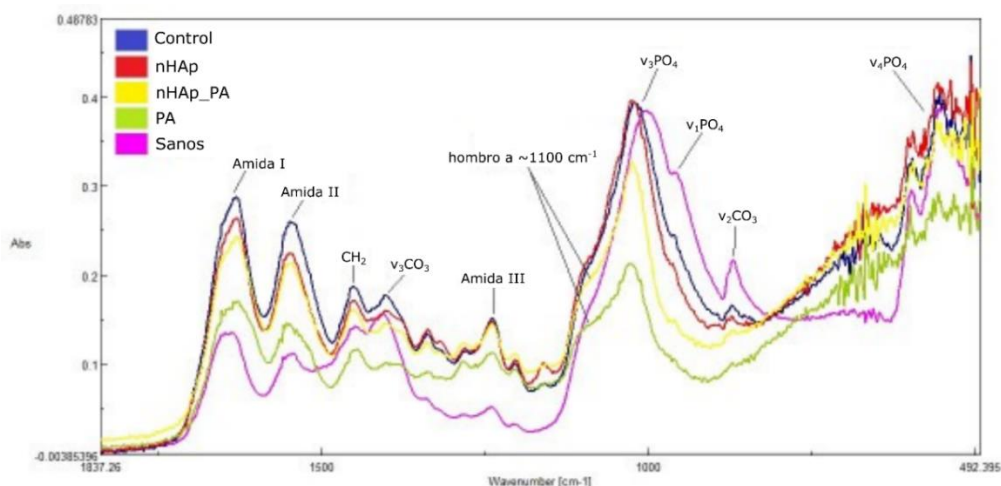


Figura 22. Espectros ATR-FTIR de las muestras de dentina: Control (línea azul), tratadas con nHAp (línea roja), nHAp_PA (línea amarilla), PA (línea verde) y Sanos (línea rosa).

Los parámetros relacionados a la composición química obtenidos mediante espectroscopia infrarroja (Tabla 4) mostraron una notable reducción en el grado de mineralización (PO_4 /Amidal) en los grupos de tratamiento. Además, también hubo una reducción en el contenido de carbonato con respecto al fosfato (CO_3/PO_4) indicando que el carbonato fue preferentemente perdido del mineral durante este proceso. También se observó que los valores de IC fueron mayores en los grupos tratados en comparación con el grupo sano, lo que indica que el mineral que queda después del tratamiento tiene una mayor cristalinidad. Por último, se observó un mayor grado de entrecruzamiento del colágeno (LKN) en los grupos PA y nHAp_PA.

Tabla 4. Composición química de la dentina determinados por ATR-FTIR. Los valores se expresan como media (DE). Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos (significación $p < 0,05$).

	Sano	Control	nHAp	nHAp_PA	PA
PO_4/Amidal	4.383 (0.94) ^a	1.307 (0.43) ^{bc}	1.520 (0.36) ^b	1.120 (0.37) ^c	0.785 (0.29) ^d
CO_3/PO_4	0.738 (0.019) ^a	0.008 (0.010) ^b	0.010 (0.012) ^b	0.004 (0.010) ^{bc}	0.000 (0.000) ^c
IC	0.538 (0.05) ^a	1.046 (0.30) ^b	0.910 (0.18) ^b	0.953 (0.19) ^b	1.384 (0.44) ^c
LKN	5.846 (1.79) ^{abc}	5.061 (0.74) ^{ab}	5.026 (0.49) ^a	5.604 (0.75) ^b	6.706 (1.13) ^c

Análisis mediante TGA

Las mediciones termogravimétricas de las muestras de dentina (Tabla 5) también confirmaron una pérdida significativa de minerales observada por la disminución de las cantidades de carbonato ($\text{CO}_3\%$) y fosfato ($\text{PO}_4\%$), así como un aumento del porcentaje de materia orgánica ($\text{MO}\%$) en todos los grupos experimentales en comparación con las muestras sanas no tratadas. Esta materia orgánica disminuye según la secuencia $\text{PA} > \text{nHAp_PA} > \text{nHAp} > \text{control} > \text{sano}$.

Tabla 5. Pérdidas de peso (%) de agua, materia orgánica (MO), CO_3 y PO_4 obtenidas a partir del análisis TGA.

	<i>Sano</i>	<i>Control</i>	<i>nHAp</i>	<i>nHAp_PA</i>	<i>PA</i>
Agua (%)	8.84	8.54	8.34	9.21	8.62
MO (%)	20.10	22.64	22.90	24.74	24.95
CO_3 (%)	2.16	1.82	1.95	1.85	1.79
PO_4 (%)	68.91	67.00	66.80	64.19	64.64
PO_4 / MO	3.42	2.95	2.91	2.62	2.59
$\text{CO}_3 / \text{PO}_4$	0.031	0.027	0.029	0.028	0.027

Análisis mediante DRX

Los espectros obtenidos con los análisis de difracción de rayos X de las muestras en polvo muestran que las partículas de nHAp y nHAp_PA son apatito nanocristalino y presentan un ensanchamiento de pico anisótropo significativo debido a su forma alargada a lo largo del eje c (Figura 23). El tamaño de los cristalitos calculados fueron 22 x 9 nm (nHAp) y 17 x 8 nm (nHAp_PA). El análisis de las barritas de dentina mediante difracción de rayos X 2D (Figura 24) mostró una marcada reducción en la intensidad total de las reflexiones de apatita del grupo control, confirmando una reducción del contenido mineral en las muestras de dentina sometidas a ciclaje de pH. Sin embargo, la dentina tratada con partículas nHAp_PA mostró valores de intensidad total comparables a las muestras sanas (no tratadas), lo que indica una remineralización potencial de la dentina por nanopartículas de apatita funcionalizadas. Además, la dentina tratada con PA también mostró un valor de intensidad elevado.

II.3 RESULTADOS

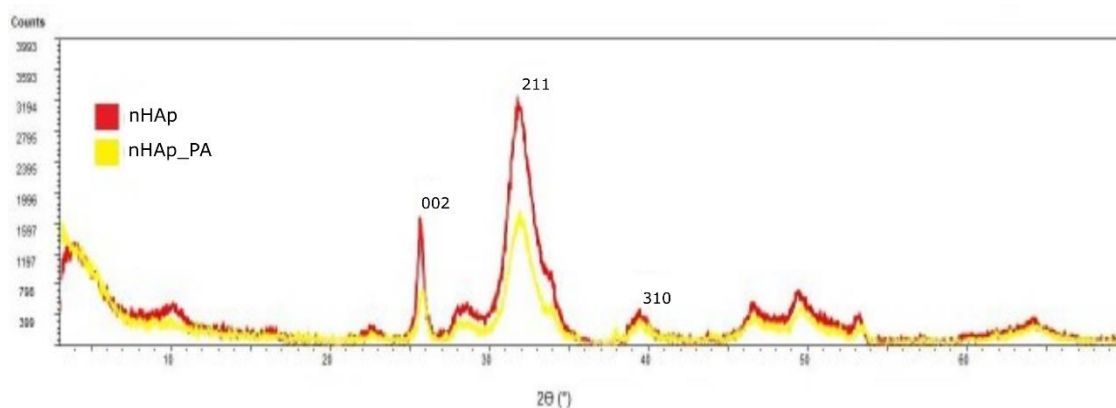


Figura 23. Espectros de DRX de las nanopartículas de nHAp (línea roja) y nHAp_PA (línea amarilla).

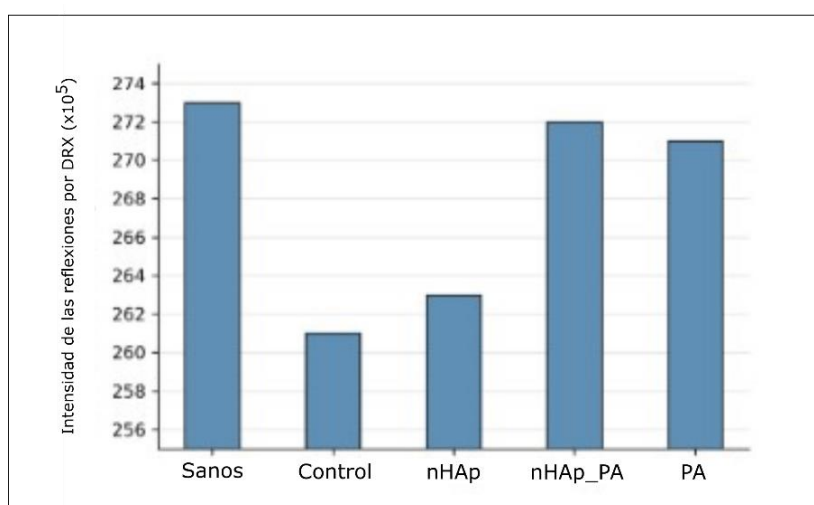


Figura 24. Contenido mineral estimado a partir de la intensidad total de las reflexiones de la apatita (DRX) de las muestras de dentina sometidas a diferentes tratamientos.

Propiedades mecánicas - Ensayo de flexión en tres puntos

Los ensayos de flexión en tres puntos mostraron diferencias significativas en las propiedades mecánicas de las distintas muestras de dentina (Figura 25). En concreto, la dentina tratada con nanopartículas nHAp y nHAp_PA presentaron los mayores índices de resistencia a la flexión.

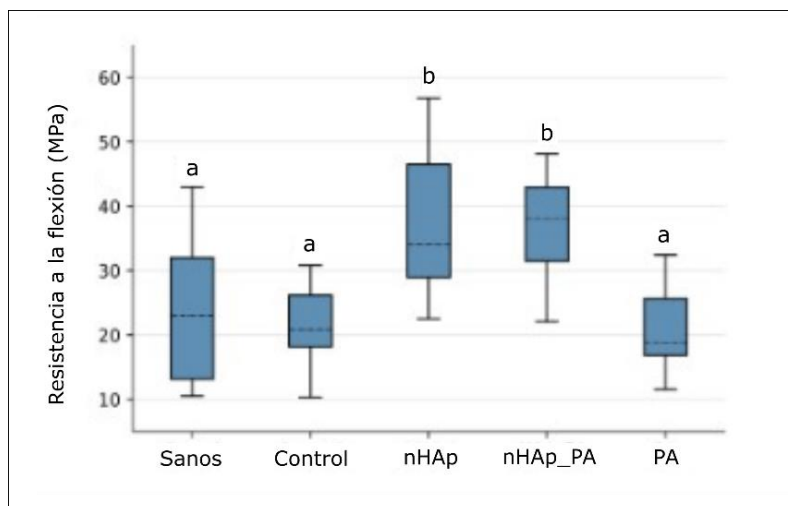


Figura 25. Resistencia a la flexión de las muestras de dentina determinada mediante ensayo mecánico de flexión en tres puntos. Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos (significación $p < 0,05$).

II.4 DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran cómo el tratamiento con nHAp_PA invirtió los efectos producidos por el ciclaje de pH en la dentina, aumentando la cantidad mineral observada mediante los análisis químicos. En concreto, este tratamiento incrementó el contenido mineral y el porcentaje de fosfato como se puede observar mediante los resultados de DRX y ATR-FTIR en las muestras. Además, el tratamiento promovió la inducción de enlaces cruzados de colágeno (ATR-FTIR), así como una mayor cantidad de sustancias orgánicas (TGA), indicando así la incorporación de minerales y la estabilización de la matriz dentinaria. Asimismo, estos efectos del tratamiento con nHAp_PA en la composición química y mineral de la dentina previamente desmineralizada, mejoraron las propiedades mecánicas de la dentina. En consecuencia, los principales hallazgos de la presente investigación sugieren que la combinación de nHAp y PA resulta en una estrategia alternativa y eficaz para fortalecer la dentina desmineralizada debido a su capacidad para promover la remineralización al mismo tiempo que mejora la estabilidad del colágeno en un tiempo muy corto (1 minuto) de tratamiento.

El modelo de ciclaje de pH se utiliza para simular in vitro los cambios dinámicos en los niveles de pH y en el contenido mineral asociados al proceso natural de la caries [18,96]. Cabe destacar que el ciclaje de pH se realizó a temperatura ambiente, se podrían

II.4 DISCUSIÓN

esperar resultados más significativos a 37 °C. Asimismo, nuestros resultados mostraron que los valores de $\text{PO}_4/\text{Amidel}$ y CO_3/PO_4 (ATR-FTIR; Tabla 4), de contenido mineral (DRX; Figura 24) y contenido de $\%\text{CO}_3$ y $\%\text{PO}_4$ (TGA; Tabla 5) disminuyen desde el grupo sano al grupo control, evidenciando la desmineralización que ocurre durante el proceso de ciclaje de pH [112,138]. También observamos que los componentes minerales pobremente cristalinos, carbonato y fosfatos de apatito (áreas de sub-bandas de 1020 cm^{-1}) son preferentemente perdidos durante la desmineralización [111,112]. Esto explica el aumento observado en el valor del Índice de Cristalinidad determinado por la relación entre fosfatos de apatito de alta y baja cristalinidad (Tabla 4) y el desplazamiento de la banda $\nu_3\text{ PO}_4$ (ATR-FTIR; Figura 22). Por otro lado, el crecimiento epitaxial sobre los cristales de HAp remanentes durante la fase de remineralización también puede producir un aumento en la cristalinidad [39].

Los métodos empleados para la síntesis de apatita (nHAp y nHAp_PA) producen nanopartículas de tamaño de aproximadamente 20 nm [134,137], tamaño que parece ser adecuado para la infiltración en dentina [53]. Cabe destacar que el grado de infiltración en la dentina depende del tamaño de la partícula, las partículas más pequeñas presentan una mayor capacidad de infiltración [53,55,133]. Durante la etapa de remineralización en el ciclaje de pH, la precipitación de HAp puede producirse a través de una transición cristalina metaestable (formación de fosfatos cálcicos amorfos) o por mecanismos de control cristalográfico (crecimiento epitaxial). No obstante, la transformación cristalina observada tras los tratamientos con nanopartículas puede haberse producido por una combinación de mecanismos de remineralización y recristalización en los que pueden intervenir varios factores fisicoquímicos. Estos procesos de cristalización serían posibles gracias a la capacidad de la matriz dentinaria de actuar como una base/modelo y de crear un entorno de recristalización adecuado [39,133]. El análisis mineralógico obtenido por difracción de rayos X confirmó que el grupo nHAp_PA presenta una mayor intensidad total de reflexiones de apatita (Figura 24). Además, los grupos nHAp y nHAp_PA también presentaron una mayor cantidad de contenido mineral $\nu_4\text{ PO}_4$ medido por ATR-FTIR (Figura 22). La cantidad de mineral en la solución de nHAp fue de 15% p/v, mientras que en la solución de nHAp_PA fue de aproximadamente 5% p/v (es decir, aproximadamente un 5% de nanohidroxiapatita y un

10% de proantocianidina). En el grupo PA, la concentración de PA fue del 6,5% p/v. La DRX mide la contribución de difracción de las fases cristalinas, mientras que el ATR-FTIR mide la absorción molecular de compuestos químicos específicos en la superficie de la muestra. Aunque en los resultados del ATR-FTIR no encontramos diferencias significativas entre los grupos experimentales, la DRX mostró diferencias en la cantidad de mineral. En el análisis termogravimétrico, que considera la masa total de la muestra, observamos que hay más contenido de CO_3 y CO_3/PO_4 en los grupos nHAp y nHAp_PA, lo que coincide con la composición de las soluciones. Asimismo, observamos un mayor contenido orgánico (MO%) en los grupos PA y nHAp_PA, lo que confirma la correcta incorporación de PA.

