

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA**



**EFICACIA ADHESIVA Y  
CARACTERIZACIÓN DE LA DENTINA  
TEMPORAL TRAS DIFERENTES  
PROCEDIMIENTOS  
ACONDICIONADORES Y MÉTODOS  
DE DEGRADACIÓN**

**TESIS DOCTORAL  
PILAR ROMERO OTERO  
Granada 2008**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Pilar Romero Otero  
D.L.: Gr. 1978-2008  
ISBN: 978-84-691-5987-3

Manuel Toledano Pérez, Profesor Titular del Departamento de Estomatología de la Universidad de Granada, certifica que ha dirigido la Tesis Doctoral titulada “EFICACIA ADHESIVA Y CARACTERIZACIÓN DE LA DENTINA TEMPORAL TRAS DIFERENTES PROCEDIMIENTOS ACONDICIONADORES Y MÉTODOS DE DEGRADACIÓN“ cuya autora es Pilar Romero Otero.

Fdo.: Prof. D. Manuel Toledano Pérez

Raquel Osorio Ruiz, Profesora Titular del Departamento de Estomatología de la Universidad de Granada, certifica que ha dirigido la Tesis Doctoral titulada ‘EFICACIA ADHESIVA Y CARACTERIZACIÓN DE LA DENTINA TEMPORAL TRAS DIFERENTES PROCEDIMIENTOS ACONDICIONADORES Y MÉTODOS DE DEGRADACIÓN‘ cuya autora es Pilar Romero Otero.

Fdo.: Prof<sup>a</sup>. Dña. Raquel Osorio Ruiz

Martin Romero Maroto, Profesor Titular del Departamento de Ciencias de la Salud III de la Facultad de Odontología de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid ha dirigido la Tesis Doctoral titulada ‘EFICACIA ADHESIVA Y CARACTERIZACIÓN DE LA DENTINA TEMPORAL TRAS DIFERENTES PROCEDIMIENTOS ACONDICIONADORES Y MÉTODOS DE DEGRADACIÓN“ cuya autora es Pilar Romero Otero.

Fdo.: Prof. D. Martin Romero Maroto

## **AGRADECIMIENTOS**

A los Dres. D. Manuel Toledano Pérez y Dña. Raquel Osorio Ruiz, por su colaboración y consejo como directores de esta tesis doctoral. Este trabajo no habría sido posible sin la disponibilidad de los recursos técnicos y humanos ofrecidos por el grupo de investigación que ellos dirigen.

Al Dr. D. Martin Romero Maroto, co-director de este tesis, por su apoyo y consejo para la realización del presente estudio y en general en mi vida académica y personal.

A la Dra. Dña Fátima Sánchez Aguilera por su ayuda inestimable e imprescindible en el desarrollo de esta investigación, su afabilidad y continuo ánimo durante todos estos años.

A la Dra. Dña Estrella Osorio Ruiz por su colaboración con el microscopio de fuerzas atómicas, por su paciencia y buena disposición para las explicaciones.

A Dña. Gertrudis Villaescusa por su colaboración técnica en el laboratorio.

Al proyecto de investigación CICYT/FEDER MAT2004-06872-C03-02, dentro del que se ha desarrollado este trabajo.

A mi marido, Antonio, por su paciencia, cariño, comprensión y apoyo durante la realización de este trabajo.

*A mi MADRE por su incondicionalidad, su fuerza, estímulo y tenacidad,  
apoyo continuo en mi vida.*

## **INDICE**

1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. CARACTERIZACIÓN DE LA DENTINA TEMPORAL	16
1.1.1 Estructura histológica de la dentina	16
Túbulos dentinarios	16
Matriz intertubular	19
1.1.2 Composición química de la dentina	19
Fase orgánica	19
Fase mineral	20
1.2. ADHESIÓN DE LOS POLÍMEROS A LA DENTINA TEMPORAL	22
1.2.1 Concepto de adhesión y su proyección en Odontología pediátrica	22
1.2.2 Mecanismo de adhesión a la dentina temporal.	23
1.2.2.1 Barrillo dentinario	23
1.2.2.2 Tratamiento del sustrato dentinario para la adhesión.	25
1.2.2.2.1 Acondicionamiento del sustrato. Grabado ácido de la dentina	25
1.2.2.2.2 Imprimación del sustrato acondicionado	28
1.2.2.2.3 Impregnación del sustrato	28
1.2.3 Clasificación de los sistemas adhesivos	31
1.2.3.1 Adhesivos que modifican el barrillo dentinario	31
1.2.3.2 Adhesivos que eliminan el barrillo dentinario	32
1.2.3.3 Adhesivos que disuelven el barrillo dentinario	34
1.3 METODOS DE MEDIDA DE LA EFICACIA ADHESIVA DE LOS POLÍMEROS A LA DENTINA TEMPORAL.	36
1.3.1 Resistencia adhesiva. Test de microtensión.	36
1.3.2 Tests de degradación de la interfaz <i>in vitro</i> .	37
1.3.2.1 Degradación química	39
1.3.2.2 Degradación mecánica	40
1.4. MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS (AFM) EN DENTINA TEMPORAL	41
1.5 MICRODUREZA DEL SUBSTRATO DENTINARIO	42
2. OBJETIVOS	45
3. MATERIAL Y MÉTODO	47

3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LA SUPERFICIE DENTINARIA TEMPORAL	48
3.1.1. Ensayo de microdureza	50
3.1.2. Ensayo de rugosidad	51
3.2 ESTUDIO DE LA EFICACIA ADHESIVA	52
3.2.1 Eficacia adhesiva inmediata	52
3.2.2 Estudio <i>in vitro</i> de la longevidad de la interfaz adhesiva	56
3.2.2.1 Degradación química de la interfaz adhesiva	56
3.2.2.2 Degradación mecánica de la interfaz de adhesión	56
3.2.3 Análisis fractográfico	57
3.2.4 Análisis estadístico	57
4. RESULTADOS	59
4.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LA SUPERFICIE DENTINARIA TEMPORAL	60
4.1.1. Rugosidad	60
4.1.2. Microscopía de fuerzas atómicas (AFM)	61
4.1.3. Microdureza	63
4.2 RESISTENCIA ADHESIVA DE LA INTERFAZ	64
4.2.1 Resistencia adhesiva a la microtensión 24 horas	65
4.2.2 Resistencia adhesiva tras degradación química	65
4.2.3 Resistencia adhesiva tras degradación mecánica	65
4.2.4. Análisis fractográfico	65
4.2.5. Microscopía electrónica de barrido (MEB)	66
5. DISCUSIÓN	75
6. CONCLUSIONES	93
7. BIBLIOGRAFÍA	95

## **1. INTRODUCCIÓN**

El desarrollo de las técnicas adhesivas durante las últimas décadas es la base de la Odontología Moderna. En la actualidad, y debido a los avances en los procedimientos adhesivos dentarios, es posible restaurar lesiones cariosas o traumáticas de un modo mucho más conservador y respetuoso con el órgano dentario. Asimismo, se han simplificado los tratamientos ortodóncicos gracias a la posibilidad de adherir, directamente sobre los dientes, los brackets y otros aditamentos. La Odontología Preventiva se ha beneficiado, igualmente, con la aplicación de selladores de fisuras y el campo de la Odontología Estética oferta una amplia variedad de tratamientos fundamentados, en su mayoría, en técnicas de adhesión sobre el tejido dentario.

El desarrollo de dichas técnicas adhesivas tiene su origen en la técnica de grabado ácido de Buonocore, quien en 1955 demostró que las resinas acrílicas se unían a la superficie del esmalte tratado con ácido mediante un sistema de retención micromecánico, autorretentivo, como resultado de la penetración de la resina en los microporos del esmalte creados por el acondicionamiento con el ácido. A pesar de que este trabajo cambiaría el rumbo de la Odontología, pasó prácticamente desapercibido durante muchos años.

En el año 1962 Bowen desarrolló el Bis-GMA y las primeras resinas compuestas. Básicamente consisten en una matriz polimérica de resina reforzada con un relleno inorgánico unidos mediante un agente de unión silánico. Desde su introducción como material de restauración dental, los composites han sido objeto de diferentes modificaciones en su formulación con el fin de mejorar sus propiedades mecánicas y disminuir la contracción de polimerización. La aplicación clínica de estos materiales mediante la técnica del grabado ácido de la superficie dentaria ha provocado la revisión y reconsideración de los principios básicos y tradicionales en los que se había cimentado la Operatoria Dental, originando una nueva corriente que procura minimizar la destrucción indiscriminada de tejido dentario sano, eliminar las retenciones físicas, obtener una estética adecuada a la morfología y color del diente e integrarse en la estructura dentaria como una entidad constitutiva. Estas ventajas han convertido a los composites en material de elección para las restauraciones de los dientes permanentes así como de los dientes deciduos (Agostini y col., 2001, Kaaden y col., 2003).

La incapacidad de las resinas compuestas para adherir directamente al substrato dental, hace que la utilización de un sistema adhesivo sea un paso intermedio indispensable en los procedimientos clínicos para la aplicación de los composites. En general, estos sistemas adhesivos, constituidos por resinas, no consiguen una adhesión química al tejido dentario sino que se fundamentan en una adhesión micromecánica (Marshall y col., 1995; Van Meerbeek y col., 1998; Toledano y col., 1999), por lo que requieren un acondicionamiento previo del substrato para hacerlo microrretentivo.

El procedimiento adhesivo al tejido adamantino no plantea grandes problemas desde que Buonocore desarrollara su técnica de grabado ácido. De todos los tejidos duros dentarios, la unión resina-esmalte es, sin duda alguna, el procedimiento más fiable, predecible y duradero (De Munck y col., 2005; Miyazaki y col., 2000). Esto es debido al alto contenido mineral (95%) presente en el esmalte y a la disposición, en grandes cristales

de hidroxiapatita, que adopta esta fracción inorgánica (Angker y col., 2004b). El grabado con ácido de este tejido provoca la disolución parcial de los cristales minerales dando lugar a la formación de microporosidades a ese nivel. De este modo se obtiene una superficie de contacto mayor. A continuación del grabado del esmalte se aplica la resina, que debe penetrar correctamente en el esmalte grabado, lo cual es facilitado por el aumento de la rugosidad y de la energía superficial de la superficie adamantina tratada y por un fenómeno de capilaridad en los microporos creados. Una vez polimerizada, la resina conformará dentro de estos microporos adamantinos los *tags* de resina o interdigitaciones responsables de la microrretención mecánica.

Sin embargo, en la situación clínica, la dentina es el tejido que mayoritariamente se ve implicado en los procedimientos restauradores, quedando el esmalte en proporción mínima y en ocasiones ausente. La dentina es un tejido mineralizado de compleja naturaleza histológica al compararla con el esmalte. Frente a un componente inorgánico que supone la casi totalidad del volumen del esmalte, la dentina apenas va a contener el 50%. La hidroxiapatita constituye el 70% en peso de este componente inorgánico (Hart y Hart, 2007) pero, al contrario que en esmalte, no va a ser el elemento estructural primordial; siendo una matriz de colágeno la que actúe como trama estructural de la dentina. Además, la disposición espacial va a ser completamente diferente, dado que la hidroxiapatita aparece dispersa aleatoriamente en la trama colágena (Pidaparti y col., 1996), a diferencia de la disposición cristalina del esmalte. A todo ello hay que añadir el porcentaje de agua contenido en la dentina que supone el 10% del total en peso, muchísimo más elevado que el contenido en el esmalte.

Otro factor de gran importancia es la existencia de estructuras tubulares en todo el espesor de la dentina que alojan a las prolongaciones citoplasmáticas de los odontoblastos, perdiéndose el carácter compacto del esmalte para convertirse en una estructura porosa, en la cual se van a diferenciar dos tipos de dentina, una que bordea los orificios de los túbulos, denominada peritubular, y la dentina que está conectando las luces tubulares, o intertubular. La diferencia entre ambas, reside en el grado de mineralización, apareciendo más mineralizada la dentina peritubular (Hirayama, 1990; Angker y col., 2004b). Al cortar la dentina, se seccionan miles de prolongaciones odontoblásticas, quedando su contenido protoplasmático expuesto al exterior. Es por ello que ante el corte mecánico de los túbulos dentinarios durante el procedimiento operatorio, cualquier material que se use como obturador tendrá sus efectos sobre el tejido pulpar e igualmente las extremidades de los odontoblastos seccionados y el fluido dentinario repercutirán con dicho material restaurador.

Además, como consecuencia del procedimiento operatorio se va a originar una capa de detritus formada por restos tisulares, componentes salivares del paciente, bacterias y otros residuos del tallado conocido como barrillo dentinario o *smear layer* (Van Meerbeek y col., 1993a), que adquiere una especial relevancia en el proceso de adhesión a la dentina. Esta capa cubre toda la superficie de la dentina, introduciéndose en el interior de los túbulos dentinarios y adhiriéndose a ella mediante fuerzas débiles de Van der Waals. El barrillo dentinario interfiere en la adhesión a dentina, al evitar la utilización de las microrretenciones que suponen los túbulos dentinarios pero, por otro lado, forma un tapón fisiológico de protección pulpar, ya que dificulta el paso de sustancias nocivas y

microorganismos hacia la pulpa a través de dichos túbulos. Este efecto protector va a depender de la integridad y permeabilidad del barrillo (Sano y col., 1999; Tay y col., 2000; Toledano y col., 2003).

En la actualidad, los sistemas adhesivos se clasifican según su mecanismo de interacción con dicho barrillo dentinario (Van Meerbeek y col., 2003): los sistemas adhesivos basados en la técnica de grabar y lavar utilizan ácido fosfórico, en concentraciones entre el 30 y 40% para acondicionar la dentina y el esmalte de forma previa a la aplicación del sistema adhesivo. El grabado ácido de la dentina elimina el barrillo dentinario y abre los túbulos dentinarios. Los sistemas autograbadores, no requieren un paso separado de grabado ácido y no eliminan el barrillo sino que producen una modificación de éste para permitir el acceso a la dentina subyacente (Van Meerbeek y col., 2003).

En un primer momento se pensaba que la resistencia de la unión a dentina venía dada por la penetración de la resina en el interior de los túbulos dentinarios expuestos, tras la acción de los agentes ácidos y los imprimadores. Este concepto, largo tiempo aceptado, parecía no mantenerse debido fundamentalmente al hecho de que no todos los sistemas disponibles eran capaces de exponer el lumen de los túbulos para que penetrasen las resinas. Se debe a Nakabayashi (1982) la introducción de un concepto que ha contribuido definitivamente a esclarecer las características de la interfaz dentina-adhesivo. Este autor utilizó el término de capa híbrida para designar a las estructuras que se observaban en la interfaz entre dentina y sistemas adhesivos, en la que se producía la hibridación de componentes pertenecientes a ambas fases, con el consiguiente refuerzo de la dentina por la acción de la resina. El hallazgo de Nakabayashi puso de manifiesto el papel de la dentina intertubular en la obtención de una interfaz de unión, independientemente del grado de penetración de las resinas en los túbulos. El grabado ácido sobre la superficie de la dentina va a exponer una trama orgánica esponjosa con elevado contenido en colágeno, cuyas propiedades resultan claramente inferiores a la hora de soportar los fenómenos mecánicos que acontecen en la interfaz restauradora. Es por ello que, en los primeros estudios de adhesión dentinaria, los valores de resistencia a la tracción, la cizalla o la comprensión eran claramente inferiores a los obtenidos en el esmalte con los procedimientos adhesivos convencionales. El problema básico consistía en la hidrofobicidad de los materiales utilizados, lo que repercutía en una humectación incompleta de la dentina, quedando de este modo la matriz de colágeno expuesta y desprotegida. Los imprimadores desarrollados posteriormente resultaron ser más hidrófilos, consiguiéndose ángulos de contacto adecuados para la dentina.

La capa híbrida continúa siendo investigada exhaustivamente, dado que se han descrito variaciones estructurales según los diferentes sistemas adhesivos empleados, que no están claramente explicadas. Sin embargo, parece mayoritariamente aceptado que se trata del mecanismo más eficaz para lograr la adhesión a dentina (Nakabayashi y Pashley, 1998; Van Meerbeek y col., 2003; Toledano y col., 2003). De este modo el planteamiento de los procedimientos clínicos para la obtención de la unión de los adhesivos dentales con la dentina se ha modificado paulatimamente para obtener la hibridación más eficaz posible entre el substrato y los materiales adhesivos y de restauración. Asimismo, el desarrollo de nuevos sistemas adhesivos permite la hibridación de la dentina mediante protocolos de

adhesión más cortos al tiempo que se reduce la sensibilidad a la técnica adhesiva. Estas condiciones hacen que el uso de estos sistemas sea una alternativa interesante en el campo de la operatoria dental infantil.

Una vez conseguida la adhesión, es necesario que ésta se mantenga en el tiempo, venciendo a los factores que tienden a romperla, como son: las tensiones debidas a los cambios dimensionales térmicos, las generadas por las cargas oclusales sobre el material y la solubilidad del adhesivo, al encontrarnos en un medio húmedo (Pashley y col., 2004; Sano y col., 1995a). En la actualidad, la efectividad adhesiva inmediata a dentina suele ser favorable en la mayoría de los sistemas adhesivos (De Munck y col., 2005), sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto que los valores adhesivos inmediatos a dentina no se correlacionan siempre con una estabilidad a largo plazo (Munck y col., 2005; Carrilho y col., 2005). En este sentido, los estudios muestran que la fuerza de adhesión a dentina disminuye durante el almacenamiento en agua a lo largo del tiempo (Gwinnet y Yu, 1995), debido a la degradación hidrolítica de la resina (Burrow y col., 1996) o de las fibras de colágeno desprotegidas dentro de la capa híbrida (Hashimoto y col., 2000b; De Munck y col., 2003; Wang y Spencer, 2003). Dicha degradación hidrolítica de las fibras de colágeno desprotegidas, ha sido también comprobada *in vivo* (Hashimoto y col., 2000b; Donmez y col., 2005). Estas fibras de colágeno desprotegidas están relacionadas con un proceso de desmineralización agresivo, tras el cual, se ve comprometida la impregnación por parte de los monómeros de resina, quedando así una zona debilitada en la base de la interfaz adhesiva (Sano y col., 1995a), resultando con el tiempo en la degradación de la unión (Pashley y col., 2004). Por ello, y a pesar de que la integridad de la adhesión se determina principalmente por los valores adhesivos iniciales, mediante los tests de resistencia adhesiva, la evaluación de la interfaz adhesiva debe realizarse a corto y a largo plazo si queremos obtener un correcto conocimiento de la naturaleza de dichas uniones y conseguir una adhesión duradera (De Munck y col., 2005).

La unión a dentina es, por tanto, un fenómeno complejo. Esta complejidad viene dada, en primer lugar, por el desconocimiento, aún hoy en día, de muchos de los factores que participan en el proceso; de manera continua surgen investigaciones nuevas relacionadas con el mecanismo de acción e interacciones de los sistemas adhesivos. No obstante, existen otros factores involucrados en el proceso de la adhesión, entre los que cabe destacar el substrato. El conocimiento de las propiedades y microestructura de las estructuras dentarias es esencial para el éxito de los tratamientos adhesivos dentarios (Hosoya y col., 2000; Marshall y col., 1997; Kinney y col., 2003a).

Durante mucho tiempo, la estructura y composición de los dientes temporales se ha considerado similar a la de los dientes permanentes, aplicando los mismos conocimientos y protocolos de la dentición definitiva sobre la dentición primaria. Sin embargo, publicaciones recientes permiten concluir que existen diferencias significativas entre ambas denticiones en su composición química y estructura morfológica (Kaden y col., 2003, Sumikawa y col., 1999, Nör y col., 1996, Hosoya y col., 2000). En este sentido la dentina primaria se describe con una mayor densidad de túbulos dentinarios (Sumikawa y col., 1999) respecto a la dentición permanente. Asimismo, se ha registrado que el espesor de la dentina peritubular temporal es entre dos y cinco veces superior, respecto a la permanente (Hirayama y col., 1986). Estas diferencias en la microestructura dentinaria conllevan una

reducción importante en el área de dentina disponible para la adhesión (Marshall y col., 1997).

En el mismo sentido, también se han registrado diferencias en la composición dentinaria entre ambas denticiones. La dentina temporal presenta un grado de mineralización menor respecto a la dentina permanente (Araujo y col., 1995, Johnsen, 1987). Este factor se ha relacionado con una mayor susceptibilidad al acondicionamiento dentinario mediante ácidos (Nör y col., 1996), aconsejándose una reducción de los tiempos de aplicación de éstos al actuar sobre dentina decidua (Nör y col., 1997). Asimismo, el descenso del contenido mineral unido al menor espesor de dentina que presentan los dientes deciduos deriva en un comportamiento mecánico claramente inferior (Hosoya y col., 2000; Hosoya, 2006a). Por todo ello, parece lógico pensar que estas diferencias en la composición y microestructura entre ambas denticiones impliquen que la naturaleza del sustrato así como sus propiedades actúen de modo diferente en relación a los procesos de adhesión, y posiblemente sean la causa de que numerosos estudios comparativos entre la dentición permanente y temporal obtengan valores de resistencia adhesiva claramente inferiores cuando se realiza adhesión en los dientes deciduos (Salama y Tao, 1991; Bordin-Akroyd y col., 1992; Jumlongras y White, 1997; Senawongse y col., 2004; Uekusa y col., 2006).

Como resultado de una adhesión defectuosa se puede producir microfiltración a nivel del margen de la restauración (Tay y col., 1995; Pashley y Carvalho, 1997), permitiendo el paso de bacterias y de componentes salivares por la interfaz restauración-diente, causando daños a la pulpa, desarrollo de caries secundarias y degradación de los márgenes de la restauración (Marshall, 1993a); comprometiéndose de este modo la duración de la restauración y la integridad dentaria (Hanning y Friedrichs, 2001). En el mismo sentido conviene destacar el proceso de nanofiltración. Este término fue introducido para describir un tipo específico de filtración, que se produce a nivel microscópico dentro de la capa híbrida y que está estrechamente relacionado con el procedimiento de grabado ácido de la dentina (Sano et al., 1995a; Armstrong et al., 2001; Wang y Spencer, 2003). Por lo tanto, el proceso de adhesión a nivel de la dentina pretende no sólo contribuir a la retención y estabilidad del material restaurador, sino que tiene la finalidad de sellar la superficie expuesta del complejo dentino-pulpar, intentando aislar la pulpa y las prolongaciones odontoblásticas del medio oral, con el fin de preservar la vitalidad pulpar, crucial para la evolución del diente restaurado. Preservar y mantener la dentición caduca va a ser decisivo para un correcto desarrollo de las funciones orofaciales en el niño, así como para el desarrollo de la dentición definitiva (Johnsen, 1987). Todas estas razones unido a la creciente demanda de asistencia odontológica en el paciente infantil, justifican que el sustrato dentinario temporal deba ser analizado de manera independiente en los procedimientos restauradores adhesivos (Hosoya, 2006a).

## 1.1. CARACTERIZACIÓN DE LA DENTINA TEMPORAL

La dentina es el eje estructural del diente y constituye el tejido mineralizado que conforma el mayor volumen del diente. En la porción coronaria se halla recubierta por el esmalte, mientras que en la región radicular está recubierta por el cemento. Interiormente, la dentina delimita una cavidad, la cámara pulpar, que contiene a la pulpa dental (único tejido blando del diente).

El espesor de la dentina varía según el diente analizado y la zona dentaria considerada (mayor en los bordes incisales o cuspídeos y menor en la raíz). Comparativamente respecto a la dentina permanente, el grosor de dentina es menor tanto en la corona como en la raíz del diente de leche (máximo de 2,5mm) (Hosoya y col., 2006b).

### 1.1.1 Estructura histológica de la dentina.

En la estructura de la dentina se pueden distinguir dos componentes básicos: la matriz mineralizada y los conductos o túbulos dentinarios que la atraviesan en todo su espesor y que alojan a los procesos odontoblásticos.

-Túbulos dentinarios.

Los túbulos dentinarios son estructuras cilíndricas delgadas que se extienden por todo el espesor de la dentina desde la pulpa hasta la unión amelodentinaria o cementodentinaria. Se asume que su longitud promedio oscila entre 1,5 y 2 mm (Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2002).

Los túbulos alojan en su interior a los procesos odontoblásticos que son las prolongaciones citoplasmáticas de las células especializadas llamadas odontoblastos, cuyos cuerpos se ubican en la región más periférica de la pulpa. Estas células producen la matriz colágena de la dentina y también participan en el proceso de calcificación de la misma, siendo por tanto, responsables de la formación y del mantenimiento de la dentina. Los procesos odontoblásticos determinan la morfología de los túbulos, que son más anchos en su base (cerca del cuerpo del odontoblasto) y terminan prácticamente en punta afilada; siguen un trayecto en "S" itálica y sus ramas laterales y terminales ocupan las ramificaciones de los túbulos dentinarios. Todavía no se conoce bien si el odontoblasto ocupa toda la longitud del túbulo o únicamente se limita a una parte de éste (Marshall y col., 1997).

Entre el proceso odontoblástico y la pared del túbulo hay un espacio denominado espacio periprocesal, ocupado por el fluido dentinal (que proviene de la sustancia intercelular de la pulpa). El proceso odontoblástico y el fluido dentinario son los responsables de la vitalidad de la dentina. En el espacio periprocesal penetran hasta cierta distancia, fibras nerviosas amielínicas provenientes de la pulpa; también pueden distinguirse algunas fibras de colágeno dispuestas circularmente, e incluso cristales de hidroxiapatita.

El fluido dentinario, que se comunica con el de la pulpa, circula por el espacio periprocesal y puede ocupar zonas dejadas libres por los odontoblastos. El volumen del fluido dentinario se ha calculado en un 10% del volumen de la dentina. La existencia de los túbulos dentinarios determina que la dentina sea muy permeable y constituyen una vía de ingreso de microorganismos.

Desde que en 1912 Noyes demostrara la relación existente entre la densidad tubular y el diámetro de los túbulos dentinarios, esta relación se ha convertido en campo de investigación, tanto en dentición permanente como en la temporal (Garberoglio y Brännström, 1976; Carrigan y col., 1984; Fosse y col., 1992; Kaga y col., 1997; Koutsi y col., 1994; Sumikawa y col., 1996; Sumikawa y col., 1999; Castillos and Chevitarese, 2002). En ambas denticiones los túbulos dentinarios son más numerosos en la dentina próxima a la pulpa que en las regiones más externas de la dentina en una proporción de 3 a 1. En porcentajes, respecto al área total de la superficie de dentina, corresponde un 22% a la zona pulpar y un 1% a la UAD (Pashley y col., 1989). Los túbulos dentinarios se distribuyen de forma más irregular en la dentina temporal respecto a la permanente (Van Waes y Stöckli, 2002).

Los estudios referentes a la densidad tubular de la dentina temporal, comparativamente respecto a la dentición permanente, son contradictorios. Mientras algunos autores describen la dentina primaria con una mayor densidad de túbulos dentinarios (Sumikawa y col., 1999; Kaga y col., 1997) otros han registrado un menor número de túbulos en el substrato temporal (Koutsi y col., 1994; Castillos and Chevitarese, 2002). De cualquier forma parece existir consenso en que la densidad tubular varía según el diente considerado (Castillos and Chevitarese, 2002) y la localización intradentaria analizada (Koutsi y col., 1994). En general, los dientes que ocupan una posición más adelantada en la arcada dentaria tienen una mayor densidad numérica de túbulos que los dientes posteriores (Sumikawa y col., 1999). La mayor densidad numérica de túbulos dentinarios en los dientes más anteriores parece ser reflejo de la necesidad de un mayor número y tamaño de odontoblastos, debido al desarrollo de dichos dientes en un periodo de tiempo más corto.

El diámetro de estos túbulos es variable según la región analizada, siendo más anchos en la proximidad de la pulpa y más estrechos en la zona periférica cercana al esmalte. Estas variaciones morfológicas en la luz influyen en los cambios de presión en el interior de los túbulos. A esto hay que agregar la obliteración gradual de la luz tubular que tiene lugar con la edad (esclerosis fisiológica de los túbulos dentinarios) y con determinadas situaciones patológicas. Si bien en la dentina permanente se ha registrado un diámetro que oscila entre 1-4  $\mu\text{m}$  (Agematsu y col., 1997), tampoco existe consenso respecto al diámetro de los túbulos dentinarios en dentina primaria. Mientras algunos autores refieren que éste es superior respecto a la dentina permanente (Sumikawa y col., 1999), otros apuntan hacia diámetros comparativamente inferiores (Hirayama y col., 1986).

Los túbulos dentinarios presentan ramificaciones colaterales o túbulos secundarios muy delgados (1  $\mu\text{m}$  de diámetro) que parten, en general, en ángulo recto y se conectan con

los túbulos vecinos. A nivel de la dentina temporal se presentan en menor número y/o con un diámetro menor de 0,5  $\mu\text{m}$  (Salim y col., 2004).

En ocasiones los túbulos dentinarios pueden presentar un diámetro superior; se han descrito desde 5 hasta 50  $\mu\text{m}$ , (Tronstad, 1972; Agematsu, 1997) pasando entonces a denominarse túbulos gigantes. Este tipo de túbulos se asocian con mayor frecuencia a procesos de dentinogénesis imperfecta (Wright y Gantt, 1985) así como a dentina temporal (Sumikawa y col., 1999). Estos túbulos gigantes analizados con MEB están rellenos por paquetes de fibras colágenas (correspondiente a colágeno tipo I y III) orientadas longitudinalmente, sobre las cuales se depositan cristales en pequeñas agrupaciones careciendo de prolongación citoplasmática u otro tipo celular (Agematsu y col., 1997). Su origen y significado funcional se desconocen por el momento.

La pared del túbulo está formada por dentina peritubular o tubular que está constituida por una matriz hipermineralizada que ofrece una estructura y una composición química característica. La formación de la dentina peritubular se produce cuando se termina de completar la mineralización de la dentina intertubular. Se deposita en forma centrípeta en relación al túbulo dentinario, de manera lenta y gradual, y con la edad puede llegar a obliterar parcial o totalmente los túbulos dentinarios (Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2002). Se ha demostrado que en una dentina joven, el espesor de la dentina peritubular es de 400 nm en la proximidad de la pulpa, mientras que en la vecindad de la UAD es de 750 nm (Ten Cate AR., 1991; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2002). Por ello, el diámetro interno de los túbulos es superior a 2,5  $\mu\text{m}$  en la parte profunda de la dentina, comparado con el diámetro de 0,9  $\mu\text{m}$  que exhiben en la zona externa. Estas características histológicas determinan el índice de permeabilidad dentinaria, el cual es mayor cerca de la pulpa y de los cuernos pulpares. Los estudios que hacen referencia al espesor de la dentina peritubular en la dentición primaria, también muestran grandes variaciones. En general, y al igual que ocurre en la dentina permanente, su espesor depende de la región analizada siendo más gruesa en los extremos distales del túbulo, adelgazándose gradualmente conforme se acerca a la base pulpar. Algunos autores asemejan su valor al encontrado en la dentina permanente (Sumikawa y col., 1999; Burrow y col., 2002) mientras que otros hablan de valores superiores entre tres y cinco veces respecto a la dentina peritubular en dentición definitiva (Hirayama y col., 1986; Uekusa y col., 2006). Es posible que las diferencias registradas en la literatura se deban a variaciones inter e intradentarias, producidos por depósitos minerales o de colágeno intratubular.

La dentina peritubular se caracteriza porque carece prácticamente de colágeno. La materia orgánica de la misma está formada, en consecuencia, por sustancias no colágenas tales como glicoproteínas, proteoglicanos y lípidos. Además, se trata de una dentina muy mineralizada, cuyos cristales de hidroxiapatita son ricos en magnesio, carbono y fosfato cálcico amorfo. Numerosas publicaciones han registrado diferencias en el grado de mineralización entre ambas denticiones (Araujo y col., 1995, Johnsen, 1987, Hosoya y col., 2000), siendo inferior el contenido mineral a nivel de la dentina peritubular primaria (46%) respecto a la dentina peritubular permanente (51,4 %) (Angker y col., 2004b).

Algunos autores (Gómez de Ferraris M.E. y Campos Muñoz A.,2002) distinguen en la dentina peritubular tres zonas distintas:

a) La zona hipomineralizada externa: se trata de la región más externa de la dentina peritubular y consiste en una interfase de menor mineralización entre la dentina peritubular y la dentina intertubular. Consiste en una zona muy delgada que antiguamente se denominaba vaina de Newmann y se consideraba otro elemento estructural de la dentina. Este concepto, ahora en desuso, surgió porque la zona de unión o interfase entre las dentinas peritubular e intertubular destaca nítidamente en los cortes por desgaste y presenta un comportamiento diferencial frente a los colorantes ácidos y básicos en las preparaciones por desmineralización. Los estudios con el microscopio electrónico de transmisión (MET) permitieron confirmar que no existe tal membrana.

b) La zona hipermineralizada media: es la que presenta mayor espesor y un grado más alto de mineralización respecto a la anterior.

c) La zona hipomineralizada interna: es la última zona que se forma y por ello está menos mineralizada que el resto; esta dentina es la que puede obliterar el conductillo.

-Matriz intertubular.

La matriz intertubular se distribuye entre las paredes de los túbulos dentinarios, Su componente fundamental son las fibras de colágeno que constituyen una malla fibrilar entre la cual y sobre la cual se depositan los cristales de hidroxiapatita semejantes a los existentes en la dentina peritubular. Las fibras de colágeno de la matriz intertubular están alineadas perpendicularmente al eje de los túbulos (Kinney y col., 2003a).

La distribución en abanico que presentan los túbulos dentro de la estructura de la dentina es la causa de que las proporciones de dentina peritubular e intertubular varíen considerablemente. Mientras en las zonas superficiales de la dentina, la parte intertubular va a constituir el 93%, con una 4% correspondiente al fluido dentinario y un 3% de dentina peritubular, en las inmediaciones de la cámara pulpar esta relación se invierte hasta que la dentina más mineralizada que rodea los túbulos alcanza el 60% de la superficie útil para la adhesión, y la dentina intertubular se reduce a un 12%, mientras que la superficie ocupada por el agua crece hasta el 28%.

### **1.1.2 Composición química de la dentina.**

- Fase orgánica.

Está constituida por varios componentes. Básicamente, consiste en un entramado de fibras de colágeno tipo I, que son sintetizadas por el odontoblasto y representa el 90% de dicha matriz. Los colágenos tipo III, IV, V y VI se han descrito en pequeñas proporciones y en diferentes circunstancias (el tipo III se segrega en casos de dentina opalescente y se halla presente ocasionalmente en la dentina peritubular, el de tipo IV en los momentos iniciales

de la dentinogénesis y los de tipo V y VI se han descrito en distintas regiones de la preentina) (Agematsu y col., 1997; Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2002).

Asimismo, se han detectado proteínas exclusivas de la localización dentinaria en la matriz orgánica, tales como la fosforina dentinaria (DPP), la proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP1) y la sialoproteína dentinaria (DSP). Las dos primeras segregadas por los odontoblastos participarían en el proceso de mineralización, y la última, segregada por odontoblastos jóvenes y también por preameloblastos, participaría de algún modo en el proceso de interrelación epitelio-mesénquima (Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2002).

Existen otras proteínas semejantes a las existentes en la matriz ósea tales como la osteonectina, la osteopontina y la proteína Gla de la dentina. Los proteoglicanos están presentes también en la matriz dentinaria así como proteínas del suero.

