

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**EFFECTOS DEL SULFATO FÉRRICO EN LA DENTINA DE
MOLARES TEMPORALES Y EN LA INTERFASE
ADHESIVA**

TESIS DOCTORAL, GRANADA 2015

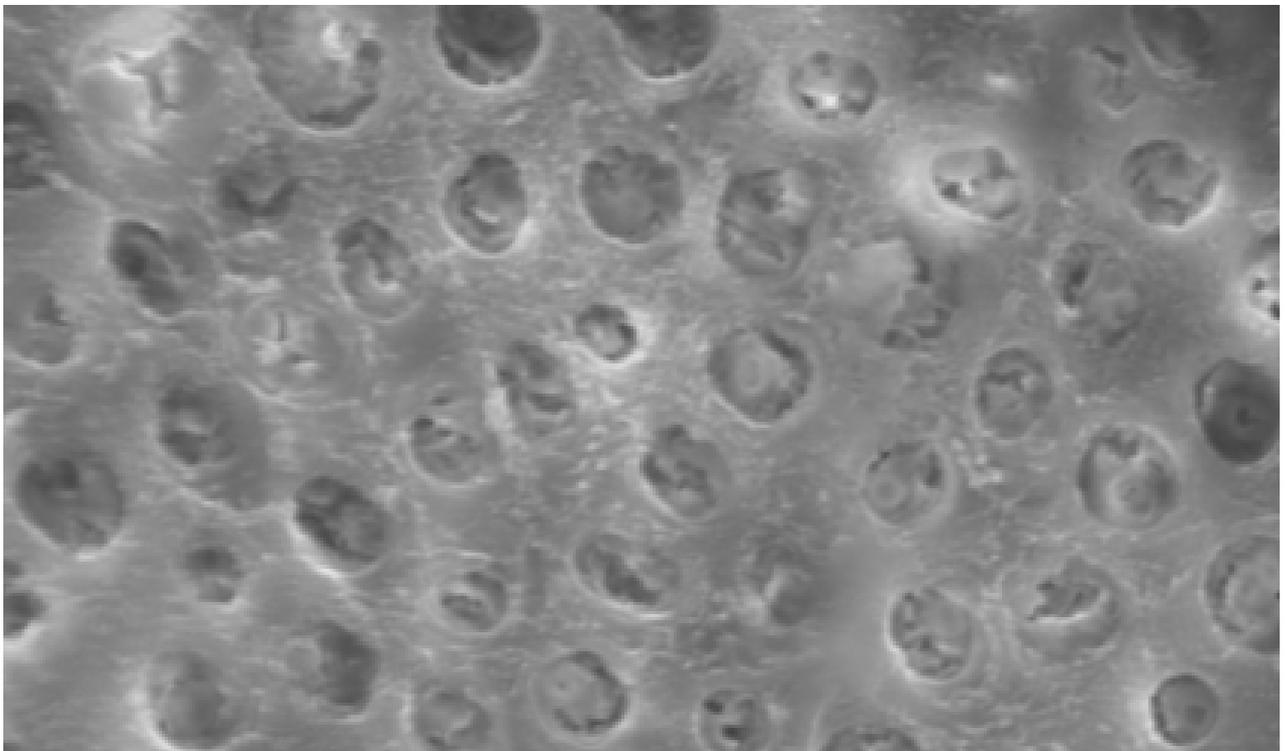
Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

MARIA ESTHER RODRÍGUEZ PRIEGO

DIRECTORES:

Prof^a. D^a María Victoria Bolaños Carmona

Prof. D. Santiago González López



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**EFECTOS DEL SULFATO
FÉRRICO EN LA
DENTINA DE MOLARES
TEMPORALES Y EN LA
INTERFASE ADHESIVA**

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

MARIA ESTHER RODRÍGUEZ PRIEGO

GRANADA, 2015

Editorial: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: María Esther Rodríguez Priego