Los factores que afectan a la solubilidad del apatito mineral son complejos e incluyen el método de preparación, las propiedades de cristalinidad y el grado de sustituciones iónicas en la red del apatito [139]. El apatito altamente cristalino tiende a ser más insoluble, mientras que el poco cristalino se disuelve más rápidamente [112,138,139]. Durante la desmineralización inducida por ácidos, se produce una disolución selectiva de la apatita poco cristalina, que se asocia con cristales más pequeños y mal organizados. Los cristales de apatita recién formados durante la remineralización son ricos en iones lábiles de carbonato y en fosfato ácido que se unen débilmente haciéndolos altamente reactivos y solubles [111,112]. La eliminación selectiva de la apatita menos cristalina deja el mineral restante enriquecido con cristales más cristalinos, más estables y más ordenadamente orientados [112]. Dado que el IC está relacionado con la proporción entre fosfatos de alta y baja cristalinidad y la DRX con el contenido mineral, se espera que los minerales ricos en fosfato de baja cristalinidad sean más solubles en un medio ácido. Tales hallazgos son más notables en el grupo PA probablemente debido al nivel ácido (con valores de $\text{pH} = 4,85$) de la solución de tratamiento. En consecuencia, debido a la acidez de la solución de PA, la apatita más cristalina permanece en la dentina mientras que la apatita poco cristalina se disuelve. Por otra parte, investigaciones anteriores [128] también observaron mediante análisis de DRX una mayor deposición mineral en la dentina desmineralizada tratada con PA. Estos resultados se atribuyeron al mecanismo quelante de la PA en el que los grupos

II.4 DISCUSIÓN

hidroxifenilo pueden actuar como ligandos con los iones calcio y fosfato promoviendo la deposición mineral sobre las fibrillas de colágeno [128,129].

Asimismo, la incorporación de PA a la matriz dentinaria se evidencia por la aparición de un hombro a $\sim 1100\text{ cm}^{-1}$ [121,140], el aumento de los picos a 1284 cm^{-1} / 1205 cm^{-1} [134], el aumento de la banda CH_2 [134,140] y la mayor inducción de enlaces cruzados de colágeno [121] observados en los grupos nHAp_PA y PA (Figura 22 y Tabla 4). En este sentido, se ha establecido que los anillos aromáticos y los grupos hidroxilo fenólicos de la PA tienen fuertes interacciones moleculares con los grupos hidroxilo, carboxilo, amino y amida del colágeno de la dentina mediante enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas [68,120,141]. Los enlaces cruzados de colágeno intra e intermoleculares inducidos adicionalmente, proporcionan bioestabilidad y refuerzan la matriz dentinaria [59]. Por lo tanto, la mayor cantidad de enlaces cruzados de colágeno observados en los grupos con PA (Tabla 4) pueden proporcionar una mayor estabilidad para la deposición mineral y una matriz dentinaria más alineada que facilita la remineralización [49]. Adicionalmente, la temperatura de descomposición reportada para las moléculas de PA se encuentra en el rango de $300\text{-}500\text{ }^{\circ}\text{C}$ [134], lo que corresponde con el ligero aumento de %MO observada en los grupos de PA en el presente estudio (Tabla 5). Por lo tanto, los datos de TGA (Tabla 5) confirmaron el mayor %MO en los grupos PA y nHAp_PA validando los resultados de ATR-FTIR sobre la incorporación de la PA en la dentina mencionados anteriormente. Es importante señalar que como el TGA mide el porcentaje del contenido en las muestras, tanto mineral como orgánico, es posible observar que los valores más altos de %MO resultan en un valor proporcionalmente más bajo de % PO_4 . Además, las proporciones de PO_4/Amid y CO_3/PO_4 mostradas en ATR-FTIR (Tabla 4) están respaldadas por los resultados de PO_4/MO y CO_3/PO_4 en TGA (Tabla 5) siguiendo la misma tendencia.

Teniendo en cuenta la caracterización composicional descrita anteriormente, hemos observado que la adición de nHAp a la PA fue capaz de modificar las características químicas y estructurales de las nanopartículas mejorando su incorporación a la dentina desmineralizada. Aunque la nHAp contiene más mineral (15% p/v) que la nHAp_PA (5% p/v de nanohidroxiapatita), esta última mostró una mayor

mineralización en DRX evidenciando el efecto sinérgico de la PA con la nHAp. Estos cambios a nivel mineral confirmados por una mayor cantidad de mineral observada mediante análisis DRX apoyan el potencial de remineralización de la nHAp_PA. Estos efectos globales también se asociaron a una mejora de la respuesta mecánica de las muestras de dentina. Cabe destacar que no existe ninguna recomendación sobre la relación longitud x grosor x anchura de las barritas de dentina coronal para los ensayos de flexión en tres puntos. Las medidas de las muestras de dentina utilizadas en este estudio pueden haber generado tensiones de cizallamiento que pueden producir efectos no lineales debido a los puntos de carga y apoyo. No obstante, la prueba de flexión en tres puntos reveló diferencias significativas entre los grupos de tratamiento (Figura 25). Como era de esperar, en nuestro estudio los grupos nHAp y nHAp_PA presentaron la mayor resistencia a la flexión como consecuencia de sus características composicionales y mineralógicas previamente descritas. La mayor infiltración de nHAp y la alteración de la estructura de la dentina son capaces de promover la recristalización y, en consecuencia, aumentar la resistencia a la flexión [55,137]. Contrariamente a estudios previos [65,66,119,128,141], el grupo PA presentó una baja resistencia mecánica similar al grupo control (Figura 25). No obstante, en todos estos estudios el pH de las soluciones se ajustó a aproximadamente 7 y la solución de PA se aplicó durante 2 a 30 minutos. Como se ha mencionado anteriormente, la mineralización producida por el tratamiento con PA fue diferente a la de los otros grupos probablemente debido a su diferente solubilidad en ambientes ácidos generando una mayor disolución de fosfatos pobremente cristalinidad [128]. Además, es posible que el tiempo de tratamiento en el presente estudio no fuera lo suficientemente largo para que el PA actuara. Por tanto el mineral formado y su asociación con la matriz orgánica presentaron diferentes propiedades que afectaron a su comportamiento mecánico [142]. En consecuencia, en base a los resultados obtenidos de la composición y propiedades minerales y su respuesta mecánica asociada, nHAp_PA presenta un efecto prometedor para el tratamiento clínico en la dentina desmineralizada.

Dos mecanismos podrían explicar la capacidad de la PA para promover la remineralización: la estabilización de la matriz orgánica que actúa como soporte para la deposición mineral y como barrera contra la pérdida mineral y la capacidad para formar

II.5 CONCLUSIONES

complejos PA-calcio [37,59,65,66,128,129,143]. Estudios previos confirman que la PA tiene un efecto sinérgico sobre la dentina desmineralizada cuando se combina con otros agentes remineralizantes [142,144,145]. Así como en el presente estudio, aunque no existen evidencias de mineralización intrafibrilar, la PA adicionada a un agente remineralizante parece ser capaz de estabilizar la matriz orgánica y promover la remineralización extrafibrilar [129].

Teniendo en cuenta los límites de este estudio, consideramos que la nHAp_PA tiene un interesante potencial para promover la remineralización al mismo tiempo que mejora la estabilidad del colágeno en la dentina desmineralizada. Además, este efecto se consigue tratando la superficie de la dentina durante 1 minuto, que es un tiempo de tratamiento clínicamente factible. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula, pues se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con nHAp, PA y nHAp_PA en la dentina. No obstante, dado que este estudio evalúa principalmente el comportamiento de estas nanopartículas en dentina, los hallazgos actuales deberían confirmarse en la interfase dentina-resina y evaluar su adhesión a largo plazo.

II.5 CONCLUSIONES

El tratamiento con nHAp_PA puede ser una estrategia alternativa para fortalecer la dentina desmineralizada debido a su capacidad para mejorar la estabilidad del colágeno y reforzarlo.

Capítulo III

El uso de nanohidroxiapatita funcionalizada con proantocianidina

como un *primer* para la adhesión dentinaria

El uso de nanohidroxiapatita funcionalizada con proantocianidina como un *primer* para la adhesión dentinaria

Este trabajo se encuentra en revisión en la revista científica *Dental Materials* (en 21/01/2024).

III.1 INTRODUCCIÓN

A pesar de los esfuerzos realizados en las investigaciones en tecnología adhesiva para prolongar el tiempo de vida de los materiales, el fracaso prematuro de las restauraciones dentales sigue siendo motivo de preocupación [25]. Varios factores contribuyen para garantizar la longevidad de la restauración dental. Uno de los más relevantes es la formación de una capa híbrida (HL) firme y estable mediante la completa infiltración y polimerización de la resina en la matriz de colágeno desmineralizada [34]. En caso de infiltración incompleta de la resina, pueden tener lugar una serie de fenómenos de degradación hidrolítica y procesos degradativos enzimáticos de las fibrillas de colágeno denudadas mediados por proteasas derivadas del huésped como las metaloproteinasas de matriz (MMP) y las cisteínas catepsinas (CT), que conducen al debilitamiento temprano de las restauraciones [28,146].

Para prevenir estos procesos degradativos y estabilizar la integridad del colágeno, las investigaciones actuales se están centrando en el desarrollo de materiales bioactivos con propiedades remineralizantes, antiproteolíticas y reticuladoras [147]. Entre los diferentes reticuladores de colágeno que se han investigado en la literatura reciente [148,149], la proantocianidina (PA) ha demostrado un gran potencial en la estabilización de la matriz de colágeno expuesta mediante el establecimiento de enlaces covalentes, iónicos, de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas [59,121]. Se ha demostrado que la aplicación de PA en la dentina mejora sus propiedades mecánicas [122,130,150,151], inhibe las MMP y las CT [63,64,126] y remineraliza las lesiones de caries artificial [65,66,129] al mismo tiempo que presenta baja toxicidad y alta biocompatibilidad [130,131].

III.2 MATERIALES Y MÉTODOS

En el capítulo 2 de la presente tesis doctoral, hemos demostrado un importante potencial de la PA funcionalizada con nHAp como un biomaterial con prometedoras propiedades remineralizantes [152]. La formación del complejo nHAp_PA fue capaz de promover la remineralización al mismo tiempo que mejoró la estabilidad del colágeno en la dentina desmineralizada con un tiempo de tratamiento clínicamente aceptado [152]. De esta manera, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de las nHAp_PA utilizadas a diferentes concentraciones como un *primer* en la resistencia a la microtensión (μ TBS). Además, se evaluó la actividad enzimática endógena en la dentina desmineralizada con el uso de un adhesivo autograbante tras 24 h y 6 meses de almacenamiento en laboratorio. Así, las hipótesis nulas probadas fueron que (1) no existen diferencias en la fuerza de adhesión entre los grupos experimentales, (2) no existen diferencias en las actividades de las MMP entre los grupos experimentales y que (3) el envejecimiento no influye en la fuerza de adhesión ni en la actividad de las MMP.

III.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y productos químicos

El extracto de semilla de uva producido a partir de *Vitis vinifera* L. (95% proantocianidina) fue proporcionado por Infisa - Instituto Fitológico s.l. (Barcelona, España, lote nº 200938). Los reactivos utilizados para la síntesis de las nanopartículas y para la producción de caries artificiales (AgNO_3 , CaCl_2 , NaH_2PO_4 , ácido acético, KCl y NH_3) fueron suministrados por Pancreat (Barcelona, España) y Scharlau (Barcelona, España). Durante todo el experimento se utilizó agua desionizada ultrapura (Milli-Q Millipore, Merck, Molsheim, Francia).

Síntesis de las nanopartículas

Siguiendo protocolos anteriores [21,22] y de manera similar a la descrita en la metodología de la parte II de la presente tesis doctoral, se sintetizaron nanopartículas de hidroxiapatita funcionalizadas con proantocianidina (nHAp_PA) por el método de precipitación química (página 57).

Preparación de las muestras y diseño experimental

La presente investigación fue aprobada por el Comité de Ética de la Universidad de Granada (#1896-2020). Cincuenta molares permanentes humanos sanos, recogidos previo consentimiento informado, se limpiaron y almacenaron en solución de timol al 0,1% a 4 °C hasta la preparación de las muestras. Se eliminaron el esmalte oclusal y las raíces 2 mm por debajo de la unión cemento-esmalte utilizando una Isomet 11/1180 (Buehler, Lake Bluff, EE. UU.) con un disco de corte de diamante (MOD 13, Struers, Ballerup, Dinamarca). La superficie de dentina expuesta se lijó con papel de carburo de silicio de grano 280 durante 60 segundos para crear una capa de barrido dentinario estandarizado. A continuación, las muestras se enjuagaron con agua destilada.

Las muestras se asignaron aleatoriamente a cinco grupos experimentales (n=10 por grupo) según el tratamiento de la dentina: i) control negativo (sin tratamiento); ii) control positivo (14 días de ciclaje de pH); iii) ciclaje de pH + nHAp_PA 2%; iv) ciclaje de pH + nHAp_PA 6,5%; v) ciclaje de pH + nHAp_PA 15%. Los especímenes correspondientes al control negativo (grupo i) se sumergieron en agua destilada. Los grupos restantes se sometieron a un procedimiento de caries artificial mediante el método de ciclaje de pH de la misma manera que en la descrita en la metodología de la parte I y II de la presente tesis doctoral (Figura 16). Tras el ciclaje de pH, se creó otro grupo control (grupo ii / control positivo). Los especímenes del grupo control positivo se sumergieron en agua destilada y los demás grupos se sometieron a un pretratamiento con soluciones que contenían nHAp_PA. Las soluciones de pretratamiento de la dentina se prepararon al 2%, 6,5% y 15% p/v disolviendo las nHAp_PA en agua desionizada y el pH final de las soluciones fueron 7.5, 7.35 y 7.25, respectivamente. El diseño experimental completo se ilustra en la Figura 26.