La comprensión de la disposición tridimensional de la matriz orgánica es fundamental para clarificar el mecanismo de adhesión sobre el substrato dentinario y cómo las fibras de colágeno interactúan con los monómeros adhesivos. Las observaciones realizadas con el microscopio electrónico de transmisión y barrido y el microscopio de fuerzas atómicas (MET, MEB y AFM) han revelado que el tejido dentinario está formado por un complejo entramado fibrilar y estructuras globulares sobre las cuales el mineral es posteriormente precipitado durante la dentinogénesis (Perdigão y col., 1996; Van Meerbeek y col., 2000). Las fibras de colágeno tipo I (con un diámetro aproximado de 70-90 nm) representan la espina dorsal de la red fibrilar orgánica dentinaria y están orientadas de forma azarosa en un plano perpendicular a la dirección de la formación de la dentina (Jones y Boyde, 1984). El conjunto de estas fibras ensambladas unas con otras constituye un entramado fibrilar complejo, conectado por ramificaciones, constituídas por fibras menores de proteínas no-colagenosas, (con un diámetro entre 20-40 nm), (Breschi y col., 1999). Los proteoglicanos y las fosfoproteínas representan los constituyentes principales de proteínas no-colagenosas en la matriz dentinaria (Cheng y col., 1999; Marshall y col., 1997). Los proteoglicanos son polianiones ricos en carbohidratos con un alto peso molecular (desde 110 hasta 220) y están constituidos por un núcleo polipéptidico al cual se conectan 1 ó más glicosaminoglicanos. Se ha apuntado que los proteoglicanos dentinarios tienen un papel fundamental en la estabilización de la disposición espacial de las fibras colágenas (Cheng y col., 1999), y por tanto, podrían ser los responsables de la disposición tridimensional de la matriz orgánica de la dentina, debido a su capacidad de rellenar los espacios, ligar y organizar moléculas de agua y repeler moléculas con carga negativa (Oyarzun y col., 2000; Breschi y col., 2007). Estos proteoglicanos pueden determinar la afinidad al agua del colágeno en la capa híbrida mediante la regulación de la substitución de agua que ocurre durante la formación de la capa híbrida.

- Fase mineral.

La fase mineral está compuesta por nanocristales de hidroxiapatita, con un espesor o grosor constante de 5nm aproximados y con forma afilada en la proximidad de la pulpa, adquiriendo una forma más oval según avanza la proximidad al esmalte (Kinney y col., 2001).

Además de los cristales de hidroxiapatita hay cierta cantidad de fosfatos amorfos, carbonatos, sulfatos y oligoelementos como flúor, cobre, zinc, hierro, magnesio, etc. Existe asimismo calcio ligado a componentes de la matriz orgánica que actuarían como reservorio para la formación de cristales de hidroxiapatita.

Por peso, aproximadamente el 46% de la dentina primaria sana está constituido por componente mineral (Angker y col, 2004), frente a un 70% de contenido mineral de la dentina permanente (Hart y Hart, 2007).

El componente mineral se encuentra de forma concentrada en la dentina peritubular, ocupando el 95% de su volumen, y de modo más disperso a nivel de la dentina intertubular (corresponde a un 30% de su volumen), en asociación con las fibras de colágeno. Dentro de la red de colágeno se puede hallar: intrafibrilar (ocupando los espacios entre las moléculas de colágeno) y extrafibrilar (en los intersticios entre las fibras). El porcentaje según la localización es incierto, si bien se cree que entre un 70-75% corresponde a la localización extrafibrilar (Pidaparti y col., 1996). La importancia de esta distribución es decisiva a la hora de establecer una estrategia de adhesión adecuada (Osorio y col., 2005a).

La reducción del contenido mineral observado a nivel de la dentina decidua va a afectar tanto a la dentina peritubular como a la intertubular habiéndose, registrado una concentración de calcio y fósforo en la dentina primaria peritubular e intertubular de 46 y 37%, respectivamente, en comparación con la permanente que se corresponde con un 51,4 y 38%, respectivamente (Angker y col., 2004b; Hirayama, 1990).

Asimismo, el porcentaje mineral también varía según la zona considerada (Ten Cate y col., 1991; Marshall y col., 2001., Angker y col., 2004b), correspondiendo un valor de media de 59,3% en la dentina temporal externa, el cual va descendiendo gradualmente hacia la zona interna alcanzando un valor de media de 41,82% en la dentina adyacente a la pulpa decidua.

Estas diferencias en el contenido mineral de la estructura dentinaria van a condicionar una diferencia en las propiedades mecánicas de ésta (dureza, módulo elástico...) (Angker y col., 2003, Johnsen, 1994). En este sentido la dureza de la dentina varía significativamente según la localización intradentaria. Así se describe una primera capa de dentina con un espesor de 200  $\mu\text{m}$ , en contacto con el esmalte, conocida como dentina del manto, que se va a caracterizar por una menor dureza ( $\text{KHN} \sim 60 \text{ Kg/mm}^2$ ) (Owaga 1983, Wang y Weiner 1998), debido a un menor grado de mineralización (Tesch y col., 2001), respecto a la dentina inmediatamente subyacente a ella ( $\text{KHN} \sim 70 \text{ Kg/mm}^2$ ), desde donde empieza a decrecer gradualmente hacia el interior de la estructura dentaria. La disminución de la dureza de la dentina en la proximidad de la pulpa ( $\text{KHN} \sim 30 \text{ Kg/mm}^2$ ) ha sido, clásicamente, atribuída al incremento en el número de túbulos por área que existe en dicha zona; sin embargo, publicaciones recientes han demostrado que existe también una disminución de la dureza en sí, de la dentina intertubular (Kinney y col., 1996, Marshall y col., 2001).

Es importante destacar que no se han registrado diferencias de calcificación entre la dentina media primaria y la dentina superficial en contacto con la unión amelodentinaria (Johnsen, 1994), por lo que no se ha confirmado la existencia de la zona conocida como dentina del manto en dentina temporal (Angker y col., 2004b).

## **1.2 ADHESIÓN DE LOS POLÍMEROS A LA DENTINA TEMPORAL**

### **1.2.1 Concepto de adhesión y su proyección en Odontología pediátrica.**

La adhesión se define como el estado en el que dos superficies se mantienen unidas mediante fuerzas o energías interfaciales basadas en mecanismos químicos, mecánicos o ambos, con la mediación de un adhesivo (ISO/TR 11405: 1994 (E)).

Según la anterior definición la adhesión puede estar basada en dos procedimientos:

- Adhesión química. Se debe a la existencia de enlaces químicos entre el adhesivo y la superficie del adherente. Los enlaces implicados pueden ser primarios o fuertes (covalentes e iónicos) y secundarios o débiles (uniones por puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals...). La adhesión que depende de atracciones producidas por este tipo de enlaces más débiles se conoce como adhesión física (Nakabayashi y Pashley, 1998).
- Adhesión mecánica. Depende de la penetración o imbricación del adhesivo en las zonas retentivas que presente el adherente en su superficie. Cuando las irregularidades superficiales responsables de la adhesión tienen dimensiones macroscópicas se habla de adhesión macromecánica, mientras que en la adhesión micromecánica las irregularidades son microscópicas.

A nivel dentario son tres substratos los que participan en la adhesión: el material de restauración, el diente y el sistema adhesivo. Entre el sistema adhesivo y el composite se establece un proceso de adhesión química, debido a la existencia de monómeros libres sin polimerizar en la capa inhibida de la resina. Sin embargo, entre el sistema adhesivo y los tejidos dentarios deciduos, aunque se ha investigado la existencia de fenómenos de adhesión química a la hidroxiapatita o al componente orgánico de la dentina, no existen resultados claros y, en caso de existir, parecen tener una menor significación en la retención de los sistemas adhesivos disponibles (Pashley y Carvalho, 1997), siendo la unión micromecánica la más efectiva como medio de fijación de las resinas a este substrato.

Para que se produzca adhesión, química o micromecánica o combinada, entre dos materiales es necesario que se cumplan una serie de condiciones entre las que cabe destacar: 1) las dos superficies a unir deben estar lo suficientemente próximas como para que puedan actuar las fuerzas interatómicas y/o se produzca la retención a nivel microscópico. Generalmente este tipo de adaptación ocurre entre un líquido (adhesivo) y un sólido (adherente o substrato). 2) Es necesario, además, que el líquido humecte la superficie adherente. Para conseguir este objetivo, el adhesivo deberá tener una baja tensión superficial y el adherente una alta energía superficial. 3) Además es importante, en el

mecanismo micromecánico, que el adhesivo entre por capilaridad en el interior de las retenciones microscópicas, lo cual está relacionado con la tensión superficial del mismo; por lo tanto, la tensión superficial del adhesivo debe ser lo suficientemente baja como para que se produzca la humectancia y lo suficientemente alta como para que se produzca la capilaridad. 4) Otra condición para una correcta adhesión es que el adhesivo en estado líquido, deberá fraguar una vez que haya entrado en íntimo contacto con el substrato. En la mayoría de los adhesivos, la reacción de fraguado implica una contracción del mismo. Si la fuerza de contracción es superior a la fuerza de adhesión las uniones se romperán y fallará la adhesión. Por lo tanto, el adhesivo debe no contraer, o hacerlo de forma mínima, durante la reacción de fraguado. 5) Una vez conseguida la adhesión, es necesario que ésta se mantenga en el tiempo, venciendo a los factores que tienden a romperla, como son: las tensiones debidas a los cambios dimensionales térmicos, las generadas por las cargas oclusales sobre el material y la solubilidad del adhesivo, al encontrarnos en un medio húmedo.

Si se analizan las condiciones descritas en relación a la superficie dentinaria es fácil concluir que el proceso de adhesión se ve dificultado cuando se quiere adherir sobre dicho substrato por varias razones. Debido a la estructura y propiedades analizadas de la dentina temporal, ésta se caracteriza por presentar una baja energía superficial lo que deriva en una mala humectancia de los adhesivos sobre ella. Además, es necesario tener en consideración la existencia del fluido dentinario en el interior de los túbulos, que tiende a salir por la presión intrapulpal dificultando de este modo la entrada de los adhesivos. Aparte del fluido dentinario, la dentina primaria tiene en su estructura un alto porcentaje de agua lo que hace que sea una superficie muy hidrofílica, en oposición con las resinas compuestas que son hidrofóbicas.

El proceso de adhesión micromecánica sobre la superficie dentinaria aún se complica más, si cabe, al considerar la presencia del barrillo dentinario, originado por el procedimiento operatorio, tal y como se analiza a continuación.

## **1.2.2 Mecanismo de adhesión a la dentina temporal**

### **1.2.2.1 Barrillo dentinario**

La preparación cavitaria con instrumental rotatorio va a dar lugar a la aparición, sobre la superficie del diente, de una capa de detritus que recibe el nombre inglés de *smear layer* (literalmente, capa pringosa, untuosa) (Eick y col., 1970). Este manto, formado por restos tisulares, se genera sobre las superficies dentales cortadas, ya sean esmalte, dentina o cemento. Sin embargo, es su presencia en la superficie dentinaria la que le confiere su importancia clínica, hasta el punto de denominársele por ello como barrillo dentinario.

Es difícil establecer en qué momento o quién introdujo el concepto de barrillo dentinario. Fué la llegada del microscopio electrónico de barrido lo que propició que Boyde, Switsur y Stewart (1963) lo citasen como *smear layer*.

Este barrillo constituye una micropelícula que queda adherida a las paredes cavitarias sin poderse remover con una simple aplicación de agua o spray. Tiene un

espesor que oscila entre 1 y 5  $\mu\text{m}$  y su composición está en relación directa con el material rotatorio empleado y las condiciones de humedad durante el tallado dental, pero esencialmente va a ser un reflejo de la dentina sometida al corte, más la mezcla subsiguiente de la saliva del paciente, bacterias y otros residuos del tallado procedentes del instrumento utilizado (Van Meerbeek y col., 1993; Marshall 1993a). En la actualidad existe controversia respecto a la supervivencia de las bacterias, por lo que se discute su conservación o no.

A nivel microscópico, el barrillo dentinario o *smear layer* consiste en un conglomerado de tejido inorgánico y orgánico, dispuesto en subunidades globulares formadas fundamentalmente por fibras mineralizadas de colágeno con un diámetro desde 0,05 a 0,1  $\mu\text{m}$ , proteínas coaguladas (procedentes del colágeno desnaturalizado por la temperatura del corte), células sanguíneas y en algunas ocasiones microorganismos (Brannstrom, 1984).

El barrillo se deposita a nivel superficial sobre la dentina intertubular pero también se encuentra compactado dentro de los túbulos dentinarios (Toledano y col., 2003), quedando así firmemente retenido en su interior. Es por ello, que su conservación puede ser considerada como un mecanismo fisiológico de protección pulpar, al evitar la movilización del fluido dentinario, disminuyendo la permeabilidad dentinaria y dificultar la contaminación bacteriana a través de los túbulos (Tay y col., 2000; Sano y col., 1999; Toledano y col., 2003).

Sin embargo, el barrillo está débilmente adherido a la dentina mediante fuerzas de Van der Waals, por lo que se considera un eslabón débil dentro de la cadena de adhesión con las resinas compuestas. Es por ello que, desde su identificación, se asoció con un efecto adverso para el procedimiento adhesivo debido a que obstaculizaba el acceso directo a la dentina para poder adherir sobre ella y a que los agentes adhesivos iniciales no conseguían valores adhesivos adecuados.

En la actualidad, y con los sistemas adhesivos existentes, ya no se considera un factor restrictivo para obtener unas fuerzas de adhesión elevadas y su conservación o eliminación depende del tipo de sistema adhesivo utilizado. Los sistemas autograbadores atraviesan el barrillo para acceder a la matriz dentinaria subyacente incorporando dicho barrillo en su mecanismo adhesivo (Tay y col., 2001; Toledano y col., 2001; Osorio y col., 2003) mientras que los sistemas de grabar y lavar lo eliminan completamente de la superficie mediante el grabado con ácido ortofosfórico (Van Meerbeek y col., 1998).

El barrillo dentinario se puede eliminar fácilmente mediante ácidos como el ortofosfórico o el ácido cítrico, con soluciones quelantes, por técnicas de ultrasonidos o modificarlo con peróxido de hidrógeno o hipoclorito sódico.

### 1.2.2.2 Tratamiento del substrato dentinario para la adhesión

El proceso de adhesión en Odontología se basa en el siguiente protocolo:

- Acondicionamiento del adherente, con el fin de alterar su morfología y/o su estructura química.
- Imprimación del adherente, mediante la aplicación de una sustancia química previa con la finalidad de hacer el sustrato más receptivo al adhesivo.
- Aplicación del adhesivo.

Estos tres pasos no tienen por qué darse siempre, ni de forma claramente diferenciada. Se pueden encontrar de forma simultánea o bien faltar alguno de ellos (Van Meerbeek y cols., 1992).

#### 1.2.2.2.1 Acondicionamiento del substrato. Grabado ácido de la dentina.

El grabado ácido de la dentina se puede hacer de forma simultánea con el esmalte (Técnica de grabado total de Fusayama, conocida actualmente como de grabar y lavar) o de forma independiente. Consiste en la colocación de un ácido sobre la superficie de la dentina durante un tiempo determinado, condicionado por el tipo de ácido o su concentración.

Al colocar el ácido sobre la superficie de dentina temporal, en primer lugar reaccionará con el barrillo dentinario, produciendo su disolución total o parcial, y posteriormente con la estructura de la dentina subyacente, resultando en un proceso de desmineralización de dicha estructura que conlleva cambios en dicho sustrato a nivel químico, histológico, morfológico y fisiológico. Dichas interacciones, entre el agente ácido acondicionador y la dentina, dependen de la composición química del agente aplicado (Van Meerbeek y col., 1992), de su concentración (Kato y Nakabayashi, 1996), pH, pKa, osmolaridad, del tiempo de aplicación (Kinney y col., 1995) y del tipo de agente de relleno (Perdigão y col., 1996).

A nivel histológico se produce una disolución de la dentina peritubular al penetrar el ácido en los túbulos dentinarios produciendo un ensanchamiento de los mismos que adoptan una forma de embudo, quedando en su interior el colágeno expuesto ( Garberoglio y Brännström, 1976; Van Meerbeek y col., 1992; Marshall y col., 1993a; Eliades y col., 1997). A nivel molecular, la desmineralización se traduce en una disminución de los ortofosfatos y carbonatos cálcicos y un aumento de los grupos amidas I, II y III. También se han registrado modificaciones moleculares en el colágeno dentinario propias de la desnaturalización del colágeno (Eliades y col., 1997).

En el caso de la dentina intertubular, la profundidad de la desmineralización oscila entre 2 y 7  $\mu\text{m}$  (Pashley y Carvalho, 1997; Van Meerbeek y col., 1992; Nakabayashi y col., 1982), y se traduce en un aumento de la rugosidad de la misma (Eliades y col., 1997). La

pérdida del contenido mineral a este nivel produce la exposición de la matriz colágena, la cual tiende a colapsarse por la pérdida del soporte inorgánico (Van Meerbeek y col., 1992; Marshall y col., 1993a).

La dentina sufre, además, cambios dimensionales debido a su desmineralización parcial que se manifiestan con un hundimiento de su superficie (Marshall y col., 1997; Kinney y col., 1995). Este hundimiento depende directamente de la fracción mineral (Ten Cate y col., 1991). De este modo la dentina intertubular desciende de forma lineal hasta estabilizarse, sin verse afectada por una sobre-exposición al ácido (Kinney y col., 1995). Parece ser que la matriz de colágeno desmineralizada limita el proceso de desmineralización (Marshall y col., 1995). Sin embargo, en la dentina peritubular, al existir una menor concentración de fibras colágenas, el grabado provoca un descenso lineal que no se estabiliza (Kinney y col., 1995; Marshall y col., 1993b).

A nivel fisiológico, el grabado ácido de la dentina da lugar a un aumento de la permeabilidad transdentinal debido a la eliminación del barrillo dentinario que se encuentra taponando los túbulos dentinarios quedando, de este modo, los túbulos expuestos (Pashley y Carvalho, 1997).

A nivel clínico, el grabado ácido previo a la aplicación de los imprimadores, con la consecuente remoción del barrillo dentinario, parece ser un paso muy importante en el tratamiento de la dentina, dado que se observa que las fuerzas de microtensión aumentan cuando se lleva a cabo dicho procedimiento (Tay y col., 2000). Esto es debido a que el grabado ácido previo hace aumentar el área de contacto entre la superficie de la dentina y el adhesivo, así como promueve un aumento del mojado de la superficie dentinaria, debido a un aumento de su rugosidad y a la apertura de los túbulos dentinarios (Toledano y col., 1999; Rosales y col., 1999).

La desmineralización producida por el ácido debe ser suficiente para permitir la penetración de la resina, pero sin llegar a debilitar la zona (Marshall y col., 1997). La adhesión queda comprometida si la profundidad de desmineralización excede a la profundidad de la penetración de la resina (Perdigão y Lopes, 2001; Nakabayashi y Pashley, 1998).

A partir de los años 90 se propusieron alternativas al ácido fosfórico como agentes grabadores con el propósito de permitir una técnica de grabar y lavar menos agresiva para la dentina. Entre otros se utilizaron el ácido maleico, cítrico, nítrico e incluso concentraciones más bajas de ácido ortofosfórico (10-20%) así como EDTA y oxalato férrico. De este modo, la dentina no sufriría una desmineralización a una profundidad inaccesible para la resina. Sin embargo, se ha demostrado que de este modo no se acondiciona suficientemente el esmalte (Van Meerbeek y col., 1994). Por el momento, los mejores resultados se han obtenido con ácidos, siendo la solución de ácido ortofosfórico en concentraciones que varían del 30 al 40 por 100 el más utilizado y el que permite lograr mejores patrones de desmineralización. En cuanto al tiempo de actuación de éste, en la actualidad se aconseja una duración de 15 s sobre dentina. Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto una mayor reactividad química de la dentina primaria al acondicionamiento con ácidos (Nör y col., 1996), lo cual parece estar relacionado con el

menor grado de mineralización observado en los tejidos dentales primarios (Hosoya y col., 2000, Angker y col., 2003), aconsejándose una reducción del tiempo de grabado para crear un substrato dentinario para la adhesión similar al que se obtiene en dentición permanente (Nör y col., 1996).

La disolución y desmineralización de los tejidos dentarios por el ácido fosfórico da lugar a la formación de precipitados solubles e insolubles que deben ser eliminados mediante el procedimiento del lavado. Si el lavado no se produce adecuadamente, los precipitados de fosfato de calcio en forma de sistemas cristalinos o amorfos, solubles o insolubles, producirá el taponamiento y contaminación de los microporos evitando la unión micromecánica a éstos. Asimismo, un lavado insuficiente hace que el ácido pueda continuar actuando en determinadas zonas. Hay que realizar un lavado con agua presurizada durante el tiempo suficiente para eliminar totalmente el ácido y bloquear su acción.

El siguiente paso clínico es el secado de la superficie. Sin embargo y a raíz de la introducción de las resinas hidrofílicas en los sistemas adhesivos se empieza a producir adhesión en presencia de humedad (técnica húmeda), por lo que el secado debe ser somero manteniendo la superficie dentaria ligeramente húmeda. Numerosos trabajos han estudiado el proceso de adhesión a dentina en condiciones de humedad, observándose que esta condición favorece las fuerzas de adhesión de los adhesivos (Kanca 1992; Miyazaki y col., 2000). Esto es debido a que la humedad evita el colapso de las fibras colágenas favoreciendo así la formación de la capa híbrida (Pashley y col., 1997).

La matriz de colágeno expuesta tras el proceso de desmineralización tiende a colapsarse por la pérdida del componente mineral, efecto que se acentúa cuando se produce el secado con aire (Carvalho y col., 2003). Durante la deshidratación se produce un acercamiento entre las fibras de colágeno que facilita el establecimiento de interacciones débiles, tipo puentes de hidrógeno, (Nakabayashi y Pashley, 1998) entre las cadenas polipeptídicas que no serían posibles en presencia de agua (Carvalho y col., 2003), reduciendo así los espacios interfibrilares y aumentando la rigidez de la matriz colágena deshidratada. Se barajan dos explicaciones respecto al colapso de la red colágena al ser secada con aire. Una postula que las fibras de colágeno quedan embebidas en agua tras la disolución de los cristales de apatita. Cuando se produce el secado con aire, al agua se evapora y las fibras de colágeno se acercan en las tres dimensiones; la otra explicación planteada al respecto apunta a un acortamiento en sí de la fibra producido al evaporarse el agua que rodea las microfibras que integran las fibras colágenas (Carvalho y col, 1996).

Por lo tanto, es fundamental que algo de agua permanezca dentro de los espacios interfibrilares manteniendo la configuración tridimensional de la red de colágeno y permaneciendo los espacios interfibrilares abiertos (Van Meerbeek y col, 1998) para la infiltración de la resina. En este sentido también ha sido propuesto la inmediata rehidratación con agua de la superficie de dentina desmineralizada y secada, consiguiendo así su reexpansión y carácter esponjoso (Gwinnett, 1992).

Por otro lado, los sistemas autograbadores recurren al uso de soluciones imprimadoras ácidas para el acondicionamiento de la dentina, las cuales son capaces de disolver la capa de barrillo dentinario penetrando entre sus partículas y desmineralizando la

parte superficial de la dentina sólida subyacente. Puesto que esta solución autograbadora sólo requiere su dispersión mediante aire y no requiere lavado, el barrillo se incorpora al proceso de adhesión formando parte de la capa híbrida (Pashley y Carvalho, 1997), reduciéndose de este modo los problemas asociados al grado de humedad requerido (Yoshiyama y col., 1998; Fritz y Finger, 1999).

#### 1.2.2.2.2 Imprimación del substrato acondicionado

Básicamente, los imprimadores o “*primers*” consisten en un polímero disuelto en un solvente orgánico. Moléculas de este tipo son el HEMA (la de más frecuente utilización), el NTG-GMA, PMDM, BPDM y el PENTA, entre otras.

Actúan como promotores de la adhesión debido a su carácter hidrófilo. La hidrofilia es fundamental para que las resinas puedan introducirse en el interior de los túbulos dentinarios húmedos y de la red colágena expuesta, actuando el agua como vehículo para su penetración. Además de mejorar la humectabilidad de la superficie van a simplificar la unión de las capas subsecuentes de resina, con carácter hidrofóbico. Al depositarlo sobre la dentina, el imprimador se introduce en la estructura dentinaria. El solvente, que suele ser acetona o etanol, se evapora, quedando el polímero por un lado unido a la superficie dentinaria y por otro con afinidad por el adhesivo.

La remoción incompleta del solvente podría interferir con la resina fluída y dificultar la unión; por ello, se aconseja secar con aire el substrato imprimado para que el solvente del *primer* pueda evaporarse completamente sin quedar residuos que podrían interferir en el mojado y la copolimerización de la resina adhesiva. De hecho, la unión entre la capa híbrida y la resina adhesiva constituye un punto débil dentro del complejo adhesivo siendo considerado lugar de inicio de la microfiltración (Tay y col., 1995; Gwinnett y Yu, 1995).

#### 1.2.2.2.3 Impregnación del substrato

Una vez preparado el substrato dentinario, se produce la impregnación de éste por medio de las resinas adhesivas, las cuales, una vez polimerizadas, quedan retenidas en dicho substrato mediante una unión físico-mecánica a nivel microscópico, que implica la interdifusión del agente adhesivo a través de la red de colágeno expuesta tras el proceso de desmineralización y la formación de *tags* de resina en el interior de los túbulos (Nakabayashi y col., 1982; Van Meerbeek y col., 1993a).

Para que dicha interdifusión se produzca es fundamental mantener la integridad estructural de las fibras de colágeno, su aspecto esponjoso y flotante, y que los espacios interfibrilares se mantengan abiertos (Nakabayashi y col, 1982; Van Meerbeek y col, 1998). Dicha situación favorece la capacidad de infiltración de la resina a través de la red fibrosa (Nakabayashi y col, 1992); de este modo, y tras la polimerización de la resina, se constituye la denominada capa híbrida (Nakabayashi y col., 1982) consistente en un conglomerado de resina polimerizada, de colágeno mezclado con resina y cristales de hidroxiapatita encapsulados por resina.

Los estudios realizados por Van Meerbeek (1992) han puesto de relieve que no existe un único tipo de hibridación con la dentina, proponiendo una denominación más específica para ello, la de zona de interdifusión resina-dentina. Así quedarían englobados los fenómenos de difusión que tienen lugar con los diferentes sistemas adhesivos existentes.

En la actualidad la formación de esa capa híbrida, cuya existencia ha sido también demostrada “*in vivo*” (Nakabayashi y col., 1992; Tay y col., 1994), parece ser fundamental en el mecanismo de adhesión a dentina, ofreciendo una unión duradera y resistente al ataque ácido (Nakabayashi y col., 1982, 1991).

La relación entre la profundidad de desmineralización y la extensión de la penetración de la resina es la clave para crear una capa híbrida de calidad. Una infiltración pobre de la resina adhesiva dentro del substrato desmineralizado permite la existencia de nano-espacios (20-100 nm) entre las fibras colágenas sin infiltrar, en la base de la capa híbrida (Sano y col., 1995a; Spencer, 1999), lo que posibilita la penetración de agua con la consiguiente hidrólisis de las fibras desprotegidas y, por lo tanto, la degradación precoz (Sano y col., 1999) de la interfaz adhesiva.

La unión micromecánica conseguida con los sistemas adhesivos de resina implican no sólo la interdifusión con el colágeno expuesto de la dentina intertubular sino también la infiltración a nivel intratubular para formar tapones o *tags* de resina (Nakabayashi y col., 1982), los cuales actúan como un mecanismo mecánico de retención, dada su falta de paralelismo. La longitud de estos tapones es muy variable, siendo de aproximadamente 10-20  $\mu\text{m}$  en dientes vitales, aunque son mayores en dientes extraídos, pudiendo alcanzar entre 40 y 300  $\mu\text{m}$ . Pese a ello no parece existir una buena correlación entre la longitud de los tapones y la resistencia adhesiva alcanzada.

Asimismo, a nivel de la dentina peritubular y tras el proceso de desmineralización, las fibras de colágeno expuestas permiten la difusión lateral de la resina (Perdigão y col., 1999) a través de los espacios interfibrilares, lo que posibilita la formación de una capa híbrida continua, fenómeno conocido como hibridación de la dentina peritubular, que será máxima en las 2-3 micras más superficiales de los *tags* de resina (Pashley y Carvalho, 1997). Además, la mayoría de los túbulos contienen ramas laterales múltiples que se irradian de 2 a 6 micras desde la luz tubular, ofreciendo una nueva vía para la hibridación tubular (Nakabayashi y Pashley, 1998) y la formación de *tags* de resina laterales (Perdigão y col., 1999).

La infiltración intratubular de las resina, además de contribuir a la retención de la restauración, permite el sellado de los túbulos dentinarios (Tay y col., 1994; Nakabayashi y col., 1998), previniendo así la microfiltración (Tay y col., 1995; Nakabayashi y col., 1998) y bloqueando la sensibilidad. La formación de los *tags* de resina se ve dificultada por la presencia de fluido dentinario (Tay y col., 1996b), por la presión intrapulpar y la presencia de núcleos minerales en el caso de la dentina esclerótica (Pashley y Carvalho, 1997).

Gwinnett (1993) habla también de un mecanismo de adhesión superficial de la resina consistente en una retención mecánica a nivel de las irregularidades de la superficie de dentina parcialmente desmineralizada.

De este modo, el procedimiento adhesivo se completa con la aplicación de la resina adhesiva, que puede ser de varios tipos:

- A. Resinas hidrofóbicas. Son resinas que presentan una mayor tensión superficial que el agua. La hidrofobia es un inconveniente para la adhesión a la dentina, ya que la dentina se encuentra en condiciones normales hidratada debido a la cantidad de agua presente en su composición y a la existencia del fluido dentinario. Sin embargo, es una buena característica en relación al material restaurador, ya que las resinas que forma parte de los composites son hidrofóbicas. Son resinas hidrofóbicas, entre otras, el Bis-GMA, los dimetacrilatos, los uretanos etc.
- B. Resinas hidrofílicas. Son resinas que tienen afinidad por el agua. Esto se debe a que tienen una menor tensión superficial que el agua. La hidrofilia es fundamental para que las resinas puedan difundir en la red de colágeno e introducirse en el interior de los túbulos dentinarios húmedos, actuando el agua como vehículo para su penetración. De la misma manera estas resinas tienen peor compatibilidad con el material restaurador hidrofóbico. Son resinas hidrofílicas el PMDM, los dimetacrilatos hidrofílicos, el HEMA, el penta ester fosfato, etc.
- C. Resinas bifuncionales. Son moléculas complejas polifuncionales que tienen distintos tipos de radicales, unos hidrofílicos y otros hidrofóbicos, para compatibilizar con los distintos elementos. Son resinas bifuncionales, también denominadas bipolares, el MMI 152 patentado por la casa Bayer y el MDP de la casa Kurakay.

Además de la composición, es importante tener en consideración el espesor de la capa de resina que queda en la superficie dentinaria y que va a tener una doble misión: como capa amortiguadora y como medio de unión al material restaurador (Zheng y col., 2001).

Cuando se realizan reconstrucciones con composites mediante técnica adhesiva, se están uniendo dos estructuras rígidas (diente-restauración). Por ello, es aconsejable interponer entre ambas un material flexible y elástico que permita cierta deformación elástica y que absorba las tensiones, recuperando posteriormente su forma inicial bajo cargas oclusales y de polimerización. Para ello, es necesario que la capa de resina tenga un espesor suficiente aunque no en demasía, al ser la zona menos resistente de la restauración. Esta zona es también importante para la adhesión a la resina compuesta, ya que la superficie expuesta al contacto con el aire de esta interfaz quedará inhibida por el oxígeno, constituyendo la denominada capa inhibida, con radicales libres por polimerizar en su seno, con lo que se posibilita la unión química con los radicales de los monómeros de las resinas compuestas de la restauración.

Por lo tanto, los sistemas adhesivos tienen una doble función, por un lado debe penetrar en las microrretenciones, para lo que deben ser hidrofílicos y con muy baja viscosidad, y por otro deben conseguir un espesor de capa suficiente y adherir químicamente a la resina compuesta hidrófoba, para lo cual debe ser más viscosa e hidrofóbica. Este doble comportamiento se puede conseguir de dos maneras:

1. Con los sistemas adhesivos clásicos se utilizan dos tipos de resinas, una hidrofílica muy fluída para iniciar la adhesión y otra hidrofóbica y viscosa para completarla.
2. Con los sistemas adhesivos monocomponentes se utiliza una sola resina muy fluída e hidrofílica, con grupos hidrofóbicos o no, que se aconseja colocar en varias capas para aumentar su espesor (Breschi y col., 2007).

Para que la adhesión se realice, es condición indispensable que esta resina cure en el interior de las microrretenciones, es decir, que se produzca la polimerización. El oxígeno y el agua dificultan la polimerización de los sistemas adhesivos, así como la presencia de solventes residuales. El oxígeno es el responsable de la formación de la capa inhibida, su presencia permite la existencia de radicales libres sin polimerizar en las capas más superficiales ofreciendo así la posibilidad de uniones químicas con los materiales aplicados posteriormente sobre ellos. El agua representa un grave inconveniente en el procedimiento adhesivo, al ser imposible que la dentina esté totalmente seca. Este fenómeno puede interferir en la polimerización de las zonas más profundas afectando así el proceso de hibridación.

### **1.2.3 Clasificación de los sistemas adhesivos.**

La clasificación que se presenta a continuación está basada en el mecanismo de interacción de los sistemas adhesivos con el substrato dentinario, haciendo referencia, de manera simultánea, a su procedimiento de aplicación clínica (Van Meerbeek y col., 1998a).

Según esta clasificación y dependiendo de la interacción con el barrillo dentinario generado durante el procedimiento operatorio, los sistemas adhesivos modernos basados en resinas pueden actuar de tres modos diferentes en el proceso de adhesión:

1. Modificando el barrillo dentinario e incorporándolo en el procedimiento adhesivo (adhesivos en uno o en dos pasos).
2. Removiendo completamente el barrillo dentinario (adhesivos de grabar y lavar en dos o en tres pasos).
3. Disolviendo el barrillo dentinario (adhesivos en uno o en dos pasos).

#### **1.2.3.1 Adhesivos que modifican el barrillo dentinario.**

Estos sistemas adhesivos surgen a partir del concepto de que el barrillo funciona como una barrera natural para la pulpa, protegiéndola de la invasión bacteriana. Igualmente

se impide la salida del fluido dentinario procedente de los túbulos dentinarios, evitando de este modo que pueda afectar a la eficacia del procedimiento adhesivo. De este modo, estos adhesivos utilizan ácidos débiles que modifican el barrillo dentinario haciéndolo más poroso para que la resina acceda a la dentina subyacente (Toledano y col., 2003).

Se dividen en uno o dos pasos según se dispensen de forma conjunta o separada en diferentes envases, respectivamente, la resina adhesiva y el imprimador.

Este grupo de materiales incluye básicamente a los antiguos sistemas adhesivos que utilizaban un grabado ácido selectivo del esmalte. Muchos de ellos no se utilizan debido a su deficiente efectividad clínica.

Se incluyen en este grupo a los agentes imprimadores que se aplican junto a las resinas modificadas con poliácidos o compómeros.