ISBN: 978-84-9125-339-6

URI: <http://hdl.handle.net/10481/41122>

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



**EFFECTOS DEL SULFATO
FÉRRICO EN LA
DENTINA DE MOLARES
TEMPORALES Y EN LA
INTERFASE ADHESIVA**

Memoria de TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública

PRESENTADA POR
MARIA ESTHER RODRÍGUEZ PRIEGO
PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR

GRANADA, 2015

DIRECTORES:

Prof^a. D^a María Victoria Bolaños Carmona
Prof. D. Santiago González López



MARIA VICTORIA BOLAÑOS CARMONA

PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

SANTIAGO GONZÁLEZ LÓPEZ

PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

CERTIFICAMOS:

Que los trabajos efectuados para la elaboración de la presente Tesis Doctoral, han sido realizados bajo nuestra dirección por D^a María Esther Rodríguez Priego, Licenciada en Odontología, y reúne las condiciones académicas para optar con ella al grado de Doctor en Odontología.

Fdo. Dra. María Victoria Bolaños Carmona

Granada, Septiembre de 2015

Fdo. Dr. Santiago González López



La presente Tesis Doctoral titulada:

“EFECTOS DEL SULFATO FÉRRICO EN LA DENTINA DE MOLARES TEMPORALES Y EN LA INTERFASE ADHESIVA”.

Ha sido realizada por la Licenciada María Esther Rodríguez Priego en el Departamento de Estomatología de la Universidad de Granada, para aspirar con ella al grado de Doctor.

Granada, Septiembre de 2015

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'M. E. Rodríguez Priego'.

Fdo. María Esther Rodríguez Priego



El doctorando María Esther Rodríguez Priego y los directores de la tesis María Victoria Bolaños Carmona y Santiago González López garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, septiembre de 2015

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo./Signed:

APORTACIONES CIENTÍFICAS RELACIONADAS CON ESTA TESIS

PUBLICACIONES

Rodríguez-Priego ME, Bolaños-Carmona MV, González-López S, Rodríguez-Navarro A, Sánchez-Sánchez MP. Ferric sulphate alterations on primary dentin and the adhesive interface. *J Adhes Dent.* 2014 Aug; 16(4): 347-56. DOI: 10.3290/j.jad.a32070.

COMUNICACIONES EN CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

Rodríguez-Priego ME, Bolaños Carmona MV. Efectos del Sulfato Férrico en la Dentina de Molares Temporales. XXX Reunión Anual de la Sociedad Española de Odontopediatría. Valencia, 1 al 3 de mayo de 2008. Publicado en la Revista Odontología Pediátrica, con ISSN: 1133-5181, Vol. 16, N° 1, 2008.

Rodríguez-Priego ME, Bolaños-Carmona MV, González-López S, Rodríguez-Vico C. Effects of ferric sulfate on primary dentin. *Optical Microscopy.* Pan-European-Federation of International Association for Dental Research (PEF-IADR) Conference. Londres, 10 al 12 de septiembre de 2008.

Rodríguez-Priego E, Bolaños-Carmona MV, González-López S, Briones-Luján MT. Effects of chlorhexidine on the dentin of ferric sulphate pulpotomized primary teeth. [abstract END 170]. IV CONSEURO, European Federation of Conservative Dentistry (EFCD) y 17º Congreso de la Sociedad Española de Odontología Conservadora (SEOC). Sevilla, 12 al 14 de mayo de 2009. Publicado en *Clin Oral Invest* 2009; 67:111-112.

PREMIOS DE INVESTIGACIÓN

Primer Premio de la Sesión de Endodoncia de la Competición de Pósters Científicos del CONSEURO 2009 (EUROPEAN FEDERATION OF CONSERVATIVE DENTISTRY), por el trabajo: Rodríguez-Priego E, Bolaños-Carmona MV, González-López S, Briones-Luján MT. Effects of chlorhexidine on the dentin of ferric sulphate pulpotomized primary teeth. Sevilla, 12 al 14 de mayo de 2009.

A mi padre, por enseñarme a caminar.

A mi madre, por levantarme cuando caí.

A mi hermana Nuria, por animarme a seguir el camino.