III.2 MATERIALES Y MÉTODOS

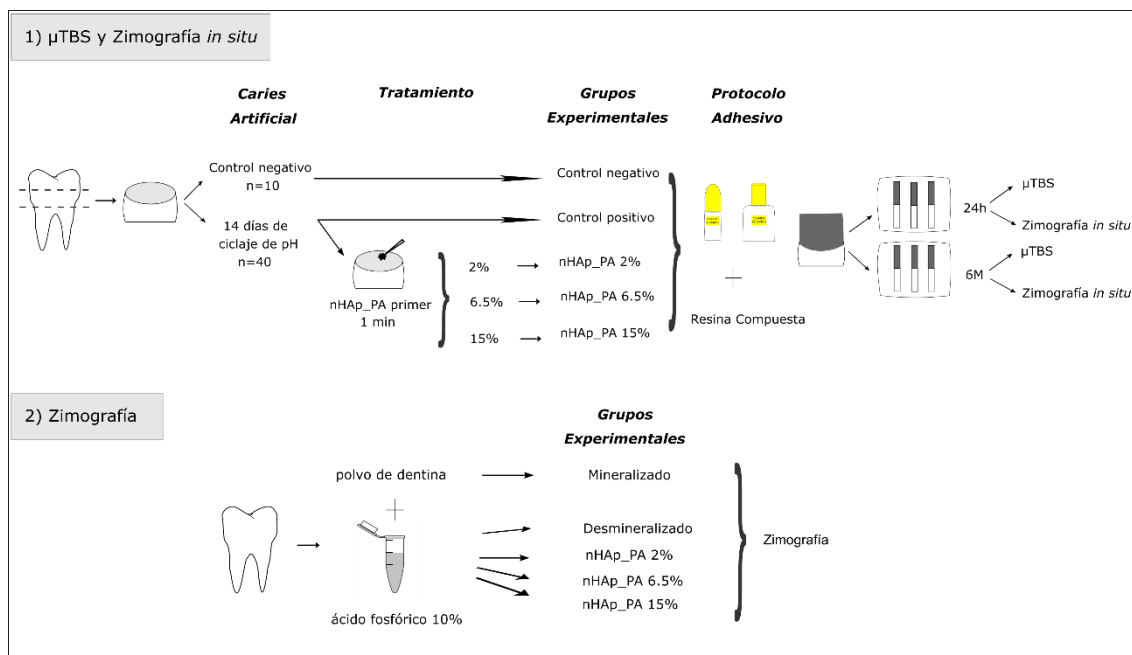


Figura 26. Diagrama de la metodología empleada en la parte III de la tesis doctoral.

Procedimientos de adhesión

Los grupos controles (negativo y positivo) no recibieron pretratamiento antes de los procedimientos de adhesión. Los grupos experimentales fueron pretratados con una solución de nHAp_PA al 2%, 6,5% o 15% durante 60 s con agitación suave utilizando un aplicador totalmente saturado. A continuación, se enjuagaron las superficies y se secaron suavemente con aire. Después del pretratamiento de la dentina, en todos los grupos, incluidos los grupos controles (negativo y positivo), se aplicó un adhesivo autograbante Universal Clearfil Se Bond 2 (Kuraray Noritake, Okayama, Japón) siguiendo las instrucciones del fabricante (Tabla 6). Finalmente, se construyeron restauraciones de resina compuesta de aproximadamente 6 mm de altura aplicando incrementos de 2 mm de composite híbrido Brilliant Ever Glow Submicron (Coltene, Altstätten, Suiza). Cada incremento se fotopolimerizó durante 20 s utilizando una lámpara de polimerización LED (Blue-phase, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) que se verificó que tenía una potencia lumínica de 1200 mW/cm^2 , según indicaba el radiómetro (Bluephase Meter, Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein). Por último, las muestras se almacenaron en agua destilada durante 24 h. Los materiales utilizados para los procedimientos de adhesión se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Materiales utilizados y su composición química, número de lote, fabricante y modo de aplicación.

Materiales	Composición química	Número del lote	Fabricante	Modo de uso
Extracto de Semilla de Uva	95% Proantocianidina	210296	Infisa, Barcelona, España	2%, 6.5% o 15% p/v en solución acuosa: Aplicar en la superficie dentinaria por 60 s con agitación suave utilizando un aplicador saturado. A continuación, enjuagar las superficies y secar suavemente con aire.
Sistema adhesivo Clearfil SE Bond 2	<i>Primer:</i> 10-MDP, HEMA, Dimetacrilato alifático hidrófilo, dl-Canforquinona, Agua	BQ0055	Kuraray Noritake, Okayama, Japón	Aplicar el <i>primer</i> con un aplicador y dejarlo actuar durante 20 s. A continuación, secar durante 5 s con un flujo de aire suave.
	<i>Adhesivo:</i> 10-MDP, HEMA, Bis-GMA, Dimetacrilato alifático hidrófobo, dl-Canforquinona, Iniciadores, Aceleradores, Sílice coloidal silanada	BJ0081		Después del <i>primer</i> , aplicar el adhesivo y fotopolimerizar durante 10 s.
Composite híbrido Brilliant Ever Glow	Metacrilatos, vidrio dental, sílice amorfa, óxido de zinc	J39958	Coltene, Altstätten, Suiza	Después de los procedimientos de adhesión, aplicar incrementos de 2 mm de composite y fotopolimerizar cada incremento durante 20 s.
Abreviaturas: 10-MDP: 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate, HEMA: 2-hydroxyethyl methacrylate, Bis-GMA: bisphenol A diglycidylmethacrylate.				

Ensayo de resistencia a la microtensión (μ TBS)

Diez dientes por grupo se seccionaron como se describe en la sección 4.1.2 de la Metodología, página 26. Las barritas de cada diente se dividieron aleatoriamente en dos subgrupos: 24 h (T0) o 6 meses de envejecimiento (T6) a 37 °C, renovando el agua destilada semanalmente, antes de las mediciones de μ TBS. La resistencia a la microtensión se determinó como se describe en la sección 4.1.2 de la Metodología, página 26.

Los fallos se analizaron con un estereomicroscopio SZ-TP (Olympus, Tokio, Japón) con un objetivo de 50X para determinar el modo de fractura y se clasificaron como cohesivos en dentina (CD), cohesivos en composite (CC), mixtos (M) y adhesivos (A). Se seleccionó aleatoriamente una muestra fracturada por grupo para obtener imágenes representativas de la interfase mediante microscopía electrónica de barrido (SEM; Phenom XL G2 Desktop SEM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) a 10 kV (Figura 27). Antes del análisis con SEM, todas las muestras se procesaron siguiendo el protocolo de procesamiento común para SEM: fijación, deshidratación gradual con alcohol y recubrimiento con carbono.



Figura 27. Microscopio SEM Phenom XL G2 disponible en el Departamento de Mineralogía y Petrología de la Facultad de Ciencias.

Zimografía en gel

La zimografía en gel se realizó como se describe en la sección 4.4.1 de la Metodología, página 33, y se definieron cinco grupos experimentales: i) mineralizados (control negativo); ii) desmineralizados con ácido fosfórico al 10 % durante 10 min a 4 °C (control positivo); iii) desmineralizados como se ha descrito anteriormente y tratados con nHAp_PA al 2%; iv) desmineralizados como se ha descrito anteriormente y tratados con nHAp_PA al 6,5%; v) desmineralizados como se ha descrito anteriormente y tratados con nHAp_PA al 15%. Los tratamientos con soluciones que contenían nHAp_PA se realizaron durante 30 min a 4 °C protegidos de la luz.

Zimografía in situ de las interfases resina-dentina

Se seleccionaron aleatoriamente dos barras de 5 dientes preparados para μ TBS, tanto en T0 como en T6. La zimografía *in situ* se realizó como se describe en la sección 4.4.2 de la Metodología, página 34.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante IBM SPSS 23.0 (SPSS Inc., Chicago, EE. UU.). El análisis de los datos de μ TBS se realizó utilizando el diente como unidad estadística (n = 10 dientes) promediando la fuerza de adhesión de las barras de cada diente. Cada diente produjo una media de 6 barras, una media de 3 barras por tiempo de envejecimiento. La distribución normal y la homogeneidad de la varianza de los datos de μ TBS y de zimografía *in situ* se confirmaron con las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene, respectivamente. Para analizar los datos se utilizaron análisis de varianza de dos vías (ANOVA; variables: método de tratamiento y tiempo de envejecimiento) y la prueba post hoc de Tukey. Las diferencias entre los tiempos de envejecimiento de cada grupo se investigaron mediante pruebas t pareadas. El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$.

III.3 RESULTADOS

Ensayo de resistencia a la microtensión (μ TBS)

En la Figura 28 se pueden observar los principales resultados de los ensayos de resistencia adhesiva por microtensión (μ TBS). El análisis ANOVA de dos vías mostró una

III.3 RESULTADOS

interacción estadística significativa entre el tiempo de envejecimiento y el tratamiento aplicado ($p = 0,02$). En T0, todas las muestras tratadas mostraron valores superiores de μ TBS en comparación con las muestras de los grupos controles positivo y negativo ($p \leq 0,001$) sin diferencias entre ellas. Tras 6 meses de envejecimiento, el grupo tratado con nHAp_PA 2% presentó un valor de μ TBS más elevado en comparación con todos los demás grupos. Las muestras del control negativo presentaron un valor de μ TBS más bajo que los demás grupos siguiendo el siguiente orden: nHAp_PA 2% > nHAp_PA 6,5% = nHAp_PA 15% $\geq$ control positivo $\geq$ control negativo ($p \leq 0,007$). Además, las pruebas t pareadas mostraron que todos los grupos disminuyeron los valores en T6 en comparación con T0 ($p \leq 0,008$).

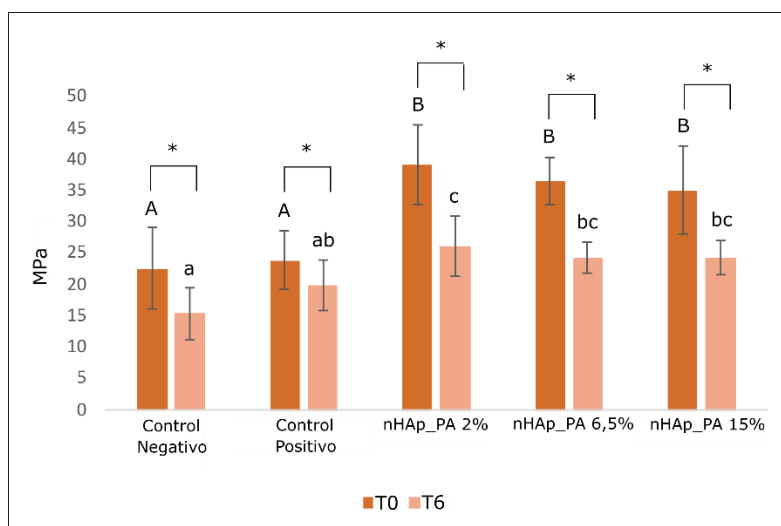


Figura 28. Resultados del ensayo de resistencia a la microtensión a las 24 h (T0) y tras 6 meses de envejecimiento artificial (T6). Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas entre grupos en T0. Letras minúsculas distintas indican diferencias significativas entre los grupos en T6. Los asteriscos indican diferencias significativas entre los tiempos estudiados en cada grupo. Significación $p < 0,05$.

El tipo de fractura de las muestras en los diferentes grupos experimentales se evaluó mediante su distribución de frecuencias y los principales resultados se resumen en la Figura 29. Los fallos de tipo adhesivos y mixtos predominaron en todos los grupos tanto en T0 como en T6. La prevalencia de fallos mixtos fue mayor en los grupos tratados, mientras que los fallos adhesivos predominaron en los grupos controles (negativo y positivo) en T0. Cabe destacar que las muestras de dentina tratadas con nHAp_PA 2%

mostraron un 42% de fracturas en composite en T0. La incidencia de fallos adhesivos aumentó tras el envejecimiento, especialmente en los grupos experimentales en comparación con los controles (negativo y positivo). A los 6 meses, el modo de fractura más frecuente en todos los grupos fue el adhesivo. La Figura 30 y la Figura 31 muestran imágenes de SEM representativas de las superficies dentinarias fracturadas en los tiempos T0 y T6 de todos los grupos estudiados. Estas imágenes muestran la presencia de túbulos dentinarios abiertos en los grupos controles (negativo y positivo) tanto en T0 como en T6 y túbulos dentinarios sellados por tags de resina en el grupo nHAp_PA 2% en T0.

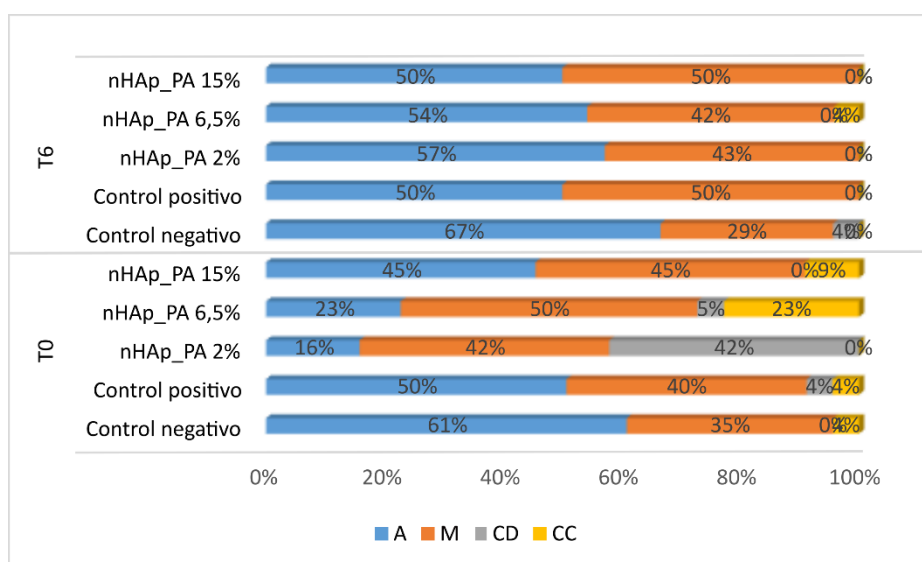


Figura 29. Porcentajes de los modos de fallo: adhesivo (A), mixto (M), cohesivo en dentina (CD) y cohesivo en composite (CC) al inicio (T0) y a los 6 meses de envejecimiento (T6).