### **1.2.3.2 Adhesivos que eliminan el barrillo dentinario.**

Actúan mediante la eliminación completa del barrillo dentinario, siguiendo el concepto de la técnica de grabado ácido total (Fusayama y col., 1979) mediante la cual se realiza el acondicionamiento simultáneo del esmalte y de la dentina. También son conocidos como sistemas de grabado total o de grabar y lavar.

En su presentación inicial, estos sistemas eran aplicados en tres pasos consecutivos: grabado ácido, imprimación y aplicación de la resina adhesiva.

El grabado con ácido provoca, en la superficie de esmalte, una disolución parcial de los cristales minerales prismáticos e interprismáticos dando lugar a la formación de microporosidades a ese nivel. De este modo se obtiene una superficie de contacto mayor que se caracteriza por un aumento de la rugosidad y de la energía superficial. A nivel de la dentina, el acondicionamiento de ésta mediante un ácido elimina el barrillo dentinario, desmineraliza la capa superficial de la dentina produciendo una exposición de 3-5  $\mu\text{m}$  de fibras de colágeno, abre los túbulos dentinarios y aumenta las microporosidades de la dentina intertubular.

La matriz de colágeno expuesta en la dentina tras el proceso de desmineralización, tiende a colapsarse por la pérdida del componente mineral, efecto que se acentúa cuando se produce el secado con aire. La pérdida de soporte físico conlleva la desaparición de los espacios necesarios para la infiltración de la resina alrededor de las fibras de colágeno. Por ello se recomienda mantener la dentina tratada húmeda antes de aplicar el adhesivo, puesto que el agua de la superficie dentinaria mantiene la red de colágena expuesta flexible y permeable para que pueda ser infiltrada por la resina (Gwinnett, 1992; Elhabashy y Swift, 1994; Saunders y Saunders, 1996).

Los imprimadores o *primers* facilitan la unión de la resina adhesiva (con carácter hidrófobo) con el tejido dentinario desmineralizado (humedecido). Para ello estos agentes contienen en su composición monómeros polimerizables con propiedades hidrofílicas disueltos en acetona, etanol y/o agua. El solvente meramente sirve como vehículo para

facilitar el acceso de los monómeros en el interior de los tejidos desmineralizados humedecidos.

Los sistemas adhesivos que contienen solventes orgánicos volátiles, como el etanol y la acetona, se fundamentan en la capacidad de estos solventes para desplazar el agua remanente, facilitando así la penetración de los monómeros a través de las microporosidades generadas por el grabado ácido en la estructura prismática del esmalte, dentro de los túbulos dentinarios abiertos y a través del entramado de fibras creado en la dentina desmineralizada (Tay y col., 1996a). De esta forma se pretende conseguir el recubrimiento de todas las fibras y la infiltración completa de los tejidos por la resina.

Los imprimadores que contienen agua llevan fundamentalmente HEMA y ácido polialkenoico. Estos materiales basan su mecanismo de acción en que tras su aplicación, y al secar la superficie con aire, el agua se evapora, aumentando la concentración de HEMA. Este principio de diferencia de volatilidad del solvente frente al soluto es muy importante: el agua tiene una presión de vapor mucho más alta que el HEMA; de hecho, a presión atmosférica el HEMA se considera casi no volátil; esto permite su retención, puesto que su solvente, el agua, se evapora durante el secado (Nakabayashi y Pashley, 1998).

Para conseguir la evaporación del solvente se recurre a la aplicación de un chorro suave de aire sobre la superficie tratada de modo que permanezca una película de resina homogénea con aspecto brillante.

El procedimiento de adhesión se completa con la aplicación de un agente adhesivo hidrofóbico para asegurar que los espacios remanentes entre las fibras se rellenen con resina, la cual se unirá químicamente a la resina compuesta aplicada posteriormente.

Con el surgimiento de los adhesivos simplificados el procedimiento convencional de aplicación de estos sistemas adhesivos de tres pasos se redujo a dos pasos, al combinar en una única solución el imprimador y la resina adhesiva. Básicamente, el mecanismo de adhesión empleado por estos sistemas simplificados es el mismo que el de sus precursores. A pesar de que el procedimiento clínico es más sencillo por el menor número de envases utilizado, el tiempo clínico de aplicación sólo se reduce ligeramente, ya que es recomendable la aplicación de estos materiales en varias capas, sobre todo cuando se trata de adhesivos con alto contenido en acetona, para garantizar un espesor suficiente de adhesivo en la superficie de la capa híbrida y así garantizar la amortiguación de las tensiones (Van Meerbeek y col., 1993b). El nanorrelleno incorporado a alguno de estos materiales también colabora en el establecimiento de una capa de resina uniforme que fortalezca la capa híbrida (Gregoire y col., 2002).

El principal inconveniente referente a estos sistemas adhesivos es la alta sensibilidad a la técnica que plantean durante su aplicación, debido a que el entramado de fibras de colágeno dentinarias desmineralizadas representa un substrato de adhesión delicado y blando. El tejido debe mantenerse húmedo, para evitar que la red de colágeno expuesta tras la desmineralización se colapse impidiendo así la infiltración completa del adhesivo. Se conoce como técnica húmeda de adhesión. El control clínico del grado de humedad necesario en la técnica húmeda es muy difícil. Si la superficie se halla con exceso

de humedad, el agua en demasía afecta a la polimerización de la resina dentro de la capa híbrida produciendo la separación entre los componentes hidrófilos e hidrófobos con la consiguiente aparición de formaciones globulares entre ellos. Estas deficiencias debilitan la unión y producen un sellado incompleto de los túbulos (Tay y col., 1996 a,b). Por el contrario, cuando la superficie dentinaria se seca, el resultado es una infiltración incompleta de los adhesivos, dando lugar a lo que Tay y col. (1996b) denominaron como capa híbridoide. La penetración insuficiente de la resina adhesiva en la base de la dentina desmineralizada va a permitir la existencia de fibras colágenas desprotegidas susceptibles de degradación precoz (Sano y col., 1995a). Para evitar estos efectos adversos, tanto por el exceso de humedad como por el secado del substrato dentinario, se recomienda utilizar una técnica de secado por absorción, removiendo el excedente con una bolita de algodón seca o papel secante después de acondicionar (Kanca, 1992; Tay y col., 1996a). Una superficie adecuadamente húmeda se evidencia clínicamente por una superficie uniformemente brillante en la que no hay agua en movimiento. Sin embargo, algunos autores no han encontrado diferencias entre la adhesión a un substrato húmedo o seco (Araujo y Garcia-Godoy, 1997). Parece ser que algunos imprimadores son capaces de restaurar el estado de las fibras de colágeno desmineralizadas y colapsadas (Eliades y col., 1997). El agua que contienen en su composición permitiría la rehidratación del colágeno facilitando así la infiltración de la resina (Courson y col., 2005).

### **1.2.3.3 Adhesivos que disuelven el barrillo dentinario.**

Son los sistemas conocidos como autograbadores. Se caracterizan por permitir un procedimiento clínico más simplificado.

Utilizan una solución imprimadora ácida capaz de disolver la capa de barrillo dentinario, penetrando entre sus partículas y desmineralizando la parte superficial de la dentina sólida subyacente. Puesto que esta solución autograbadora sólo requiere su dispersión mediante aire y no requiere lavado, el barrillo se incorpora al proceso de adhesión formando parte de la capa híbrida (Pashley y Carvalho, 1997; Salim y col., 2004). La simplificación en el procedimiento clínico para su aplicación se debe no sólo a la reducción en el número de pasos clínicos sino, fundamentalmente, por obviar la necesidad de realizar el lavado de la superficie posteriormente al acondicionamiento del substrato dentinario (Nakabayashi y Pashley, 1998). Por esto, el uso de los sistemas adhesivos autograbadores parece ser prometedor reduciéndose de este modo los problemas asociados al grado de humedad requerido (Yoshiyama y col., 1998; Fritz y Finger, 1999). Además, la principal razón que aconseja el uso de estos sistemas es que desmineralizan superficialmente la dentina y de manera simultánea infiltran la red de fibras colágenas expuesta (Watanabe y col., 1994; Nakabayashi y Saimi, 1996; Nakabayasi y Pashley, 1998), de modo que no existen incongruencias entre la profundidad de desmineralización y la penetración de la resina, evitando así que permanezca colágeno desprotegido susceptible de hidrólisis y degradación precoz.

Asimismo este tipo de sistemas adhesivos se asocia, en la práctica clínica, a una menor frecuencia de sensibilidad postoperatoria, al permitir que los tapones de barrillo dentinario permanezcan sellando junto a la resina infiltrada el orificio de los túbulos dentinarios (Watanabe y col., 1994, Toledano y col., 2006a).

En su concepción inicial estos sistemas fueron propugnados para su aplicación únicamente sobre dentina, requiriendo un grabado ácido selectivo del esmalte previo. En la actualidad los sistemas adhesivos autograbadores actúan simultáneamente en esmalte y dentina realizando su acondicionamiento e imprimación.

Los sistemas adhesivos diseñados para ser aplicados sobre el barrillo dentinario pueden hacerse acídicos de tres formas genéricas. La primera de ellas utiliza monómeros resinosos metacrilatos polimerizables que contienen moléculas de ácido sulfónico, carboxílico, fosfórico o sus ésteres (Hasegawa y col., 1989). La segunda, incorpora minerales o ácidos orgánicos como aditivos a monómeros resinosos no acídicos hidrofílicos. La tercera, mezcla minerales o ácidos orgánicos con monómeros acídicos hidrofílicos. En esta última se pueden incorporar ácidos inorgánicos fuertes, ácidos anhídridos o ácidos orgánicos no polimerizables (ácido cítrico) a los monómeros resinosos acídicos para aumentar la capacidad acídica y favorecer el grabado del esmalte (Tay y Pashley, 2001). Los sistemas autograbadores actuales se desarrollan a partir de la primera y segunda estrategia, siendo preferible la primera de ellas al utilizar monómeros resinosos acídicos basados en metacrilatos, puesto que el ácido y los grupos funcionales polimerizables están dentro de la misma molécula. Estos monómeros penetran, invariablemente, en toda la zona desmineralizada del substrato cubierto por barrillo.

La profundidad de desmineralización durante la aplicación del adhesivo depende del tipo de monómero acídico, de la duración de la aplicación y de la composición del substrato (Miyakazi y col., 2002a). Debido a que estos adhesivos deben atravesar el barrillo dentinario para acceder a la dentina subyacente, la composición y grosor de la capa de barrillo puede afectar a la calidad de la adhesión (Tay y Pashley, 2001; Pangsrisonboon y col., 2007). Además la capacidad tampón del componente mineral de la dentina y del barrillo puede disminuir la capacidad acídica del imprimador, reduciendo así su efectividad (Pashley y Carvalho, 1997).

Además de la interdigitación micromecánica a través del proceso de hibridación, se ha registrado la posible interacción de algunos monómeros acídicos mediante una reacción ácido-base con el calcio residual de la hidroxiapatita del tejido desmineralizado (Yoshida y col., 2004b). La estabilidad de las sales cálcicas formadas y su efectividad en el proceso de adhesión están todavía por determinar.

Los adhesivos autograbadores se dividen en adhesivos de dos pasos y de un paso (*all in one*). Los primeros se presentan en dos frascos separados conteniendo en uno de ellos el agente autograbador (monómeros acídicos y agentes imprimadores) y en el otro el agente de unión, el cual es aplicado posteriormente. El último avance en el concepto del sistema autograbador ha sido el desarrollo de los sistemas de un solo bote. Estos sistemas incorporan todos los componentes (acondicionador acídico, imprimador hidrofílico y resina adhesiva) en una única solución y constituyen los primeros agentes adhesivos que permiten realizar la técnica realmente en un sólo paso (*one step*). Al presentarse en un solo envase, contienen mezclados los monómeros hidrofílicos e hidrofóbicos, por lo que requieren elevadas concentraciones del solvente para mantenerlos en solución (Tay y col., 2002a).

En lo que se refiere a la composición, componentes como HEMA y agua están presentes en casi todos los adhesivos autograbadores, además de moléculas acídicas como monómeros fosfatados (MDP, PENTA, di-HEMA- fosfato) y moléculas acídicas orgánicas (4-MET, ácidos maleico e itacónico). En todos los sistemas adhesivos autograbadores, el agua es un componente fundamental (Tay y Pashley, 2001), ya que permite la ionización de los monómeros acídicos para que haya una desmineralización de los tejidos dentales duros. El HEMA es también muy frecuente por ser un agente de mojado con una alta difusibilidad en ambientes húmedos, así como co-solvente de otros monómeros que se disuelven mal en agua.

A pesar de que los sistemas autograbadores poseen un pH mayor que el ácido fosfórico, lo que resulta en una menor capacidad de acondicionamiento, se ha registrado que son una alternativa válida al grabado convencional con ácido ortofosfórico en esmalte y dentina permanente (Tay y Pashley, 2001). De hecho, se ha demostrado que no existe relación entre la capacidad ácida del adhesivo autograbador y mayores fuerzas adhesivas (Pangrisomboon y col., 2007). Por lo tanto, además de la capacidad ácida del sistema adhesivo es importante valorar la constante de disociación (pKa), los diferentes monómeros de la resina así como el grado de polimerización alcanzado.

### **1.3 MÉTODOS DE MEDIDA DE LA EFICACIA ADHESIVA DE LOS POLÍMEROS A LA DENTINA TEMPORAL.**

#### **1.3.1 Resistencia adhesiva. Test de microtensión.**

Podemos definir la resistencia adhesiva como la máxima tensión (MPa) que puede soportar un adhesivo sin separarse en la interfaz. Para que un adhesivo cumpla su función, esta resistencia adhesiva debe ser mayor o igual a las tensiones que ha de soportar la restauración.

Existen varios métodos para estudiar la resistencia adhesiva de los materiales a los tejidos dentales. Entre los métodos más convencionales y habitualmente utilizados están el de tracción y el de cizalla. En el test de cizalla se emplea un espécimen para cada prueba, ofreciendo un área de adhesión grande. Este hecho limita el número de muestras y produce una gran dispersión en los resultados al producirse un alto porcentaje de fracturas cohesivas en dentina, atribuido a una distribución del estrés no uniforme, con gran dependencia en la geometría de la zona adhesiva y de las cargas aplicadas en la prueba (Sano y col., 1994). En la actualidad, la mayoría de las investigaciones determinan la resistencia adhesiva a dentina mediante el test de microtensión desarrollado por Sano y col. (1994b). A diferencia de las técnicas convencionales de tracción o el test de resistencia al cizallamiento, que utilizan áreas de superficie relativamente grandes, el test de microtensión permite medir áreas adheridas con una sección desde 0,5 mm<sup>2</sup>. Esta reducción en el área de superficie implica múltiples ventajas para valorar la eficacia adhesiva en el substrato dentinario (Pashley y col., 1999; Nakabayashi y col., 1998), siendo, por ello, ampliamente utilizado (Pashley y Carvalho, 1997; Burrow y col., 2002; Nikaido y col. 2002; Uekusa y col., 2006; Toledano y col., 2006a; Osorio y col., 2005b). Entre estas ventajas cabe citar:

- Una distribución de fuerzas más homogénea en toda la interfaz y la aplicación de fuerzas de tracción puras. A diferencia de los tests convencionales que no producen una distribución uniforme de las tensiones a lo largo de la interfaz (Van Noort y col., 1989) dando lugar a grandes variaciones entre las muestras.
- Una menor presencia de defectos en la interfaz resina-diente, los cuales actúan como puntos de estrés e inicio de *cracks* que podrían provocar la ruptura de los enlaces adhesivos (Kinney y col., 2003a). Es por ello que los valores resultantes con esta técnica son superiores respecto a las técnicas que utilizan especímenes de mayor tamaño.
- Esta técnica permite obtener varias muestras de un solo diente. Cada espécimen es considerado una unidad experimental individual, independientemente de que proceda del mismo diente o diferente (Pashley y col., 1999).
- Permiten evaluar diferencias regionales intradentarias en los valores adhesivos (Hosoya y col., 2006).
- Facilitar la colecta de datos en un corto periodo de tiempo (1-5 h), en comparación con otros tests.

### 1.3.2 Tests de degradación de la interfaz *in vitro*.

El procedimiento de adhesión a dentina no se limita únicamente a la retención de las restauraciones dentarias, sino que requiere que las uniones creadas sean fuertes y estables para proveer un adecuado sellado de la interfaz de estas restauraciones. Como resultado de una adhesión defectuosa se puede producir una microfiltración a nivel del margen de la restauración, permitiendo el paso de bacterias y de componentes salivares por la interfaz restauración-diente, causando daños a la pulpa, desarrollo de caries secundarias y degradación de los márgenes de la restauración (Marshall, 1993a) comprometiéndose de este modo la integridad dentaria así como la duración de la restauración (Hanning y Friedrichs, 2001).

En el mismo sentido conviene destacar el proceso de nanofiltración. Este término fue introducido para describir un tipo específico de filtración, que se produce a nivel microscópico dentro de la capa híbrida y que está estrechamente relacionado con el procedimiento de grabado ácido de la dentina. Parece ser que esta filtración representa defectos submicrónicos internos de la capa híbrida o de tejido desmineralizado que no han sido rellenados de modo efectivo por la resina adhesiva (Sano y col., 1995a; Armstrong y col., 2001; Wang y Spencer, 2003). Estos defectos son tan pequeños que las bacterias no pueden acceder, pero sí productos ácidos y enzimas de origen bacteriano así como es posible la penetración de líquidos procedentes de la cavidad oral o de la pulpa (Sano y col., 1995a; Spencer, 1999; Carvalho y col., 2005), repercutiendo en una mayor susceptibilidad a la degradación hidrolítica y bacteriana. El proceso de nanofiltración depende del tipo de agente adhesivo utilizado y de diferentes parámetros relativos a la técnica de aplicación, tales como el tiempo de grabado y humedad de la dentina (Pioch y col., 2001). Asimismo,

la nanofiltración es independiente de la microfiltración siendo mucho menos extensa y posiblemente sin relevancia clínica a corto plazo, pero sí a largo plazo comprometiendo la estabilidad de las uniones adhesivas (Pioch y col., 2001).

La mayoría de los sistemas adhesivos actuales consiguen una efectividad adhesiva aceptable de forma inmediata a su aplicación, contrarrestando las tensiones producidas durante la polimerización del composite, independientemente del sistema adhesivo utilizado (Inoue y col., 2001; Nikaido y col., 2002). Sin embargo, la estabilidad a corto y a largo plazo de las resinas adheridas a dentina permanece cuestionable en muchos aspectos (De Munck y col., 2005). De hecho, se ha observado que las fuerzas de adhesión a dentina disminuyen con el paso del tiempo (Sano y col., 1999; De Munck y col., 2003).

La longevidad clínica de la capa híbrida parece involucrar tanto a factores físicos como químicos. Los factores físicos tales como las fuerzas oclusales masticatorias y las tensiones producidas por los procesos de contracción-expansión debidos a los cambios de temperatura dentro de la cavidad oral parecen afectar la estabilidad de las interfaces (De Munck y col., 2005). Asimismo, los agentes químicos ácidos presentes en el fluido dentinario, la saliva, los alimentos y bebidas así como los productos bacterianos comprometen la interfaz adhesiva dando lugar a diversos patrones de degradación (Hashimoto y col., 2000b; Hashimoto y col., 2002; Nikaido y col., 2002; Pashley y col., 2004).

Aunque el mecanismo de degradación no está suficientemente clarificado, los estudios *in vitro* han demostrado dos mecanismos básicos de degradación de la interfaz adhesiva: (1) la hidrólisis directa de las fibras de colágeno que quedan desprotegidas durante la infiltración de la resina, en la base o dentro de la capa híbrida, tras la descalcificación de la superficie dentinaria (Armstrong y col., 2003; Hashimoto y col., 2000b; Osorio y col., ), consecuencia de los procesos de nanofiltración; (2) la solubilización de los componentes de resina dentro de la capa híbrida (Hashimoto y col., 2003; De Munck y col., 2005; Toledano y col., 2007a).

Una de las principales razones de degradación de la resina dentro de la capa híbrida se debe a un proceso de hidrólisis de la resina en los espacios interfibrilares. La hidrólisis es un proceso químico en el cual se rompen los enlaces covalentes entre los polímeros mediante la adición de agua a las uniones éster, resultando en una pérdida de la masa de resina (Breschi y col., 2007). Por lo tanto, la degradación hidrolítica de la resina está relacionada con la absorción de agua dentro de la capa híbrida, que a su vez se ha correlacionado con la hidrofilia del adhesivo (Ito y col., 2005; Tay y col., 2000b; Tay y col., 2003; Toledano y col., 2007a).

El agua es también el principal responsable en el proceso de degradación del colágeno. En particular, el deterioro de la matriz de colágeno se ha relacionado con la existencia de fibras desprotegidas tras el proceso de adhesión, de tal forma que se ha producido una infiltración incompleta por parte de los monómeros de resina en el seno del tejido desmineralizado, quedando así fibras colágenas que no han sido encapsuladas por la resina adhesiva. Independientemente del sistema adhesivo utilizado, esta hibridación incompleta de la superficie dentinaria parece ser un lugar preferencial del inicio de la

degradación de la interfaz (Pashley y col., 2004; Gwinnett y Yu, 1995; Carvalho y col., 2005; Toledano y col., 2007b; Osorio y col., 2005b). La degradación del colágeno que ocurre en la base de la capa híbrida ha sido también confirmada por estudios *in vivo* (Hebling y col., 2005; Koshiro y col., 2005). Asimismo se ha demostrado *in vivo* que la desproteínización de las fibras de colágeno dentro de la estructura adherida causa un descenso de los valores de adhesión a largo plazo (Hashimoto y col., 2000b; Donmez y col., 2005).

Las fibras colágenas desprotegidas son susceptibles a la degradación hidrolítica así como vulnerables a otros factores de degradación, como el solvente residual del adhesivo (Yiu y col., 2005)

Con el fin de analizar la durabilidad y estabilidad de las uniones adhesivas se han desarrollado diferentes tests de acelerado *in vitro*, mediante la reducción del tamaño de los especímenes (barritas de dentina-resina adheridas de 1 mm<sup>2</sup> de área) y la inmersión de los especímenes en diferentes medios de almacenamiento. Gracias a estos tests es posible evaluar la capacidad de los diferentes monómeros de resina de proteger la matriz de colágeno.

#### 1.3.2.1 Degradación química

Estudios recientes han puesto de manifiesto que la matriz dentinaria grabada con ácido puede ser degradada a lo largo del tiempo por enzimas proteolíticas endógenas derivadas de la dentina, en ausencia de enzimas bacterianas (Van Strijp y col., 2003; Pashley y col., 2004). Parece ser que las enzimas endógenas responsables del proceso de degradación del colágeno son metaloproteinasas (MMPs) (Pashley y col., 2004; Toledano y col., 2007b) que quedan atrapadas dentro de la matriz dentinaria mineralizada durante el desarrollo dentario (Van Strijp y col., 2003). Dado que estas enzimas son hidrolasas, requieren la presencia de agua para hidrolizar las uniones peptídicas en las moléculas de colágeno (Toledano y col., 2007a). La liberación y subsecuente activación de estas enzimas endógenas es producida durante los procedimientos de adhesión dentinaria (Tay y col., 2006; Nishitani y col., 2006).

Debido al efecto proteolítico inespecífico del hipoclorito sódico, que actúa de manera efectiva sobre los componentes orgánicos (Nakabayashi y Saimi, 1996; Spencer y Swafford, 1999) cuando éstos están expuestos a su acción, este compuesto es capaz de hidrolizar y solubilizar las fibras de colágeno que quedan desprotegidas dentro de la estructura adherida (De Munck y col., 2005; Toledano y col., 2007a; Osorio y col., 2005b).

En solución acuosa, el hipoclorito sódico, forma radicales superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) que producen la oxidación y fragmenta las cadenas proteicas (Yoshida y col., 2004a; Osorio y col., 2005b; Yamauti y col., 2003). Se utiliza en solución al 10%, como sustituto de las enzimas proteolíticas (Spencer y Swafford, 1999; Nakabayashi y Saimi, 1996), permitiendo testar de forma acelerada el deterioro de las uniones dentina-resina en un corto periodo de tiempo (Yamauti y col., 2003).

Asimismo, este agente permite valorar, de forma indirecta, la capacidad de los diferentes monómeros de resina de proteger a la matriz dentinaria de colágeno (Osorio y col., 2005b; Yamauti y col., 2003; Yoshida y col., 2004a) y es considerado como uno de los medios más eficaces para analizar la durabilidad de las uniones.

### 1.3.2.2 Ciclado mecánico

Los dientes están sujetos a cargas cíclicas durante la masticación. La frecuencia de la carga fisiológica de masticación es de 1 Hz (Anderson, 1956). El promedio de fuerzas masticatorias registradas a nivel de la superficie oclusal de los dientes durante la masticación oscila entre 5-15 Kg (Berkovitz y col., 2002), pudiendo alcanzar un valor entre 50-100 Kg en adultos; no habiéndose registrado valores superiores a 30 Kgf en niños de 3 a 5 años de edad (Rentes y col., 2002) y en 7 a 9 años (Maki y col., 2001), sin embargo los hábitos parafuncionales tales como el apretamiento o rechinar dentario pueden hacer aumentar la frecuencia así como la intensidad de las fuerzas oclusales. En general, la fuerza masticatoria máxima funcional va a depender de: sexo y edad, grupos dentarios, posición mandibular, estado de la dentición, disfunción del sistema estomatognático, características esqueléticas craneofaciales (dolico-meso-braquifacial) y área de sección transversal de los músculos (Raadsheer y col., 1999; Pereira y col., 2007).

El sumatorio de todos los contactos oclusales que una persona realiza, incluyendo la deglución, en condiciones normales durante un día es aproximadamente de dieciocho minutos (Bates y col., 1975). La frecuencia media de masticación de una persona con dentición natural es del orden de 80 ciclos por minuto (Bates y col., 1975).

Las fuerzas masticatorias y deglutorias que se producen en la cavidad oral pueden inducir la formación de *cracks* a nivel de la interfaz adhesiva (Nalla y col., 2002), los cuales al propagarse pueden deteriorar la integridad de las uniones resina-dentina dando lugar fenómenos de micro o nanofiltración (Sano y col., 1995a), comprometiéndose de este modo la supervivencia a largo plazo de estas uniones (Sano y col., 1999).

Conviene recordar el hecho de que los fallos adhesivos se inician en defectos. Estos defectos pueden ser intrínsecos (regiones de mineralización alterada) o extrínsecos (causados por la preparación cavitaria o generados durante la aplicación de los materiales). La existencia de estos defectos puede causar la fractura dentaria a tensiones lejanas de su fuerza de adhesión teórica (Kinney y col., 2003a). Resulta importante identificar estos defectos así como comprender como un defecto sub-crítico puede crecer y coalescer con el ciclado mecánico (Kinney y col., 2003a; Nalla y col. 2002).

El uso combinado de ciclado mecánico con el test de fuerzas adhesivas de microtensión (MTBS) permite la evaluación *in vitro* de la durabilidad de la adhesión resina-dentina bajo unas condiciones clínicamente más relevantes de las que son usadas normalmente en la técnica de fuerzas de adhesión estáticas (Nikaido y col., 2002; Toledano y col., 2006b).

## 1.4 MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS (AFM) EN DENTINA TEMPORAL

Desde su aparición en los años 80, el Microscopio de Fuerzas Atómicas (AFM), ha contribuido de forma determinante en la investigación de las propiedades y la microestructura de los materiales. Basado en la interacción local entre la punta y la superficie de una muestra, proporciona imágenes tridimensionales de superficies con alta resolución espacial en tiempo real.

Está constituido por cinco elementos fundamentales: la punta, el escáner, el detector, el sistema de control electrónico y el sistema de aislamiento de vibración.

El AFM escudriña la superficie de la muestra con una punta seleccionada de acuerdo al tipo de muestra y las propiedades que se desean obtener; ésta puede ser de diferentes materiales, las más comunes son de Nitruro de Silicio o de Silicio. Esta punta va colocada en el extremo distal de un cantilever y funciona mediante un procedimiento de resonancia que produce la excitación mecánica de ésta. Tiene un radio de curvatura de 20 a 60 nm. Las fuerzas entre la punta y la muestra provocan la deflexión del cantilever; esta deflexión es medida por un detector a medida que la punta se desplaza sobre la superficie de la muestra generando una micrografía de la superficie.

La muestra se coloca sobre el escáner que tiene forma de tubo y es de un material cerámico piezoeléctrico que cambia de dimensiones como respuesta a un voltaje aplicado, de este modo permite la movilidad de la muestra en las tres dimensiones del espacio con una precisión subnanométrica. Estos movimientos se van a corresponder con la morfología de las superficies, dado que la muestra se escanea a fuerza constante. La resolución vertical del microscopio es de 0,1 nm.

El microscopio de fuerzas atómicas trabaja en múltiples modos de operación de acuerdo a las características físicas de la muestra y de las propiedades a medir:

- Contacto: Mide la topografía de la muestra deslizando la punta sobre su superficie.
- *Tapping* o Contacto intermitente: Mide la topografía de la muestra tocando intermitentemente su superficie.
- Imagen de fase: Proporciona una imagen contrastada generada por las diferencias de adhesión en la superficie de la muestra.
- No contacto: Mide la topografía de acuerdo a las fuerzas de Van der Waals que existen entre la muestra y la punta.
- Fuerza magnética: Mide el gradiente de fuerza magnética sobre la superficie de la muestra.

- Fuerza eléctrica: Mide el gradiente de fuerza eléctrica sobre la superficie de la muestra.
- Potencial de superficie: Mide el gradiente de campo eléctrico sobre la superficie de la muestra.
- Modo lift: Técnica que utiliza dos modos de operación usando la información topográfica para mantener la punta a una altura constante sobre la superficie.
- Modulación de fuerza: Mide la elasticidad/suavidad relativa de la superficie de la muestra.
- Microscopía de tunelamiento: Mide la topografía de superficie de la muestra utilizando la corriente de tunelamiento.
- Microscopía electroquímica: Mide la estructura de la superficie y las propiedades de los materiales conductores inmersos en soluciones electrolíticas.
- Litografía: se emplea una punta especial para grabar información sobre la superficie de la muestra.

Además del estudio de la microestructura y propiedades de los materiales de uso odontológico, el AFM permite el estudio del proceso de desmineralización dentaria. Esto es debido a la capacidad de obtener imágenes tridimensionales, proporcionando así información sobre la profundidad y morfología de las muestras y a la actuación en tiempo real. De esta forma es posible la observación directa de los estadios del proceso de desmineralización dentaria, permitiendo una evaluación longitudinal de la estructura alterada, dada su alta resolución y el potencial de operar en aire o solución (Marshall y col., 1993b; Kinney y col., 1993; Cassinelli y Morra, 1994), lo que le aventaja frente a las técnicas de microscopía electrónica (MEB Y MET) que pueden provocar la contracción de la muestra durante su preparación y observación al vacío (Marshall y col., 1995). Asimismo, este sistema posibilita la realización de estudios de rugosidad y determinación de la nanodureza, en las superficies dentarias. La incorporación de un indentador en el microscopio de fuerzas atómicas ha permitido medir la dureza y rigidez de especímenes completamente hidratados con precisión de nanómetros (Kinney y col., 1996).

## **1.5. MICRODUREZA DEL SUBSTRATO DENTINARIO**

El conocimiento de la microestructura así como de las propiedades mecánicas del substrato dentinario a adherir es un factor clave en el procedimiento adhesivo al depender este proceso, en gran medida, de la integridad de la interfaz creada entre la estructura dentaria y el sistema adhesivo (Meredith y col., 1996; Angker y col., 2003; Hosoya y col., 2006). La microdureza se define como la resistencia que ofrece un material a la deformación local. Los cálculos se basan en la deformación permanente inducida en la superficie que permanece tras ser retirada la carga (Van Meerbeek y col., 1993).

La mayoría de las mediciones de dureza en la dentina se realizan mediante las pruebas Knoop y Vickers. Ambas se clasifican como pruebas de microdureza. Las escotaduras resultantes son muy pequeñas y se limitan a una profundidad menor de  $19\ \mu\text{m}$ , siendo necesario un microscopio para medir la huella de la indentación. Ambas técnicas son apropiadas para determinar la dureza de materiales frágiles, por lo que se utilizan para medir la dureza de las estructuras dentarias.

En la prueba de durometría Vickers se utiliza un indentador piramidal de diamante de base cuadrada con un ángulo diedro de  $136^\circ$ . Para calcular el número de dureza Vickers (VHN) se divide la carga utilizada por el área proyectada de la muesca. Las longitudes de las diagonales de la muesca se miden y se promedian.

En la prueba de dureza Knoop, la punta del indentador es piramidal pero de base rómbica, formada por dos caras perpendiculares entre sí con ángulos de  $172^\circ 30'$  y  $130^\circ$  (Anusavice, 1996). Después de aplicar la carga seleccionada durante el tiempo se retira el indentador dejando sobre la muestra una huella con forma de rombo. El tamaño de la huella se determina midiendo la longitud de la diagonal más larga del rombo mediante un microscopio óptico. El número de dureza Knoop (KHN) es función de una constante relacionada con la geometría del indentador y de la carga aplicada dividida por el área proyectada de la indentación.

Se ha registrado que existe una relación lineal entre la dureza y el módulo de elasticidad (Mahoney y col., 2000; Angker y col., 2003; Angker y col., 2004a)). La elasticidad propia de la dentina tiene gran importancia funcional, ya que permite compensar la rigidez del esmalte, amortiguando los impactos masticatorios. El porcentaje de sustancia orgánica y el contenido de agua presentes en la dentina van a influir en la elasticidad del tejido dentinario. Esta propiedad de la dentina es la responsable de que al realizar una muesca sobre este sustrato se produzca la recuperación elástica de la impresión proyectada. Se ha observado que en el caso del indentador Knoop las tensiones se distribuyen de tal modo que sólo las del menor eje se someten a carga por relajación, por lo que ocurre principalmente a expensas de un acortamiento de la diagonal más corta (Craig y Peyton, 1958). De este modo, las medidas de dureza obtenidas con este método son prácticamente insensibles a la recuperación elástica del material (Fuentes y col., 2003).

Además, uno de los factores que caracteriza al test de dureza Knoop es su sensibilidad a las condiciones de la superficie y textura. Para una misma carga, el indentador Vickers penetra aproximadamente el doble de la distancia que el indentador Knoop y la muesca realizada es un tercio más corta que la diagonal larga producida en la huella del indentador Knoop. Por ello, la prueba de Vickers se considera menos sensible a las condiciones de la superficie. Además, debido al menor tamaño de la huella, el método Vickers es más propenso a que se produzcan mediciones erróneas (Knoop y col., 1939; Lasheras, 1981).

Se ha registrado que la estructura dentaria es un sistema complejo compuesto por varios componentes que se protegen mutuamente, con alta resistencia a la fractura (Marshall, 1993a). Dado que el gran reto de los procedimientos restauradores es devolver al diente restaurado sus propiedades físicas y mecánicas, parece aconsejable que los procesos acondicionadores tengan un efecto mínimo en las propiedades físicas y mecánicas del sustrato dentario, al tiempo que consiguen su objetivo de preparar dicho sustrato para hacerlo más receptivo a los agentes adhesivos. Es por ello que para el desarrollo del presente trabajo se estableció una hipótesis nula doble:

1- No existen diferencias en la rugosidad, microdureza y eficacia adhesiva a dentina decidua al utilizar diferentes sistemas adhesivos así como al reducir a la mitad el tiempo de acondicionamiento de dichos sistemas.