A mi hermano Víctor, del que aprendí a mirar adelante.

A Darío, por acompañarme en mi senda.

A mi hijo Darío, que me ha enseñado a mirar desde el suelo.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no habría sido posible sin el trabajo de la Dra. María Victoria Bolaños Carmona, su infatigable ahínco, la sabiduría que transmite, su ánimo y su valía como profesional, como científica, como docente y como persona. He de agradecer también al Dr. Santiago González López sus sabios consejos, sus revisiones, su empuje hacia el trabajo, por supuesto su buen humor, el perfeccionismo y las ganas de hacer bien las cosas que siempre destila y su ejemplo como profesor, como dentista y como persona.

A Yudi por tener paciencia conmigo, por enseñarme lo que necesitaba en el laboratorio, por intentar que hiciera bien las cosas y explicarme las técnicas de laboratorio desde el punto de vista práctico, cosas que no se aprenden en los artículos ni en los libros. A los doctorandos que compartieron conmigo el laboratorio de investigación de la Facultad de Odontología, por tener siempre sonrisas, por interesarse por mi trabajo y por mostrarme el suyo para que pudiera aprender. A los compañeros, como Javier Pascual y Rocío Mateos, que me animaron a seguir adelante.

A Marisol y Juan Carlos, de la biblioteca de la Facultad de Odontología de Granada, por su buena disposición, su inestimable ayuda y su carácter afable, porque saben transmitir alegría y ánimos. A Rafael Olivares, por su buena disposición, por estar siempre para ayudar, por preocuparse por mis necesidades como doctorando, por ayudarme cuando andaba perdida entre bases de datos, referencias, revistas y accesos electrónicos, por enseñarme diferencias entre niveles y cómo acceder a la información y seleccionarla. Como él mismo dice, "Estoy encantada de conocerte, Rafael".

A todos los niños que prestaron sus muelas de leche, arrebatándolas de las manos del ratón Pérez para entregarlas a las de esta dentista y ver cómo podíamos saber más acerca de la estructura de éstas y cómo le afectan los materiales usados en el estudio. A sus padres y a los dentistas que contribuyeron a que obtuviéramos las muestras.

A Alejandro Rodríguez Navarro, por permitirnos robarle parte de su tiempo y aprovecharnos de su gran trabajo en cristalografía y uso de técnicas como la difracción de rayos x, y el software diseñado por él mismo, y a Purificación Sánchez Sánchez, por animarme a leer respecto a la espectrofotometría de Infrarrojos, por su disposición para su uso y su trabajo con el espectrofotómetro, para desvelar la estructura de la dentina primaria y cómo le afecta el sulfato usado en pulpotomías y el uso de técnicas adhesivas.

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

DRX: Difracción de Rayos X.

ECHA: Agencia Europea de Químicos.

IARC: Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer.

FT-IR: Espectrofotometría de Infrarrojos.

MO: Microscopía Óptica.

MTA: Agregado Trióxido Mineral.

NCI: Instituto Nacional del Cáncer (de los Institutos Nacionales de la Salud, Estados Unidos).

RAC: Comité de Valoración de Riesgo de la Agencia Europea de Químicos.

SF: Sulfato férrico.

VP-SEM/EDS: Microscopía electrónica de barrido de Presión Variable y microanálisis elemental por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Pulpotomía.....	3
1.2. Sulfato férrico.....	8
1.2.1. Uso en Odontología.....	8
1.2.2. Mecanismo de acción.....	10
1.3. Restauración de molares pulpotomizados	11
1.4. Efectos del SF en la dentina	12
1.5. Efectos del SF en la adhesión.....	13
HIPÓTESIS DE TRABAJO	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.1. Pruebas preliminares.....	17
2.1.1. Determinación del pH	17
2.1.2. Análisis elemental/Calorimetría.....	18