III.3 RESULTADOS

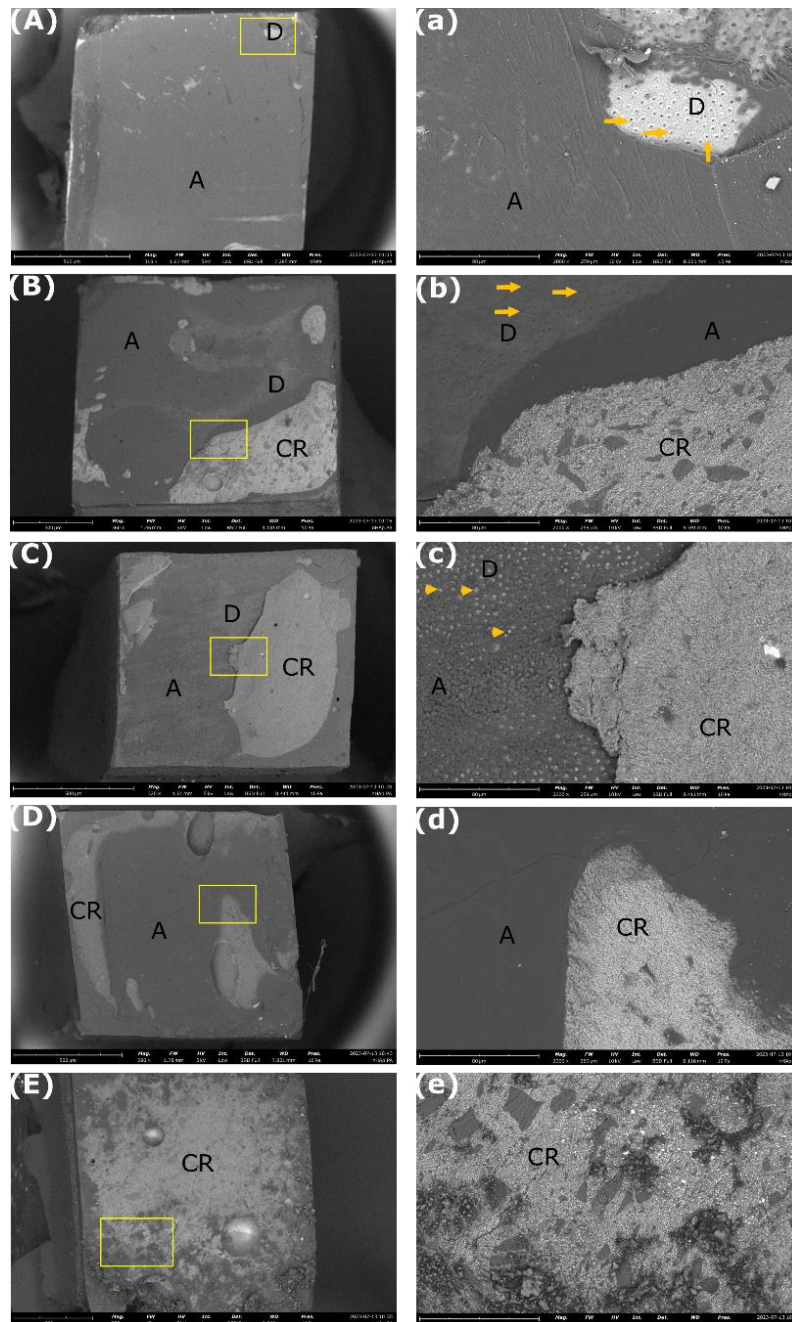


Figura 30. Imágenes de SEM representativas de las superficies de dentina fracturadas en T0. (A - E) Menor aumento (500 X, escalas: 500 µm) y (a - e) mayor aumento (2000 X, escalas: 80 µm) de las zonas limitadas por la sección amarilla en (A - E). (A) Grupo control negativo con fallo adhesivo. (a) Presencia de una capa de adhesivo y túbulos dentinarios abiertos. (B) Grupo control positivo con fallo mixto. (b) Presencia de túbulos dentinarios abiertos, capa de adhesivo y resina compuesta. (C) nHAp_PA 2% con fallo mixto. (c) Presencia de túbulos dentinarios sellados por tags de resina, capa de adhesivo y resina compuesta. (D) nHAp_PA 6.5% con fallo mixto. (d) Presencia de capa adhesiva y resina compuesta. (E) nHAp_PA 15% con fallo cohesivo en resina compuesta. (e) Presencia de resina compuesta en toda la superficie. Flechas: túbulos dentinarios abiertos. Puntas de flecha: túbulos dentinarios sellados por tags de resina. A: Adhesivo. D: Dentina. CR: resina compuesta.

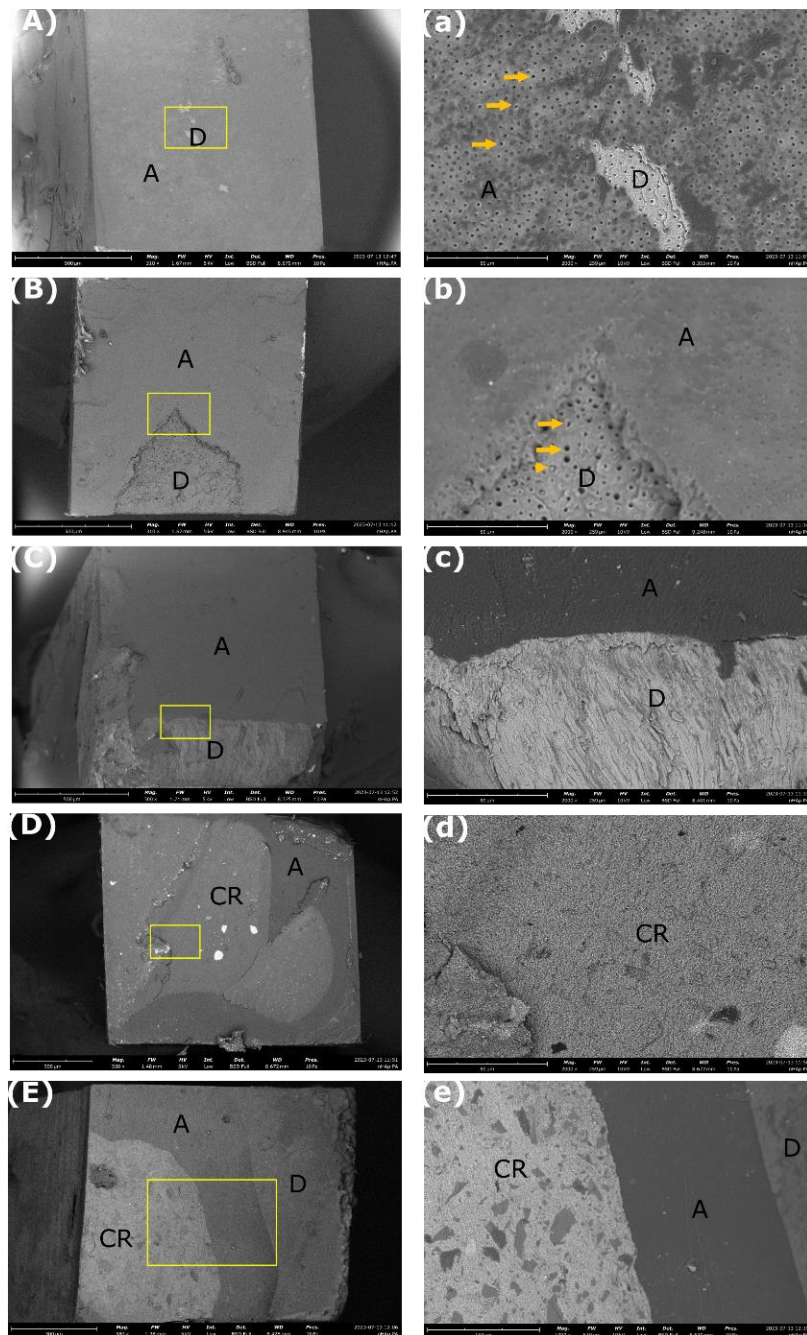


Figura 31. Imágenes de SEM representativas de las superficies de dentina fracturadas en T6. (A - E) Menor aumento (500 X, escalas: 500 µm) y (a - e) mayor aumento (2000 X, escalas: 80 µm) de las zonas limitadas por la sección amarilla en (A - E). (A) Grupo control negativo con fallo adhesivo. (a) Presencia de una capa adhesiva y varios túbulos dentinarios abiertos. (B) Grupo control positivo con fallo adhesivo. (b) Presencia de túbulos dentinarios abiertos en su mayoría y una capa adhesiva. (C) nHAp_PA 2% con fallo adhesivo. (c) Presencia de una capa adhesiva y fractura en dentina. (D) nHAp_PA 6,5% con fallo mixto. (d) Presencia de resina compuesta. (E) nHAp_PA 15% con fallo mixto. (e) Presencia de dentina, capa adhesiva y resina compuesta. Flechas: túbulos dentinarios abiertos. Cabeza de flecha: túbulos dentinarios sellados por tags de resina. A: Adhesivo. D: Dentina. CR: resina compuesta.

III.3 RESULTADOS

Zimografía en gel

La Figura 32 muestra los datos cualitativos y cuantitativos de la zimografía en gel. La dentina desmineralizada mostró la mayor actividad enzimática de las formas pro y activa de MMP-2 (72 kDa y 66 kDa, respectivamente) y MMP-9 (92 kDa y 86 kDa, respectivamente), mientras que la dentina mineralizada mostró la menor actividad de ambas MMP. Además, todos los grupos tratados con nHAp_PA demostraron una reducción de la actividad enzimática en comparación con el grupo desmineralizado, presentando casi el mismo nivel de actividad gelatinolítica que el grupo mineralizado.

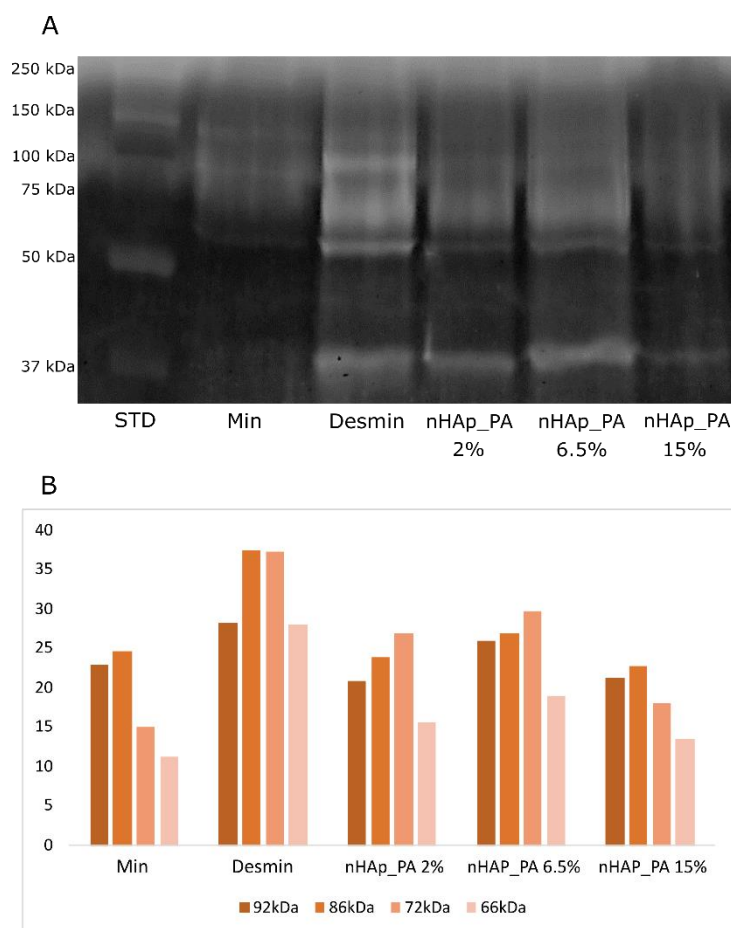


Figura 32. (A) Análisis de zimografía en gel de los grupos estándar (STD), dentina mineralizada (Min), dentina desmineralizada (Demin) y tratados. (B) Cuantificación de las bandas de los píxeles del análisis de zimografía.

Zimografía in situ de las interfases resina-dentina

La actividad enzimática en la interfase resina-dentina se analizó *in situ* mediante microscopía de fluorescencia. La Figura 33 muestra imágenes representativas de la interfase resina-dentina para todos los grupos experimentales. La presencia de actividad gelatinolítica se evidencia por la señal de fluorescencia que se distribuye principalmente en los túbulos, siendo especialmente intensa en el control positivo. La Figura 34 muestra los resultados cuantitativos de los niveles de actividad gelatinolítica en las interfases resina-dentina en todos los grupos. Puede observarse que los efectos principales (tratamiento y envejecimiento), así como su interacción, influyeron significativamente en el nivel de fluorescencia de la dentina en los diferentes grupos ($p < 0,001$).

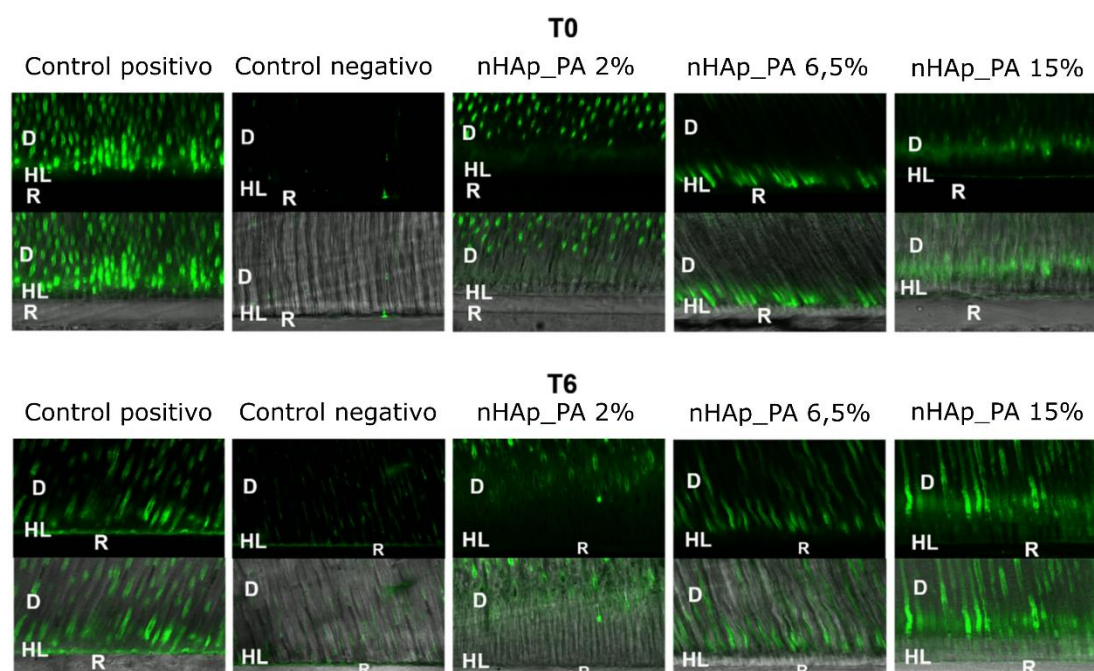


Figura 33. Interfases resina-dentina incubadas en gelatina conjugada con fluoresceína en T0 y T6 meses. La imagen superior de cada grupo se adquirió con canal verde y muestra la fluorescencia en los túbulos dentinarios y dentro de la capa híbrida de los grupos analizados. La imagen inferior de cada grupo se obtuvo fusionando la imagen de contraste de interferencia diferencial (DIC) (que muestra la densidad óptica de la interfase resina-dentina) y la imagen adquirida con el canal verde. Abreviaturas: D: dentina; HL: capa híbrida; R: composite de resina; T0: 24 h de envejecimiento; T6: 6 meses de envejecimiento.