2- La degradación mecánica y química no tiene efecto en la eficacia adhesiva a dentina primaria.

## **2. OBJETIVOS**

Los objetivos del presente estudio fueron los siguientes:

1. Caracterizar físicamente la superficie dentinaria primaria mediante el estudio de su dureza y rugosidad, en condiciones normales y después de diferentes procesos de acondicionamiento del tejido.
2. Evaluar la eficacia adhesiva a dentina primaria de diferentes sistemas adhesivos actuales.
3. Determinar la resistencia adhesiva dentinaria de dichos sistemas adhesivos al modificar los tiempos de acondicionamiento de la dentina.
4. Estudiar el efecto de la degradación química en la interfaz dentina decidua-resina creada con los sistemas adhesivos seleccionados y según el tiempo de acondicionamiento dentinario.
5. Valorar la influencia de la degradación mecánica sobre la interfaz dentina temporal-resina según el tipo de adhesivo utilizado y en relación al tiempo de acondicionamiento del substrato dentinario.
6. Realizar el análisis fractográfico de los fallos obtenidos con los diferentes sistemas adhesivos.

### **3. MATERIAL Y MÉTODO**

Para el desarrollo de este estudio se han utilizado primeros y segundos molares temporales sanos extraídos por motivos ortodóncicos, bajo consentimiento informado institucional de los padres. La investigación fue aprobada por la Comisión de Ética e Investigación de la Universidad de Granada.

Los dientes fueron conservados hasta su utilización inmersos en una solución de timol a 4° C por un periodo de tiempo inferior a seis meses (Rueggeberg, 1991).

De acuerdo con los objetivos propuestos se llevaron a cabo los siguientes estudios:

- Caracterización física de la superficie de dentina primaria en condiciones normales y tras ser sometida a diferentes tratamientos acondicionadores. Para ello se realizó 1) medición de dureza mediante técnica de microindentación Knoop y 2) estudio de rugosidad con microscopio de fuerzas atómicas (AFM).

- Estudio de la eficacia adhesiva a dentina primaria de diferentes sistemas adhesivos, mediante test de microtensión y análisis fractográfico de las superficies fracturadas: 3) a corto plazo (24 horas) y posterior a proceso de 4) degradación química y 5) mecánica de las interfaces generadas con estos mismos sistemas adhesivos.

Los sistemas adhesivos utilizados fueron: un sistemas de grabar y lavar de dos pasos, Single Bond (SB) (3M ESPE Dental Products, St Paul, MN, USA), un sistema autograbador de dos pasos, Clearfil SE Bond (CSEB) (Kurakay Co. Ltd., Osaka, Japan) y un autograbador de un paso, One-Up Bond F (OUB) (Tokuyama Europe GMBH, Dusseldorf, Germany). La relación de éstos, así como sus composiciones químicas y características se encuentran reflejadas en la Tabla 1.

### **3.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LA SUPERFICIE DENTINARIA TEMPORAL**

En la realización de este estudio se utilizaron 42 molares temporales. Para la preparación de los especímenes se realizó un corte transversal de las coronas dentarias, por debajo de la unión amelodentinaria (UAD) y perpendicular al eje longitudinal del diente, con una recortadora a baja velocidad (Accutom Hard Tissue Microtome; Struers, Dinamarca) bajo irrigación con agua. De este modo, se obtuvo una superficie de dentina, libre de esmalte, con los túbulos dentinarios orientados perpendicularmente a la superficie expuesta.



Fig.1. Bloques de resina con los dientes introducidos

Para facilitar el pulido y manejo de las superficies de dentina, los dientes cortados se introdujeron en bloques de resina epoxy, los cuales fueron conformados con moldes circulares de plástico. Una vez realizados los bloques, se procedió al pulido de las superficies dentinarias mediante discos de SiC hasta 180 grit, bajo irrigación con agua.

Los bloques fueron aleatoriamente divididos en los siguientes grupos experimentales:

Grupo 1. Dentina pulida sin tratar. Los especímenes de este grupo fueron sometidos a un pulido metalográfico de las superficies, con el fin de obtener una superficie lisa y altamente pulida sin barrillo dentinario detectable. Para ello se utilizó una pulidora struers labopol 4 (Copenhage, Dinamarca) con discos de SiC en una secuencia progresiva 500, 800, 1200, 2400 y 4000 Grit bajo irrigación con agua, finalizando el proceso de pulido con discos de terciopelo y pasta diamantada de  $1\mu$  y  $1/4\mu$  sumergiendo las muestras en una cuba de ultrasonidos durante 5 minutos de forma previa al pulido con cada pasta diamantada. Las muestras fueron almacenadas en agua destilada hasta su uso.

Grupo 2. La dentina fue pulida y desmineralizada con ácido ortofosfórico siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se aplicó un gel de ácido ortofosfórico al 35% sobre la superficie dentinaria durante 15s, agitándolo durante dicho periodo de tiempo con un pincel. A continuación se procedió al lavado de la superficie con abundante agua durante 30s para retirar el ácido. Los especímenes fueron conservados en agua destilada hasta el momento de su utilización.

Grupo 3. La superficie de dentina se desmineralizó con ácido ortofosfórico la mitad del tiempo recomendado por el fabricante. Se realizó el mismo procedimiento que en el grupo 2 excepto para el tiempo de aplicación del ácido ortofosfórico que fue de 7s.

Grupo 4. Se aplicó el imprimador del Clearfil SE Bond (CSEB) a la superficie pulida según las instrucciones del fabricante, durante 20s.

Grupo 5. Se aplicó el imprimador CSEB la mitad del tiempo recomendado por el fabricante (10s), sobre la dentina pulida.

Grupo 6. Tras el pulido de la superficie dentinaria, One-Up Bond fue aplicado a la superficie durante el tiempo indicado por el fabricante, 20s.

Grupo 7. El agente adhesivo One-Up Bond fue aplicado a la superficie pulida durante la mitad del tiempo que recomienda el fabricante (10s).

Los materiales adhesivos autograbadores (grupos 4,5,6 y 7) fueron eliminados de la superficie mediante lavado con diferentes soluciones crecientes de etanol (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y 100%) durante 1 minuto cada una (Pashley y Tay, 2001) finalizando el proceso mediante la inmersión de las muestras en cuba ultrasónica con una solución absoluta de etanol durante 1 minuto para disolver el líquido autograbador, *primer* o adhesivo. A continuación, las muestras fueron rehidratadas con agua destilada para proceder a determinar los valores de microdureza y rugosidad de la superficie dentinaria (Pashley y Tay, 2001).

**Tabla 1 . Relación de los sistemas adhesivos utilizados con su composición química y pH.**

<b>Sistemas adhesivos</b>	<b>Composición</b>	<b>pH</b>
Adhesivo de grabado total		
<b>Single Bond (SB)</b> (3M Dental-Espe, EE.UU.) Lote n° 4JH	Etanol, HEMA, Bis-GMA, glicerol 1,3 dimetacrilato, copolímero de ácido acrílico e itacónico, agua, diuretano dimetacrilato.	4,3
Ácido ortofosfórico Scotchbond etchant, 3M Dental Products, St Paul, MN, EEUU	Ácido ortofosfórico al 35%	0,6
Adhesivo autograbador de dos pasos		
<b>Clearfil SE Bond (CSEB)</b> (Kurakay Co., Ltd., Osaka, Japón) Lote n° 41501	<i>Imprimador:</i> 10-MDP, HEMA, dimetacrilato hidrofílico, CQ, DEPT y agua. <i>Adhesivo:</i> MDP, HEMA, Bis-GMA, CQ, dimetacrilato hidrofóbico, DEPT y sílice coloidal silanizado.	2,1
Adhesivo autograbador de un paso		
<b>One-Up Bond F (OUB)</b> (Tokuyama Corp., Tokyo, Japón) Lote n° 221E	<i>Agente adhesivo A:</i> MAC-10, monómeros de fosfato, Bis-GMA, TEGDMA, fotodesensibilizador. <i>Agente adhesivo B:</i> HEMA, fluor-aluminosilicato Micro Filler, Photosensitizer, agua.	1,3

Abreviaturas: **HEMA:** 2-hidroxietil metacrilato; **Bis-GMA:** bisfenol A glicidil éter dimetacrilato; **MDP:** 10-metacrilatoiloxi metacrilato; **CQ:** d,l-camforoquinona; **DEPT:** N,N-dietanol p-toluidina; **TEGDMA:** Trietilenglicoldimetacrilato.

**Tabla2 .Composición química del composite utilizado.**

### **Composite**

<b>TPH</b> (DENTSPLY DeTrey GmbH, Konstanz, Alemania) Lote n° 0510101	Aducto Bis-GMA, Bis-EMA, TEGDMA, fotoiniciador de canforoquinona, estabilizador Barioaluminoborosilicato Bariofluoraluminoborosilicato Dioxido de silice
--	--

#### **3.1.1 Ensayo de Microdureza.**

Para la realización del test de dureza se utilizó un microdurómetro V-testor 4021, (Instron Wolpert GmbH, Ludwigshafen, Alemania) con indentador Knoop.

En el presente estudio se utilizó una carga de 50g para cada indentación en dentina mineralizada y de 20g en los especímenes acondicionados. La aplicación de una carga de 50g en los especímenes acondicionados resultó excesiva, provocando daños en las superficies reblandecidas tras los procedimientos acondicionadores y haciendo

impracticables las mediciones de la diagonal larga. Tanto para las cargas de 50g como para las de 20g el tiempo de aplicación fue de 15 segundos.

El test de dureza se llevó a cabo de forma inmediata después del pulido de los especímenes. Se realizaron aproximadamente 15 indentaciones en cada espécimen respetando una distancia de 100  $\mu\text{m}$  hasta el límite amelodentinario y entre las indentaciones, para evitar interacciones entre las áreas deformadas. Entre cada indentación, los especímenes eran recubiertos con un papel mojado para evitar la deshidratación de la superficie dentinaria (Xu y col., 1998). A pesar de que la medición óptica de la indentación se ve dificultada cuando la dentina está hidratada (Hosoya y col., 2000) se ha demostrado que de este modo se obtienen resultados más reales y válidos (Totah, 1942). En las condiciones descritas se procedió a la lectura de la diagonal larga en la huella provocada por el indentador y se determinó la dureza Knoop, expresada en *Knoop Hardness Number* (KHN) mediante exámen de la superficie con microscopio óptico (800X) (Karl Zeiss, Alemania) y según la siguiente fórmula:

$$\text{KHN} = 14,229 \text{ P/L}^2,$$

donde P = carga, en gramos, y L = longitud de la diagonal mayor, en micrometros.

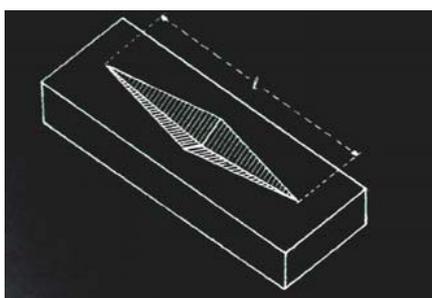


Fig.2a. Diseño esquemático indentación Knoop



Fig.2b. Indentación Knoop

Con los valores KHN obtenidos en cada indentación se calculó la media y la desviación estándar de la microdureza de cada espécimen, utilizando dichas medias para el cálculo de la media y desviación estándar del valor de microdureza para cada grupo experimental. Estos valores fueron sometidos a análisis estadístico mediante el Test de ANOVA *One way* utilizándose los parámetros de microdureza como variable dependiente y el tratamiento de acondicionamiento dentinario como factor. Las comparaciones posteriores se llevaron a cabo con el test de Student-Newman-Keuls, estableciéndose el nivel de significación en  $p < 0,05$ .

### 3.1.2 Ensayo de Rugosidad.

Para determinar la rugosidad de las superficies tratadas se utilizó un microscopio de fuerzas atómicas (AFM), seleccionando el modo de contacto intermitente o *tapping* para el desarrollo del presente estudio. Una ventaja del modo de acción seleccionado para el presente trabajo es la ausencia de fuerzas de fricción, evitando así las fuerzas de torque

sobre el cantilever. De esta manera se consigue que la onda de *feedback* mantenga una vibración a una amplitud constante en el cantilever.

Para el desarrollo de este estudio, se prepararon discos de dentina de aproximadamente 1 mm de espesor a partir de los molares primarios introducidos en bloques de resina. Hasta su preparación los molares se almacenaron en agua destilada a 4°C. Los cortes se realizaron perpendicularmente al eje axial del diente, con un disco de diamante (Buehler Instruments, Lake Bluff, IL, EEUU) a baja velocidad y bajo irrigación con agua, con el objetivo de que los túbulos dentinarios quedaran en una orientación perpendicular a la superficie expuesta. A continuación se procedió a realizar el pulido metalográfico de las muestras con polvo de alumina 0,1 µm para eliminar completamente el barrillo dentinario.

Se prepararon en total 21 discos que fueron asignados aleatoriamente a los grupos experimentales descritos (tres superficies dentinarias por grupo). Cada muestra era colocada en el AFM manteniendo una gota de agua destilada en su superficie, la cual era eliminada con papel de fieltro en el momento de determinar la rugosidad. Se tomaron tres imágenes de 20 x 20 µm para cada muestra, realizándose tres medidas aleatorias de rugosidad en cada una, en secciones de aproximadamente las mismas dimensiones.

Se determinaron las medias y desviaciones estándar de los valores de rugosidad (Ra) y se sometieron a análisis estadístico con análisis de la varianza *One way ANOVA* utilizándose los parámetros de rugosidad como variable dependiente y el tratamiento dentinario como factor. Se realizaron múltiples comparaciones con el test de Student-Newman-Keuls estableciéndose el nivel de significación en  $p < 0,05$ .

## **3.2 ESTUDIO DE LA EFICACIA ADHESIVA**

### **3.2.1. EFICACIA ADHESIVA INMEDIATA**

Para la realización de este estudio se utilizaron doce molares temporales sanos. En la preparación de los especímenes se realizó un corte paralelo al plano oclusal dentario por debajo de la UAD para eliminar el esmalte de los dientes, con discos de diamante montados en una máquina de corte Accutom (Struers, Copenhague, Dinamarca) y bajo irrigación continua con agua. A continuación se preparó la superficie dentaria utilizando discos de silicona hasta 500 grit en una pulidora EXAKT-Apparatebau D-2000 (Nerderstedt, Alemania) hasta eliminar completamente el esmalte y obtener una superficie de dentina lisa, siempre bajo irrigación con agua. Las superficies pulidas fueron analizadas bajo lupa de aumento (x20) para garantizar la eliminación completa del esmalte. Tras ello se realizó un pulido adicional, bajo irrigación, con discos de SiC de 600 grit durante 30s para obtener una capa estandarizada de barrillo dentinario y una rugosidad similar a la que se obtendría en clínica con una fresa de tungsteno (McInnes y col, 1990).

Los especímenes se distribuyeron aleatoriamente en seis grupos experimentales de igual tamaño, según el tipo de sistema adhesivo a valorar (Tabla 1) y según los tiempos de acondicionamiento dentinario aplicados:

Grupo 1: Utilización de un sistema adhesivo de grabar y lavar (Single Bond 3M). La dentina se grabó con un gel de ácido ortofosfórico al 35% aplicado durante 15 segundos, según las indicaciones del fabricante. Posteriormente se lavó con agua, durante 10s, y se secó ligeramente dejando la dentina húmeda, tras lo que se aplicó el adhesivo con un pincel en dos capas consecutivas. Finalmente se secó levemente con chorro de aire libre de aceites y se fotopolimerizó durante 10s.

Grupo 2: Se aplicó el mismo sistema adhesivo que en el grupo 1 reduciendo el tiempo de grabado con ácido ortofosfórico al 35% a 7 segundos, es decir, a la mitad del tiempo recomendado por el fabricante. Posteriormente se continuó el proceso tal y como se ha descrito en el subgrupo anterior.

Grupo 3: Utilización de un sistema adhesivo autograbador de dos pasos (Clearfil SE Bond). Se procedió a la preparación de la superficie siguiendo las instrucciones del fabricante, tal y como se indica a continuación. El imprimador se aplicó sobre la dentina, dejándolo actuar durante 20s y posteriormente fue secado con aire, durante 5s, para favorecer la evaporación de los ingredientes volátiles. A continuación, se pinceló una capa uniforme del agente adhesivo sobre toda la superficie, la cual fue sutilmente adelgazada con un suave chorro de aire libre de aceites y polimerizada durante 10s.

Grupo 4: Aplicación del adhesivo autograbador de dos pasos Clearfil SE Bond reduciendo a la mitad el tiempo de imprimación dentinaria. El procedimiento fue idéntico al anterior salvo que se redujo a la mitad el tiempo de actuación del *primer* permitiendo su actuación durante 10s.

Grupo 5: Aplicación de un sistema adhesivo autograbador de un paso (One Up Bond) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Tras dispensar gotas iguales del agente adhesivo A y del agente adhesivo B, se procedió al mezclado de ambas durante 5s hasta obtener una mezcla líquida homogénea de color rosa, la cual fue aplicada sobre la superficie dentinaria permitiendo que actuara durante 20s y posteriormente polimerizada durante 10s.

Grupo 6: Se utilizó el sistema autograbador de un paso del grupo anterior (One Up Bond) aplicando el acondicionador dentinario la mitad del tiempo recomendados por el fabricante. Se procedió de igual forma que en el grupo 5 excepto por la reducción a la mitad del tiempo de actuación sobre la superficie de dentina, es decir 10s.

La polimerización de las resinas se llevó a cabo con una lámpara de luz visible Optilux 400 (Demetron Research Corporation, Danbury, CT., USA), controlando que la intensidad de la luz fuera siempre superior a  $600 \text{ mW/cm}^2$ , mediante un radiómetro del

mismo fabricante (Demetron Curing Radiometer Model 100 Demetron Research Corporation, Danbury, CT., EEUU).

Una vez completados los protocolos de adhesión, se conformaron bloques de composite sobre la superficie acondicionada (Fig. 3). Se utilizó un composite híbrido fotopolimerizable TPH (DENTSPLY DeTrey GmbH, Konstanz, Alemania) (cuya composición química está reflejada en la Tabla 2) en capas de espesores no mayores a 1,5 mm, polimerizando 40s cada capa, hasta obtener una altura de aproximadamente 6 mm. Se utilizó una lámpara de luz visible Optilux 400 (Demetron Research Corporation, Danbury, CT., EEUU) controlando que la intensidad de la luz fuera siempre superior a  $600 \text{ mW/cm}^2$ .

En el último incremento de composite se utilizó un porta-muestras de cristal para conseguir que la interfaz de dentina-adhesivo fuera paralela a la base de la "corona" de composite. El paralelismo entre estas dos superficies fué una condición fundamental, para evitar otros tipos de carga durante la prueba de microtensión.

Después de conservar los dientes durante 24 horas sumergidos en agua destilada a  $37^\circ\text{C}$  se procedió a la preparación de la superficie radicular. Para ello, tras la eliminación de cualquier resto pulpar que pudiera existir mediante fresa de tungsteno 330 montada en turbina (Kavo Dental GMBH & Co., Biberach, Alemania), se prepararon las cámaras pulpares con ácido ortofosfórico al 35% durante 15s y el sistema adhesivo Single Bond. A continuación se rellenaron las cámaras pulpares con resina TPH y se conformó, del mismo modo que se ha descrito anteriormente, un bloque de composite mediante capas de 1,5 mm de espesor máximo polimerizando cada capa durante 40s, y manteniendo la interfaz de dentina coronal-adhesivo paralela a la base del bloque de composite.

La superficie de composite que se correspondía con la interfaz a valorar posteriormente en las pruebas de microtensión, es decir, el composite correspondiente a la dentina coronal, fue marcada con rotulador indeleble de color verde para su posterior identificación.

Por último, se procedió al pulido de las superficies laterales de las muestras con el fin de retirar los excesos de composite y visualizar correctamente las interfaces creadas.

#### Ensayo de microtensión

Una vez conformadas las muestras dentarias según los diferentes protocolos de adhesión, cada muestra, individualmente, fue fijada mediante cera dental a unos porta-muestras de resina acrílica autopolimerizable para proceder a su corte en una máquina de cortes seriados Accuton 50 (Struers, Copenhage, Dinamarca). Se obtuvieron entre 12 y 15 barritas dentarias libres de esmalte de cada muestra, con un área de sección transversal de aproximadamente  $1 \text{ mm}^2$ , según la técnica descrita por Shono y col. (1999) Sano y col., (1994b).

Cada barra fue sometida a un ensayo de microtensión, para lo cual era fijada a un aparato de test modificado Bencor Multi-T (Danville Engineering Co., Danville, CA, EEUU) de modo que la interfaz a valorar quedara colocada perpendicularmente a las fuerzas de tracción. La fijación de las barras se realizó mediante un adhesivo de cianocrilato (Zapit, Dental Ventures of America Inc., Corona, CA, EEUU) en cada uno de los extremos de la barra, cuidando que dicho adhesivo no invadiera la interfaz adhesiva a valorar. El ensayo se realizó en una máquina de tracción universal Instron 4411 (Instron Corporation, Canton, MA, EEUU) en la que se testó cada barra bajo tracción hasta su rotura con una velocidad de cruceta de 0,5 mm/min.

Los datos generados durante la prueba de microtensión fueron monitorizados por un programa de ordenador. En el momento de la fractura, el movimiento era automáticamente interrumpido y la carga registrada en KN en la pantalla del ordenador.

Las barras fracturadas fueron cuidadosamente retiradas del aparato con la ayuda de una hoja de bisturí nº 15, para proceder a la medición del área de la sección transversal en el punto de fractura, mediante un calibrador digital Sylvae Ultra-Call Li (Fowler Inc., Newton, MA, EEUU) con una desviación de hasta 0,01 mm.

El valor de la carga máxima de cada barra en el momento de la fractura obtenido en Newtons fue dividido por el área de la sección. Los valores finales de resistencia adhesiva fueron expresados en megapascales (Mpa). Para cada subgrupo se calculó la media de la fuerza de tensión a partir de al menos 10 barras.

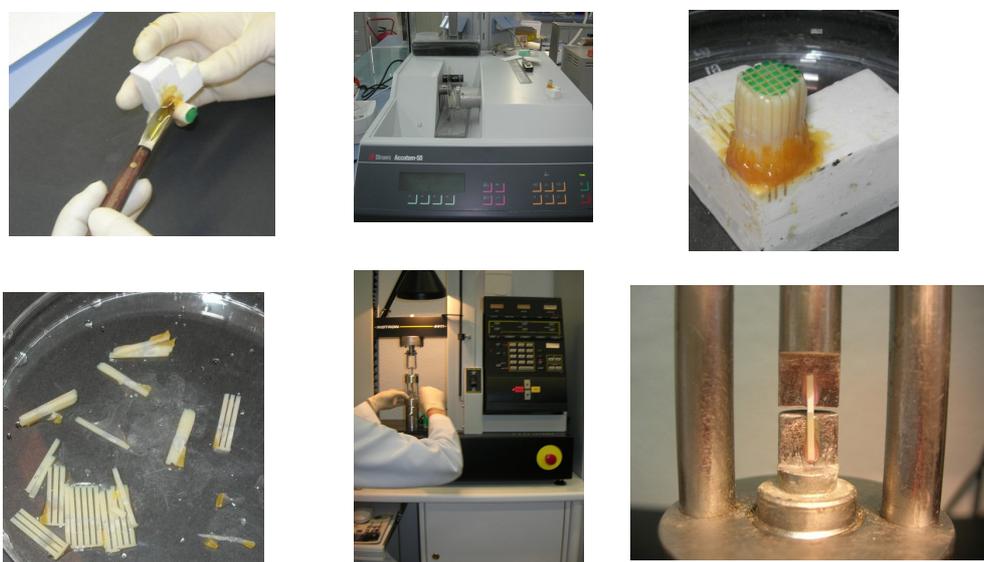


Fig.3. Método de corte y medición de la resistencia adhesiva a la microtensión.

### 3.2.2 ESTUDIO *IN VITRO* DE LONGEVIDAD DE LA INTERFAZ ADHESIVA

Para evaluar la longevidad *in vitro* de los distintos sistemas adhesivos se realizó una prueba de degradación química de la interfaz, mediante la inmersión de los especímenes en una solución de hipoclorito sódico, y un test de degradación mecánica, sometiendo las muestras a un proceso de ciclado mecánico.

#### 3.2.2.1 Degradación química de la interfaz adhesiva

Se utilizaron 12 molares temporales en total, dos por cada grupo experimental. Una vez preparados los especímenes con cada sistema adhesivo, tal y como se ha descrito anteriormente, se procedió al corte de la muestra para la obtención de las barritas, las cuales fueron sumergidas en una solución de hipoclorito sódico al 10% (Panreac Química SA, Barcelona, España) durante cinco horas, a 37 °C. Transcurrido dicho tiempo, las barritas fueron cuidadosamente lavadas, durante 1 hora, con agua destilada para eliminar el hipoclorito y por lo tanto neutralizar su efecto. A continuación se determinó la resistencia adhesiva a la microtensión en cada una de las barritas, del mismo modo que se ha explicado previamente (ensayo de microtensión).



Fig.4. Especímenes introducidos en hipoclorito sódico

#### 3.2.2.2 Degradación mecánica de la interfaz de adhesión

Para este ensayo se utilizaron 12 molares temporales. Una vez preparados los especímenes de los grupos correspondientes (dos molares por cada grupo experimental) y antes de proceder a conformar el bloque de composite radicular, las interfaces adhesivas creadas fueron sometidas a un proceso de degradación mecánica. Para ello, la porción radicular de cada molar fue fijada mediante yeso dental a anillos realizados con resina epoxy, los cuales fueron introducidos en un recipiente plástico con agua. La interfaz adhesiva quedó sumergida en agua, con una temperatura ambiental de 37°C estable. En las condiciones descritas, cada molar fue posicionado en una cicladora mecánica (S-MMT-250NB; Shimadzu, Tokio, Japón) la cual, mediante una esfera de acero de 5 mm de diámetro, aplicaba una carga cíclica compresiva a 3 Hz (3 ciclos/segundo) en el centro de la corona de composite y de forma perpendicular a la interfaz.



Fig.5. Las muestras fueron sometidas a un proceso de ciclado mecánico durante el cual, la interfaz creada estaba sumergida en agua.

Se seleccionó un programa de ciclado mecánico bajo una carga de 90 N durante 5000 ciclos. Una vez completado el proceso de ciclado se procedió al corte de cada molar para ser sometido a un ensayo de microtensión, actuando del mismo modo que se ha descrito anteriormente.

### 3.2.3 ANÁLISIS FRACTOGRÁFICO

Todos los especímenes fracturados se analizaron en un estereo-microscopio (Olympus SZ-CTV, Olympus, Tokio, Japón) a 40x aumentos para determinar el tipo de fallo. Los tipos de fallo fueron clasificados en adhesivos, cohesivos (en la dentina o en el composite) y mixtos.

Se seleccionaron los especímenes más representativos de cada grupo experimental para la observación de la interfaz dentina-adhesivo con microscopio electrónico de barrido (SEM). La preparación de los especímenes consistió en una primera deshidratación mediante soluciones crecientes de etanol. La batería de alcoholes siguió las siguientes concentraciones y tiempos: etanol al 25% durante 20 minutos, etanol al 50% durante 20 minutos, etanol al 75% durante 20 minutos, etanol al 90% durante 30 minutos y etanol al 100% durante una hora.

Los especímenes, una vez procesados, se desecaron en estufa durante 24 horas y se cementaron en un portamuestras de aluminio para microscopio electrónico de barrido con un pegamento con carbón. A continuación se cubrieron con oro utilizando una unidad de cobertura Polaron E-5000 (Polaron Equipment Ltd. Watford, Inglaterra). Las superficies se observaron en un microscopio electrónico de barrido ZEISS DSM-950 (Kart-Zeiss, Göttingen, Alemania) con un voltaje de aceleración de 20 Kv.

### **3.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se efectuó el análisis estadístico de todas las variables estudiadas. Se calcularon las medias aritméticas y las desviaciones estándar de cada grupo.

La variable dependiente cuantitativa estudiada fue la resistencia adhesiva a la microtensión.

Se realizaron tests de ANOVA Múltiple para establecer la relación de las variables dependientes con las variables independientes: tratamiento de superficie (diferentes sistemas adhesivos utilizando distintos tiempos de acondicionamiento) y tipo de degradación (24 horas, degradación mecánica y química). Se incluyeron en el ANOVA análisis de las interacciones. Las comparaciones múltiples posteriores se llevaron a cabo mediante el test de Student-Newman-Keuls. El nivel de significación aceptado fue de 0,05.

El análisis de los datos fue realizado con el paquete estadístico SPSS/PC+V-4.0 (SPSS INC., Chicago, IL, EEUU).

## **4. RESULTADOS**

Los resultados obtenidos se presentan en dos capítulos. Por un lado, los correspondientes a la caracterización de la superficie dentinaria decidua en condiciones normales y tras diversos procesos de acondicionamiento, mediante determinación de la rugosidad con AFM y microdureza Knoop. Por otro lado, los relativos a la resistencia adhesiva de la interfaz generada entre el tejido dentinario primario y los diferentes sistemas adhesivos aplicados siguiendo las instrucciones del fabricante y variando el protocolo de aplicación, mediante ensayo de microtensión y análisis fractográfico, a las 24h y tras varios procesos de degradación artificial de la interfaz (degradación química y mecánica).

## 4.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LA SUPERFICIE DENTINARIA TEMPORAL

### 4.1.1 Rugosidad.

La variable dependiente estudiada fue la rugosidad de la superficie dentinaria primaria. La variable independiente fue el tratamiento de superficie aplicado: pulido, grabado con ácido ortofosfórico durante 15 y 7s, acondicionamiento con imprimador CSEB durante 20 y 10s y con imprimador OUB durante 20 y 10s.

Los valores de rugosidad total y de la dentina intertubular obtenidos con los diferentes tratamientos de superficie se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Medidas de rugosidad (Ra) en la superficie dentinaria (media y desviación estándar) obtenidas con los distintos sistemas acondicionadores durante los diferentes tiempos de grabado.

Tratamiento de superficie	Rugosidad Intertubular	Rugosidad total
D. Pulida	10,17 (2,2) a	21,17 (2,7) 1
Ac. Fosfórico 15s	69,15 (19,5) c	269,98 (44,9) 3
Ac.Fosfórico 7s	98,49 (38,5) d	332,84 (48,9) 3
Imprimador CSEB 20s	45,60 (9,3) b	154,85 (87,4) 2
Imprimador CSEB 10s	29,24 (4,9) b	125,39 (36,9) 2
OUB 20s	76,78 (10,4) c	102,92 (9,3) 2
OUB 10s	109,01 (27,2) d	140,60 (37,1) 2

Para cada columna: los valores con diferente letra o número indican significación estadística ( $P < 0,05$ )

El análisis de la varianza simple (test de ANOVA) mostró diferencias estadísticamente significativas en la rugosidad de superficie total ( $F=48,31$ ;  $p=0,000$ ) e intertubular ( $F=25,31$ ;  $p=0,000$ ) según el tipo de tratamiento aplicado.

Las comparaciones posteriores con el test de Student-Newman-Keuls (SNK) revelaron que los diferentes tratamientos acondicionadores de superficie recibidos afectaron a la rugosidad total de la dentina primaria, produciendo un incremento de ésta de manera significativa en comparación con la dentina pulida.

El incremento de rugosidad total fue superior cuando se utilizó el sistema de grabar y lavar respecto a los sistemas autograbadores, los cuales no mostraron diferencias entre ellos.

Al comparar los tiempos de acondicionamiento no se observaron diferencias significativas en las medidas de rugosidad total obtenidas en ninguno de los sistemas adhesivos utilizados.

Los valores de rugosidad a nivel de la dentina intertubular, que también se vieron incrementados de modo significativo tras la aplicación de los diferentes sistemas acondicionadores, mostraron diferencias según los tiempos de acondicionamiento aplicados para el ácido fosfórico y el OUB.

Para el sistema adhesivo CSEB no se registraron diferencias estadísticamente significativas en la rugosidad intertubular al modificar los tiempos de aplicación del imprimador.

#### 4.1.2 Microscopía de fuerzas atómicas.

Se observaron las superficies dentinarias temporales en condiciones normales y tras los diferentes procesos de acondicionamiento objeto de estudio, mediante el microscopio de fuerzas atómicas. Las imágenes analizadas se corresponden con un área de dentina de  $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ .

Fig.6. Corresponde a una imagen de dentina primaria pulida. La entrada de los túbulos dentinarios no se muestra ensanchada y la dentina intertubular aparece lisa y sin barrillo dentinario detectable.

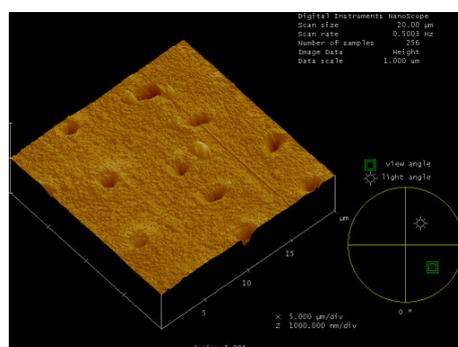


Fig.7. Imágenes tomadas con AFM de dentina primaria tratada con ácido fosfórico durante a) 15 segundos y b) 7 segundos. El acondicionamiento con ácido fosfórico de la superficie dentinaria decidua muestra un aumento de la rugosidad de dicha superficie en

ambos casos, respecto a la dentina pulida. El patrón rugoso resultante es más acentuado para la dentina acondicionada 7s (7b).

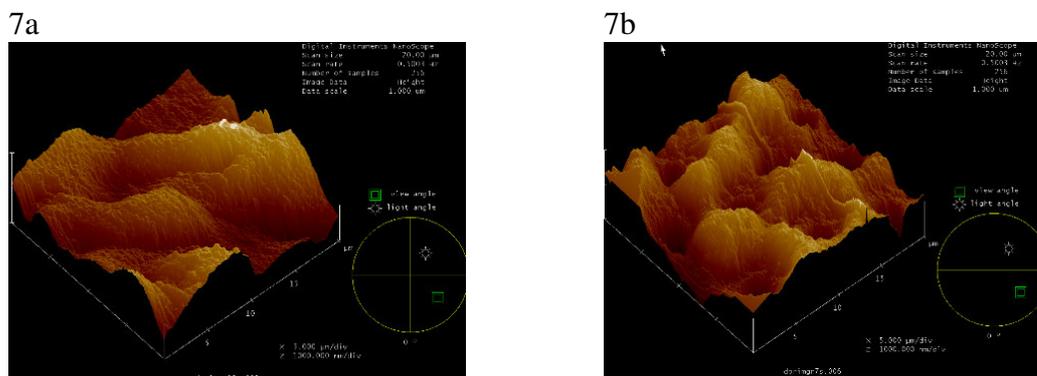


Fig.8. Para el sistema CSEB, la rugosidad de la superficie también aparece aumentada en ambos casos respecto a la dentina pulida, sin aparentar diferencias notables entre los diferentes tiempos de acondicionamiento (a) 20 segundos y b) 10 segundos). Sin embargo, las irregularidades creadas en la superficie muestran diferencias notables en comparación a las observadas en la dentina acondicionada con ácido fosfórico (Fig 7).