2.2. Efectos del SF en la dentina de molares temporales	20
2.2.1. Microscopía óptica (MO)	20
2.2.2. VP-SEM/EDS	25
2.2.3. FT-IR	26
2.2.4. DRX	29
2.3. Efectos del SF en la interfase adhesiva	29
2.3.1. Microscopía óptica (MO)	29
2.3.2. VP-SEM/EDS	30
2.3.3. Microtensión por compresión (μ TBS)	30
Análisis estadístico	35
3. RESULTADOS	37
3.1. Pruebas preliminares	39
3.1.1. Determinación del pH	39
3.1.2. Análisis elemental/Calorimetría	40
3.2. Efectos del SF en la dentina de molares temporales	40
3.2.1. Microscopía óptica (MO)	40
3.2.1.1. Tinción tricrómica de Masson	40

3.2.1.2. Tinción de Perls.....	41
3.2.2. VP-SEM/EDS.....	42
3.2.3. FT-IR.....	48
3.2.4. DRX.....	54
3.3. Efectos del SF en la interfase adhesiva.....	57
3.3.1. Microscopía óptica (MO).....	57
3.3.1.1. Tinción tricrómica de Masson.....	57
3.3.1.2. Tinción de Perls.....	59
3.3.2. VP-SEM/EDS.....	61
3.3.3. Microtensión por compresión (μ TBS).....	64
4. DISCUSIÓN.....	67
5. CONCLUSIONES.....	81
RELEVANCIA CLÍNICA.....	83
6. BIBLIOGRAFÍA.....	85
7. ANEXOS.....	103

ANEXO I: INFORME FAVORABLE DE APROBACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN POR EL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA.....	105
--	-----

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Pulpotomía

La pulpotomía consiste en la remoción de la pulpa coronal, incluyendo una zona expuesta afectada, y el mantenimiento de la pulpa radicular remanente^{1, 2}. Es el procedimiento terapéutico indicado en dientes temporales cuando se producen exposiciones pulpares mecánicas por traumatismos o durante la remoción de caries extensas, si no existe evidencia de patología radicular^{3, 4}. Pueden utilizarse medios físicos (electrocoagulación, láser) o agentes químicos en la cámara pulpar para el mantenimiento asintomático de la pulpa radicular³.

Se consideraba que el agente utilizado tras la extirpación de la pulpa coronal, debía cumplir una serie de requisitos (Fuks, 2002)⁵:

- Ser bactericida.
- No dañar la pulpa y los tejidos circundantes.
- Fomentar la cicatrización de la pulpa radicular.
- No interferir en el proceso fisiológico de resorción radicular.

En la actualidad (Revisión Cochrane, 2014)⁶, se comparan los estudios sobre los efectos de las técnicas y materiales para el tratamiento de la pulpa coronal en molares temporales en función de sus:

* Resultados primarios: fallo clínico y radiológico a los 6, 12 y 24 meses; y

* Resultados secundarios, siguiendo la clasificación de Smail-Faugeron de 2013⁷:

- Fallo total,
- Resultados/Fallos clínicos secundarios: dolor, patología de tejidos blandos, movilidad patológica, movilidad del tejido adyacente, restauración defectuosa (clínicamente), caries secundaria en el margen (clínicamente), formación de bolsa periodontal, ansiedad/fobia dental, pérdida prematura del diente, signos de exfoliación, mal olor;
- Resultados radiológicos secundarios: radiolucidez patológica, reabsorción radicular patológica, obliteración del canal pulpar, formación de puente de dentina, reabsorción radicular fisiológica, restauración defectuosa (radiográficamente), caries secundaria (radiográficamente), anomalía del material de relleno.

De los estudios disponibles sobre tratamientos pulpares en molares temporales en la bases de datos MEDLINE, Cochrane Oral Health Group's Trial register, Cochrane Central Register of Controlled Trials (CENTRAL), EMBASE, Web of Science, OpenGrey; y US National Institutes of Health Trials Register and WHO International Clinical Trial Registry Platform; la revisión Cochrane de 2014⁶ seleccionó 47 estudios para su análisis: 19 metaanálisis y 27 artículos de comparaciones simples (no metaanálisis). Del total, 33 ensayos (70%) comparaban pulpotomías con distintos materiales (25 comparaciones), resultando de interés:

- 14 estudios que comparan MTA con formocresol, obteniendo el primero menores fallos clínicos y radiográficos y mejores resultados secundarios, pero sin significación estadística excepto en el caso de la reabsorción radicular patológica a los 24 meses y formación de puente de dentina a los 6 meses.
- 2 estudios que comparan MTA con hidróxido de calcio, siendo el primero el que produce mejores resultados en todos los parámetros, pero con diferencias estadísticamente

significativas sólo en el caso del fallo radiológico a los 12 meses.