Considerando los tratamientos analizados al inicio (T0), el control positivo demostró una actividad enzimática significativamente mayor en comparación con los demás grupos ($p < 0,001$). El pretratamiento con nHAp_PA redujo la actividad enzimática dentinaria en comparación con el control positivo. Sin embargo, no fue capaz de inhibir

III.4 DISCUSIÓN

completamente la actividad enzimática y reducirla al nivel del control negativo independientemente de la concentración de las nanopartículas del *primer* (control positivo > nHAp_PA 15% = nHAp_PA 6,5% > nHAp_PA 2% > control negativo). Tras el envejecimiento (T6), la actividad gelatinolítica en el grupo control positivo siguió siendo mayor que en el control negativo, nHAp_PA 6,5% y nHAp_PA 2% ($p \leq 0,009$). Además, no fue diferente del grupo nHAp_PA 15% ($p = 0,326$). nHAp_PA 15% demostró una actividad gelatinolítica significativamente mayor en comparación con el grupo control negativo ($p = 0,035$). Entre los demás grupos investigados, no hubo diferencias significativas. Por otra parte, la actividad enzimática disminuyó significativamente tras 6 meses de envejecimiento artificial ($p < 0,05$) en todos los grupos, excepto en el grupo control negativo ($p \leq 0,031$) que se mantuvo el mismo nivel (bajo) de fluorescencia.

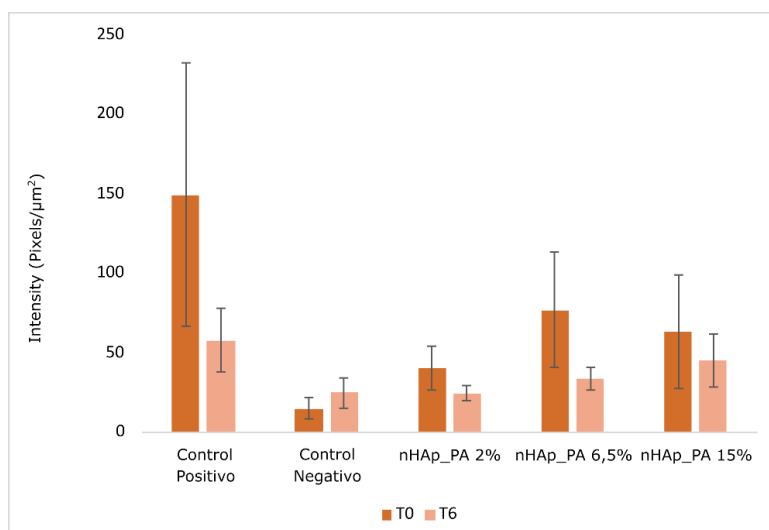


Figura 34. Cuantificación de la actividad gelatinolítica en las interfases resina-dentina de todos los grupos analizados.

III.4 DISCUSIÓN

A pesar del rápido desarrollo de la odontología adhesiva en las últimas décadas, sigue siendo necesarias nuevas estrategias para prevenir la degradación de la adhesión y promover la longevidad de las restauraciones dentales. En el presente estudio, se investigaron los efectos de las nanopartículas de hidroxiapatita funcionalizadas con proantocianidina (nHAp_PA) utilizadas como un *primer* en la longevidad de la interfase adhesivo-dentinaria. Nuestros resultados verificaron que la aplicación de nHAp_PA en la

dentina sometida a ciclaje de pH mejoró la resistencia de adhesión y redujo las actividades de MMP-2 y MMP-9 después de 6 meses. Además, el grupo nHAp_PA al 2% demostró tener los resultados más prometedores en todos los análisis estudiados. Por lo tanto, se rechazan las dos primeras hipótesis nulas, puesto que existieron diferencias entre los grupos experimentales en la resistencia de la unión adhesivo-dentina y en las actividades de las MMP. Además, los valores de resistencia de la unión en T6 disminuyeron y la actividad enzimática endógena aumentó en todos los grupos en comparación con T0, por lo que también se rechazó la tercera hipótesis nula.

Investigaciones anteriores no encontraron ninguna diferencia entre el uso de un sistema adhesivo de autograbado o de grabado-lavado en la resistencia a la microtensión cuando se aplicaban agentes reticulantes [153,154]. Dado que el modo de autograbado en dos pasos es el protocolo de adhesión estándar para la dentina [155], decidimos probar un sistema adhesivo de autograbado de dos pasos en la presente investigación. Además, la elección de las concentraciones de nHAp_PA en este estudio se basó en las concentraciones utilizadas habitualmente en las investigaciones actuales [156–159]. Asimismo, hemos probado las nanopartículas en dentina desmineralizada creada por un proceso de ciclaje de pH. Este método parece ser más apropiado para simular un sustrato comparable a la capa de dentina afectada por la caries [18].

Es bien sabido que la proantocianidina forma fuertes enlaces insolubles entre su grupo hidroxilo fenólico y el grupo carbonilo amida del colágeno de la dentina [59]. Esta interacción entre el colágeno y la PA es capaz de aumentar la dureza de la dentina desmineralizada, mantener la integridad de la estructura compleja del colágeno, facilitar la interdifusión de los monómeros, favorecer la remineralización e inhibir la actividad de las colagenasas [154,160]. Algunas revisiones sistemáticas y metaanálisis concluyeron que debido a las propiedades mencionadas anteriormente, la aplicación de reticulantes de colágeno como un *primer* aumenta la fuerza de adhesión inmediata y a largo plazo [154,160,161]. Estas conclusiones están de acuerdo con nuestros resultados, puesto que los grupos tratados mostraron valores de μ TBS superiores a los controles (negativo y positivo) tanto en T0 como en T6 (Figura 28). Tras 6 meses de envejecimiento, no hubo diferencias estadísticas entre el control positivo, nHAp_PA 6,5% y nHAp_PA 15%. Sin

III.4 DISCUSIÓN

embargo, el nHAp_PA 2% mostró valores de μ TBS superiores en comparación con ambos grupos controles. Por lo tanto, nuestros resultados concuerdan que cuanto más concentrado es el *primer* con PA, menor es la fuerza de unión [162]. Esto podría deberse al hecho de que la PA dona átomos a los radicales libres en proporción directa a la concentración de PA utilizada, inhibiendo el inicio y la propagación de la polimerización adhesiva [162]. Además, la adición de nHAp a una mayor concentración también tiene un efecto negativo sobre la resistencia de la unión [163]. Esto puede deberse al hecho de que, a bajas concentraciones, la nHAp es capaz de infiltrarse en los túbulos dentinarios, aumentando las propiedades mecánicas, mientras que, a concentraciones más altas, las partículas se aglomeran en la superficie y reducen la penetración adhesiva en la dentina [164,165]. No obstante, algunos trabajos sugieren que la oclusión de los túbulos dentinarios por la deposición de minerales no sólo facilita la remineralización, sino que también reduce la degradación de la interfase y aumenta la fuerza de adhesión inmediata y a largo plazo [153,166]. Según nuestros resultados, la nHAp no perjudicó la resistencia de adhesión y podría ser una fuente de liberación de calcio y fosfato. Además, los mayores valores de μ TBS de los grupos tratados pueden atribuirse al efecto acumulativo del rendimiento de la PA combinado con la nHAp, pues la nHAp también puede interactuar con la apatita dentinaria, reforzando y estabilizando la matriz dentinaria [167]. Asimismo, los sistemas adhesivos de autograbado tienen monómeros funcionales capaces de interactuar químicamente con la hidroxiapatita dentinaria [33]. El adhesivo de autograbado Clearfil Se Bond 2 utilizado en el presente estudio, contiene el monómero 10-metracriloxidecil dihidrogenofosfato (10-MDP) que forma un fuerte enlace químico con la hidroxiapatita cálcica de la dentina, dando lugar a la formación de un nuevo fosfato cálcico [33]. La aplicación de nHAp como un *primer* sobre la dentina proporciona ubicaciones adicionales de Ca^{2+} para reacciones químicas con el 10-MDP, estableciendo una unión química-mecánica [168,169]. Esta interacción potencial de la nHAp con el sistema adhesivo también puede ser otro factor que explique el aumento de la fuerza de adhesión en los grupos tratados.

Las frecuencias de los modos de fallos (Figura 29) mostró que en T0 la mayoría de los modos de fractura de los grupos tratados fueron mixtos, mientras que en los grupos controles (negativo y positivo) fueron adhesivos. En T6, todos los grupos

mostraron una mayoría de fallos adhesivos (Figura 29). Curiosamente, el grupo nHAp_PA 2% presentó un 42% de fallos en resina compuesta en T0. Esto podría indicar que la fuerza de adhesión resina-dentina promovida por este *primer* excedió la fuerza cohesiva acumulada dentro del composite. Además, las imágenes de SEM mostraron tags de resina dentro de los túbulos dentinarios en este grupo (Figura 30c), mientras que ambos grupos controles presentaron túbulos abiertos en T0 (Figura 30a y Figura 30b). En T6, los grupos controles (negativo y positivo) también mostraron, en su mayoría, túbulos abiertos (Figura 31a y Figura 31b).

Cuando son activadas por agentes ácidos durante el protocolo adhesivo, las MMP y CT detectadas en el fondo de la capa híbrida degradan el colágeno tipo I que no fue infiltrado por los monómeros de resina [146]. Por lo tanto, el uso de *primers* bioactivos con reticuladores para inactivar las MMP y prevenir la degradación de la interfase adhesiva es una estrategia válida para conseguir la longevidad de la restauración [69,170]. El modo de acción de los reticuladores es doble, por un lado estabilizan y refuerzan la matriz dentinaria, mientras que por otro son inhibidores inespecíficos de las MMP debido a su capacidad para inducir cambios conformacionales en las propias enzimas y, simultáneamente, enmascarar los sitios de clivaje de la enzima en la molécula de colágeno [68,69]. Se sabe que el hidroxilo fenólico de la PA interactúa con la amida carbonilproteica del colágeno de la dentina a través de enlaces covalentes, iónicos, de hidrógeno e hidrofóbicos, formando enlaces cruzados fuertes y permanentes [59]. Además, la gran fracción galloil de la PA ofrece más grupos hidroxilo para la reticulación, lo que proporciona un mejor rendimiento [59]. En el presente estudio, la detección de las actividades de las MMP se realizó mediante zimografía en gel y zimografía *in situ*. La zimografía de gelatina con polvo de dentina reveló una mayor actividad enzimática en el grupo desmineralizado, mientras que el grupo mineralizado mostró la menor actividad (Figura 32). Además, el uso del nHAp_PA como un *primer* disminuyó la actividad enzimática tanto de la proforma como de las formas activas de MMP-2 y MMP-9. Asimismo, los grupos de tratamiento presentaron casi la misma intensidad de actividad enzimática que el grupo mineralizado, lo que confirma el potencial de inactivación de las MMP con el pretratamiento de la dentina con nHAp_PA. El análisis zimográfico *in situ* de las interfases dentina-resina corroboró la eficacia del uso de los *primers* en la inhibición

III.5 CONCLUSIONES

de la actividad gelatinolítica dentinaria endógena (Figura 33 y Figura 34). Los resultados mostraron que el proceso ciclaje de pH antes de la aplicación del sistema adhesivo indujo la actividad enzimática, ya que el control positivo presentó la mayor actividad. Además, tras 6 meses de envejecimiento, nHAp_PA 2% y nHAp_PA 6,5% fueron capaces de disminuir la actividad enzimática en la interfase resina-dentina al igual que el control negativo. Curiosamente, todos los grupos (aparte del control negativo) demostraron una disminución de la actividad enzimática tras el envejecimiento, aunque cabría esperar que esta actividad aumentara. Esto podría explicarse por el hecho de que los especímenes fueron envejecidos en agua destilada y no en saliva artificial rica en minerales necesarios para el funcionamiento de las MMP. En otra investigación, también se describió una disminución de la actividad gelatinolítica evaluada mediante zimografía *in situ* en especímenes envejecidos en agua [171].

Los resultados del presente estudio corroboran que cuando se utiliza PA, se forman enlaces cruzados fuertes y permanentes en la matriz dentinaria, incluso en asociación con nHAp. Además, el nHAp_PA puede inactivar las MMP durante un periodo medio-largo, así como aumentar la fuerza de adhesión. Los presentes resultados complementan resultados anteriores en los que la aplicación de nHAp_PA fue capaz de remineralizar y fortalecer la matriz dentinaria desmineralizada [152]. Nuestros hallazgos actuales validan los efectos beneficiosos del pretratamiento de la dentina durante 1 min con nHAp_PA en μ TBS y en la inactivación de MMP-9 y MMP-2. Además, el *primer* con nHAp_PA al 2% demostró tener el mejor desempeño. De cualquier modo, es recomendable la realización de nuevos ensayos con mayores tiempos de evaluación, así como ensayos clínicos para validar estos beneficios *in vivo*.

III.5 CONCLUSIONES

El uso de *primers* que contienen nHAp_PA antes de los procedimientos adhesivos parece ser una opción de tratamiento factible, que ofrece la preservación de la fuerza de adhesión después de 6 meses de envejecimiento artificial, posiblemente debido a la inhibición de la actividad enzimática. El *primer* que contiene un 2% de las nanopartículas

parece ser el más eficaz, tanto en términos de adhesión como con propiedades inhibitoras de las MMP.

5. Conclusiones

1. Existen diferencias significativas entre la dentina humana y bovina sometidas a un proceso de desmineralización/remineralización mediante ciclaje de pH en cuanto a su composición química y características estructurales que influyen en la respuesta mecánica. Estas variaciones pueden representar una posible limitación al considerar la sustitución de dientes humanos por bovinos en estudios *in vitro*.
2. El tratamiento con nHAp_PA se presenta como una estrategia alternativa para fortalecer la dentina desmineralizada, puesto que posee la capacidad de mejorar la estabilidad del colágeno y reforzarlo.
3. La aplicación de *primers* de nHAp_PA previamente a los procedimientos adhesivos es capaz de preservar la fuerza de adhesión incluso después de 6 meses de envejecimiento artificial. El *primer* que contiene 2% de estas nanopartículas parece ser el más eficaz, tanto en términos de adhesión como en sus propiedades inhibitorias de las MMP.
4. El tratamiento de la dentina durante 1 minuto con *primer* de nHAp_PA al 2% puede ser una estrategia alternativa para aumentar la longevidad de las restauraciones dentales.

6. Conclusions

1. There are significant differences between human and bovine dentin subjected to a demineralization/remineralization process by pH cycling in terms of their chemical composition and structural characteristics, which influence the mechanical response. These variations may represent a possible limitation when considering the substitution of human for bovine teeth in *in vitro* studies.
2. Treatment with nHAp_PA is presented as an alternative strategy to strengthen demineralized dentin, since it has the ability to improve collagen stability and reinforce it.
3. The application of nHAp_PA primers prior to adhesive procedures can preserve bond strength even after 6 months of artificial aging. The primer containing 2% of these nanoparticles seems to be the most effective, both in terms of adhesion and in its MMP inhibitory properties.
4. Treatment of dentin for 1 minute with 2% nHAp_PA primer could be an alternative strategy to increase the longevity of dental restorations.