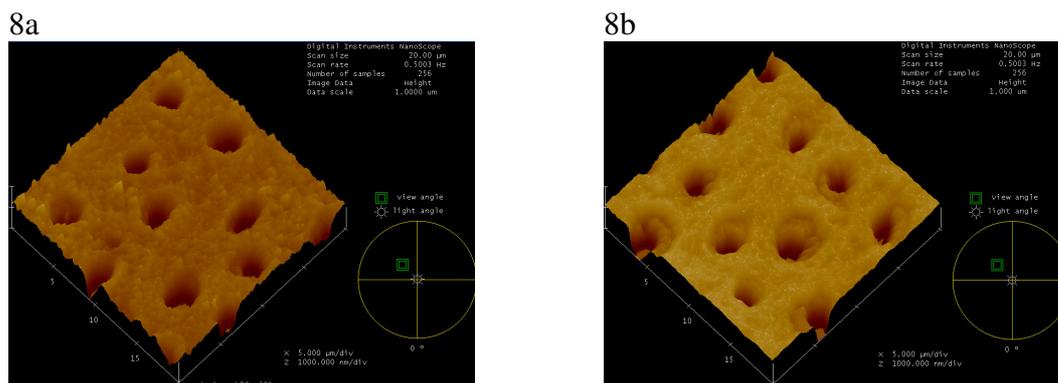
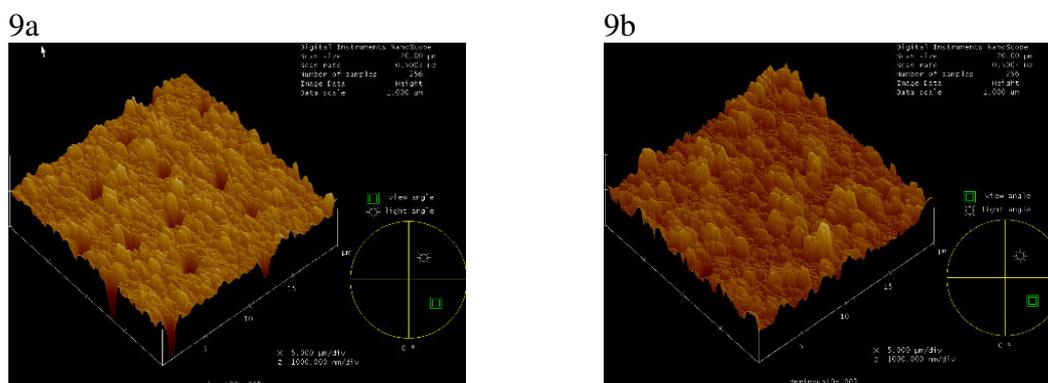


Fig.9. Imágenes tomadas con AFM de dentina primaria tratada con OUB durante a) 20 segundos y b) 10 segundos. Tras el acondicionamiento de la superficie con este sistema se observa un aumento de la rugosidad en la superficie decidua, para ambos tiempos de acondicionamiento. Las imágenes demuestran claramente que dicho efecto es más irregular e intenso cuando se utilizan tiempos reducidos de acondicionamiento ácido.



### 4.1.3 Microdureza

La variable dependiente estudiada fue la microdureza (KHN) de la superficie dentinaria y la variable independiente fue el tratamiento realizado sobre la superficie dentinaria decidua. Los valores medios de microdureza ( $\text{g}/\mu\text{m}^2$ ) para cada grupo experimental están expresados en la tabla 4.

**Tabla 4.** Valores medios de microdureza ( $\text{g}/\mu\text{m}^2$ ) obtenidos para los diferentes tratamientos acondicionadores.

Tratamiento de superficie	Microdureza (KHN)	
Pulida	65,71 (5,2)	a
Ac. fosfórico 15s	21,86 (8,6)	d
Ac. Fosfórico 7s	23,89 (10,9)	d
Imprimador CSEB 20s	45,07 (7,6)	c
Imprimador CSEB 10s	55,53 (3,3)	b
OUB 20s	52,08 (2,8)	b
OUB 10s	62,354 (5,5)	a

Los valores con diferente letra indican significación estadística ( $P < 0,05$ )

El análisis de ANOVA evidenció la influencia estadísticamente significativa en la microdureza de los diferentes tratamientos de acondicionamiento de superficie ( $F = 167,407$ ;  $p = 0,000$ ).

Las comparaciones posteriores con el test de Student-Newman-Keuls (SNK) revelaron que los diferentes tratamientos acondicionadores de superficie recibidos afectaron a la microdureza de la dentina primaria respecto a la dentina pulida excepto, para el OUB aplicado durante 10s.

Para ambos sistemas autograbadores, los resultados mostraron un aumento significativo de la microdureza de la dentina decidúa al reducir los tiempos de acondicionamiento aconsejados por el fabricante.

El tratamiento con ácido fosfórico fue el que afectó de manera más acentuada la microdureza de la superficie de dentina temporal, independientemente del tiempo de aplicación de éste, seguido del imprimador CSEB aplicado durante el tiempo recomendado por el fabricante. Al reducir a la mitad el tiempo de aplicación de CSEB, la dureza aumentó significativamente, mostrando unos valores similares al OUB aplicado según las indicaciones del fabricante.

## 4.2 RESISTENCIA ADHESIVA DE LA INTERFAZ

Se aplicó el test ANOVA multifactorial. Se consideró como variable dependiente la resistencia a la microtensión y como variables independientes: 1) el sistema adhesivo empleado (SB, CSEB y OUB) con los diferentes tiempos de aplicación utilizados para cada adhesivo (tiempo recomendado por el fabricante y reducido a la mitad) y 2) el tratamiento de degradación de la interfaz (sin degradación (24 horas), degradación química (con hipoclorito) y degradación mecánica (ciclado mecánico)).

Tanto el factor tipo de adhesivo ( $F=30,35$ ;  $p=0,000$ ) como el tipo de degradación ( $F= 21,5$ ;  $p=0,000$ ) afectaron significativamente a los valores adhesivos a dentina obtenidos con el test de microtensión. Las interacciones entre los factores fueron también estadísticamente significativas ( $F=1,22$ ;  $p=0,281$ ). La variabilidad explicada de la variable microtensión por las variables dependientes seleccionadas fue del 71%.

Los resultados de las comparaciones múltiples para cada uno de los grupos, con las cifras de la media aritmética de las fuerzas de tracción expresadas en MPa, la desviación estándar y el tamaño muestral de cada grupo (n) están reflejadas en la tabla 5.

**Tabla 5:** Media y desviación estándar de MTBS (MPa) obtenidos para los especímenes adheridos con los diferentes sistemas adhesivos según las instrucciones del fabricante (SF) o reduciendo el tiempo de acondicionamiento a la mitad (MT), a las 24 horas y tras los ensayos de degradación mecánica y química. N: número de especímenes testados.

		SINGLE BOND	n	CLEARFIL SE BOND	n	ONE UP BOND	n
24 horas	SF	29,38(11,5) a1	28	29,29(13,1) a1	29	11,74(3,7) b1	18
	MT	42,00(17,1) a2	20	27,36(15,3) b1	23	17,98(13,4) c2	14
Degradación Química	SF	10,67 (6,3) a3	12	13,43 (5,6) a3	14	FALLO PRETEST	
	MT	12,88 (4,4) a3	15	21,96 (5,3) b2	17	4,66 (1,3) c3	11
Degradación mecánica	SF	25,04 (10) a1	22	32,98(14,1) b1	20	13,52(7,6) c12	14
	MT	30,36(10,1) a1	16	21,97 (8,3) b2	21	11,96(2) a1	16

Para cada fila horizontal: los valores con diferente letra indican significación estadística ( $P<0,05$ ). Los números indican diferencias en las columnas.

#### **4.2.1. Resistencia adhesiva a la microtensión a las 24 horas.**

Los valores adhesivos obtenidos con SB y CSEB fueron significativamente superiores a los obtenidos con OUB, independientemente del tiempo de acondicionamiento.

La reducción en el tiempo de grabado resultó en un ascenso significativo de los valores de MTBS cuando se utilizó SB y OUB.

Para el sistema adhesivo CSEB no se observaron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los tiempos de aplicación.

#### **4.2.2. Resistencia adhesiva tras degradación química.**

Tras la inmersión de los especímenes adheridos en solución de hipoclorito sódico al 10% durante 1 hora los valores adhesivos obtenidos con el método de microtensión para el SB mostraron una disminución de la eficacia adhesiva estadísticamente significativa, independientemente del tiempo de aplicación del ácido fosfórico. Sin embargo, los resultados obtenidos con los sistemas autograbadores de dos y un paso revelaron una dependencia al tiempo de acondicionamiento del sustrato, resultando en una mayor eficacia adhesiva al utilizar el CSEB durante la mitad de tiempo aconsejado por su fabricante. Cuando se utilizó el OUB reduciendo el tiempo de aplicación los valores adhesivos disminuyeron de manera significativa.

Algunos especímenes de este ensayo se fracturaron espontáneamente de forma previa a la realización del test de microtensión, durante el almacenamiento o al ser manipulados. En el grupo del sistema adhesivo OUB utilizado según las indicaciones del fabricante, se produjo el fallo pretest de todas las barras tras la inmersión en el hipoclorito. Éstos no fueron incluidos en el análisis, de tal forma que los valores de microtensión obtenidos así como el número de especímenes testados se muestran en la tabla 5.

#### **4.2.3. Resistencia adhesiva tras degradación mecánica.**

El proceso de ciclado mecánico no evidenció disminución de los valores de MTBS, respecto a la eficacia adhesiva inmediata, para los diferentes sistemas adhesivos al ser aplicados siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Al reducir los tiempos de acondicionamiento, los valores de MTBS reflejaron una disminución estadísticamente significativa de la eficacia adhesiva de las interfaces creadas para todos los sistemas adhesivos tras ser sometidas al proceso de ciclado, respecto a los valores adhesivos obtenidos a las 24 horas.

#### **4.2.4 Análisis fractográfico**

Al analizar el porcentaje de fallos de los especímenes fracturados de acuerdo con el tratamiento de superficie realizado (tabla 6), se observó que el modo más frecuente de

fractura fue el mixto para todos los grupos. No se observaron fallos cohesivos puros en ningún grupo. Los valores de adhesión bajos fueron asociados con altos porcentajes de fallos adhesivos. En general, se observó una tendencia en todos los grupos, a disminuir los fallos adhesivos al reducir el tiempo de grabado.

Tras la inmersión de los especímenes en hipoclorito sódico los porcentajes de fallos adhesivos aumentaron considerablemente.

Tabla 6. Porcentaje de la distribución del modo de fallo: A-adhesivo, M-mixto.

	SINGLE BOND				CLEARFIL SE BOND				ONE UP BOND				A	M
	SF		MT		SF		MT		SF		MT			
	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M		
<b>24 horas</b>			42	58	33	67	48	52	45	55	73	27	61	39
<b>Degradación química</b>			69	31	67	33	67	33	65	35			83	17
<b>Degradación mecánica</b>			40	60	44	56	49	51	45	55	71	29	79	21

#### 4.2.5. Microscopía electrónica de barrido.

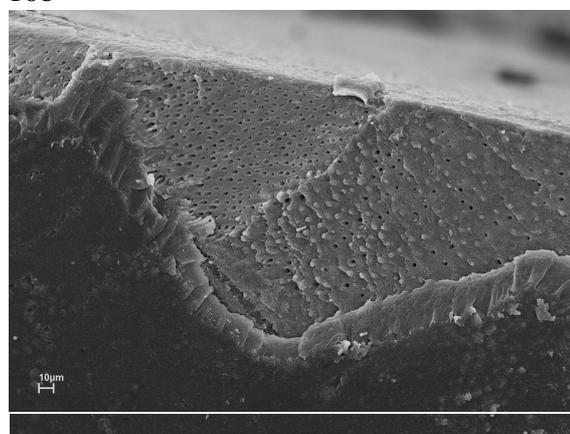
En las siguientes figuras se muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido de las interfaces generadas con los diferentes sistemas adhesivos a la superficie dentinaria decidua tras el fallo.

Fig.10. Imagenes tomadas con MEB de dos especímenes adheridos con SB donde se muestra la superficie de dentina primaria fracturada. (a) Corresponde a un fallo mixto de dentina grabada durante 15 segundos. La fractura se ha producido en la base de la capa híbrida. (b) A mayor aumento, se observa una fractura cohesiva de la dentina localizada en el centro de la figura. Se observan algunos *tags* de resina protruyendo desde los túbulos.

10a

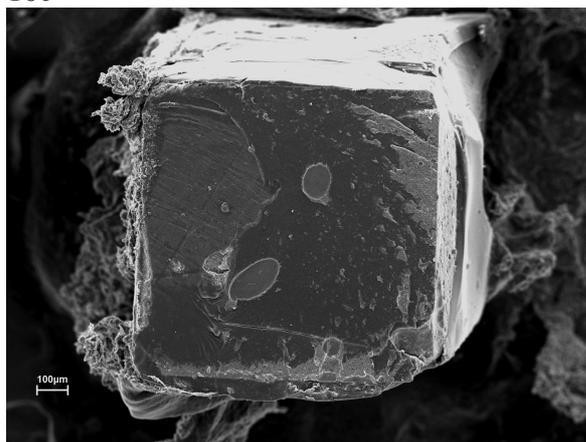


10b



En la Fig. 10c se observa un fallo mixto después de grabar la dentina durante 7 segundos con ácido fosfórico. (d) A mayor aumento, se observa que el fallo se ha producido en la parte superior de la capa híbrida así como un correcto patrón de infiltración de la resina en la dentina intertubular.

10c



10d

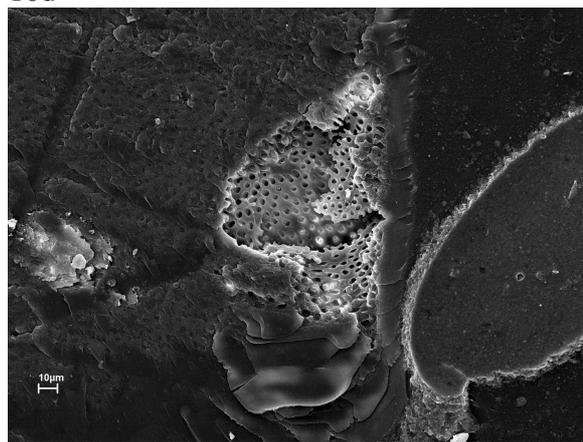
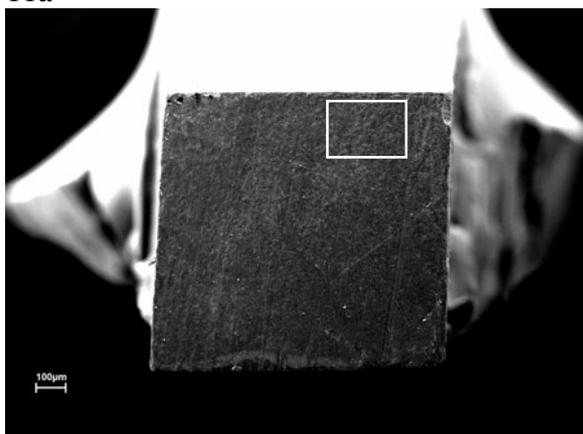
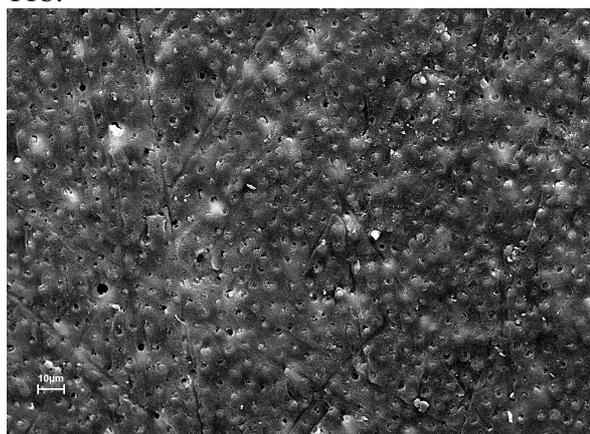


Fig.11. Imágenes tomadas con MEB a lo largo de las superficies dentinarias fracturadas de dos especímenes adheridos con CSEB. (a) Tras haber sido aplicado el imprimador del adhesivo durante 20 segundos. Se observa un fallo mixto (b). A mayor aumento, el proceso de hibridación parece haberse realizado correctamente. La mayoría de los túbulos están ocluidos por *tags* de resina.

11a

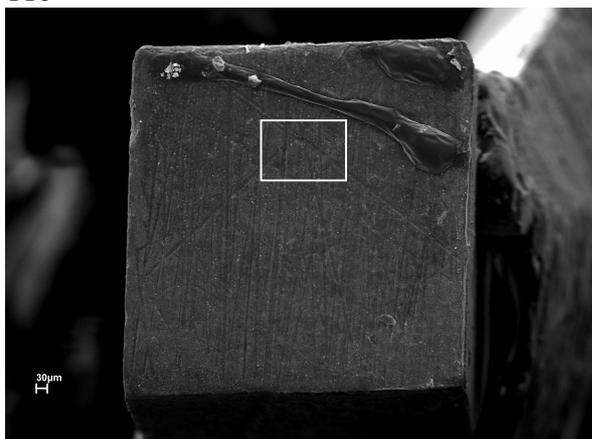


11b.



La imagen 11c corresponde a un fallo mixto tras haber sido aplicado el imprimador del adhesivo durante 10 segundos. (d). A mayor aumento, el fallo ocurrió en la parte superior de la capa híbrida, la cual aparece completamente hibridizada (se observan las marcas del pulido en la superficie de dentina expuesta). Los túbulos están sellados por los *tags* de resina.

11c



11d.

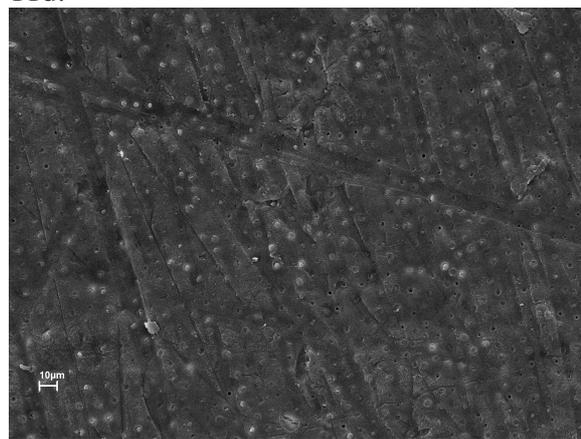
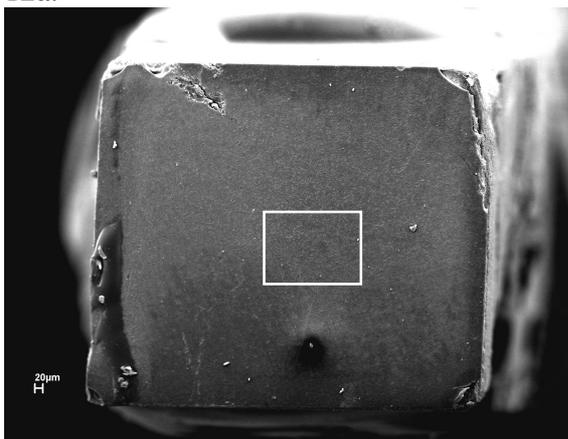
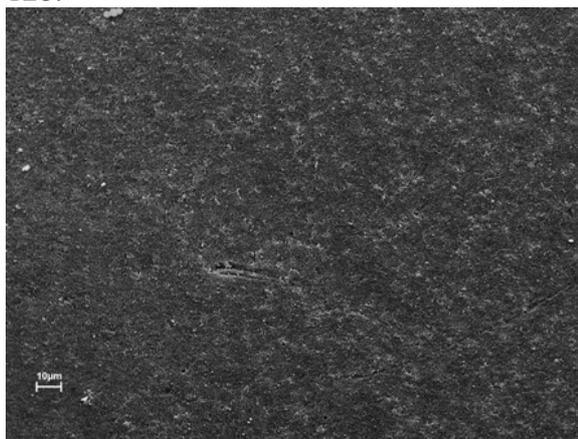


Fig.12. Imágenes tomadas con MEB a lo largo de las superficies dentinarias fracturadas de dos especímenes adheridos con OUB. (a) Tras haber sido aplicado el adhesivo durante 20 segundos, se puede observar un fallo mixto (b). A mayor aumento se observa un área en la cual la fractura ocurrió en la base del complejo hibridizado. Se aprecia un escaso número de *tags* de resina ocluyendo los túbulos dentinarios.

12a.

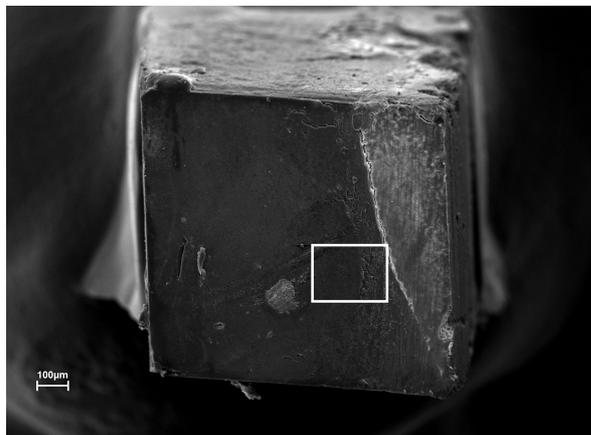


12b.



Tras haber sido aplicado el sistema adhesivo OUB durante 10 segundos (Fig. 12d) se observa también un fallo mixto. (e) A un mayor aumento se puede evidenciar un mayor número de *tags* de resina así como una pobre infiltración de la resina intertubular.

12c.



12d.

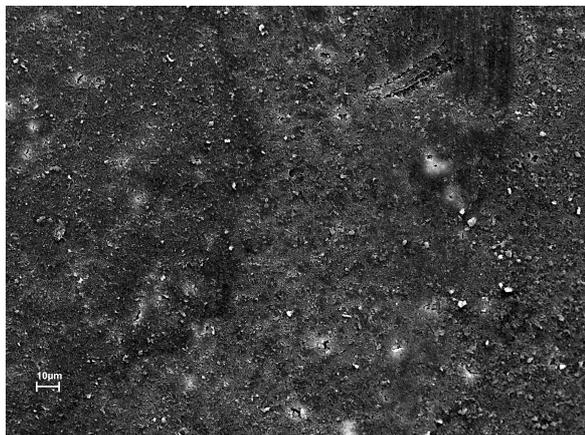
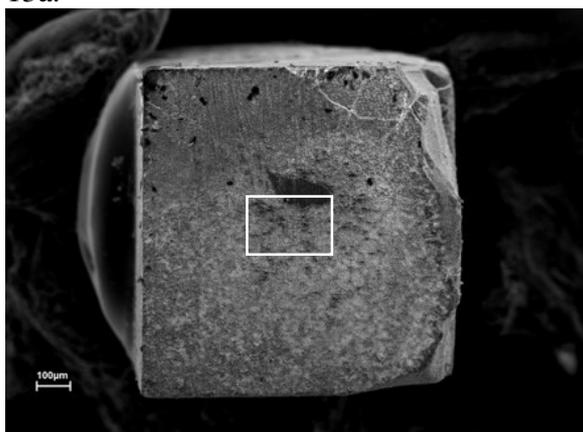
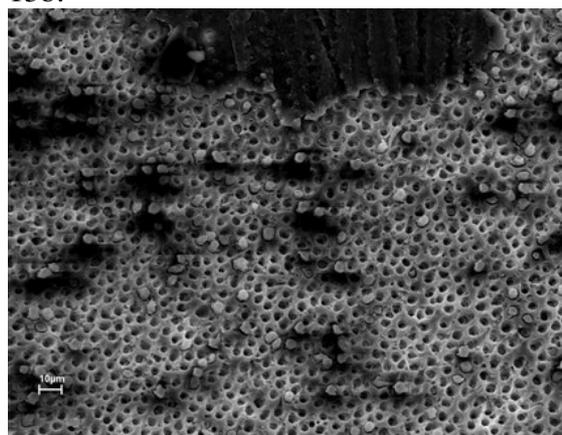


Fig.13. Después de la inmersión en solución de hipoclorito sódico, Single Bond aplicado según fabricante falló a nivel de la base de la capa híbrida (Fig.13a). La resina de la superficie dentinaria desapareció desde la periferia hacia el centro de los especímenes ocasionando una gran área de dentina expuesta. A mayor aumento, los túbulos aparecieron ensanchados mostrando, en ocasiones, la persistencia de los *tags* de resina en su interior (Fig.13b). La dentina intertubular manifestó un aspecto alterado poroso y rugoso.

13a.

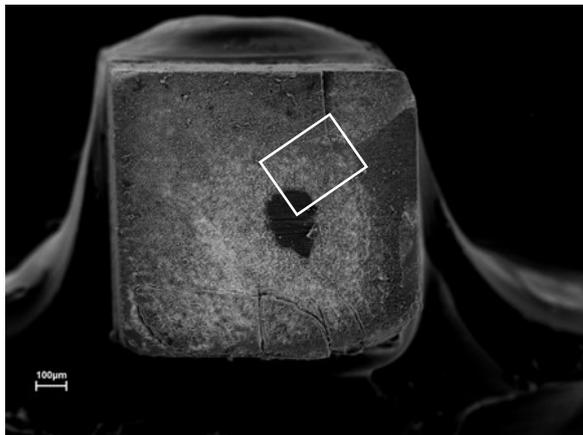


13b.



Al reducir el tiempo de grabado a 7 segundos (Fig 13c), la superficie fracturada después de la inmersión en hipoclorito sódico falló también en la base de la capa híbrida, mayoritariamente. Se observa un mayor número de *tags* de resina ocluyendo los túbulos dentinarios.

13c.



13d.

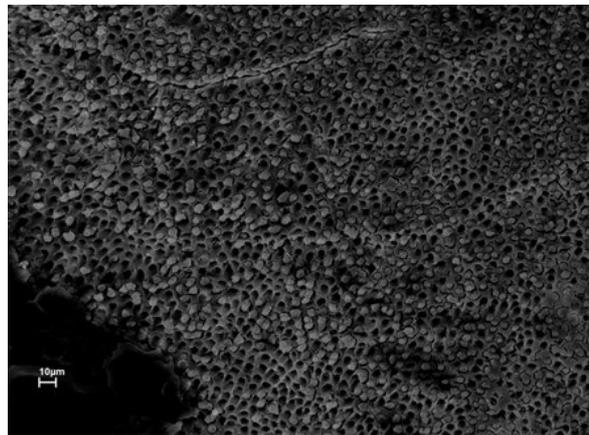


Fig.14. Cuando se utilizó CSEB y tras la inmersión en hipoclorito, los fallos se localizaron dentro del complejo hibridizado (Fig.14a). Parte de la resina permanecía en la superficie fracturada, los túbulos no estaban ensanchados y la dentina intertubular no mostraba ninguna alteración.

Fig.14a.

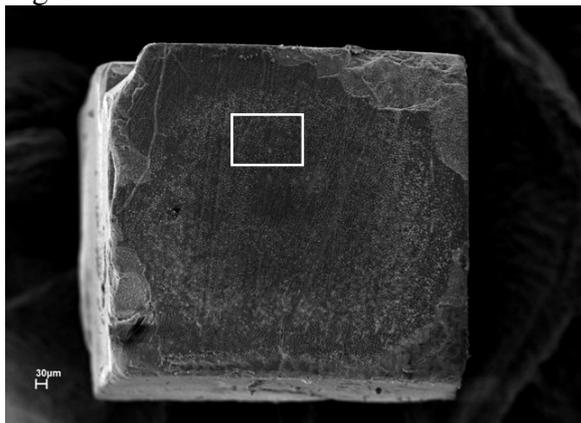
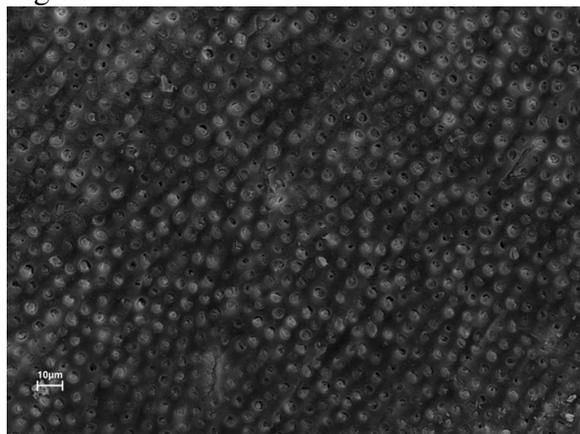


Fig.14b



Al reducir los tiempos de acondicionamiento con este adhesivo, el fallo se produjo en la porción superior de la capa híbrida (se observan las marcas del pulido Fig 14d) así como dentro de la estructura hybridizada. El patrón de disolución observado para este adhesivo fue menor al reducir los tiempos de acondicionamiento, conservándose la capa híbrida íntegra en el centro de la barrita (Fig 14c).

Fig. 14c.

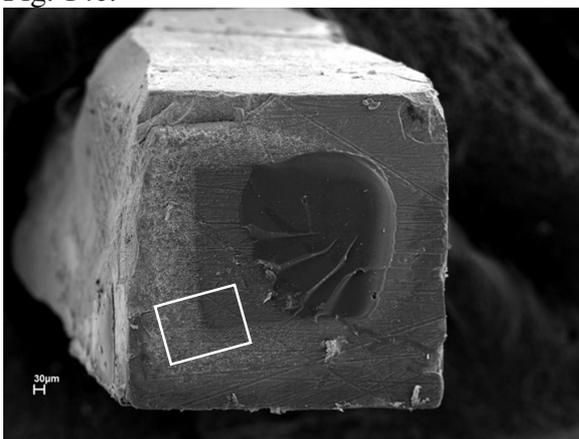


Fig. 14d.

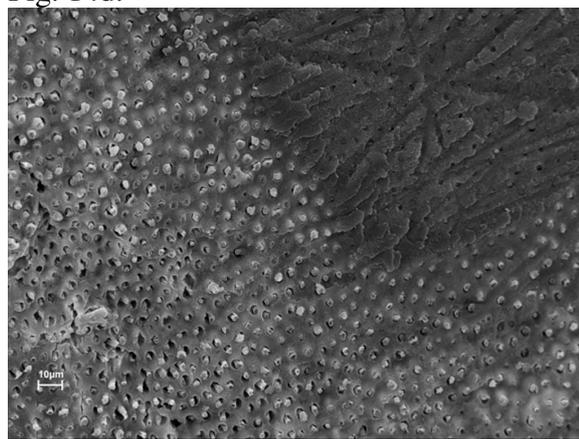


Fig.15. Cuando se adhirió con OUB disminuyendo el tiempo de acondicionamiento a 10s y tras la inmersión en hipoclorito sódico (Figuras 15a-b), el fallo se produjo también en la porción superior de la capa híbrida. Se observó una elevada pérdida de adhesivo. Se apreciaban las estrías del pulido en la superficie. La mayor parte de los túbulos aparecieron vacíos sin *tags* de resina.

Fig. 15a.

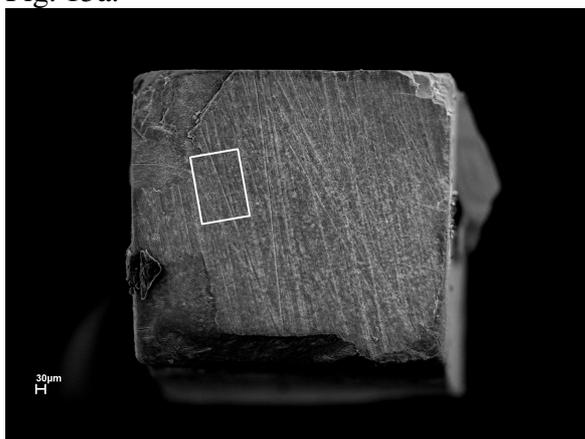


Fig. 15b

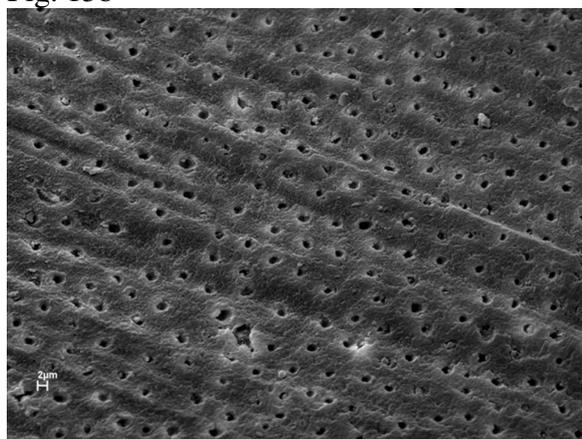


Fig.16. Imágenes tomadas en los especímenes fracturados aplicando los sistemas adhesivos según las indicaciones del fabricante y tras ser sometidos a un proceso de ciclado mecánico. Al utilizar SB siguiendo las instrucciones del fabricante (Fig 16a) el ciclado evidenció la debilidad de la capa híbrida en su porción inferior debido a una incorrecta impregnación de la resina, provocando que el fallo ocurriera a este nivel. A mayor aumento (Fig 16b) se observa el ensanchamiento de las luces de los túbulos, los cuales aparecen mayoritariamente vacíos. Sin embargo, al utilizar tiempos reducidos de acondicionamiento ácido (Fig 16c, d) las imágenes demuestran un patrón más correcto de infiltración e impregnación por parte de la resina.

Fig. 16a

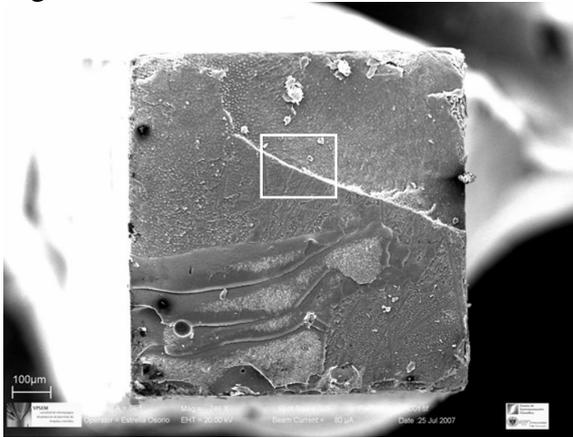


Fig. 16b

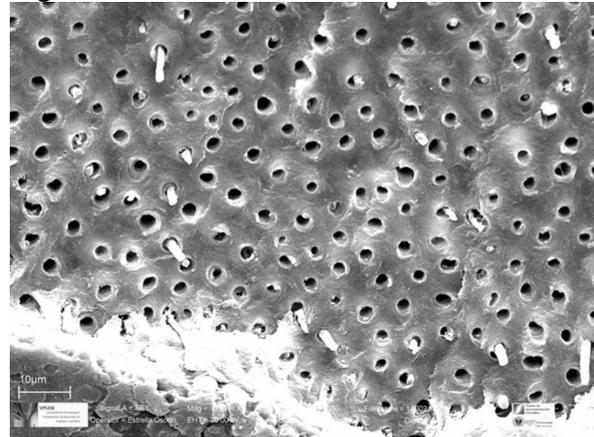


Fig. 16c

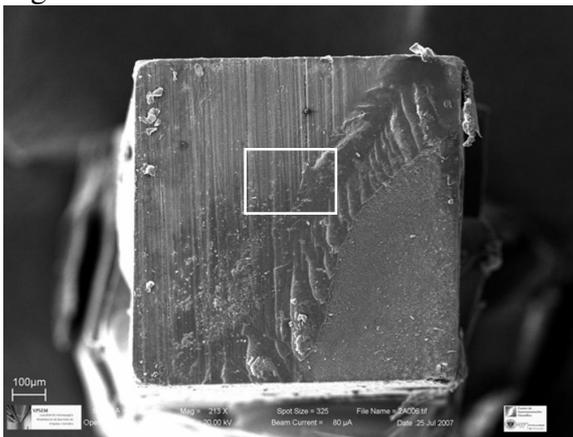
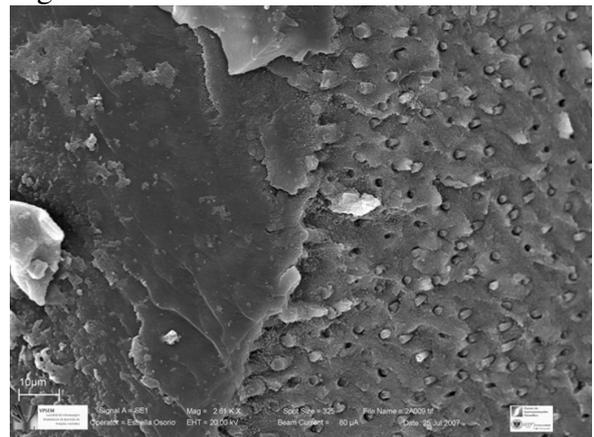


Fig. 16d



En las figuras 17 a-d se muestran los especímenes adheridos con CSEB tras ser sometidos al ciclado mecánico y al ensayo de microtensión. La Figura 17a corresponden a un fallo mixto al utilizar el CSEB siguiendo las recomendaciones del fabricante. El fallo se produjo dentro del complejo hibridizado. Todos los túbulos permanecieron sellados por la resina. El patrón de infiltración de la dentina intertubular era correcto (Fig 17b).

Al reducir el tiempo de acondicionamiento a 10s con este sistema adhesivo se observa también un fallo mixto (Fig 17c). A mayor aumento (Fig 17d) se observa que el fallo se produjo en la porción superior de la capa híbrida. Algunos túbulos se muestran vacíos.

Fig. 17a

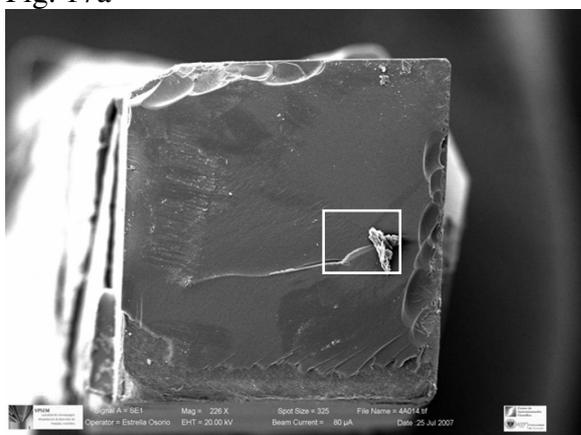


Fig.17b

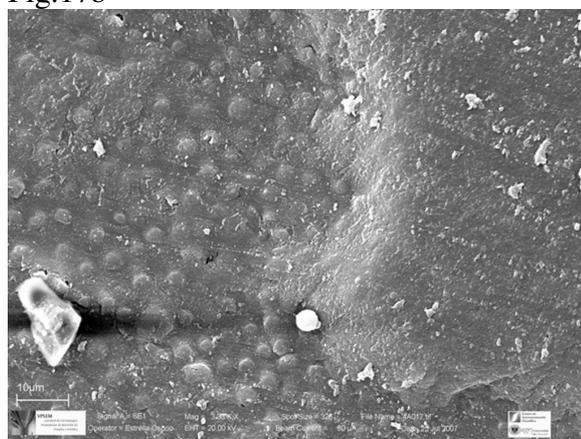


Fig.17c

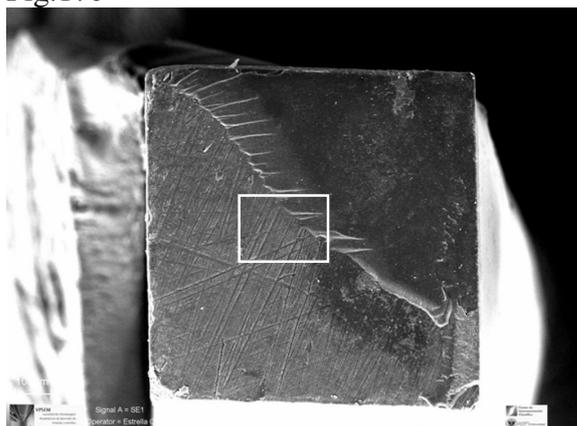
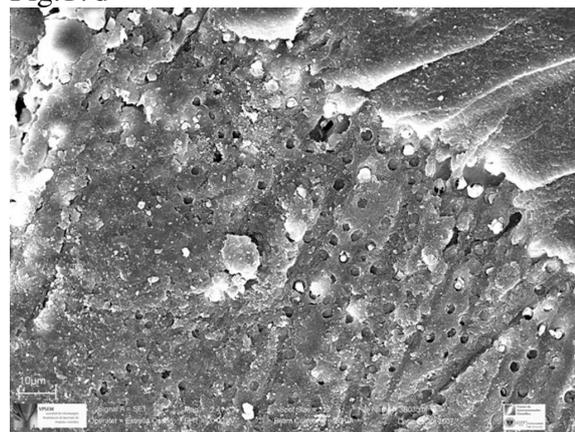


Fig.17d



Al utilizar el OUB según las instrucciones del fabricante y someter las muestras a la carga mecánica seleccionada, la superficie de dentina fracturada analizada con MEB (Fig 18 a y b) falló en la parte superior de la capa híbrida. Los túbulos dentinarios se mostraron ensanchados y mayoritariamente vacíos.

Al reducir el tiempo de aplicación del adhesivo OUB a 10s (Fig 18 c y d), el fallo se produjo dentro del complejo hybridizado. Algunos tubulos muestran los *tags* de resina protruyendo mientras que otros aparecen vacíos.

Fig. 18a

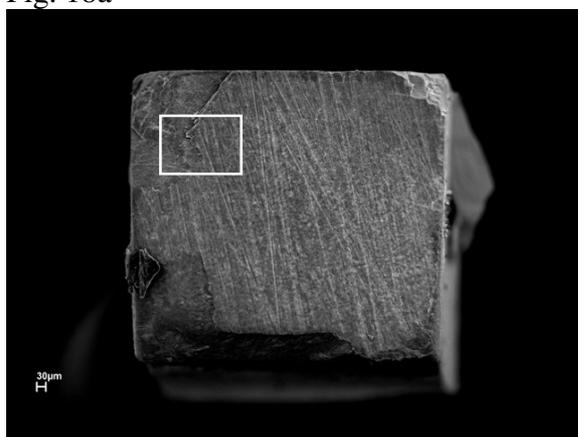


Fig. 18b

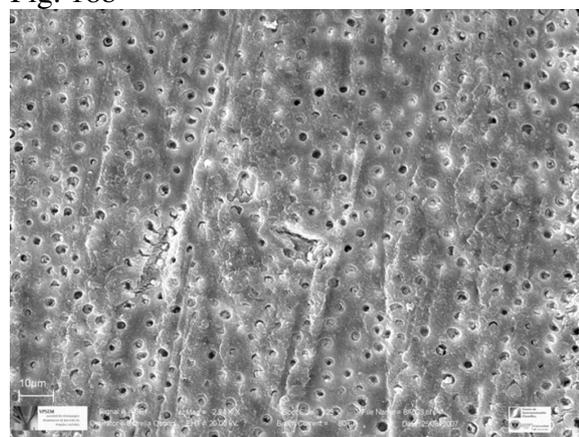


Fig. 18c

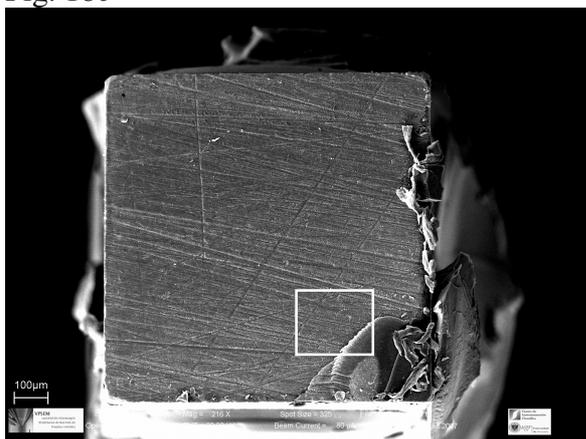
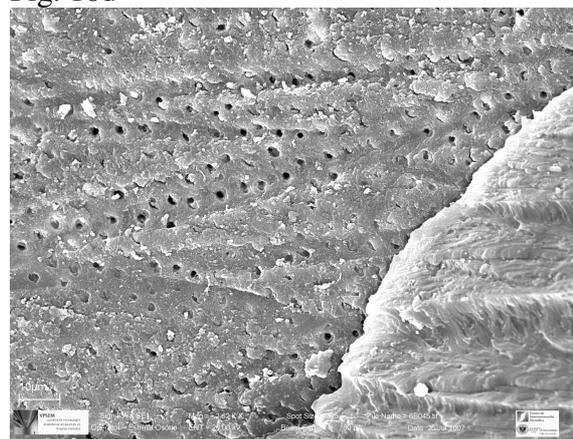


Fig. 18d



## **5. DISCUSIÓN**

Durante las últimas décadas, los sistemas basados en resinas se han convertido en material de elección para la restauración del diente permanente y temporal (Agostini y col., 2001, Kaaden y col., 2003). El desarrollo de estos materiales adhesivos ha propiciado la aparición de nuevos productos que requieren técnicas cada vez más simplificadas, lo que resulta especialmente interesante en el campo odontopediátrico. Sin embargo, mientras que la adhesión al diente permanente ha sido investigada ampliamente, pocos estudios analizan la adhesión de resina sobre el diente temporal. A este respecto, la estructura y composición de los dientes temporales se ha considerado similar, durante muchos años, a la de los dientes permanentes, aplicando los mismos conocimientos y protocolos de la dentición definitiva sobre la dentición primaria. Sin embargo, la mayoría de los artículos disponibles que valoran tanto la adhesión en dentina permanente como en dentina temporal, muestran unos valores de adhesión notoriamente más bajos en dentina primaria en comparación con la permanente (Tay y col., 1995; Salama y col., 1991; Bordin-Aykroyd y col., 1992; Senawongse y col., 2004; Uekusa y col., 2006).

Publicaciones recientes han registrado diferencias importantes en la microestructura y composición de la dentina temporal, en relación a la dentina permanente (Johnsen, 1987; Koutsi 1994; Sumikawa y col., 1999; Hosoya y col., 2000), que podrían ser la causa de los menores valores adhesivos obtenidos en la dentina primaria. Se ha observado un mayor diámetro y densidad de túbulos dentinarios en los dientes primarios, resultando en una reducción del área de dentina intertubular disponible para la adhesión (Marshall y col., 1997; Sumikawa y col., 1999; Sardella y col., 2005). También se ha observado una menor concentración de calcio y fosfatos en la dentina peritubular e intertubular a nivel de la dentición temporal (Angker y col., 2004b; Hirayama, 1990), así como un comportamiento mecánico inferior (Yoshima y col., J Dent Res 2002). Sin embargo, otros autores (Burrow y col., 2002) refieren que el menor espesor de dentina que caracteriza a estos dientes (Hosoya y col., 2006) repercute en un mayor porcentaje de agua existente, por la proximidad de la pulpa, fundamentando así el descenso de los valores adhesivos cuando se adhiere a dentina primaria. En este sentido, la dentina temporal se asemejaría a la dentina profunda permanente, donde los valores de adhesión son inferiores respecto a la dentina superficial (Toledano y col., 2002).

En la actualidad, la adhesión a dentina de los sistemas basados en resinas se fundamenta básicamente en la impregnación de la matriz fibrilar de colágeno por parte de la resina adhesiva (Van Meerbeek y col., 1993a). En este proceso, el acondicionamiento químico previo del tejido dentinario parece ser un paso fundamental (Rontani y col., 2000; Gotti y col., 2004). El acondicionamiento con ácidos va a producir cambios en la morfología de la superficie dentinaria que favorezcan la infiltración del sistema adhesivo pero también en las propiedades físicas de este sustrato (Sano y col., 1995b). Debido a las diferencias registradas en la dentina temporal respecto a la dentina permanente (Nör y col., 1997; Koutsi y col., 1994; Suzuki y Finger., 1988; Hosoya y col., 2001) y dada la importancia que adquiere el sustrato en el proceso adhesivo (Hosoya y col., 2000; Marshall y col., 1997; Kinney y col., 2003a) se realizaron estudios previos de rugosidad y de microdureza de la superficie dentinaria decidúa en condiciones normales y tras los diferentes procesos de acondicionamiento dentinario propios de cada sistema adhesivo

seleccionado, con el fin de caracterizar el substrato primario y conocer las modificaciones producidas en éste durante el procedimiento adhesivo. Los adhesivos testados en el presente estudio fueron un sistema de grabar y lavar de dos pasos, el Single Bond (SB), un autograbador de dos pasos, el Clearfil SE Bond (CSEB) y un autograbador de un paso, el One Up Bond (OUB) (Tabla 1). Todos ellos son sistemas adhesivos actuales que utilizan diferentes estrategias de adhesión y que presentan un procedimiento de aplicación clínica simplificado, por lo que su uso resulta interesante para el tratamiento del paciente infantil.

Para el trabajo experimental se utilizaron molares temporales sanos. Estos dientes fueron extraídos por motivos ortodóncicos debido a una retención prolongada y conservaban parte de las raíces, por lo que parece lógico pensar que el substrato dentinario sea similar al de la práctica clínica. El periodo de conservación de los dientes hasta su utilización fue inferior a 6 meses, tiempo límite recomendado (Rueggeberg, 1991).

Para el estudio de rugosidad de la superficie se utilizó el microscopio de fuerzas atómicas (AFM). Este dispositivo ha sido ampliamente utilizado para el estudio del proceso de desmineralización dentaria. La posibilidad de observar directamente los estadios del proceso de desmineralización (Marshall y col., 1993b; Kinney y col., 1993; Cassinelli y Morra, 1994) mediante imágenes tridimensionales de alta resolución y el potencial de operar en aire o solución, le aventaja frente al uso del microscopio electrónico de barrido o de transmisión (MEB o MET) (Marshall y col., 1995).

El AFM actúa de diferentes modos. Para este estudio se utilizó el modo *tapping*, en el cual se utiliza una punta fina de  $\text{Si}_3\text{N}_4$  que contacta con la muestra de forma intermitente y pulsátil durante el registro de la superficie. Dicha punta va montada en el extremo distal de un cantilever, provocando así la deflexión de éste según analiza la topografía de la superficie. La ventaja del modo de acción seleccionado para el presente trabajo, es que al no establecer un contacto continuo sobre la muestra se reducen las fuerzas de fricción y con ello se evitan las fuerzas de torque sobre el cantilever. De esta manera se consigue que la onda de *feedback* mantenga una vibración a una amplitud constante en el cantilever.

Los resultados obtenidos en el presente estudio (Tabla 3) demuestran un aumento significativo de la rugosidad de la superficie de dentina primaria total e intertubular de forma posterior a la aplicación de los procedimientos acondicionadores en todos los sistemas evaluados.

El acondicionamiento ácido de la dentina se considera un paso fundamental para conseguir una adhesión micromecánica efectiva a la dentina (Nakabayashi y col., 1982, 1992; Rontani y col., 2000). Al colocar el ácido sobre la superficie de dentina, este ácido va a reaccionar en primer lugar con el barrillo dentinario, produciendo su eliminación total o parcial, y posteriormente con la estructura dentinaria subyacente, provocando una disolución gradual de los componentes minerales dentarios cuyo resultado es un substrato rugoso y con alta energía superficial (Fusayama y col., 1979). Estudios previos han demostrado que la desmineralización es más intensa en la fase temprana (Kinney y col., 2003b), reduciéndose de un modo progresivo hasta finalizar, probablemente, cuando el ácido se agote. Se piensa que el mineral extrafibrilar se disuelve primero, mientras que el

que se localiza intrafibrilarmente es protegido por las moléculas de colágeno, por lo que se disuelve de un modo más lento (Habelitz y col., 2002). Es por ello que, a nivel de la dentina peritubular, donde la concentración de minerales es mayor y las fibras colágenas escasas, se produce la disolución de ésta estructura en mayor medida resultando en un ensanchamiento de la luz tubular, la cual va a ser penetrada por los agentes adhesivos para constituir los *tags* de resina. Sin embargo, en la dentina intertubular el proceso de grabado se ve limitado por la mayor concentración de colágeno, quedando como resultado un entramado de fibras colágenas expuesto en la superficie desmineralizada, el cual va a ser penetrado por los agentes adhesivos para crear una estructura híbrida, compuesta por dentina parcialmente desmineralizada en íntima asociación con los polímeros adhesivos (Marshall y col., 1995), denominada capa híbrida (Nakabayashi y col., 1982). Todos los adhesivos que se han evaluado en este estudio consiguen la adhesión a dentina basándose en el concepto de hibridación.

El aumento de rugosidad de la dentina intertubular fue dependiente del agente acondicionador testado, obteniéndose una superficie más rugosa cuando se utilizó el ácido fosfórico y el OUB. Asimismo, los resultados reflejaron que la rugosidad intertubular fue dependiente del tiempo de acondicionamiento para dichos agentes (ácido fosfórico y OUB). Ambos sistemas poseen un pH altamente ácido (0,6 para el ácido fosfórico y 1,3 para el OUB) que conduce a una gran desmineralización de la dentina intertubular, responsable del aumento de rugosidad. El ácido fosfórico se utiliza como acondicionador inorgánico de los sistemas adhesivos de grabar y lavar (en nuestro estudio SB). Los resultados mostraron una mayor rugosidad de la superficie intertubular al reducir el tiempo de acondicionamiento. Algunos estudios previos han observado que la extensión de la desmineralización producida por este agente se ve limitada por la acción tampón de la fase mineral de la dentina cuando se aplica durante breves periodos de tiempo, registrándose una menor difusión del flujo de iones de hidrógeno (Sardella y col., 2005; Camps y Pashley, 2000). La reducción en el tiempo de aplicación originó una superficie de dentina intertubular más rugosa posiblemente debido a esta menor destrucción de tejido.

One Up Bond mostró, asimismo, un ascenso significativo de la rugosidad intertubular al reducir el tiempo de acondicionamiento a la mitad. Este sistema adhesivo autograbador de acidez elevada provoca, mediante los monómeros acídicos, una desmineralización a niveles profundos, dando lugar a la exposición de las fibras de colágeno y a la disolución de casi toda la hidroxiapatita. Como consecuencia de esto, el mecanismo fundamental de adhesión de este sistema autograbador está básicamente basado en un proceso de difusión, asemejándose al que desarrolla el ácido fosfórico (Kaaden y Schmalz, 2003). La reducción en el tiempo de grabado cuando se utilizó OUB, podría haber limitado la extensión del proceso de desmineralización debido a la neutralización de los iones fosfato por la capacidad tampón de los componentes del barrillo y de la dentina, del mismo modo al descrito para el ácido fosfórico, reduciéndose de este modo el fuerte acondicionamiento ácido que característicamente desarrollan estos autograbadores simplificados y repercutiendo en un aumento de la rugosidad intertubular.

La rugosidad intertubular obtenida con el acondicionador del sistema CSEB fue comparativamente menor respecto a los otros sistemas. Este adhesivo autograbador de dos

pasos se caracteriza por desarrollar una acidez moderada, en comparación con el ácido fosfórico y el OUB (Tabla 1), tal y como han registrado estudios previos (Oliveira y col., 2003), (pH 1,9-2,04), por lo que es de esperar que el efecto de desmineralización sobre el tejido dentario sea menor. En este sentido, se ha demostrado la permanencia de cristales de hidroxiapatita residuales tras el proceso de acondicionamiento con este agente (Yoshida y col., 2004).

Los resultados referentes a la rugosidad total de la superficie de dentina primaria acondicionada demuestran, igualmente, un aumento significativo de forma posterior a la aplicación de todos los agentes acondicionadores testados (Tabla 3). Dicho aumento fue dependiente del agente acondicionador utilizado, observándose una superficie más rugosa cuando se utilizó ácido fosfórico respecto a los sistemas autograbadores. Las imágenes tomadas con el AFM demuestran el ataque preferencial del ácido sobre la dentina peritubular, más pronunciado con el ácido fosfórico (Fig 7), el cual de modo rápido provocó una disolución acelerada de la estructura peritubular produciendo un ensanchamiento de la luz tubular y adquiriendo forma de embudo con la porción estrecha hacia el interior (Marshall y col., 1995). La superficie de dentina intertubular pareció engrosarse, indicando hidratación y sugiriendo una disminución del contenido mineral (Ho y col., 2004).

Sin embargo, la rugosidad total de la superficie decidua acondicionada no mostró diferencias al modificar los tiempos de aplicación del acondicionador en ninguno de los sistemas evaluados. La explicación a estas observaciones parece estar relacionada con la estructura histológica de la dentina decidua. Se ha registrado que los túbulos dentinarios muestran un mayor diámetro a nivel de la dentina decidua, en relación a la dentina permanente (Sumikawa y col., 1999; Sardella y col., 2005), lo que repercute en una reducción del substrato sólido de adhesión. De este modo, y debido a la rápida disolución de la dentina peritubular con el consiguiente ensanchamiento de las luces tubulares, disminuyendo aún más el área de la dentina intertubular disponible, es posible que los cambios acaecidos a nivel de la matriz dentinaria expuesta no resultaran significativos a nivel global, mostrando unos valores de rugosidad total con tendencia a la disminución pero que no logran alcanzar la significación estadística.

Además de modificar la morfología de la superficie dentaria, se ha apuntado que los tratamientos acondicionadores de la dentina pueden inducir cambios en las propiedades del substrato dentario (Van Meerbeek y col., 1993b; Sano y col., 1995b; Marshall, 1997). El conocimiento de las propiedades físicas de los tejidos dentarios es esencial para entender cómo se distribuyen y absorben las fuerzas originadas durante la masticación (Meredith y col., 1996; Mahoney y col., 2000). Asimismo, nos permite conocer los cambios ocasionados por los diversos procedimientos restauradores (Marshall y col., 1997), los cuales podrían influir en el comportamiento clínico de las restauraciones adhesivas así como alterar el comportamiento mecánico de la dentina sometida a carga (Santiago y col., 2005; Hosoya, 2006a). El grabado ácido del tejido dentinario va a exponer una trama orgánica esponjosa con elevado contenido en colágeno, cuyas propiedades resultan claramente inferiores a la hora de soportar los fenómenos mecánicos que acontecen en la interfaz restauradora. En este sentido y a pesar de que el acondicionamiento ácido de la

dentina es un paso fundamental para la adhesión micromecánica de la resina a este tejido y la formación de la capa híbrida (Pashley y Carvalho, 1997; Van Meerbeek y col., 1994; Rontani y col., 2000) se ha registrado que este procedimiento conlleva cambios en dicha estructura que podrían alterar la distribución del estrés a lo largo de la interfaz originada así como determinar la localización preferencial de fallos (Toledano y col., 2005; Fuentes y col., 2004).

En el presente trabajo se utilizó la técnica de microindentación como medio para comprender las consecuencias mecánicas del proceso de acondicionamiento ácido de la dentina. En este sentido, no es aconsejable que este tratamiento reduzca en exceso las propiedades mecánicas del substrato adhesivo, al haber sido relacionadas con las fuerzas de adhesión (Panighi y G'Shell, 1993).

Existen varios dispositivos para determinar la microdureza siendo el indentador Knoop el más frecuentemente utilizado (Johnsen, 1994; Meredith y col., 1996; Hosoya y col., 2000, Pashley y col., 1985; Toledano y col., 2005). El valor medio de microdureza obtenido en el presente trabajo para dentina temporal sana fue de 65 KHN. Este valor es semejante al registrado para dentina permanente profunda en estudios previos (Toledano y col., 2003), lo que parece contribuir a la similitud entre ambos substratos.

Otros autores han presentado valores de dureza algo inferiores para dentina decidua, oscilando entre 35-60 KHN (Johnsen, 1994; Hosoya y col., 2000). La dureza es una medida relacionada con el grado de calcificación de los tejidos dentarios (Panighi y G'Shell, 1992; Hosoya y col., 2000) así como con el grosor de los cristales minerales (Tesch y col., 2001), por lo que podría interpretarse que el porcentaje mineral de los dientes de este estudio fue más alto. Sin embargo las comparaciones son complicadas debido a variaciones entre los métodos utilizados (condiciones de la técnica de microindentación, dientes, superficies dentarias). Se ha demostrado que la dureza y el módulo elástico de la dentina primaria varían entre diferentes dientes y según la localización intradentaria (Hosoya y Marshall Jr, 2004). Asimismo, imperfecciones en la superficie o factores tales como la exposición a fluoruros pueden afectar su valor. En el mismo sentido, la edad en la que se produce la extracción dentaria puede influenciar la microdureza, al ser la mineralización de la dentina un proceso continuo (Angker y col., 2003). Adicionalmente, podría considerarse el tiempo de almacenaje como otra variable determinante del contenido mineral de los dientes evaluados, ya que todos los minerales tienen un cierto grado de solubilidad a una temperatura determinada en soluciones acuosas, el cual es inherente a cada tipo mineral. La disolución de los minerales en agua es relativamente rápida y disminuye a medida que se alcanza el equilibrio de la solución (Ten Cate, 2003). Por lo tanto, la comparación de la dureza Knoop reportada en esta investigación con la obtenida por otros autores podría no ser adecuada. Sin embargo, es importante resaltar que las diferencias de los valores iniciales de microdureza Knoop de los dientes analizados en esta investigación no fueron diferentes estadísticamente por lo que se consideró una muestra homogénea.

Los resultados obtenidos en este trabajo (Tabla 4) demostraron un descenso significativo de la microdureza de la superficie dentinaria decidua acondicionada según los tiempos recomendados por el fabricante. Esta disminución parece ser reflejo del descenso

del contenido mineral debido al proceso de desmineralización. Asakawa y col. (2001) obtuvieron resultados similares al comparar SB y OUB.

La dentina acondicionada con ácido fosfórico mostró los valores más bajos de microdureza respecto a los otros sistemas adhesivos testados, provocando una reducción de la microdureza superior al 60% respecto a la dentina mineralizada. Esta disminución fue independiente del tiempo de aplicación del ácido y es superior a la registrada a nivel de dentina permanente profunda en estudios previos siguiendo la misma metodología (Toledano y col., 2005). Debido a la mayor reactividad registrada para la dentina decidua al grabado con ácido (Nör y col., 1996), es posible que el ácido fosfórico causara un sobre acondicionamiento y una excesiva desmineralización de ésta. Esta drástica reducción en las propiedades mecánicas del sustrato puede tener repercusión clínica para el procedimiento adhesivo posterior. Tras el grabado ácido, la disolución de la hidroxiapatita provoca que la matriz fibrilar dentinaria quede sin soporte, excepto por el aportado por el agua existente en el tejido dentinario (Carvalho y col., 2003). Debido a la escasa rigidez, la red de colágena puede colapsarse al secarla con aire, produciéndose un acercamiento entre las fibras y disminuyendo los espacios necesarios para que se produzca la infiltración de los monómeros. Es por ello, que se recomienda una técnica de adhesión húmeda (Kanca, 1992). En el mismo sentido, se ha registrado que una desmineralización en exceso puede causar el colapso de la matriz fibrilar dentinaria (Tam y Pilliar, 1997). Los solventes orgánicos que componen los adhesivos tienen la función de reemplazar el contenido de agua de las fibras de colágena para facilitar la infiltración de la resina. Si permanece una capa de dentina alterada y desprotegida por la resina, o bien si la resina no es capaz de reforzar dicho sustrato alterado, esta zona funcionará como punto débil de la interfaz y conducirá al fallo prematuro de la unión resina-dentina (Tay y col., 2002c; Tay y col., 2003; Hashimoto y col., 2000b).

Sin embargo, los resultados reflejaron que la microdureza fue superior y dependiente del tiempo de aplicación para los dos adhesivos autograbadores testados, CSEB y OUB. Los sistemas autograbadores acondicionan e imprimen la dentina de manera simultánea y sin necesidad de lavado. Se basan en su capacidad de disolver parcialmente la hidroxiapatita para conseguir una zona de resina infiltrada con minerales incorporados (Pêrdigao y Lopes, 1999). Sin embargo, no todos los sistemas autograbadores tienen la misma capacidad para interactuar con el barrillo dentinario. En este sentido, han sido clasificados en tres categorías, dependiendo de su pH: suaves, moderados y agresivos (Pashley y Tay, 2001). El Clearfil SE Bond corresponde a los autograbadores de acidez moderada mientras que el One Up Bond está clasificado como un adhesivo de acidez agresiva que elimina por completo el barrillo dentinario. En el mismo sentido, dependiendo de la capacidad de acondicionamiento de estos adhesivos, el efecto producido en la dentina subyacente será de mayor o menor intensidad, con el consiguiente grado de ensanchamiento de la luz tubular y de disolución de los cristales de hidroxiapatita que cubren la colágena de la dentina intertubular. A este respecto, estudios recientes han comprobado que el sistema adhesivo OUB produce una disminución significativa de la dureza de la dentina decidua subyacente a la capa híbrida (20-30  $\mu\text{m}$ ) creada por este adhesivo respecto a la dentina más profunda (Hosoya y Tay, 2006), atribuyendo este hecho a un proceso de grabado continuo por parte de los monómeros ácidos de la resina debido

a una incompleta polimerización de ésta, ocasionando así una zona de dentina parcialmente desmineralizada sin infiltrar. Sin embargo, los valores de microdureza Knoop obtenidos en este trabajo no reflejaron esta observación. Este hecho podría ser atribuible a que, en el presente estudio, se procedió a eliminar el adhesivo de las muestras acondicionadas con los sistemas autograbadores de forma inmediata y previa a la técnica de microindentación, mediante un proceso de deshidratación con etanol, con el objetivo de realizar la lectura sobre la superficie de dentina decidua remanente. De este modo, se neutralizó la acción ácida de los monómeros sobre dicha estructura la cual mostró una menor afectación mecánica para el sistema adhesivo OUB.

En este sentido, la deshidratación con etanol podría haber afectado a los valores de microdureza obtenidos con los sistemas autograbadores, respecto al ácido fosfórico. Se ha registrado que la profundidad de penetración del indentador, y por lo tanto el área de indentación depende de la carga aplicada, del tiempo y del estado de hidratación (Hosoya y col., 2000). A pesar de que la necesidad de realizar la medición óptica de la indentación se ve dificultada cuando la dentina está hidratada se ha apuntado que, de este modo, se obtienen resultados más reales y válidos (Hosoya y col., 2000; Angker y col., 2003), al asemejar las condiciones existentes de la dentina en la cavidad oral, observándose un descenso de los valores de dureza en dentina primaria cuando está hidratada. Este aspecto fue controlado con especial cuidado durante la realización del ensayo (Xu y col., 1998). Sin embargo, es posible que el proceso de deshidratación produjera la contracción de la dentina parcialmente desmineralizada y, aunque se procedió a rehidratar la dentina de forma posterior, no se conoce la influencia de estos métodos en la dureza de la dentina decidua.

Los valores más altos de dureza de la superficie acondicionada correspondieron al adhesivo OUB, el cual mostró los valores más bajos de fuerza de adhesión, en los ensayos de microtensión, respecto a los otros adhesivos. Estos resultados parecen cuestionar que la dureza del substrato dentinario acondicionado contribuya de manera decisiva a la fuerza de adhesión interfacial siendo más importantes las propiedades de la capa híbrida resultante tras el proceso de adhesión, es decir las propiedades físicas de la resina infiltrada polimerizada así como de la colágena impregnada y reforzada por los monómeros adhesivos (Sano y col., 1995b). En este sentido, estudios previos (Hosoya, 2006a) han determinado la dureza en las interfaces de dentina utilizando los mismos adhesivos (SB y CSEB) en dientes primarios sanos, sin encontrar diferencias significativas con la dentina subyacente ni entre los diferentes adhesivos.

En el proceso de adhesión a dentina es fundamental la valoración de la resistencia adhesiva. Para ello se recurrió al test de microtensión desarrollado por Sano y col. (1994b). Este test permite la medición de áreas adheridas con secciones muy pequeñas respecto a otros tests convencionales, lo que le confiere múltiples ventajas, siendo ampliamente utilizado en la actualidad para testar la resistencia adhesiva de los diferentes sistemas adhesivos dentinarios actuales (Pashley y Carvalho, 1997; Burrow y col., 2002; Nikaido y col 2002; Uekusa y col., 2006). Asimismo se recomienda su utilización en combinación con ensayos de degradación artificial (Gwinnett and Yu, 1995; Armstrong y col., 2001; De Munck y col., 2005; Toledano y col., 2006a; Osorio y col., 2005b), en los que exhibe una mayor sensibilidad respecto a otros tests.

En el test de microtensión, la prueba de eficacia adhesiva se efectúa sobre barritas cortadas que poseen un área aproximada de  $1\text{mm}^2$  de espesor. Este hecho hace que el método de microtensión sea más laborioso y técnicamente más complicado, sin embargo contribuye a que las fuerzas de tracción se concentren en la unión diente-resina de un modo uniforme, por lo que permite una interpretación más fiel de la resistencia adhesiva de los materiales estudiados. Además este test permite producir varios especímenes a partir de un solo diente, de este modo se reduce la variabilidad interdientaria (De Munck y col., 2005) además de facilitar el estudio cuando la disponibilidad de las muestras es limitada (Kaden y col., 2003).

Siguiendo los protocolos de aplicación recomendados por cada fabricante, los valores de microtensión obtenidos en el presente estudio para el adhesivo de grabar y lavar (SB) y el autograbador de dos pasos (CSEB) fueron similares y significativamente mayores que los del autograbador de un paso (OUB) (Tabla 5). Miranda y col. (2006) obtuvieron resultados similares al utilizar SB y CSEB en dentina primaria. Los bajos valores de microtensión obtenidos con el autograbador OUB se asociaron a una mayor frecuencia de fallos adhesivos (Tabla 6).

A pesar de que los adhesivos autograbadores de un paso han sido desarrollados para acortar los protocolos de adhesión y reducir la sensibilidad a la técnica adhesiva, condiciones especialmente deseables en la clínica odontopediátrica, existe consenso general en la bibliografía respecto al funcionamiento deficiente que presentan estos materiales (Toledano y col., 2003; Osorio y col., 2003; De Munck y col., 2003; Dias da Silva y col., 2001). En estos sistemas, los monómeros hidrofóbicos e hidrofílicos se presentan entremezclados en una única solución combinada de agua y solvente (Van Landuyt y col., 2005; Tay y col., 2002c). Se ha registrado que se produce una separación de fases entre los componentes del sistema (Van Landuyt y col., 2005) durante el procedimiento adhesivo. Cuando el solvente comienza a evaporarse de la mezcla, se produce un desequilibrio del balance solvente-monómero que repercute en que el agua se separe del resto de los componentes adhesivos solubles en agua en forma de vesículas, las cuales quedan atrapadas dentro de la capa híbrida (Tay y col., 2002c). A pesar de que el agua es un componente esencial para la ionización de los monómeros acídicos de los adhesivos autograbadores, la presencia de agua dentro de la capa de resina (Yiu y col., 2005) podría causar la incompleta polimerización del adhesivo, diluyendo los monómeros solubles hasta el punto que se ha comprobado que no existe una adecuada propagación de los radicales libres, comprometiendo así la fuerza adhesiva final a dentina primaria.