Bibliografia

- [1] MacHiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of dental caries and dental caries management: Consensus report of a workshop organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res* 2020;54:7–14. <https://doi.org/10.1159/000503309>.
- [2] BaniHani A, Hamid A, Van Eeckhoven J, Gizani S, Albadri S. Minimal Intervention Dentistry (MID) mainstream or unconventional option? Study exploring the impact of COVID-19 on paediatric dentists' views and practices of MID for managing carious primary teeth in children across the United Kingdom and European Union. *Eur Arch Paediatr Dent* 2022;23:835–44. <https://doi.org/10.1007/s40368-022-00746-2>.
- [3] Elson N. Minimally invasive dentistry approach benefits of using Laser. *J Dent Oral Care* 2016;2:1–4. <https://doi.org/10.15436/2379-1705.16.1076>.
- [4] Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global burden of severe tooth loss : a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res* 2014;93. <https://doi.org/10.1177/0022034514537828>.
- [5] Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. *J Oral Sci* 2011;53:273–82. <https://doi.org/10.2334/josnurd.53.273>.
- [6] Franchini Pan Martinez L, K. L. Ferraz N, C. N. L. Lannes A, C. Rodrigues M, F. De Carvalho M, G. Zina L, et al. Can bovine tooth replace human tooth in laboratory studies? A systematic review. *J Adhes Sci Technol* 2023;37:1279–98. <https://doi.org/10.1080/01694243.2022.2066936>.
- [7] Soares FZM, Follak A, da Rosa LS, Montagner AF, Lenzi TL, Rocha RO. Bovine tooth is a substitute for human tooth on bond strength studies: A systematic review and meta-analysis of in vitro studies. *Dent Mater* 2016;32:1385–93. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.09.019>.
- [8] Ferreira M, Carvalho F De, Neiva C. Viability of bovine teeth as a substrate in

- bond strength tests : A systematic review and meta-analysis. *J Adhes Dent* 2018;20:471–80. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a41636>.
- [9] Nakamichi I, Iwaku M, Fusayama T. Bovine teeth as possible substitutes in the adhesion test. *J Dent Res* 1983;62:1076–81. <https://doi.org/10.1177/00220345830620101501>.
- [10] Dutra-Correa M, Anauate-Netto C, Arana-Chavez VE. Density and diameter of dentinal tubules in etched and non-etched bovine dentine examined by scanning electron microscopy. *Arch Oral Biol* 2007;52:850–5. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.03.003>.
- [11] Lopes MB, Sinhoreti MAC, Gonini Júnior A, Consani S, McCabe JF. Comparative study of tubular diameter and quantity for human and bovine dentin at different depths. *Braz Dent J* 2009;20:279–83. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402009000400003>.
- [12] Tanaka JLO, Medici Filho E, Salgado JAP, Salgado MAC, Moraes LC De, Moraes MEL De, et al. Comparative analysis of human and bovine teeth: radiographic density. *Braz Oral Res* 2008;22:346–51. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242008000400011>.
- [13] Fonseca RB, Haiter-Neto F, Fernandes-Neto AJ, Barbosa GAS, Soares CJ. Radiodensity of enamel and dentin of human, bovine and swine teeth. *Arch Oral Biol* 2004;49:919–22. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.05.006>.
- [14] Qin XF, Zi H, Zeng XJ. Changes in the global burden of untreated dental caries from 1990 to 2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease study. *Heliyon* 2022;8:e10714. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10714>.
- [15] Fejerskov O, KKidd E, Nyvad B, Baelum V. Dental caries: the disease and its clinical management. second edition. 2008.
- [16] Bhadila GY, Baras BH, Balhaddad AA, Williams MA, Oates TW, Weir MD, et al. Recurrent caries models to assess dental restorations: A scoping review. *J Dent* 2023;136:104604. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2023.104604>.
- [17] Dohan Z, Friedlander LT, Cooper PR, Li KC, Ratnayake JT, Mei ML. In vitro models used in the formation of root caries lesions—a review of the literature. *Dent J* 2023;11. <https://doi.org/10.3390/dj11120269>.
- [18] Marquezan M, Corrêa FNP, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-

- Pinto AC, et al. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol* 2009;54:1111–7.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.09.007>.
- [19] de Carvalho FG, de Fucio SBP, Sinhoreti MAC, Correr-Sobrinho L, Puppim-Rontani RM. Confocal laser scanning microscopic analysis of the depth of dentin caries-like lesions in primary and permanent teeth. *Braz Dent J* 2008;19:139–44.
<https://doi.org/10.1590/s0103-64402008000200010>.
- [20] Young DA, Nový BB, Zeller GG, Hale R, Hart TC, Truelove EL, et al. The american dental association caries classification system for clinical practice: A report of the american dental association council on scientific affairs. *J Am Dent Assoc* 2015;146:79–86. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2014.11.018>.
- [21] Banerjee A, Frencken JE, Schwendicke F, Innes NPT. Contemporary operative caries management: Consensus recommendations on minimally invasive caries removal. *Br Dent J* 2017;223:215–22. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2017.672>.
- [22] Sharif MO, Catleugh M, Merry A, Tickle M, Dunne SM, Brunton P, et al. Replacement versus repair of defective restorations in adults: Resin composite. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;2014.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD005971.pub3>.
- [23] Islam MS, Nassar M, Elsayed MA, Jameel DB, Ahmad TT, Rahman MM. In vitro optical and physical stability of resin composite materials with different filler characteristics. *Polymers (Basel)* 2023;15:1–10.
<https://doi.org/10.3390/polym15092121>.
- [24] Eltahlah D, Lynch CD, Chadwick BL, Blum IR, Wilson NHF. An update on the reasons for placement and replacement of direct restorations. *J Dent* 2018;72:1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.03.001>.
- [25] Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Adhesion to enamel and dentin: Current status and future challenges. *Oper Dent* 2003;28:215–35.
- [26] Tjäderhane LEO, Carrilho MR, Breschi L, Tay FR, Pashley DH. Dentin basic structure and composition — an overview. *Endod Top* 2012;20:3–29.
- [27] Orsini G, Ruggeri A, Mazzoni A, Nato F, Manzoli L, Putignano A, et al. A review of the nature, role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part 1:

- proteoglycans and glycoproteins. *Endod Top* 2009;21:1–18.
<https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00270.x>.
- [28] Maravic T, Mazzoni A, Comba A, Scotti N, Checchi V, Breschi L. How stable is dentin as a substrate for bonding? *Curr Oral Heal Reports* 2017;4.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s40496-017-0149-8>.
- [29] Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater* 2011;27:1–16.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.016>.
- [30] Mazzoni A, Scaffa P, Carrilho M, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Polimeni A, et al. Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res* 2013;92:82–6. <https://doi.org/10.1177/0022034512467034>.
- [31] de Moraes IQS, do Nascimento TG, da Silva AT, de Lira LMSS, Parolia A, Porto ICC de M. Inhibition of matrix metalloproteinases: a troubleshooting for dentin adhesion. *Restor Dent Endod* 2020;45:1–20.
<https://doi.org/10.5395/rde.2020.45.e31>.
- [32] Mazzoni A, Scaffa P, Carrilho M, Tjäderhane L, Lenarda R Di, Polimeni A, et al. Effects of etch-and-rinse and self-etch adhesives on dentin MMP-2 and MMP-9. *J Dent Res* 2013;92:82–6. <https://doi.org/10.1177/0022034512467034>.
- [33] Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater* 2011;27:17–28.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.dental.2010.10.023>.
- [34] 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. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2007.02.009>.
- [35] Knott L, Whitehead CC, Fleming RH, Bailey AJ. Biochemical changes in the collagenous matrix of osteoporotic avian bone. *Biochem J* 1995;310:1045–51.
<https://doi.org/10.1042/bj3101045>.
- [36] Miles CA, Avery NC, Rodin V V., Bailey AJ. The increase in denaturation temperature following cross-linking of collagen is caused by dehydration of the fibres. *J Mol Biol* 2005;346:551–6. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.12.001>.
- [37] Bedran-Russo AK, Pauli GF, Chen SN, McAlpine J, Castellán CS, Phansalkar RS, et al. Dentin biomodification: Strategies, renewable resources and clinical

- applications. *Dent Mater* 2014;30:62–76.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.10.012>.
- [38] Lynch RJM, Smith SR. Remineralization agents – New and effective or just marketing hype ? *Adv Dent Res* 2012;24:63–7.
<https://doi.org/10.1177/0022034512454295>.
- [39] Niu LN, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen JH, et al. Biomimetic remineralization of dentin. *Dent Mater* 2014;30:77–96.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.07.013>.
- [40] Liu Y, Mai S, Li N, Yiu CKY, Mao J, Pashley DH, et al. Differences between top-down and bottom-up approaches in mineralizing thick, partially demineralized collagen scaffolds. *Acta Biomater* 2011;7:1742–51.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.11.028>.
- [41] Walsh T, Hv W, Am G, Vcc M, Jeroncic A, Walsh T, et al. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries (Review). *Cochrane Database Syst Rev* 2019.
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD007868.pub3>. www.cochranelibrary.com.
- [42] Fejerskov O, Nyvad B, Kidd E, editors. *Dental caries: The disease and its clinical management*. Third edit. Wiley Blackwell; 2015.
- [43] Arifa MK, Ephraim R, Rajamani T. Recent advances in dental hard tissue remineralization : A review of literature. *Int J Clin Pediatr Dent* 2019;12.
<https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1603>.
- [44] O'Hagan-Wong K, Enax J, Meyer F, Ganss B. The use of hydroxyapatite toothpaste to prevent dental caries. *Odontology* 2022;110:223–30.
<https://doi.org/10.1007/s10266-021-00675-4>.
- [45] Huang SB, Gao SS, Yu HY. Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. *Biomed Mater* 2009;4.
<https://doi.org/10.1088/1748-6041/4/3/034104>.
- [46] Kantharia N, Naik S, Apte S, Kheur M, Kheur S, Kale B. Nano-hydroxyapatite and its contemporary applications. *J Dent Res Sci Dev* 2014;1:15.
<https://doi.org/10.4103/2348-3407.126135>.
- [47] Bordea IR, Candrea S, Alexescu GT, Bran S, Băciuț M, Băciuț G, et al. Nano-hydroxyapatite use in dentistry : a systematic review. *Drug Metab Rev* 2020;0:1–

14. <https://doi.org/10.1080/03602532.2020.1758713>.
- [48] Liu DM, Troczynski T, Tseng WJ. Water-based sol-gel synthesis of hydroxyapatite: Process development. *Biomaterials* 2001;22:1721–30. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00332-X](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00332-X).
- [49] Daood U, Fawzy AS. Minimally invasive high-intensity focused ultrasound (HIFU) improves dentine remineralization with hydroxyapatite nanorods. *Dent Mater* 2020;36:456–67. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2020.01.005>.
- [50] Onwubu SC, Mhlungu S, Mdluli PS. In vitro evaluation of nanohydroxyapatite synthesized from eggshell waste in occluding dentin tubules. *J Appl Biomater Funct Mater* 2019;17. <https://doi.org/10.1177/2280800019851764>.
- [51] Memarpour M, Shafiei F, Rafiee A, Soltani M, Dashti MH. Effect of hydroxyapatite nanoparticles on enamel remineralization and estimation of fissure sealant bond strength to remineralized tooth surfaces: An in vitro study. *BMC Oral Health* 2019;19:1–14. <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0785-6>.
- [52] Tschoppe P, Zandim DL, Martus P, Kielbassa AM. Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. *J Dent* 2011;39:430–7. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2011.03.008>.
- [53] Huang S, Gao S, Cheng L, Yu H. Remineralization potential of nano-hydroxyapatite on initial enamel lesions: An in vitro study. *Caries Res* 2011;45:460–8. <https://doi.org/10.1159/000331207>.
- [54] Albrecht C, Scherbart AM, Berlo D Van, Braunbarth CM, Schins RPF, Scheel J. Evaluation of cytotoxic effects and oxidative stress with hydroxyapatite dispersions of different physicochemical properties in rat NR8383 cells and primary macrophages. *Toxicol Vitr* 2009;23:520–30. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.01.005>.
- [55] Besinis A, Van Noort R, Martin N. Remineralization potential of fully demineralized dentin infiltrated with silica and hydroxyapatite nanoparticles. *Dent Mater* 2014;30:249–62. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.11.014>.
- [56] Breschi L, Maravic T, Cunha SR, Comba A, Cadenaro M, Tjäderhane L, et al. Dentine bonding systems: From dentin collagen structure to bond preservation and clinical applications. *Dent Mater* 2018;34:78–96. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.11.005>.

- [57] Paschalis EP, Verdelis K, Doty SB, Boskey AL, Mendelsohn R, Yamauchi M. Spectroscopic characterization of collagen cross-links in bone. *J Bone Miner Res* 2001;16:1821–8. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.10.1821>.
- [58] Knott L, Bailey AJ. Collagen cross-links in mineralizing tissues: A review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone* 1998;22:181–7. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(97\)00279-2](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(97)00279-2).
- [59] Cai J, Palamara JEA, Burrow MF. Effects of collagen crosslinkers on dentine: A literature review. *Calcif Tissue Int* 2018;102:265–79. <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0343-7>.
- [60] Hagerman AE, Butler LG. The Specificity of Proanthocyanidin-Protein Interactions. *J Biol Chem* 1981;256:4444–97.
- [61] Hass V, De Paula AM, Parreiras S, Gutiérrez MF, Luque-Martinez I, De Paris Matos T, et al. Degradation of dentin-bonded interfaces treated with collagen cross-linking agents in a cariogenic oral environment: An in situ study. *J Dent* 2016;49:60–7. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.02.009>.
- [62] Fang M, Liu R, Xiao Y, Li F, Wang D, Hou R, et al. Biomodification to dentin by a natural crosslinker improved the resin-dentin bonds. *J Dent* 2012;40:458–66. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.02.008>.
- [63] Seseogullari-Dirihan R, Mutluay MM, Pashley DH, Tezvergil-Mutluay A. Is the inactivation of dentin proteases by crosslinkers reversible? *Dent Mater* 2017;33:e62–8. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.09.036>.
- [64] Seseogullari-Dirihan R, Mutluay MM, Vallittu P, Pashley D. Effect of pretreatment with collagen crosslinkers on dentin protease activity. *Dent Mater* 2015;31:941–7. <https://doi.org/10.1126/science.1249098.Sleep>.
- [65] Pavan S, Xie Q, Hara AT, Bedran-Russo AK. Biomimetic approach for root caries prevention using a proanthocyanidin- rich agent. *Caries Res* 2011;45:443–7. <https://doi.org/10.1159/000330599>.
- [66] Xie Q, Bedran-Russo AK, Wu CD. In vitro remineralization effects of grape seed extract on artificial root caries. *J Dent* 2008;36:900–6. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2008.07.011>.
- [67] Ishikawa M, Maki K, Tofani I, Kimura K, Kimura M. Grape seed proanthocyanidins extract promotes bone formation in rat's mandibular

- condyle. *Eur J Oral Sci* 2005;113:47–52. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2004.00176.x>.
- [68] Balalaie A, Rezvani MB, Mohammadi Basir M. Dual function of proanthocyanidins as both MMP inhibitor and crosslinker in dentin biomodification: A literature review. *Dent Mater J* 2018;37:173–82. <https://doi.org/10.4012/dmj.2017-062>.
- [69] Maravic T, Mancuso E, Comba A, Checchi V, Generali L, Mazzitelli C, et al. Dentin cross-linking effect of carbodiimide after 5 years. *J Dent Res* 2021;100:1090–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/00220345211014799>.
- [70] Bhardwaj A, Bhardwaj A, Misuriya A, Maroli S, Manjula S, Singh AK. Nanotechnology in dentistry: Present and future. *J Int Oral Heal JIOH* 2014;6:121–6.
- [71] Jandt KD, Watts DC. Nanotechnology in dentistry: Present and future perspectives on dental nanomaterials. *Dent Mater* 2020;36:1365–78. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2020.08.006>.
- [72] AlKahtani RN. The implications and applications of nanotechnology in dentistry: A review. *Saudi Dent J* 2018;30:107–16. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2018.01.002>.
- [73] Carrouel F, Viennot S, Ottolenghi L, Gaillard C, Bourgeois D. Nanoparticles as anti-microbial, anti-inflammatory, and remineralizing agents in oral care cosmetics: A review of the current situation. vol. 10. 2020. <https://doi.org/10.3390/nano10010140>.
- [74] Shamel K, Ahmad M Bin, Jaffar Al-Mulla EA, Ibrahim NA, Shabanzadeh P, Rustaiyan A, et al. Green biosynthesis of silver nanoparticles using *callicarpa maingayi* stem bark extraction. *Molecules* 2012;17:8506–17. <https://doi.org/10.3390/molecules17078506>.
- [75] Nath D, Banerjee P. Green nanotechnology - A new hope for medical biology. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013;36:997–1014. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.09.002>.
- [76] Moghadam ET, Yazdani M, Tahmasebi E, Tebyanian H, Ranjbar R, Yazdani A, et al. Current herbal medicine as an alternative treatment in dentistry: In vitro, in vivo and clinical studies. *Eur J Pharmacol* 2020;889.

- <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173665>.
- [77] Mashwani Z ur R, Khan T, Khan MA, Nadhman A. Synthesis in plants and plant extracts of silver nanoparticles with potent antimicrobial properties: current status and future prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99:9923–34. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6987-1>.
- [78] Yin IX, Yu OY, Zhao IS, Mei ML, Li QL, Tang J, et al. Developing biocompatible silver nanoparticles using epigallocatechin gallate for dental use. *Arch Oral Biol* 2019;102:106–12. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.03.022>.
- [79] Patra S, Mukherjee S, Kumar A, Ganguly A, Sreedhar B, Ranjan C. Green synthesis , characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics. *Mater Sci Eng C* 2015;53:298–309. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.04.048>.
- [80] Wang L, D’Alpino PHP, Lopes LG, Pereira JC. Mechanical properties of dental restorative materials: relative contribution of laboratory tests. *J Appl Oral Sci* 2003;11:162–7. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572003000300002>.
- [81] Miura D, Ishida Y, Miyasaka T, Shinya A, Aoki H. Reliability of different bending test methods for dental press ceramics. *Materials (Basel)* 2020;13:1–10. <https://doi.org/10.3390/ma13225162>.
- [82] Armstrong S, Breschi L, Ozcan M, Pfefferkorn F, Ferrari M, Van Meerbeek B. Academy of Dental Materials guidance on in vitro testing of dental composite bonding effectiveness to dentin/enamel using micro-tensile bond strength (μ TBS) approach. *Dent Mater* 2017;33:133–43. <https://doi.org/10.1037//0033-2909.126.1.78>.
- [83] Lopes C de CA, Limirio PHJO, Novais VR, Dechichi P. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone. *Appl Spectrosc Rev* 2018;53:747–69. <https://doi.org/10.1080/05704928.2018.1431923>.
- [84] Larkin PJ. Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation. Elsevier; 2017.
- [85] Boskey AL, Mendelsohn R. Infrared spectroscopic characterization of mineralized tissues. *Vib Spectrosc* 2005;38:107–14. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2005.02.015>.

- [86] Rodríguez-Navarro A, Romanek C, Alvarez-Lloret P, Gaines K. Effect of in ovo exposure to PCBs and Hg on clapper rail bone mineral chemistry from a contaminated salt marsh in coastal Georgia. *Environ Sci Technol* 2006;40:4936–42. <https://doi.org/10.1021/es060769x>.
- [87] Miller LM, Vairavamurthy V, Chance MR, Mendelsohn R, Paschalis EP, Betts F, et al. In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared micro-spectroscopy of the ν_4 PO₄³⁻ vibration. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2001;1527:11–9. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(01\)00093-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(01)00093-9).
- [88] Holager J. Thermogravimetric examination of enamel and dentin. *J Dent Res* 1970;49:546–8.
- [89] Lim JJ, Liboff AR. Thermogravimetric analysis of dentin. *J Dent Res* 1972;51:509–14. <https://doi.org/10.1177/00220345720510024401>.
- [90] Elfersi S, Grégoire G, Sharrock P. Characterization of sound human dentin particles of sub-millimeter size. *Dent Mater* 2002;18:529–34. <https://doi.org/10.1586/ecp.10.28>.
- [91] Kim SH, Lee CM, Kafle K. Characterization of crystalline cellulose in biomass: Basic principles, applications, and limitations of XRD, NMR, IR, Raman, and SFG. *Korean J Chem Eng* 2013;30:2127–41. <https://doi.org/10.1007/s11814-013-0162-0>.
- [92] Reyes-Gasga J, Martínez-Piñeiro EL, Rodríguez-Álvarez G, Tiznado-Orozco GE, García-García R, Brès EF. XRD and FTIR crystallinity indices in sound human tooth enamel and synthetic hydroxyapatite. *Mater Sci Eng C* 2013;33:4568–74. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.014>.
- [93] Gadaleta SJ, Paschalis EP, Betts F, Mendelsohn R, Boskey AL. Fourier transform infrared spectroscopy of the solution-mediated conversion of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite: New correlations between X-ray diffraction and infrared data. *Calcif Tissue Int* 1996;58:9–16. <https://doi.org/10.1007/BF02509540>.
- [94] Razavi SB, Hoang D, Kuzyakov Y. *Zymography: methods and protocols*. 2017.
- [95] Wegehaupt FJ, Widmer R, Attin T. Is bovine dentine an appropriate substitute in abrasion studies? *Clin Oral Investig* 2010;14:201–5. <https://doi.org/10.1007/s00784-009-0283-3>.

- [96] White DJ. The application of in vitro models to research on demineralization and remineralization of the teeth. *Adv Dent Res* 1995;9:175–93.
- [97] Pacheco LF, Banzi EC de F, Rodrigues E, Soares LES, Pascon FM, Correr-Sobrinho L, et al. Molecular and structural evaluation of dentin caries-like lesions produced by different artificial models. *Braz Dent J* 2013;24:610–8. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302357>.
- [98] Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine in situ. *Caries Res* 2003;37:339–44. <https://doi.org/10.1159/000072165>.
- [99] De Dios Teruel J, Alcolea A, Hernández A, Ruiz AJO. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Arch Oral Biol* 2015;60:768–75. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.01.014>.
- [100] Silva Soares LE, Do Espírito Santo AM. Morphological and chemical comparative analysis of the human and bovine dentin-adhesive layer. *Microsc Microanal* 2015;21:204–13. <https://doi.org/10.1017/S143192761401366X>.
- [101] Falla-Sotelo FO, Rizzutto MA, Tabacniks MH, Added N, Barbosa MDL, Markarian RA, et al. Analysis and discussion of trace elements in teeth of different animal species. *Brazilian J Phys* 2005;35:761–2. <https://doi.org/10.1590/S0103-97332005000500010>.
- [102] Soares LES, Campos ADF, Martin AA. Human and bovine dentin composition and its hybridization mechanism assessed by FT-Raman spectroscopy. *J Spectrosc* 2013;1. <https://doi.org/10.1155/2013/210671>.
- [103] Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *Journal-Canadian Dent Assoc* 2003;69:722–5.
- [104] Ito A, Maekawa K, Tsutsumi S, Ikazaki F, Tateishi T. Solubility product of OH-carbonated hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 1997;36:522–8. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19970915\)36:4<522::AID-JBM10>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19970915)36:4<522::AID-JBM10>3.0.CO;2-C).
- [105] Ortiz-Ruiz AJ, Teruel-Fernández J de D, Alcolea-Rubio LA, Hernández-Fernández A, Martínez-Beneyto Y, Gispert-Guirado F. Structural differences in enamel and dentin in human, bovine, porcine, and ovine teeth. *Ann Anat* 2018;218:7–17.

- <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2017.12.012>.
- [106] Barralet JE, Best S, Bonfield W. Carbonate substitution in precipitated hydroxyapatite: An investigation into the effects of reaction temperature and bicarbonate ion concentration. *J Biomed Mater Res* 1998;41:79–86.
- [107] Rey C, Collins B, Goehl T, Dickson IR, Glimcher MJ. The carbonate environment in bone mineral: A resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy study. *Calcif Tissue Int* 1989;45:157–64. <https://doi.org/10.1007/BF02556059>.
- [108] Donnelly E, Boskey AL, Baker SP, van der Meulen MCH. Effects of tissue age on bone tissue material composition and nanomechanical properties in the rat cortex. *J Biomed Mater Res Part A* 2010;92:1048–56. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32442>.
- [109] Kinney J, Balooch M, Haupt D, Marshall Jr. S, Marshall Jr G. Mineral Distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. *J Dent Res* 1995;74:1179–84.
- [110] Almahdy A, Downey FC, Sauro S, Cook RJ, Sherriff M, Richards D, et al. Microbiochemical analysis of carious dentine using raman and fluorescence spectroscopy. *Caries Res* 2012;46:432–40. <https://doi.org/10.1159/000339487>.
- [111] Cazalbou S, Combes C, Eichert D, Rey C, Glimcher MJ. Poorly crystalline apatites: evolution and maturation in vitro and in vivo. *J Bone Min Metab* 2004;22:310–7. <https://doi.org/10.1007/s00774-004-0488-0>.
- [112] Dominguez-Gasca N, Benavides-Reyes C, Sánchez-Rodríguez E, Rodríguez-Navarro AB. Changes in avian cortical and medullary bone mineral composition and organization during acid-induced demineralization. *Eur J Mineral* 2019;31:209–16. <https://doi.org/10.1127/ejm/2019/0031-2826>.
- [113] Ryou H, Amin N, Ross A, Eidelman N, Wang DH, Romberg E, et al. Contributions of microstructure and chemical composition to the mechanical properties of dentin. *J Mater Sci Mater Med* 2011;22:1127–35. <https://doi.org/10.1007/s10856-011-4293-8>.
- [114] Ferreira M, Carvalho F De, Neiva C, Cochrane S, Burrow MF, Novais VR, et al. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Caries Res* 2000;45:339–44. [https://doi.org/10.1016/S0003-9969\(00\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S0003-9969(00)00006-6).

- [115] Camargo CHR, Siviero M, Camargo SEA, de Oliveira SHG, Carvalho CAT, Valera MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. *J Endod* 2007;33:422–6.
<https://doi.org/10.1016/J.JOEN.2006.12.011>.
- [116] Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, et al. Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990-2015: A systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. *J Dent Res* 2017;96:380–7. <https://doi.org/10.1177/0022034517693566>.
- [117] Elkassas D, Arafa A. The innovative applications of therapeutic nanostructures in dentistry. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med* 2017;13:1543–62.
<https://doi.org/10.1016/J.NANO.2017.01.018>.
- [118] Cai Y, Tang R. Calcium phosphate nanoparticles in biomineralization and biomaterials. *J Mater Chem* 2008;18:3775–87.
<https://doi.org/10.1039/b805407j>.
- [119] Bedran-Russo AKB, Castellan CS, Shinohara MS, Hassan L, Antunes A. Characterization of biomodified dentin matrices for potential preventive and reparative therapies. *Acta Biomater* 2011;7:1735–41.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.12.013>.
- [120] Vidal CMP, Leme AA, Aguiar TR, Phansalkar R, Nam JW, Bisson J, et al. Mimicking the hierarchical functions of dentin collagen cross-links with plant derived phenols and phenolic acids. *Langmuir* 2014;30:14887–93.
<https://doi.org/10.1021/la5034383>.
- [121] Liu Y, Bai X, Li S, Liu Y, Keightley A, Wang Y. Molecular weight and galloylation affect grape seed extract constituents' ability to cross-link dentin collagen in clinically relevant time. *Dent Mater* 2015;31:814–21.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.04.006>.
- [122] Leme-Kraus AA, Aydin B, Vidal CMP, Phansalkar RM, Nam JW, McAlpine J, et al. Biostability of the proanthocyanidins-dentin complex and adhesion studies. *J Dent Res* 2017;96:406–12. <https://doi.org/10.1177/0022034516680586>.
- [123] Liu Y, Dusevich V, Wang Y. Proanthocyanidins rapidly stabilize the demineralized dentin layer. *J Dent Res* 2013;92:746–52.

- <https://doi.org/10.1177/0022034513492769>.
- [124] Liu Y, Chen M, Yao X, Xu C, Zhang Y, Wang Y. Enhancement in dentin collagen's biological stability after proanthocyanidins treatment in clinically relevant time periods. *Dent Mater* 2013;29:485–92.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.01.013>.
- [125] Scheffel D, Hebling J, Scheffel R, Agee K, Turco G, de Souza Costa C, et al. Inactivation of matrix-bound matrix metalloproteinases by cross-linking agents in acid-etched dentin. *Oper Dent* 2014;39:152–8. <https://doi.org/10.2341/12-425-l>.
- [126] Epasinghe DJ, Yiu CKY, Burrow MF, Hiraishi N, Tay FR. The inhibitory effect of proanthocyanidin on soluble and collagen-bound proteases. *J Dent* 2013;41:832–9. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.06.002>.
- [127] Kojima K, Maki K, Tofani I, Kamitani Y, Kimura M. Effects of grape seed proanthocyanidins extract on rat mandibular condyle. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2004;4:301–7. https://doi.org/10.2504/kds.58.188_2.
- [128] Tang CF, Fang M, Liu RR, Dou Q, Chai ZG, Xiao YH, et al. The role of grape seed extract in the remineralization of demineralized dentine: Micromorphological and physical analyses. *Arch Oral Biol* 2013;58:1769–76.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.09.007>.
- [129] Epasinghe DJ, Burrow MF, Yiu CKY. Effect of proanthocyanidin on ultrastructure and mineralization of dentine collagen. *Arch Oral Biol* 2017;84:29–36.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.09.012>.
- [130] Hass V, Luque-Martinez IV, Gutierrez MF, Moreira CG, Gotti VB, Feitosa VP, et al. 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;32:732–41.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.03.008>.
- [131] Yamakoshi J, Saito M, Kataoka S, Kikuchi M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food Chem Toxicol* 2002;40:599–607. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00006-6).
- [132] Han B, Jaurequi J, Bao Wei T, Nimni ME. Proanthocyanidin: A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. *J Biomed Mater Res Part A*