El fuerte acondicionamiento ácido que característicamente desarrollan estos autograbadores simplificados disuelve por completo el barrillo dentinario. La combinación del *smear layer* y los tapones de barrillo reducen la permeabilidad dentinaria (Pashley y Carvalho, 1997). Al eliminar la barrera de barrillo dentinario se produce la salida del fluido a la superficie, lo cual podría interferir con la adhesión a dentina y la disolución de los agentes adhesivos. El agua produce una deficiente polimerización de los monómeros acídicos, provocando que éstos continúen grabando la dentina (Carvalho y col., 2005; Toledano y col., 2006b) lo que repercute en valores adhesivos inferiores.

Se ha comprobado que si se utiliza un ácido fuerte durante un periodo prolongado de tiempo, además de producirse la eliminación completa del barrillo dentinario y los tapones de barrillo introducidos en los túbulos, se provoca una desmineralización excesiva de la dentina peritubular e intertubular. Esta desmineralización en exceso puede provocar el colapso de la red de colágeno dentinario. En este caso, la acción de los imprimadores hidrofílicos puede no ser suficiente para restituir a su estado original la trama de fibrillas colágenas, y de forma consecuente comprometer la capacidad de adhesión (Hashimoto y col., 2000). Es por ello que estudios previos han enfatizado en la importancia del control del tiempo de aplicación, la concentración y la composición de la solución acídica (Nör y col., 1996) durante la fase de acondicionamiento. En el caso de los dientes permanentes el tiempo óptimo de acondicionamiento dentario es bien conocido y cada fabricante lo indica de forma detallada en sus instrucciones. Desafortunadamente, las instrucciones de uso cuando se trabaja en dentición primaria no están firmemente establecidas y los fabricantes actuales no recomiendan un protocolo diferente para sus productos cuando se utilizan en los dientes temporales, a pesar de haber sido claramente postulado (Nör y col., 1997).

Químicamente, la dentina primaria parece ser más reactiva al acondicionamiento con ácidos (Nör y col., 1996), lo cual parece estar relacionado con el menor grado de mineralización observado en los tejidos dentales primarios (Hosoya y col., 2000, Angker y col., 2003) provocando una descalcificación más profunda de la dentina intertubular y formando capas híbridas de espesores aumentados en los dientes temporales (Sardella y col., 2005). Las capas híbridas gruesas se han relacionado con dentina desmineralizada y no infiltrada en la base de esta zona de interdifusión, quedando, de este modo, una zona de máxima debilidad dentro de la interfaz adhesiva (Sano y col., 1995a ; Hashimoto y col., 2000a).

Debido a la excesiva profundidad de desmineralización observada durante el acondicionamiento de la dentina decidua parece aconsejable reducir el tiempo de acondicionamiento dentinario cuando se trate de adherir sobre ella, de este modo se disminuye la posibilidad de aparición de zonas debilitadas o vías de microfiltración en la base de la capa híbrida de los dientes temporales. Reduciendo el tiempo de grabado a la mitad en dentina primaria parece ser suficiente para crear una capa híbrida con espesor similar a las obtenidas en dentina permanente, intentando producir un substrato dentinario para la adhesión similar al que se obtiene en dentición permanente (Nör y col., 1996).

De acuerdo con los resultados de este estudio, al reducir el tiempo de acondicionamiento a la mitad, los valores de microtensión fueron superiores y estadísticamente significativos para SB y OUB, no detectándose diferencias significativas en los valores adhesivos obtenidos con CSEB. SB es un adhesivo de grabar y lavar que utiliza ácido fosfórico en concentraciones entre el 30-40% como acondicionador inorgánico. Tal y como se ha comentado anteriormente, la reducción en el tiempo de aplicación limita la extensión del proceso de desmineralización debido a la capacidad tampón de la dentina (Sardella y col., 2005; Camps y Pashley, 2000). Este hecho puede haber contribuido a una mayor impregnación de la dentina desmineralizada, tal y como muestran las imágenes tomadas con microscopía electrónica de barrido (Fig. 10c-10d),

produciendo un fenómeno más completo de infiltración de la dentina desmineralizada, lo que repercutió en una mejor eficacia adhesiva. Asimismo, y según las mediciones de rugosidad obtenidas con el microscopio de fuerzas atómicas, se puede afirmar que la reducción del tiempo de grabado a la mitad con SB confiere una rugosidad intertubular significativamente mayor a la dentina de la superficie del diente temporal, en comparación con la superficie pulida y tras 15 segundos de grabado (Tabla 3). Este aumento de la rugosidad va a repercutir en un incremento del área de superficie de adhesión y consecuentemente de su humectabilidad (Toledano y col., 1999), traduciéndose en un ascenso significativo de los valores de microtensión.

One Up Bond mostró, asimismo, un ascenso significativo de los valores adhesivos al reducir el tiempo de acondicionamiento a la mitad (Tabla 5). La formulación química de los sistemas adhesivos autograbadores de un paso consiste en alcoholes bivalentes con ácidos metacrílico y fosfórico. El residuo de fosfato produce el acondicionamiento de la dentina dando lugar a la exposición de las fibras de colágeno y a la disolución de casi toda la hidroxiapatita, mientras que el componente metacrilato de la molécula está disponible para la copolimerización con el adhesivo o el material restaurador. Se ha demostrado que el agresivo proceso de grabado ácido que desarrollan estos adhesivos es capaz de producir el deterioro las fibras de colágeno de la superficie causando la desmineralización a niveles más profundos (Marshall y col., 1995) formando complejos hibridizados con grandes espesores (Toledano y col., 2003; Osorio y col., 2003; Cardoso y col., 2002) y *tags* de resina gruesos (Osorio y col., 2003), disminuyendo la eficacia adhesiva (Yoshiyama y col., 1998). Al reducir el tiempo de grabado del sistema adhesivo OUB parece limitarse el alcance del proceso de desmineralización por la capacidad tampón de la dentina, del mismo modo al descrito para el ácido fosfórico. En este sentido, los resultados obtenidos con AFM parecen confirmar esta hipótesis reflejando un aumento significativo de la rugosidad a nivel de la dentina intertubular al reducir el tiempo de acondicionamiento para OUB (Fig. 9), mostrando un comportamiento similar al seguido por SB aplicado 7s (Tabla 3).

Como resultado de la limitación en el proceso de desmineralización, el barrillo dentinario no fue eliminado completamente, tal y como muestran las imágenes de MEB (Fig. 12d) y AFM (Fig. 9) lo que posiblemente evitara la salida del fluido dentinario procedente de la pulpa. La menor presencia de agua en la interfaz da como resultado una mayor eficacia adhesiva, reduciendo de este modo el efecto de la separación de fases de los componentes solubles en agua del sistema resinoso (Toledano y col., 2007), así como un mayor grado de polimerización del adhesivo (Tay y col., 2005). Como consecuencia de ello, este sistema autograbador de un paso mejora su estabilización sobre el substrato, contribuyendo a un grabado y un proceso de infiltración más favorable (Fig. 12c-12d), cuando se aplica durante 10 segundos.

Clearfil SE Bond (CSEB) no se vió afectado por la reducción del tiempo de acondicionamiento. Este adhesivo autograbador de dos pasos contiene 10-MDP como monómero funcional ácido diluido en agua, lo que le confiere una acidez moderada (pH ~ 2). Al actuar sobre la dentina, causa una mínima disolución del barrillo dentinario así como de los tapones, difundiendo a través de ellos hasta su capa basal y reaccionando con la dentina desmineralizada subyacente. De este modo, el mecanismo de adhesión que

establece el Clearfil SE Bond resulta de la desmineralización e impregnación simultánea de los tejidos dentarios con resultado de continuidad en el substrato, incorporando el *smear plug* en el *tag* de resina (Toledano y col., 2001; Oliveira y col., 2003) y constituyendo una capa híbrida poco profunda y uniforme (Inoue y col., 2000; Osorio y col., 2003; Toledano y col., 2003). En el mismo sentido, el ensayo de rugosidad con AFM demostró que el acondicionamiento de la dentina decidua con este sistema adhesivo produce un aumento significativo de la rugosidad de la superficie primaria independientemente del tiempo de aplicación, y que parece ser suficiente para conseguir una óptima fuerza de adhesión sobre dicho tejido. Asimismo, la presencia del monómero 10-MDP, de naturaleza fundamentalmente hidrofílica, se piensa que mejora la humectabilidad de las superficies dentarias húmedas, a lo que hay que añadir que este monómero posee dos grupos hidroxílicos con capacidad de establecer uniones químicas con el calcio de la hidroxiapatita remanente en la red de colágeno (Yoshida y col., 2004), complementando así su acción adhesiva microrretentiva con una unión química al componente mineral, lo que podría ser beneficioso para el sellado interfacial (Yoshida y col., 2001). Todos estos motivos pueden haber contribuido a los resultados obtenidos, independientemente del tiempo de grabado. En ambos casos, la dentina intertubular aparece completamente infiltrada así como la presencia de numerosos *tags* de resina ocluyendo los túbulos dentinarios (Fig 11a-d), reflejando una correcta eficacia adhesiva.

En la actualidad, y de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, la mayoría de los sistemas adhesivos disponibles consiguen una efectividad adhesiva inmediata a dentina aceptable. Sin embargo, se ha registrado que los resultados a largo plazo son todavía inciertos (De Munck y col., 2005). En este sentido, los estudios muestran que la fuerza de adhesión a dentina disminuye durante el almacenamiento en agua a lo largo del tiempo (Gwinnet y Yu, 1995, Toledano y col., 2007a) debido a la degradación hidrolítica de la resina (Burrow y col., 1996) o de la matriz de colágeno desprotegida dentro de la capa híbrida (Hashimoto y col., 2000b; De Munck y col., 2003; Wang y Spencer, 2003). Dicha degradación hidrolítica de las fibras de colágeno desprotegidas, ha sido también comprobada *in vivo* (Hashimoto y col., 2000b; Donmez y col., 2005). Estas fibras de colágeno desprotegidas están relacionadas con un proceso de desmineralización agresivo, tras el cual se ve comprometida la impregnación por parte de los monómeros de resina. De este modo, permanece una zona debilitada en la base de la interfaz adhesiva (Sano y col., 1995a) que podría ser afectada por la hidrólisis, el ataque enzimático dependiente de las metaloproteinasas, y el estrés mecánico y térmico, resultando con el tiempo en la degradación de la unión (Pashley y col., 2004). A pesar de que la durabilidad de las uniones entre las resinas adhesivas y la dentina es un factor clave en la adhesión dentaria, disponemos de poca información acerca de la estabilidad de dichas uniones, especialmente en lo que a dentina temporal se refiere.

Es posible desarrollar tests de acelerado *in vitro*, mediante la reducción del tamaño de los especímenes (a barras de 1mm<sup>2</sup> de área) y el almacenamiento de éstos en diferentes medios, de tal modo que la interfaz adhesiva quede expuesta a la influencia del medio seleccionado, en unas dimensiones que permiten un deterioro de las uniones de un modo acelerado. En este sentido, los tests de acelerado *in vitro* de las uniones dentina-resina pueden servir de ayuda para evaluar la estabilidad a largo plazo de estas interfaces bajo

condiciones clínicamente más relevantes. Con este fin, en el presente estudio se recurrió al con hipoclorito sódico y al ciclado mecánico, como técnicas de degradación *in vitro* que permiten simular el efecto a largo plazo en el ambiente oral (Yamauti y col., 2003), analizando la influencia de dichos ensayos en los valores adhesivos de los diferentes sistemas utilizados, mediante el test de microtensión y el análisis fractográfico.

Debido a su efecto proteolítico inespecífico (Nakabayasi y Saimi, 1996; Spencer y Swafford, 1999), se ha utilizado la solución de hipoclorito sódico (Yamauti y col., 2003; Yoshida y col., 2004a) para la inmersión de los especímenes adheridos. En solución acuosa, el hipoclorito sódico, forma radicales superóxido ( $O_2^-$ ) que producen la oxidación y fragmenta las cadenas proteicas (Yoshida y col., 2004a; Osorio y col., 2005b; Yamauti y col., 2003). De este modo, este compuesto se utiliza para hidrolizar y solubilizar las fibras de colágeno que quedan desprotegidas dentro de la estructura adherida (De Munck y col., 2005) permitiendo así valorar la capacidad de los diferentes monómeros de resina de proteger a la matriz dentinaria de colágeno (Osorio y col., 2005b; Yamauti y col., 2003; Yoshida y col., 2004a). Para ello se utilizó una solución acuosa de hipoclorito sódico al 10% durante 1 hora. Se ha comprobado que este periodo de tiempo es suficiente para la deproteinización de la capa híbrida y la dentina subyacente inmediata (Yamauti y col., 2003). Asimismo, se ha registrado que mayores tiempos de almacenamiento no resultan en mayores reducciones de las fuerzas adhesiva (Yoshida y col., 2004a) pero sí es posible una afectación del substrato dentario intacto, especialmente en el caso de la dentina, que posee un elevado contenido orgánico (De Munck y col., 2007).

Después del almacenamiento en solución de hipoclorito sódico, los valores adhesivos disminuyeron significativamente para todos los sistemas adhesivos testados (tabla 5).

Aunque el mecanismo de degradación no está suficientemente clarificado, los estudios *in vitro* han demostrado dos mecanismos básicos de degradación de la interfaz adhesiva: (1) la hidrólisis directa de las fibras de colágeno que quedan desprotegidas durante la infiltración de la resina, en la base o dentro de la capa híbrida, tras la descalcificación de la superficie dentinaria (Sano y col., 1999; Armstrong y col., 2003; Hashimoto y col., 2000b); y (2) la solubilización de los componentes de resina dentro de la capa híbrida (Hashimoto y col., 2003; De Munck y col., 2005).

Parece ser que las enzimas proteolíticas presentes en la microflora oral así como enzimas proteinasas endógenas dentinales son las responsables de la degradación química de la matriz de colágeno (Van Strijp y col., 2003). Estas enzimas son hidrolasas que actúan rompiendo las uniones peptídicas en presencia de agua (Toledano y col., 2007). Se ha apuntado que el descenso de los valores de MTBS ocurre como consecuencia de la degradación hidrolítica del colágeno, no observándose disminución de estos valores en ausencia de agua (Toledano y col., 2007a).

La degradación de la capa híbrida sucedió para todos los sistemas testados. Para SB esta disminución fue independiente del tiempo de acondicionamiento ácido. Sin embargo, para los adhesivos autograbadores CSEB y OUB el tiempo de acondicionamiento mostró

diferencias entre los valores de MTBS obtenidos tras la inmersión de los especímenes en hipoclorito.

En el mismo sentido, el análisis fractográfico demostró diferencias entre los distintos tipos adhesivos. Las imágenes de MEB de los especímenes adheridos con SB revelaron grandes áreas de dentina expuesta debido a la acción del hipoclorito sódico en la estructura adhesiva, donde se apreció una disolución completa de la capa híbrida, ocasionando frecuentes fallos en la base de la misma (Fig. 13a y c). Se ha demostrado que los sistemas de grabar y lavar dan lugar a zonas de infiltración incompleta a lo largo de la base híbrida en las que se conservan fibras colágenas desprotegidas en zonas de dentina desmineralizadas, creadas por la discrepancia entre la profundidad del grabado ácido y la de infiltración de la resina (Hashimoto y col., 2000b; Toledano y col., 2006a). Este fenómeno parece ser debido a la restricción en la difusión del bis-GMA (Wang y Spencer, 2003) y del copolímero de ácido polialkenoico (Toledano y col., 2003) en la base de dentina desmineralizada. La incompleta penetración de la resina tiene una influencia negativa en la integridad del proceso adhesivo (Hashimoto y col., 2000b). Tal y como reflejaron los resultados obtenidos, la degradación de la interfaz fue independiente del tiempo de aplicación del ácido, lo que parece evidenciar que el ácido fosfórico resultó excesivo para el acondicionamiento de la dentina temporal incluso reduciendo el tiempo de aplicación, originando una excesiva desmineralización de este substrato. También es posible que los monómeros adhesivos de este sistema no difundieran adecuadamente en la red de colágeno de la dentina decidua. El entramado de fibras de colágeno dentinarias desmineralizadas representa un substrato de adhesión delicado y blando; el tejido debe mantenerse húmedo (Gwinnet, 1992; Kanca, 1992), para evitar que la red de colágeno expuesta tras la desmineralización se colapse impidiendo así la infiltración completa del adhesivo. A pesar de que este aspecto fue controlado con especial cuidado, numerosos estudios confirman la permanencia de fibras de colágeno desprotegidas tras la aplicación de la técnica de grabar y lavar (Toledano y col., 2006a; Tay y col., 2002c), las cuales fueron degradadas por el hipoclorito durante su almacenamiento repercutiendo en el descenso de los valores adhesivos. Además, debido al alto porcentaje de monómeros hidrofílicos en la composición química de los sistemas de grabar y lavar de dos pasos, se ha registrado que estos sistemas dan lugar a interfaces adhesivas que muestran altos grados de permeabilidad, incluso después de la polimerización, incrementándose de esta manera el proceso de nanofiltración y de solubilización de la resina (Tay y col., 2003).

En el mismo sentido, se ha registrado que los adhesivos autograbadores de un solo paso, formados por altas concentraciones de resinas hidrofílicas y ácidas, dan lugar a interfaces adhesivas que carecen de capa de resina hidrofóbica insoluble, lo que conduce a la creación de capas híbridas que se comportan como membranas semipermeables, permitiendo el movimiento de fluidos a través de ellas y comprometiendo la estabilidad de la adhesión (Tay y col., 2002c). De este modo, el aumento de la permeabilidad (Tay y Pashley, 2001; Chersoni y col., 2004), el menor grado de polimerización alcanzado por la resina adhesiva por la presencia de agua (Ito y col., 2005) y/o solvente residual (Nunes y col., 2005) así como la infiltración incompleta que llevan a cabo como consecuencia de la separación de fases descrita anteriormente (Toledano y col., 2007a; Tay y col., 2002a; Yiu y col., 2005) podrían haber acelerado el efecto de degradación (Osorio y col., 2005b) y

solubilización de la resina de OUB (Toledano y col., 2007b) tras la inmersión en hipoclorito, ocasionando el fallo pretest de los especímenes. La vibración del corte durante la preparación de las barritas provocó que las muestras fallaran antes de la prueba de microtensión. Asimismo, al reducir el tiempo de acondicionamiento a 10s, los resultados reflejaron una drástica caída de los valores de microtensión. Estos valores ponen de manifiesto la deficiente capacidad adhesiva de este sistema en dentina temporal, evidenciando que, a pesar de aparentar una mejora en los valores de adhesión inmediata al reducir el tiempo de acondicionamiento aconsejado por el fabricante, la alta permeabilidad de las interfaces creadas debido al alto porcentaje de monómeros hidrófilos, pudo influir para que el hipoclorito deteriora la adhesión conseguida. Las imágenes tomadas con MEB reflejaron una elevada pérdida de adhesivo, los túbulos estaban ensanchados y en su mayoría se mostraban vacíos, sin *tags* de resina (Fig. 15c y d).

Por otro lado, cuando los especímenes adheridos con CSEB fueron expuestos a la acción del hipoclorito, los valores adhesivos disminuyeron de modo significativo, a pesar del proceso de infiltración superior que desarrolla este sistema adhesivo (Toledano y col., 2006a). Es posible que una incompleta eliminación del agua asociada a los monómeros de resina hidrofílicos en la composición química del adhesivo (Armstrong y col., 2003; Pashley y col., 2004), o bien procedente de la estructura dentinaria subyacente, provocara la degradación hidrolítica de estas resinas hidrofílicas, contribuyendo así a la degradación de la capa híbrida y causando el descenso de los valores de MTBS observados con este adhesivo. La hidrofilia que presenta la resina adhesiva del CSEB es una ventaja en el proceso adhesivo a dentina al facilitar el proceso de impregnación de la dentina, produciendo un buen sellado dentinario (Hashimoto y col., 2004), pero va a repercutir en su grado de permeabilidad (Hashimoto y col., 2006), lo cual parece ser una desventaja en los estudios a largo plazo.

El análisis fractográfico de las superficies fracturadas mostró un patrón de disolución diferente respecto a los otros adhesivos. Para este sistema, la pérdida fue de adhesivo más que de colágeno. Las imágenes de las superficies fracturadas demostraron una menor afectación de la matriz dentinaria intertubular así como un menor ensanchamiento de las luces tubulares, las cuales permanecieron selladas por la resina (Fig 14). Los imprimadores ácidos de estos sistemas disuelven la fase inorgánica de la dentina permitiendo, simultáneamente, la infiltración de la resina adhesiva en la fase de dentina desmineralizada, por lo que se piensa que el riesgo de dejar dentina desmineralizada y sin infiltrar es menor (Toledano y col., 2001; Oliveira y col, 2003). Dado que no existe paso de lavado, el mineral solubilizado se queda formando parte con la resina (Yamauti et al., 2003). También partículas inorgánicas procedentes del barrillo dentinario pueden observarse dentro de la capa híbrida para los sistemas autograbadores (Tay y Pashley, 2001). El fallo se localizó en la porción superior o dentro del complejo hibridizado, por lo que es posible que la disminución de la eficacia adhesiva fuese debido a la pérdida de resina.

Cuando el tiempo de desmineralización dentinaria se redujo con este adhesivo (CSEB) el patrón de solubilización del colágeno fue menor así como los valores de MTBS se vieron menos disminuídos. Asimismo, los resultados obtenidos con la técnica de

microindentación Knoop demostraron que las propiedades mecánicas del substrato primario se vieron menos afectada al utilizar el agente ácido de este adhesivo durante un tiempo inferior al recomendado. Este hecho pone de relieve una respuesta del tejido dentinario deciduo más favorable a la aplicación de ácidos más suaves en periodos de tiempo reducidos respecto a las aconsejadas por el fabricante para la creación de la interfaz adhesiva a resina. Además, debido a la eliminación del paso clínico de lavado y secado se reduce la posibilidad de sobremojado y sobresecado, ambos con efecto negativo en el proceso adhesivo, siendo por ello mucho menos sensibles a la técnica adhesiva, respecto a los sistemas de grabar y lavar. Por otro lado, investigaciones recientes han revelado que el monómero 10-metacriloxydecil dehidrógeno fosfato (10-MDP) del CSEB puede establecer enlaces químicos entre los grupos carboxilo o fosfato de su monómero funcional y los cristales de hidroxiapatita residuales que permanecen en la red de colágeno dentinaria debido a la agresividad moderada de la fase ácida (Yoshida y col., 2001; Van Meerbeek y col., 2003; Nunes y col., ), constituyendo así sales de calcio con un ratio de solubilidad muy bajo (Yoshida y col., 2004b; Inoue y col., 2005), las cuales pueden retrasar el proceso de solubilización de la resina. Esta interacción adicional actúa de forma sinérgica con el proceso de infiltración superior que llevan a cabo los monómeros adhesivos dentro del substrato descalcificado y parece mejorar la estabilidad de la unión a lo largo del tiempo (De Munck y col., 2005).

Por otro lado, en la situación clínica, las uniones adhesivas están sometidas a estrés mecánico, durante la masticación y la deglución (Nikaido y col., 2002). Las fuerzas masticatorias y deglutorias pueden inducir la formación de *cracks* a nivel de la interfaz adhesiva (Nalla y col., 2002), los cuales al propagarse pueden deteriorar la integridad de las uniones resina-dentina comprometiendo así la estabilidad de dicha interfaz (De Munck y col., 2005). Con el objetivo de comprobar la influencia del posible deterioro mecánico relacionado con los procesos de masticación y deglución sobre las interfaces creadas con los diferentes adhesivos y las variaciones en el protocolo de aplicación del agente acondicionador se recurrió al ciclado mecánico. Se ha comprobado que el ciclado mecánico simula el estrés mecánico en las interfaces adheridas (Li y col., 2002). Además, el uso combinado del ciclado mecánico con el test de fuerzas adhesivas de microtensión (MTBS) permite la evaluación *in vitro* de la durabilidad de la adhesión resina-dentina bajo unas condiciones clínicamente más relevantes de las que son usadas normalmente en la técnica de fuerzas de adhesión estáticas (Nikaido y col., 2002; Toledano y col., 2006b).

Con el fin de simular lo más fielmente posible las condiciones del entorno oral, los ensayos se realizaron con los especímenes introducidos en un depósito estanco de metacrilato con agua, de tal forma que la interfaz adhesiva quedó sumergida en agua, con una temperatura ambiental de 37°C estable. Se seleccionó un programa de ciclado mecánico bajo una carga de 90 N durante 5000 ciclos. El promedio de fuerzas masticatorias registradas a nivel de la superficie oclusal de los dientes durante la masticación oscila entre 5-15 Kg (Berkovitz y col., 2002), pudiendo alcanzar un valor entre 60 - 100 Kg dependiendo de diversos factores: sexo, edad, grupos dentarios, posición mandibular, estado de la dentición, disfunción del sistema estomatognático, características esqueléticas craneofaciales (dolico-meso-braquifacial) y área de sección transversal de los músculos.

Los resultados muestran que el ciclado mecánico no afectó a las interfaces creadas para los diferentes grupos de adhesivos al ser aplicados siguiendo las instrucciones del fabricante. Sin embargo, el análisis comparativo mostró una tolerancia superior para el CSEB, estadísticamente significativa, respecto a los otros sistemas adhesivos. La distribución de las tensiones en la interfaz resina-dentina depende de las propiedades mecánicas de sus componentes (Prati y col., 1999). En este sentido se ha observado que es fundamental una correcta impregnación del sustrato dentinario y la formación de una capa híbrida de calidad, compacta y homogénea, (Breschi y col., 2007) en relación a la estabilidad de la interfaz y las fuerzas adhesivas. De acuerdo con Sardella y col. (2005), la formación de una capa híbrida más homogénea podría haber inducido una mejor distribución de las tensiones a lo largo de la interfaz adhesiva, dando como resultado un mejor comportamiento al ser sometida a las cargas mecánicas. Asimismo, el estudio realizado por Hosoya (2006a) en dentina decidua registró que no había diferencias en el módulo elástico entre la capa híbrida y la dentina decidua subyacente para el adhesivo SB pero sí para CSEB. Este gradiente de elasticidad permite la formación de un área de adhesión elástica capaz de aliviar las tensiones entre las restauraciones de composite y el sustrato rígido dentario (Hosoya, 2006a).

En el análisis fractográfico, los especímenes de Clearfil SE Bond fracturados mostraron una capa de adhesivo bien definida. Esto podría ser resultado del hecho de que el Clearfil SE Bond contiene un 10% de nanorrelleno dando como resultado una capa de adhesivo más gruesa y por lo tanto una interfaz más flexible. Esta flexibilidad en la capa del adhesivo, puede contribuir al comportamiento superior que muestra este sistema a la degradación mecánica. Asimismo, el alto porcentaje de canforoquinona (Nunes y col., 2005), y el efecto protector del recubrimiento del colágeno por la resina así como de las sales de calcio insolubles en agua que forma el monómero MDP (Yoshida y col., 2001) parecen contribuir a la estabilidad de la adhesión de la capa híbrida (Yoshida y col., 2004), lo que pudo haber influido en los resultados obtenidos.

Sin embargo, cuando los adhesivos fueron aplicados reduciendo el tiempo de acondicionamiento recomendado, los valores de MTBS resultantes tras el proceso de ciclado disminuyeron de manera significativa respecto a los valores obtenidos a las 24 horas, para todos los sistemas adhesivos. Se ha registrado que la existencia de defectos internos dentro de la capa híbrida pueden actuar absorbiendo el estrés y reduciendo así la transmisión de éste a la dentina subyacente (Monticelli y col., 2006). De este modo, la matriz de colágeno desprotegida asociada a los sistemas de grabar y lavar así como la presencia de poros y vesículas de agua en el seno de la capa adhesiva relacionada con los sistemas autograbadores de un paso (Van Landuyt y col., 2005) junto a una incompleta polimerización de la resina de la capa híbrida, podrían haber influido en este sentido.

A pesar de que los últimos avances en el campo de los adhesivos dentinarios están dirigidos a la simplificación del procedimiento adhesivo (Van Meerbeek y col., 2003), los estudios al respecto están evidenciando un detrimento en la eficacia adhesiva, en comparación con los sistemas adhesivos previos (Inoue y col., 2001; De Munck y col., 2003). En el presente trabajo, el sistema autograbador de un paso OUB demostró los peores valores de adhesión en el test de microtensión inmediato en relación a los otros sistemas

testados. En el mismo sentido, mostró un deficiente comportamiento adhesivo tras los diferentes ensayos de degradación *in vitro*. Es por ello que el uso en dentina temporal de los sistemas autograbadores de un paso no parece recomendable en la práctica restauradora, al permanecer cuestionables la longevidad y la efectividad de la adhesión conseguida con estos sistemas, siempre en un ejercicio de extrapolación al universo de los adhesivos autograbadores de un paso. Este adhesivo mostró un comportamiento adhesivo inmediato superior al reducir el tiempo de acondicionamiento ácido a la mitad. En el mismo sentido SB mostró un aumento significativo de la eficacia adhesiva inmediata al reducir el tiempo de grabado aconsejado. A pesar de que CSEB no pareció aumentar sus valores de adhesión inmediata a dentina temporal es interesante señalar que la microdureza se incrementó al reducir el tiempo de acondicionamiento. La mejora de las propiedades mecánicas ha sido correlacionado con un mejor funcionamiento clínico (Toledano y col., 2005). Asimismo, este adhesivo autograbador de dos pasos mostró un comportamiento adhesivo superior en el ensayo de degradación con hipoclorito cuando se redujo su tiempo de acondicionamiento sobre el substrato decíduo, respecto a los tiempos recomendados por el fabricante y respecto a los demás adhesivos testados, demostrando una mayor capacidad para proteger a la matriz dentinaria expuesta (Yoshida y col., 2004a; Osorio y col., 2005b). Estos resultados nos hacen rechazar la hipótesis nula establecida así como parecen recomendar la aplicación rutinaria de tiempos de acondicionamiento reducidos sobre dentina decidua y la utilización de acondicionadores ácidos más suaves.

Teniendo en cuenta la menor sensibilidad a la técnica, el procedimiento de aplicación más rápido y el menor riesgo de nanofiltración, la estrategia de adhesión de los adhesivos autograbadores de dos pasos podría convertirse en el modelo de adhesión para la dentición temporal. A este respecto son necesarios estudios clínicos que confirmen las ventajas de aplicar *in vivo* los procedimientos ensayados *in vitro*. Igualmente son necesarios más estudios con el objeto de comprender la morfología y el proceso de degradación de las interfaces adhesivas a nivel de la dentición decidua, así como el papel jugado por los diferentes sistemas adhesivos. En este sentido, conocemos como actúan algunos componentes de estos sistemas en dentición permanente pero son escasas las referencias en la literatura de la función que asumen estos compuestos específicamente en relación a la dentina primaria.

## **6. CONCLUSIONES**

De acuerdo con la metodología utilizada y los resultados obtenidos en este estudio se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- 1- Los adhesivos testados en este estudio lograron adecuadas fuerzas de adhesión inmediata a dentina primaria excepto para el sistema autograbador de un paso OUB, el cual también demostró los peores resultados a la MTBS en los ensayos de degradación *in vitro*.
- 2- La reducción en el tiempo de grabado ácido aumentó la fuerza de adhesión inmediata de Single Bond y One Up Bond a dentina decidua pero no mejoró su capacidad adhesiva tras los procesos de degradación química y/o mecánica.
- 3- La disminución del tiempo de acondicionamiento ácido para Clearfil SE Bond provocó un descenso de la eficacia adhesiva de este sistema tras ser sometido a degradación química, sin embargo repercutió en una mayor estabilidad de las interfases creadas de forma posterior a la degradación mecánica.
- 4- Ningún adhesivo evaluado en este trabajo logró evitar la degradación hidrolítica de las interfaces originadas sobre dentina decidua.
- 5- La rugosidad intertubular de la dentina primaria fue dependiente del tratamiento acondicionador de superficie realizado así como de los tiempos de acondicionamiento ácido para los sistemas adhesivos con un pH más bajo (SB y OUB), sin embargo la rugosidad total registrada a nivel del tejido dentinario temporal sólo fue sensible al material acondicionador utilizado, sin mostrar variaciones a los cambios en el tiempo de acondicionamiento para cada sistema.
- 6- Los resultados demostraron que los valores de microdureza de la superficie dentinaria decidua dependen del tratamiento acondicionador realizado sobre dicha superficie, sin embargo no parece tener una influencia decisiva en la eficacia adhesiva posterior.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**

- Agematsu H., Sawada T Watanabe H., Yanagisawa T., Ide Y. Inmuno-scanning electrón microscope characterization of large tubules in human deciduous dentin. The anatomical record 1997; 248: 339-345.
- Agostini FG., Kaaden C., Powers JM. Bond strength of self-etching primers to enamel and dentin of primary teeth. *Pediatr Dent* 2001;23(6):481-486.
- Anderson D.J. Measurement of stress in mastication. *J Dent Res* 1956; 35: 664-670.
- Angker L., Nihjof N., Swain MV., Kilpatrick NM. Influence of hydration and mechanical characterization of carious primary dentine using an ultra-micro indentation system (UMIS). *Eur J Oral Sci* 2004a;112(3):231-6.
- Angker L., Nockolds C., Swain MV., Kilpatrick N. Quantitative analysis of the mineral content of sound and carious primary dentine using BSE imaging. *Archives of Oral Biology* 2004b; 49: 99-107.
- Angker L., Swain M.V., Kilpatrick N. Micro-mechanical characterization of the properties of primary tooth dentin. *Journal of Dentistry* 2003; 31: 261-267.
- Araujo F.B., Moraes F.F., Fossati A.C.M. A estrutura da dentina do dente decíduo e sua importancia clínica. *Revista Brasileira de Odontología* 1995; 52: 37-43.
- Araujo FB., García-Godoy F. A comparison of three resin bonding agents to primary tooth dentin. *Pediatr Dent* 1997;19:253-257.
- Armstrong SR., Keller JC., Boyer DB. The influence of water storage and C-factor on the dentin-resin composite microtensile bond strength and debond pathway utilizing a filled and unfilled adhesive resin. *Dent Mater* 2001;17:268-276.
- Armstrong SR., Vargas MA., Fang Q., Laffon JE. Microtensile bond strength of a total etch 3-step, total-etch 2-step, self-etch 2-steps, and a self-etch 1-step dentin bonding system through 15-month water storage. *J Adhes Dent* 2003;5:47-56.
- Asakawa T., Manabe A., Itoh K., Inoue M., Hisamitu H., Sasa R. Efficacy of dentin adhesives in primary and permanent teeth. *J Clin Pediatr Dent* 2001;25(3):231-236.
- Bates JF., Stafford GD., Harrison A. Masticatory function-a review of the literature (II). Speed of movement of the mandible, rate of chewing and forces developed in chewing. *J Oral Rehabil* 1975;2:349-361.
- Berkovitz BKB., HollandGR., Moxham BJ. Oral anatomy, embryology and histology. 3<sup>rd</sup> edition. Ed. Mosby, 2002.