- 2003;65A:118–24. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10460>.
- [133] Besinis A, Van Noort R, Martin N. Infiltration of demineralized dentin with silica and hydroxyapatite nanoparticles. *Dent Mater* 2012;28:1012–23. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2012.05.007>.
- [134] Zhou R, Si S, Zhang Q. Water-dispersible hydroxyapatite nanoparticles synthesized in aqueous solution containing grape seed extract. *Appl Surf Sci* 2012;258:3578–83. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.11.119>.
- [135] Zhou J, Chiba A, Scheffel DLS, Hebling J, Agee K, Tagami J, et al. Cross-linked dry bonding: A new etch-and-rinse technique. *Dent Mater* 2016;32:1124–32. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.06.014>.
- [136] Castellan CS, Bedran-Russo AK, Karol S, Pereira PNR. Long-term stability of dentin matrix following treatment with various natural collagen cross-linkers. *J Mech Behav Biomed Mater* 2011;4:1343–50. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.05.003>.
- [137] Delgado-López JM, Iafisco M, Rodríguez I, Tampieri A, Prat M, Gómez-Morales J. Crystallization of bioinspired citrate-functionalized nanoapatite with tailored carbonate content. *Acta Biomater* 2012;8:3491–9. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.04.046>.
- [138] Enrich-Essvein T, Benavides-Reyes C, Álvarez-Lloret P, Bolaños-Carmona MV, Rodríguez-Navarro AB, González-López S. Influence of de-remineralization process on chemical, microstructural, and mechanical properties of human and bovine dentin. *Clin Oral Investig* 2020;25:841–9. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03371-9>.
- [139] Fulmer MT, Ison IC, Hankermayer CR, Constantz BR, Ross J. Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites. *Biomaterials* 2002;23:751–5. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00180-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00180-6).
- [140] Liu Y, Dusevich V, Wang Y. Addition of grape seed extract renders phosphoric acid a collagen-stabilizing etchant. *J Dent Res* 2014;93:821–7. <https://doi.org/10.1177/0022034514538972>.
- [141] Aydin B, Leme-Kraus AA, Vidal CMP, Aguiar TR, Phansalkar RS, Nam JW, et al. Evidence to the role of interflavan linkages and galloylation of proanthocyanidins at sustaining long-term dentin biomodification. *Dent Mater*

- 2019;35:328–34. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.11.029>.
- [142] Cai J, Burrow MF, Manton DJ, Tsuda Y, Sobh EG, Palamara JEA. Effects of silver diamine fluoride/potassium iodide on artificial root caries lesions with adjunctive application of proanthocyanidin. *Acta Biomater* 2019;88:491–502. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.02.020>.
- [143] Silva APP da, Gonçalves RS, Borges AFS, Bedran-Russo AK, Shinohara MS. Effectiveness of plant-derived proanthocyanidins on demineralization on enamel and dentin under artificial cariogenic challenge. *J Appl Oral Sci* 2015;23:302–9. <https://doi.org/10.1590/1678-775720140304>.
- [144] Epasinghe DJ, Yiu CKY, Burrow MF. Synergistic effect of proanthocyanidin and CPP-ACFP on remineralization of artificial root caries. *Aust Dent J* 2015;60:463–70. <https://doi.org/10.1111/adj.12249>.
- [145] Epasinghe DJ, Kwan S, Chu D, Mei ML, Burrow MF, Yiu CKY. Synergistic effects of proanthocyanidin, tri-calcium phosphate and fluoride on artificial root caries and dentine collagen. *Mater Sci Eng C* 2017;73:293–9. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.078>.
- [146] Perdigão J, Reis A, Loguercio AD. Dentin adhesion and MMPs: A comprehensive review. *J Esthet Restor Dent* 2013;25:219–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jerd.12016>.
- [147] Cadenaro M, Josic U, Maravić T, Mazzitelli C, Marchesi G, Mancuso E, et al. Progress in dental adhesive materials. *J Dent Res* 2023;102:254–62. <https://doi.org/10.1177/00220345221145673>.
- [148] de Paula DM, Lomonaco D, Parente da Ponte AM, Cordeiro KE, Magalhães Moreira M, Giovarruscio M, et al. Collagen cross-linking lignin improves the bonding performance of etch-and-rinse adhesives to dentin. *Materials (Basel)* 2022;15. <https://doi.org/10.3390/ma15093218>.
- [149] Maravic T, Breschi L, Comba A, Cunha SR, Angeloni V, Nucci C, et al. Experimental use of an acrolein-based primer as collagen cross-linker for dentine bonding. *J Dent* 2018;68:85–90. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.11.006>.
- [150] Liu R, Fang M, Xiao Y, Li F, Yu L, Zhao S, et al. The effect of transient proanthocyanidins preconditioning on the cross-linking and mechanical

- properties of demineralized dentin. *J Mater Sci Mater Med* 2011;22:2403–11.
<https://doi.org/10.1007/s10856-011-4430-4>.
- [151] Fang M, Liu R, Xiao Y, Li F, Wang D, Hou R, et al. Biomodification to dentin by a natural crosslinker improved the resin–dentin bonds. *J Dent* 2012;40:458–66.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.02.008>.
- [152] Enrich-Essvein T, Rodríguez_Navarro AB, Álvarez-Lloret P, Cifuentes-Jiménez C, Bolaños-Carmona M V., González López S. Proanthocyanidin-functionalized hydroxyapatite nanoparticles as dentin biomodifier. *Dent Mater* 2021;37:1437–45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.dental.2021.07.002>.
- [153] Yu J, Zhang Z, Guo R, Peng W, Yang H, Huang C. Epigallocatechin-3-gallate/nanohydroxyapatite platform delivery approach to adhesive-dentin interface stability. *Mater Sci Eng C* 2021;122:111918.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.111918>.
- [154] Zhao S, Hua F, Yan J, Yang H, Huang C. Effects of plant extracts on dentin bonding strength: A systematic review and meta-analysis. *Front Bioeng Biotechnol* 2022;10. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.836042>.
- [155] Meerbeek B Van, Yoshihara K, Landuyt K Van, Yoshida Y, Peumans M. From Buonocore ' s pioneering acid-etch technique to self-adhering restoratives . A status perspective of rapidly advancing dental adhesive technology. *J Adhes Dent* 2020;22:7–34. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a43994>.
- [156] Rolim DCM, Souza LC, Hass V, Silva PGB, Signori C, Cenci MS, et al. Effect of cross-linker's incorporation into two adhesive systems with self-etch mode applied on sound and caries-affected dentin. *Int J Adhes Adhes* 2022;113.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2021.103074>.
- [157] Silva Sousa AB, Vidal CMP, Leme-Kraus AA, Pires-de-Souza FCP, Bedran-Russo AK. Experimental primers containing synthetic and natural compounds reduce enzymatic activity at the dentin–adhesive interface under cyclic loading. *Dent Mater* 2016;32:1248–55. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2016.07.012>.
- [158] Dávila-Sánchez A, Gutierrez MF, Bermudez JP, Méndez-Bauer ML, Hilgemberg B, Sauro S, et al. Influence of flavonoids on long-term bonding stability on caries-affected dentin. *Dent Mater* 2020;36:1151–60.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2020.05.007>.

- [159] Cai J, Burrow MF, Manton DJ, Hardiman R, Palamara JEA. Remineralising effects of fluoride varnishes containing calcium phosphate on artificial root caries lesions with adjunctive application of proanthocyanidin. *Dent Mater* 2021;37:143–57.
- [160] Chen H, Sun G, Wang H, Yu S, Tian Z, Zhu S. Effect of collagen cross-linkers on dentin bond strength: A systematic review and network meta-analysis. *Front Bioeng Biotechnol* 2023;10:1–19.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1100894>.
- [161] Mendes TAD, Pascoal SCD, Estellita MCA, Lemos MVS, Silva PG de B, Mendonça JS. Effect of grape seed extract on stability of restorations with composites resin: A systematic review and meta-analysis. *Int J Adhes Adhes* 2022;113:2–10.
<https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2021.103039>.
- [162] de Souza LC, Rodrigues NS, Cunha DA, Feitosa VP, Santiago SL, Reis A, et al. Two-year clinical evaluation of proanthocyanidins added to a two-step etch-and-rinse adhesive. *J Dent* 2019;81:7–16. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.12.012>.
- [163] Wagner A, Belli R, Stötzel C, Hilpert A, Müller FA, Lohbauer U. Biomimetically- and hydrothermally-grown HAp nanoparticles as reinforcing fillers for dental adhesives. *J Adhes Dent* 2013;15:413–22. <https://doi.org/10.3290/j.jad.a29534>.
- [164] Sadat-Shojai M, Atai M, Nodehi A, Khanlar LN. Hydroxyapatite nanorods as novel fillers for improving the properties of dental adhesives: Synthesis and application. *Dent Mater* 2010;26:471–82.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.01.005>.
- [165] Leitune VCB, Collares FM, Trommer RM, Andrioli DG, Bergmann CP, Samuel SMW. The addition of nanostructured hydroxyapatite to an experimental adhesive resin. *J Dent* 2013;41:321–7.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.01.001>.
- [166] Gonapa P, Sajjan GS, Bhupathi A, Podugu UK, Sundar S, Gondi D, et al. Evaluation of bond durability, surface morphology, and remineralization at the adhesive interface with dentin bonding agents modified with silica-doped nanohydroxyapatite. *Contemp Clin Dent* 2022.
https://doi.org/https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_321_21.
- [167] Gurucharan I, Derick Isaac D, Madhubala M, Vijay Amirtharaj L, Mahalaxmi S,

- Jayasree R, et al. Effect of chitosan and hydroxyapatite nanocomposite on dentin erosion: An in-vitro study. *J Int Oral Heal* 2022;14:509–17.
https://doi.org/https://doi.org/10.4103/jioh.jioh_50_22.
- [168] Escalante-Otárola WG, Castro-Núñez GM, Jordão-Basso KCF, Guimarães BM, Palma-Dibb RG, Kuga MC. Evaluation of dentin desensitization protocols on the dentinal surface and their effects on the dentin bond interface. *J Dent* 2018;75:98–104. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2018.06.002>.
- [169] Meng Y, Huang F, Wang S, Li M, Lu Y, Pei D, et al. Bonding performance of universal adhesives applied to nano-hydroxyapatite desensitized dentin using etch-and-rinse or self-etch mode. *Materials (Basel)* 2021;14.
<https://doi.org/10.3390/ma14164746>.
- [170] Seseogullari-Dirihan R, Apollonio F, Mazzoni A, Tjaderhane L, Pashley D, Breschi L, et al. Use of crosslinkers to inactivate dentin MMPs. *Dent Mater* 2016;32:423–32. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2015.12.012>.
- [171] Josic U, Mazzitelli C, Maravic T, Comba A, Cadenaro M, Radovic I, et al. The effect of carbodiimide on push-out bond strength of fiber posts and endogenous enzymatic activity. *BMC Oral Health* 2023;23:1–12.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12903-023-03067-y>.

Financiación

Los estudios presentes en esta tesis doctoral fueron financiados por los proyectos: CGL2015-64683-P, PGC2018-102047-B y PID2020-116660GB-100 del Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España y A-RNM-408-UGR20 de la Junta de Andalucía.

Aportaciones científicas

PUBLICACIONES QUE FORMAN PARTE DE ESTA TESIS DOCTORAL

- Enrich-Essvein, Tattiana; Benavides-Reyes, Cristina; Álvarez-Lloret, Pedro; Victoria Bolaños-Carmona, María; Rodríguez-Navarro, Alejandro B.; González-López, Santiago. **Influence of de-mineralization process on chemical, microstructural, and mechanical properties of human and bovine dentin.** Clinical Oral Investigations. 2021. <https://doi.org/10.1007/S00784-020-03371-9>
- Enrich-Essvein, Tattiana; Rodríguez-Navarro, Alejandro B.; Álvarez-Lloret, Pedro; Cifuentes-Jiménez, Carolina; Bolaños-Carmona, María, V; González-López, Santiago. **Proanthocyanidin-functionalized hydroxyapatite nanoparticles as dentin biomodifier.** Dental Materials. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.DENTAL.2021.07.002>
- Tattiana Enrich-Essvein, Santiago González-López, Alejandro B. Rodríguez-Navarro, Carolina Cifuentes-Jiménez, Tatjana Maravic, Claudia Mazzitelli, Vittorio Checchi, Uros Josic, Annalisa Mazzoni, Lorenzo Breschi. **Proanthocyanidin-Functionalized Hydroxyapatite Nanoparticles as a Dentin Primer.** En revisión – Dental Materials (en 21/01/2024).

OTRAS PUBLICACIONES

- Cifuentes-Jiménez, C.C.; Bolaños-Carmona, M.V.; Enrich-Essvein, T.; González-López, S.; Álvarez-Lloret, P. **Evaluation of the remineralizing capacity of silver diamine fluoride on demineralized dentin under ciclaje de pH conditions.** Journal of Applied Oral Science. 2023. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2022-0306>

COMUNICACIONES EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

- 2023: Comunicación Oral y Póster: “Effects of Proanthocyanidin-Functionalized Hydroxyapatite Nanoparticles on Dentin Bonding.” (CED/NOF-IADR Oral Health Research Congress, Rhodes, Greece).
- 2022: Póster: “Biosíntesis y propiedades mecánicas de nanopartículas de plata producidas por tecnología verde”. (XXIV Congreso Nacional y XI Internacional de la Sociedad Española de Odontología Conservadora y Estética, Pamplona, España).
- 2019: Póster: “Chemical and mechanical composition of bovine and human dentin.” (CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress, Madrid, Spain).

ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN

- Estancia de 3 meses en la Universidad de Bologna, Italia. Supervisada por el Profesor Lorenzo Breschi, del Departamento de Ciencias Biomédicas y Neuromotoras (DIBINEM).

PROYECTOS

- De los biocristales a las conchas ¿qué factores controlan la organización y el crecimiento a diferentes niveles? 2021 – 2024. (PID2020-116660GB-I00 - Programas Estatales de Generación de Conocimiento y Fortalecimiento Científico y Tecnológico del Sistema de I+D+i y de I+D+i Orientada a los Retos de la Sociedad).
- Factores que controlan los procesos de desmineralización de tejidos óseos. 2020-2023. (FEDER A-RNM-408-UGR20 – Proyectos I+D+i del Programa Operativo FEDER 2020).

- Eficacia antimicrobiana y de remineralización de nanopartículas metálicas obtenidas mediante la tecnología verde. 2021. (Proyectos de Investigación Precompetitivos del Plan Propio de Investigación de la Universidad de Granada, España).

PREMIOS Y BECAS

- 2023: Ayuda CED-IADR Travel Award 2023 con el trabajo: “Effects of Proanthocyanidin-Functionalized Hydroxyapatite Nanoparticles on Dentin Bonding.” (CED/NOF-IADR Oral Health Research Congress, Rhodes, Greece).
- 2022: Ayudas de Movilidad Internacional de Estudiantes de Doctorado a la Universidad de Bologna (Universidad de Granada, España).
- 2022: Premio por mejor artículo científico relacionado con la odontología conservadora publicado en revistas científicas en 2020/2021: “Proanthocyanidin-functionalized hydroxyapatite nanoparticles as dentin biomodifier” (XXIV Congreso Nacional y XI Internacional SEOC, España).