- Bordin-Aykroid S., Sefton J., Davies E.H. In vitro bond strengths of three current dentin adhesives to primary and permanent teeth. *Dent. Mater.* 1992; 8: 74- 78.
- Breschi L, Gobbi P, Mazzotti G, Ellis TH, Sacher E, Stangel I. A field emission in-lens SEM study of enamel and dentin. *J Biomed Mater Res* 1999;46:315–23.
- Breschi L., Mazzoni B., Ruggeri A., Cadenaro M., Di Lenarda R., De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater* 2007;10.
- Buonocore M. Simple method of increasing adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res* 1955; 50: 125
- Burrow MF, Satoh M, Tagami J. Dentin bond durability after three years using a dentin bonding agent with and without priming. *Dent Mater* 1996; 12: 302-307.
- Burrow MF., Nopnakeepong U., Phrukkanon. A comparison of microtensile bond strengths of several dentin bonding systems to primary and permanent dentin. *Dent Mater* 2002;18:239-245.
- Camps J., Pashley DH. Buffering action of human dentin in vitro. *J Adh Dent* 2000;2:39-50.
- Cardoso PE., Placido E., Moura SK. Microleakage of four simplified adhesive systems under thermal and mechanical stresses. *Am J Dent* 2002;15:164-168.
- Carrigan P.J., Morse D.R., Furst M.L., Sinai I.H. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. *J. Endod.* 1984; 10:359- 363.
- Carrilho MR., Carvalho RM., Tay FR., Yiu C., Pashley DH. Durability of resin-dentin bonds related to water and oil storage. *Am J Dent* 2005;18:315-319.
- Carvalho RM., Chersoni S., Frankerberger R., Pashley DH., Prati C., Tay FR. A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives. *Biomater* 2005;26:1035-1042.
- Carvalho RM., Mendonca JS., Santiago SL., Silveira RR., García FCP., Tay FR., Pashley DH. Effects of HEMA/solvent combinations on bond strength to dentin. *J Dent Res* 2003;82(8):597-601.
- Carvalho RM., Yoshiyama M., Pashley EL., Pashley DH. In vitro study of the dimensional changes of human dentine after demineralization. *Arch Oral Biol* 1996;41:369-377.

- Cassinelli C and Morra M. Atomic force microscopic studies of the interaction of a dentin adhesive with tooth hard tissue. *J Biomed Mater Res* 1994;28:1427-1431.
- Castillhos H., Chevitaese O. Density and diameter of dentinal tubules of first and second primary human molars-comparative scanning electron microscopy study. *J. Clin. Pediatr. Dent* 2002; 26(3): 297-304.
- Cehreli ZC., Akca T. Effect of dentinal tubule orientation on the microtensile bond strength to primary dentin. *J Dent Child* 2003; 70(2):139-144.
- Cheng H, Caterson B, Yamauchi M. Identification and immunolocalization of chondroitin sulfate proteoglycans in tooth cementum. *Connect Tissue Res* 1999;40:37-47.
- Chersoni S., Suppa P., Grandini S., Goracci C., Monticelli F., Yiu C y col. In vivo and in vitro permeability of one step self-etch adhesives. *J Dent Res* 2004;83:459-464.
- Courson F., Bouter D., Ruse ND., Degrange M. Bond strengths of nine current dentine adhesive systems to primary and permanent teeth. *J Oral Rehab* 2005;32:296-303.
- Craig R.G., Peyton F.A. Elastic and mechanical properties of human dentin. *J Dent Res* 1958; 37: 710-718.
- De Munck J., Ermis RB., Koshiro K., Inoue S., Ikeda T., Sano H., Van Landuyt K., Van Meerbeek B. NaOCl degradation of a HEMA-free all-in-one adhesive bonded to enamel and dentin following two air-blowing techniques. *J Dent* 2007;35:74-83.
- De Munck J., Van Landuyt KL., Peumans M., Poitevin A., Lambrechts A., Braem M., Van Meerbeek B. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res* 2005;84(2):118-132.
- De Munck J., Van Meerbeek B., Yoshida Y., Inoue S., Vargas M., Suzuki K., Lambrechts P., Vanherle G. Four year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2003;82:136-140.
- Dias da Silva PT., Moreira MA., Nör JE. SEM study of a self-etching primer adhesive system used for dentin bonding in primary and permanent teeth 2001;23(4):315-320.
- Donmez S., Belli DH., Pashley DH., Tay FR. Ultrastructural correlates of in vivo/in vitro bond degradation in self-etch adhesives. *J Dent Res* 2005; 84(4):355-359.
- Eick JD, Wilko RA, Anderson CH, Sorenson SE. Scanning electron microscopy of cut tooth surfaces and identification of debris by use of electron microprobe. *J Dent Res* 1970; 49: 1359-1368.

- Eliades G., Vougiouklakis G., Palaghias G. Effect of dentin primers on the morphology, molecular composition and collagen conformation of acid-demineralized dentin in situ. *Dent Mater* 1997;15:310-317.
- Fosse G., Saele PK., Eide R. Numerical density and distributional pattern of dentinal tubules. *Acta Odontol. Scand.* 1992; 50: 201-210.
- Frankerberger R., Tay FR. Self-etching vs etch-and-rinse adhesives: effect of thermo-mechanical fatigue loading on marginal quality of bonded resin composite restorations. *Dent Mater* 2005;21:397-412.
- Fritz UB, Finger WJ. Bonding efficiency of single-bottle enamel/dentin adhesives. *Am J Dent* 1999; 12: 277-282.
- Fuentes V., Ceballos L., Osorio R., Toledano M., Carvalho RM., Pashley DH. Tensile strength and microhardness of treated human dentina. *Dent Mater* 2004;20:522-529.
- Fuentes V., Toledano M., Osorio R., Carvalho RM. Microhardness of superficial and deep sound human dentin. *J Biomed Mat Res* 2003;66A:850-853.
- Fusayama T., Nakamura M., Kurosaki N., Iwaku M. Non-pressure adhesion of a new restorative resin. *J Dent Res* 1979; 58: 1364-1370.
- Garberoglio R. Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch. Oral. Biol.* 1976; 21:355- 362.
- García-Godoy, F., Donly K.J. Dentin/enamel adhesives in pediatric dentistry. *Pediatric Dentistry* 2002; 24: 462-4.
- Gómez de Ferraris M.E., Campos Muñoz A. *Histología y embriología bucodental*. Ed Panamericana. 2ª ed, 2002.
- Gotti G., Goracci C., García-godoy F., Ferrari M. Evaluation of the bonding mechanism of an adhesive material to primary teeth. *J Dent Child* 2004;71(1):54-60.
- Gregoire GL., Akon BA., MillasA. Interfacial micro morphological differences in hybrid layer formation between water-and solvent based dentin bonding systems. *J Prosthet Dent* 2002; 87(6): 633-641.
- Gwinnett AJ. Quantitative contribution of resin infiltration/hybridization to dentin bonding. *Am J Dent* 1993;6:7-9.
- Gwinnett AJ. Moist versus dry dentin:its effect on shear bond strength. *Am J Dent* 1992;5:127-129.

- Gwinnett AJ, Yu S. Effect on long-term water storage on dentin bonding. *Am J Dent* 1995; 8: 109-111.
- Habelitz S., Balooch M., Marshall S., Balloch G., Gray W. In situ atomic force microscopy of partially demineralised human dentin collagen fibrils. *J Struct Biol* 2002;138:227-236.
- Hanning M., Friedrichs C. Comparative in vivo and in vitro investigation of interfacial bond variability. *Oper. Dent.* 2001; 26(1): 3-11.
- Hart PS, Hart TC. Disorders of human dentin. *Cells Tissues Organs* 2007; 186(1): 70-7).
- Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H. Degradation patterns of different adhesives and bonding procedures. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2003; 66B: 324-330.
- Hashimoto M., de Gee AJ., Kaga M., Feilzer AJ. Contraction stress in dentin adhesives bonded to dentin 2006; 85(8):728-732.
- Hashimoto M., Ito S., Tay FR., Svizero NR., Sano H., Kaga M., Pashley DH. Fluid movement across the resin-dentin interface during and after bonding. *J Dent Res* 2004; 83(11):843-848.
- Hashimoto M., Ohno H., Endo K., Kaga M., Sano H., Oguchi H. The effect of hybrid layer thickness on bond strength: demineralised dentin zone of the hybrid layer. *Dent Mater* 2000a;16:406-411.
- Hashimoto M., Ohno H., Kaga M., Endo K., Sano H., Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in human over 1 to 3 years. *J Dent Res* 2000b; 79:1385-1391.
- Hashimoto M., Ohno H., Kaga M., Endo K., Sano H., Oguchi H. Resin-tooth adhesive interfaces after long-term function. *Am J Dent* 2001;14:211-225.
- Hashimoto M., Ohno H., Sano H., Tay FR., Kaga M., Kudou Y., Oguchi H., Araki Y., Kubota m. Micromorphological changes in resin-dentin bonds after 1 year of water storage. *J Biomed Mater Res* 2002; 63:306-311.
- Hebling J., Pashley DH., Tjaderhane L., Tay FR. Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005;84:741-746.
- Hiraishi N., Nishiyama N., Ikemura K., Yau JY., King NM., Tagami J. y col. Water concentration in self-etching primers affects their aggressiveness and bonding efficacy to dentin. *J Dent Res* 2005;84:653-658.

- Hirayama A. Experimental analytical electron microscopic studies on the quantitative analysis of elemental concentrations in biological thin specimens and its application to dental science. *Shikwa Gakuho* 1990;90(8):1019-1036.
- Hirayama A., Yamada M., Miake K. An electrón microscopic study on dentinal tubules of human deciduous teeth. *Shikwa Gahuko* 1986;86:1021-1031.
- Ho SP, Goodis H, Balooch M., Nonamura G., Marshall SJ., Marshall G. The effect of sample preparation technique on determination of structure and nanomechanical properties of human cementum hard tissue. *Biomater* 2004;25:4847-4857.
- Hosoya Y. Hardness and elasticity of bonded carious and sound primary tooth dentin. *J Dent* 2006a;34(2):164-171.
- Hosoya Y., Kawada E., Ushigome T., Oda Y., García-Godoy F. Microtensile bond strength of sound and caries-affected primary tooth dentin measured with original designed jig. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006b ;77(2):241-248.
- Hosoya Y., Kawashita Y., Marshall GW., Goto G. Influence of carisolv for resin adhesion to sound human primary dentin and young permanent dentin. *J Dent* 2001;29:163-171.
- Hosoya Y., Marshall Jr. GW. The nano-hardness and elastic modulus of carious and sound primary canine dentin. *Oper Dent.* 2004;29:142-149.
- Hosoya Y., Marshall SJ., Watanabe L.G., y col. Microhardness of carious deciduous dentin. *Oper Dent* 2000;25:81-89.
- Hosoya Y., Tay FR. Hardness, elasticity, and ultrastructure of bonded sound and caries-affected primary tooth dentin. *J Biomed Mat Res B Appl Biomater* 2006.
- Inoue S., Koshiro K., Yoshida Y., De Munck J., Nagakane K., Suzuki K., Sano H., Van Meerbeek B. Hydrolytic stability of self-etch adhesives bonded to dentin. *J Dent Res* 2005;84(12):1160-1164.
- Inoue S., Van Meerbeek B., Vargas M., Yoshida Y., Lambrechts P., Vanherle G. Adhesión mechanism of self-etching adhesives. In: Tagami J., Toledano M., Prati C. (eds) *Proceedings of 3<sup>rd</sup> International Kurakay Symposium on Advanced Adhesive Dentistry*, 2000. Grafiche Erredue, Como.
- Inoue S., Vargas MA., Abe Y., Yoshida Y., Lambrechts P., VanherleG., Sano H., Van Meerbeek B. Microtensile bond strength of eleven contemporary adhesives to dentin. *J Adhes Dent* 2001;3:237-245.
- Ito S., Hashimoto M., Wadgaonkar B., Svizero N., Carvalho RM., Yiu C y col. Effects on resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomater* 2005;26:6449-6459.

- Johnsen D.C. Comparison of primary and permanent teeth. In: Avery JK ed. Oral development and histology. BC Decker Philadelphia 1987: 180-190.
- Jones S.J., Boyde a. Ultrastructure of dentin and dentinogenesis. In: Dentin and dentinogenesis. Linde J. editor. Boca Ratón CRC Press 1984, pp 81-134.
- Jumlongras D., White G.E. Bond strengths of composite resin and compomers in primary and permanent teeth. *J. Clin. Pediatr. Dent.* 1997; 21:223-229.
- Kaaden C., Schmalz G., Powers J.M. Morphological characterization of the resin-dentin interface in primary teeth. *Clin Oral Invest*, 2003; 7: 235-240.
- Kaga M., Hashimoto M., Oguchi H. Bond strength of dentinal adhesives in primary molars and premolars. *J Dent Res* 1997; 76: 188 abstr.1393.
- Kanca J. Resin bonding to wet substrate I. Bonding to dentin. *Quintessence Int* 1992; 23:39-41.
- Kato G, Nakabayashi N. The durability of adhesion to phosphoric acid etched, wet dentin substrates. *Dent Mater* 1998; 14: 347-352.
- Kinney JH., Balooch M., Haupt DL., Marshall SJ. Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. *J Dent Res* 1995;74:1179-1184.
- Kinney J.H., Balooch M., Marshall S.J., Marshall G.W. Jr., Weihs T.P. Hardness and Young's modulus of human peritubular and intertubular dentine. *Arch Oral Biol* 1996; 41: 9-13.
- Kinney J.H., Marshall S.J., Marshall G.W. The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003a; 14(1): 13-29.
- Kinney J.H., Pople J.A., Marshall G.W., Marshall S.J. Collagen orientation and crystallite size in human dentin: a small angle x-ray scattering study. *Calcif Tissue Int* 2001; 69:31-37.
- Kinney JH., Baboch M., Marshall GW., Marshall SJ. Atomic force microscope study of dimensional changes in dentine during drying. *Arch Oral Biol* 1993;38:1003-1007.
- Kinney JH., Habelitz S., Marshall SJ., Marshall GW. The importance of intrafibrillar mineralization of collagen on the mechanical properties of dentin. *J Dent Res* 2003b;82:957-961.

- Knoop F., Peters CG., Emerson W.G. A sensitive pyramidal-diamond tool for indentation measurements. *J Res Nat Bur Stand* 1939; 23: 39-61.
- Koshiro K., Inoue S., Sano H., De Munck J., Van Meerbeek B. In vivo degradation of resin-dentin bonds produced by a self-etch and an etch-and-rinse adhesive. *Eur J Oral Sci* 2005;113:341-348.
- Koutsi V., Nooman R.G., Horner J.A., Simpson M.D., Matthews W.G., Pashley D.H. The effect of dentin depth on the permeability and ultrastructure of primary molars. *Pediatr Dent* 1994; 16: 29- 35.
- Lasheras Esteban JM. *Materiales Industriales*. Zaragoza: Cedel;1981.p 901.
- Li H., Burrow MF., Tyas MJ. The effect of load cycling on the nanoleakage of dentin bonding systems. *Dent Mater* 2002;18:111-119.
- Mahoney E., Holt A., Swain M., Kilpatrick N. The hardness and modulus of elasticity of primary molar teeth: an ultra-micro-indentation study. *J Dent* 2000;28(8):589-594.
- Maki K., Nishioka T., Morimoto A., Naito M., Kimura M. A study on the measurement of occlusal force and masticatory efficiency in school age Japanese children. *International Journal of Paediatric Dentistry* 2001; 11: 281.
- Marshall GW. Dentin: Microstructure and characterization. *Quintessence Int* 1993a; 24:606-617.
- Marshall GW., Habelitz S., Gallagher R, Balooch M., Balooch G., Marshall SJ. Nanomechanical properties of hydrated carious human dentin. *J dent Res* 2001; 80(8): 1768-1771.
- Marshall GW., Baboch M., Tench R., Kinney JH., Marshall SW. Atomic force microscopy of acid effects on dentin. *Dent Mater* 1993b;9:265-268.
- Marshall GW., Balooch M., Kinney JH., Marshall SJ. Atomic force microscopy of conditioning agents on dentin. *J Biomed Mat Res* 1995;29:1381-1387.
- Marshall Jr GW, Marshall SJ, Kinney JH, , Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent* 1997; 25: 441-458.
- McInnes PM., Wendt SL., Retief DH., Weinberg R. Effect of dentin surface roughness on shear bond strength. *Dent Mater* 1990;6:204-207.
- Meredith N., Sherriff M., Setchell DJ., Swanson SA. Measurement of the microhardness and Young's modulus of human enamel and dentine using an indentation technique. *Arch Oral Biol* 1996;41(6):539-545.

- Miyakazi M, Tsubota K, Onose H, Hinoura K. Influence of adhesive application duration on dentin bond strength of single application bonding systems. *Oper Dent* 2002; 27: 278-283.
- Miyazaki M., Onose H., Moore BK. Effect of operator variability on dentin bond strength of two step bonding systems. *Am J Dent* 2000;13:101-104.
- Mozner N., Salz U., Zimmermann J. Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: a systematic review. *Dent Mater* 2005;21:895-910.
- Nakabayashi N., Ashizawa M., Nakamura M. Identification of a resin-dentin hybrid layer in vital human dentin created in vivo: durable bonding to vital dentin. *Quintessence Int* 1992; 23:135-141.
- Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res* 1982; 16: 265-273.
- Nakabayashi N, Pashley DH. Hybridization of dental hard tissues. Ed Quintessence, Tokyo, 1998.
- Nakabayashi N, Saimi Y. Bonding to intact dentin. *J Dent Res* 1996; 75: 1706-1715.
- Nakabayashi N, Watanabe A, Arao T. A tensile test to facilitate identification of defects in dentine bonded specimens. *J Dent* 1998; 26: 379-385.
- Nalla R.K., Imbeni V., Kinney J.H., Staninec M., Marsall S.J., Ritchie R.O. On the in vitro fatigue behavior of human dentin with implications for life prediction. *J. Biomed Mater Res* 2002.
- Nikaido T., Kunzelmann KH., Chen H., Ogata M., Harada N., Yamaguchi S., Cox CF., Hickel R., Tagami J. Evaluation of thermal cycling and mechanical loading on bond strength of a self-etching primer system to dentin. *Dent Mater* 2002;18:269-275.
- Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, y col. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci* 2006;114:160-166.
- Nör J.E., Feigal R.J., Dennison J.B., Edwards C.A. Dentin bonding: SEM comparison of the dentin surface in primary and permanent teeth. *Pediatr. Dent.* 1997; 19(4): 246-252.
- Nör JE., Feigal RJ., Dennison JB., Edwards CA. Dentin bonding: SEM comparison of the resin-dentin interface in primary and permanent teeth. *J Dent Res* 1996, 75(6):1396-1403.

- Nunes TG., Ceballos L., Osorio R., Toledano M. Spatially-resolved photopolymerization kinetics and oxygen inhibition in dental adhesives. *Biomater* 2005;26:1809-1817.
- Oliveira SS., Pugach MK., Hilton JF., Watanabe LG., Marshall SJ., Marshall GW. The influence of the dentin smear layer on adhesion: a self-etching primer vs a total-etch system. *Dent Mat* 2003;19:758-767.
- Osorio R., Erhardt MC., Pimenta LA., Osorio E., Toledano M. EDTA treatment improves resin-dentin bonds' resistance to degradation. *J Dent Res* 2005a;84(8):736-740.
- Osorio R., Toledano M., de Leonardi G., Tay F. Microleakage and interfacial morphology of self-etching adhesives in class V resin composite restorations. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2003;66:399-409.
- Osorio R., Toledano M., Osorio E., Aguilera FS, Tay FR. Effect of load cycling and in vitro degradation on resin-dentin bonds using a self-etching primer. *J Biomed Mater Res* 2005b; 72: 399-408.
- Oyarzun A., Rathkamp H., Dreyer E. Immunohistochemical and ultrastructural evaluation of the effects of phosphoric acid etching on dentin proteoglycans. *Eur J Oral Sci* 2000;108(6):546-554.
- Pangrisomboon B., Harnirattisai C., Nilsri K., Burrow MF. Microtensile bond strength of self-etching adhesive systems to differently prepared dentin. *Am J Dent* 2007;20(4):259-262.
- Panighi M, G'Sell C. Influence of calcium concentration on the dentin wettability by an adhesive. *J Biomed Mater Res* 1992;26:1081-1089.
- Panighi M., G'Shell C. Effect of the tooth microstructure on the shear bond strength of a dental composite. *J Biomed Mat Res* 1993;27:975-981.
- Pashley DH., Carvalho RM. Dentine permeability and dentine adhesion. *J Dent* 1997; 25: 355-372.
- Pashley DH., Carvalho RM., Sano H., Nakajima M., Yoshiyama M., Shono Y., Fernández CA., Tay F. The microtensile bond test: A review. *J. Adhes Dent* 1999; 1(4):299-309.
- Pashley DH. Dentin: a dynamic substrate- a review. *Scan Microsc* 1989; 3: 161-176.
- Pashley DH., Parham P. The relationship between dentin microhardness and tubule density. *Endod Dent Traumatol* 1985; 1: 176-179.

- Pashley DH, Tay FR. Agressiveness of contemporary self-etching adhesives. Part II: etching effects on unground enamel. *Dent Mater.* 2001; 17:430-444.
- Pashley DH., Tay FR., Yiu C., Hashimoto M., Breschi L., Carvalho RM., y col. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004; 83:216-221.
- Perdigão J., Lambrechts P., Van Meerbeek B., Tomé AR., Vanherle G., Lopes ALB. A morphological Field Emission SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin. *Dent Mater* 1996;12:262-271.
- Perdigão J., Lopes M. Dentin bonding: questions for the new millennium. *J Adhes Dent* 1999;1:191-209.
- Perdigão J., Lopes M. The effect of etching time on dentin demineralization. *Quint Int* 2001;32(1):19-26.
- Pereira LJ., Gaviao MB., Bonjardim LR., Castelo PM., Van der Bilt A. *Eur J Orthod* 2007;29(1):72-78.
- Pidaparti R.M., Chandran A., Tacaño Y., Turner C.H. Bone mineral lies mainly outside collagen fibrils: predictions of a composite model for osteonal bone. *J Biomechan* 1996; 29:909-916.
- Pioch T., Staehle HI., Duschner H., Garcia.Godoy F. Nanoleakage at the composite-dentin interface: a review. *Am J Dent* 2001;14(4):202-208.
- Prati C., Chersoni S., Pashley DH. Effect of removal of surface collagen fibrils on resin-dentin bonding. *Dent Mater* 1999;15:323-333.
- Raadsheer MC, Van Eijden TM., Van Ginkel fc., Prahl-Andersen B. *J Dent Res*1999;78(1):31-42.
- Rentes A.M., Gaviao M.B., Amaral J.R. Bite force determination in children with primary dentition. *Journal Of Oral Rehabilitation* 2002; 29: 1174-1180.
- Rontani RMP., Ducatti CH., García-Godoy F., De Goes MF. Effect of etching agent on dentinal interface in primary teeth. *J Clin Pediatr Dent* 2000;24(3):205-209.
- Rosales JI, Marshall GW, Marshall SJ, Watanabe LG, Toledano M, Cabrerizo MA, Osorio R. Acid-etching and hydration influence on dentin roughness and wettability. *J Dent Res* 1999; 78: 1554-1559.
- Salama F.S., Tao L. Comparison of Gluma Bond strength to primary vs. permanent teeth. *Pediatr. Dent.* 1991; 13: 163- 166.

- Salim DA., Andia-Merlin RY., Arana-Chavez VE. Micromorphological análisis of the interaction between one-bottle adhesive and mineralised primary dentine after superficial deproteinization. *Biomater* 2004;25:4521-4527.
- Sano H., Ciucchi B., Matthews W.G., Pashley D.H. Tensile properties of mineralized and demineralized human and bovine dentin. *J Dent Res* 1994a; 73: 1205-1211.
- Sano H., Shono T., Sonoda H., Takatsu T., Ciucchi B., Carvalho R., Pashley DH. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength – Evaluation of a micro-tensile bond strength. *Dent Mater*, 1994b; 10: 236-240.
- Sano H, Takatsu T, Ciucchi B, Horner JA, Matthews WG, Pashley DH. Nanoleakage: Leakage within the hybrid layer. *Oper Dent* 1995a; 20: 18-25.
- Sano H., Takatsu T., Ciucchi B., Russell C.M., Pashley D.H. Tensile properties of resin-infiltrated demineralized human dentin. *J Dent Res* 1995b; 74: 1093-1102.
- Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Morigami M, Tagami J, Pashley DH. Long term durability of dentin bonds made with a self etching primer, in vivo. *J Dent Res* 1999; 78: 906-911.
- Santiago BM., Ventin DA., Primo LG., Barcelos R. Microhardness of dentine underlying ART restorations in primary molars: an in vivo pilot study. *Brit Dent J* 2005;199(2):103-106.
- Sardella TN., Alves de Castro FL., Sanabe ME., Hebling J. Shortening of primary dentin etching time and its implication on bond strength. *J Dent* 2005;33:355-362.
- Senawongse P., Harnirattisai C., Shimada Y., Tagami J. Effective bond strength of current adhesive systems on deciduous and permanent dentin. *Oper Dent*. 2004;29(2):196-202.
- Spencer P, Swafford JR. Unprotected protein at the dentin-adhesive interface. *Quintessence Int* 1999; 30: 501-507.
- Sumikawa D.A., Marshall G.W., Gee L., Marshall S.J. Microstructure of primary tooth dentin. *Pediatr Dent* 1999; 21: 439-444.
- Sumikawa D.A., Strawn S.E., Watanabe L.G., Marshall G.W., Marshall S.J. Microstructure of dentin in primary teeth. *J Dent Res* 1996; 75: 196 abstr.1432.
- Suzuki T., Finger W.J. Dentin adhesives: site of dentin vs. bonding of composite resins. *Dent. Mater*. 1988; 4: 379-383.

- Tam LE., Pilliar RM. Effects of dentin surface treatment on the fracture toughness and tensile bond strength of a dentin-composite adhesive interface. *J Dent Res* 1994;73:1530-1538.
- Tay FR, Gwinnett AJ, Pang KM, Wei SHY. Resin permeation into acid-conditioned moist, and dry dentin: A paradigm using water-free adhesive primers. *J Dent Res* 1996a; 75: 1034-1044.
- Tay FR, Gwinnett AJ, Pang KM, Wei SHY. Structural evidence of a sealed tissue interface with a total-etch wet-bonding technique in vivo. *J Dent Res* 1994; 73:629-636.
- Tay FR, Gwinnett AJ, Wei SHY. Micromorphological spectrum from overdrying to overwetting acid-conditioned dentin in water-free, acetone-based, single bottle primer/adhesives. *Dent Mater* 1996b; 12: 236-244.
- Tay FR, Pashley DH. Agressiveness of contemporary self-etching systems. Part I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater* 2001; 17(4): 296-308.
- Tay FR., Gwinnett AJ., Pang KM., Wei Shy. Variability in microleakage observed in a total-etch wet-bonding technique under different handling conditions. *J Dent Res* 1995; 74:1168-1178.
- Tay FR., Hashimoto M., Pashley DH., Peters MC., Lai SCN., Yiu CKI., Cheong C. Aging affects two modes of nanoleakage expression in bonded dentin. *J Dent Res* 2003;82(7):537-541.
- Tay FR., King NM., Chan KM., Pashley DH. How can nanoleakage occur in self etching adhesive systems that demineralize and infiltrate simultaneously? *J Adhes Dent* 2002a; 4:255-269.
- Tay FR., Pashley DH., Hiraishi N., Imazato S., Rueggeberg FA., Salz U. y col. Tubular occlusion prevents water-treeing and through-and-through fluid movement in a single-bottle, one step self-adhesive model. *J Dent Res* 2005;84:891-896.
- Tay FR., Pashley DH., Loushine RJ., Weller RN., Monticelli F., Osorio R. Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin. *J Endod* 2006; 32:862-868.
- Tay FR., Pashley DH., Suh BI., Carvalho RM., Itthagarun A. Single-step adhesives are permeable membranes. *J Dent* 2002c;30:371-382.
- Tay FR., Pashley DH., Yoshiyama M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. *J Dent Res* 2002b; 81:472-476.
- Tay FR., Sano H., Carvalho R., Pashley EL., Pasley DH. An ultrastructural study of the influence of acidity of self-etching primers and smear layer thickness on bonding to intact dentin. *J Adhes Dent* 2000;2:83-98.

- Ten Cate JM., Nyvad B., Van de Plassche-Simons YM., Fejerskov O. A quantitative análisis of mineral loss and shrinkage of in vitro demineralised human root surfaces. *J Dent Res* 1991; 70(10): 1371-1374.
- Tesch W., Eidelman N., Roschger P., Goldeberg F., Klaushofer K., Fratz P. Graded microstructure and mechanical properties of human crown dentin. *Calcified Tissue Int* 2001; 69:147-157.
- Toledano M, Osorio R, Perdigão J, Rosales JI, Thompson JY, Cabrerizo Vilchez MA. Effect of acid-etching and collagen removal on dentin wettability and roughness. *J Biomed Mater Res* 1999; 47:198-203.
- Toledano M., Osorio R., Albaladejo A., Aguilera FS., Osorio E. Diferencial effects of in vitro degradation on resin-dentin bonds produced by self-etch vs total etch adhesives. *Journal of Biomedical Materials Research A* 2006a;77A:128-135.
- Toledano M., Osorio R., Albaladejo A., Aguilera FS., Tay F., Ferrari M. Effect of cyclic loading on the microtensile bond strength of total-etch and self-etch adhesives. *Oper Dent* 2006b;31:25-32.
- Toledano M., Osorio R., Ceballos L., Fuentes MV., Fernández CAO., Tay FR., Carvalho RM. Microtensile bond strength of several adhesive systems to different dentin depths. *Am J Dent* 2003;16:292-298.
- Toledano M., Osorio R., de Leonardi G., Rosales-Leal JI., Cevallos L., Cabrerizo Vilchez MA. Influence of self-etching primer on the resin adhesion to enamel and dentin. *Am J Dent* 2001;14:205-210.
- Toledano M., Osorio R., Osorio E., Aguilera F., Yamauti M., Pashley D., Tay F. Durability of resin-dentin bonds : Effects of direct/indirect exposure and storage media. *Dent Mater* 2007a;23:885-892.
- Toledano M., Osorio R., Osorio E., Aguilera FS., Yamauti M., Pashley DH., Tay F. Effect of bacterial collagenase on resin-dentin bonds degradation. *J Mater Sci Mater Med* 2007b;18:2355-2361.
- Toledano M., Osorio R., Osorio E., Prati C., Carvalho RM: Microhardness of acid-treated and resin infiltrated human dentin. *J Dent* 2005;33:349-354.
- Toledano M., Perdigao J., Osorio E., Osorio R. Influence of NaOCl deprotenization on shear bond strength in function of dentin depth. *Am J Dent* 2002;15:252-255.
- Totah VP. Increase in hardness of dentine on drying. *J Dent Res* 1942;21:99-101.
- Tronstad L. Optical and microradiographic appearance of intact and worn human coronal dentine. *Arch Oral Biol* 1972; 17:847-858.

- Uekusa S., Yamaguchi K., Miyazaki M., Tsubota K., Kurokawa H., Hosoya Y. Bonding efficacy of single-step self-etch systems to sound primary and permanent tooth dentin. *Oper Dent* 2006;31(5):569-576.
- Van Meerbeek B, Dhem A, Goret-Nicase M, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Comparative SEM and TEM examination of the ultrastructure of the resin-dentin interdiffusion zone. *J Dent Res* 1993a; 72: 495-501.
- Van Meerbeek B, Perdigão J, Lambrechts P, Vanherle G. The clinical performance of adhesives. *J Dent* 1998;26(1):1-20.
- Van Meerbeek B, Vargas M, Inque S, Yoshida Y, Perdigao J, Lambrechts P, y col. Microscopy investigations. Techniques, results, limitations. *Am J Dent* 2000;13:3D–18D.
- Van Meerbeek B., De Munck J., Yoshida Y., Inoue S., Vargas M., Vigía P., y col. Buonocore memorial lecture. Adhesión to enamel and dentin: current status and future Challenges. *Oper Dent* 2003;28:215-235.
- Van Meerbeek B., Inokoshi S., Braem M., Lambrechts P., Vanherle G. Morphological aspects of the resin-dentin interdiffusion zone with different dentin adhesive systems. *J Dent Res* 1992;71:1530-1540.
- Van Meerbeek B., Peumans M., Verschueren M., Gladys S., Braem M., Lambrechts P., Vanherle G. Clinical status of ten dentin adhesive systems. *J Dent Res*, 1994; 73: 1690-1702.
- Van Meerbeek B., Willems G., Celis J.P., Roos J.R., Braem M., Lambrechts M., y col. Assessment by nano-indentation of the hardness and elasticity of the resin-dentin bonding area. *J Dent Res* 1993b; 72: 1434-1442.
- Van Noort R., Noroozi S., Howard IC., Cardew G. A critique of bond strength measurements. *J Dent* 1989;17:61-67.
- Van Strijp AJP., Jansen DC., DeGroot J., Ten Cate JM., Everts V. Host-derived proteinases and degradation of dentine collagen in situ. *Caries Research* 2003;37:58-65.
- Van Waes HJM and Stöckli PW. *Atlas de Odontología Pediátrica*. Ed Masson, 2002.
- Wang RZ., Weiner S. Strain-structure relations in human teeth using Moire fringes. *Journal of Biomechanics* 1998;31:135-41.
- Wang Y., Spencer P. Hybridization efficiency of the adhesive/dentin interface with wet bonding. *J Dent Res* 2003;82:141-145.

- Watanabe I, Nakabayashi N, Pashley DH. Bonding to ground dentin by a phenyl-P self-etching primer. *J Dent Res* 1994; 73 (6):1212-1220.
- Wright J.T. and Gant D.G. The ultrastructure of the dental tissues in dentinogenesis imperfecta in man. *Arch Oral Biol* 1985; 30:201-206.
- Xu HHK., Smith DT., Jahanmir S., Romberg E., Kelly JR., Thompson VT., Rekow DE. Indentation damage and mechanical properties of human enamel and dentin. *J Dent Res* 1998;77(3):472-480.
- Yamauti M, Hashimoto M, Sano H, Ohno H, Carvalho RM, Kaga M, Tagami J, Oguchi H, Kubota M. Degradation of resin-dentin bonds using NaOCl storage. *Dent Mater*, 2003; 19: 399-405.
- Yiu CKY., Pashley EL., Hirashi N., King NM., Goracci C., Ferrari M y col. Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation. *Biomater*. 2005;26:6863-6872.
- Yoshida E., Hashimoto M., Hori M., Kaga M., Sano H., Oguchi H. Deproteinizing effects on resin-tooth bond structure. *J Biomed Mater Res* 2004a;68B:29-35.
- Yoshida N., Nagakane K., Fukuda R., Nakayama Y., Okazaki M., Shintani H., Inoue S., Tagawa Y., Suzuki K., De Munck J., Van Meerbeek B. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res* 2004b;83:454-458.
- Yoshida Y., Van Meerbeek B., Nakayama Y., Yoshira M., Snauwaert J., Abe Y., Lambrechts P., Vanherle G., Okazaki M. Adhesion to and decalcification of hydroxyapatite by carboxylic acids. *J Dent Res* 2001;80:1565-1569.
- Yoshiyama M, Matsuo T, Ebisu S, Pashley D. Regional bond strength of self-etching/self priming adhesive systems. *J Dent* 1998; 26: 609-616.
- Zheng L, Pereira PNR, Nakajima M, Sano H, Tagami J. Relationship between adhesive thickness and microtensile bond strength. *Oper Dent* 2001; 26: 97-104.