- 3 estudios que comparan MTA con sulfato férrico, dando el primero menos fallos radiográficos, clínicos y totales, diferencias con significación estadística sólo a los 24 meses.

- 7 estudios que comparan formocresol con hidróxido de calcio, existiendo diferencias estadísticamente significativas en los resultados primarios clínicos a los 6 y 12 meses; y radiográficos a los 6, 12 y 24 meses.

- 7 estudios que comparan formocresol con sulfato férrico sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

Para el resto de comparaciones entre medicamentos usados en pulpotomías, el bajo número de estudios y la inconsistencia de los resultados imposibilita cualquier interpretación. Los autores de la revisión Cochrane sobre tratamiento pulpar en dentición temporal (2014)⁶ concluyen que: no existe evidencia para identificar un material y técnica superiores para pulpotomía: MTA y sulfato férrico son los materiales de elección. El coste del MTA puede impedir su uso, en cuyo caso puede recurrirse al del sulfato férrico. Es necesario realizar un balance entre el coste y efectividad de ambos materiales.

El formocresol constituye el material de referencia o "Gold Standard" (Dumus y Tanboga, 2014)⁸ por la amplia difusión de su uso y por su éxito clínico y radiográfico. Se utiliza para comparar otros materiales y medios (Deery, 2005; Loh et al., 2004; Peng et al., 2006; Peng et al., 2007; Rao et al., 2009)⁹⁻¹³. Contiene formaldehído en su composición, que fue reclasificado de probable (Grupo 2A) a conocido carcinógeno humano (Grupo 1) en 2004 por la Agencia Internacional para la investigación en Cáncer (IARC); siendo en 2012 catalogado como potencialmente carcinógeno en humanos (Carc. 1B) en lugar de como conocido carcinógeno humano (Carc. 1A) por el Comité de Valoración del Riesgo

(RAC) de la Agencia Europea de Químicos (ECHA). El desacuerdo entre las agencias reguladoras americana y europea se debe a la interpretación y difusión de un estudio de cohortes del Instituto Nacional de Cáncer (NCI) de Estados Unidos, que en 1994 que relacionaba la exposición a formaldehído con la mortalidad por cáncer nasofaríngeo, pero cuyos resultados de seguimiento en 2004 no fueron concluyentes (Marsh et al., 2014)¹⁴.

International Agency for Research on Cancer



World Health
Organization

		Animals				
		Sufficient	Limited	Inadequate	Suggesting lack	
		1 = established	2A = probably	2B = possibly	3 = unclassifiable	4 = probably not
Humans	Sufficient	1	1	1	1	
	Limited	2A (1)	2B (2A)	2B (2A)	2B (2A)	
	Inadequate	2B (1, 2A, 3)	3 (2B)	3	3 (4)	
	Suggesting lack	3 (1)	3	3	4	

Figura 1. Clasificación de la carcinogenicidad de las sustancias químicas según la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer de la OMS.



EU classification of CMR substances	
Category	Criteria
Cat. 1 A	known to have CMR potential for humans, based largely on human evidence
Cat. 1 B	presumed to have CMR potential for humans, based largely on experimental animal data
Cat. 2	suspected to have CMR potential for humans:
effects on or via lactation	evidence of adverse effects in the offspring due to transfer in the milk and/or on the quality of the milk and/or the substance is present in potentially toxic levels in breast milk
EU classification of CMR mixtures based on hazards of components (if not specified otherwise)	
Category	Criteria
Cat. 1 A or B	-carcinogen/mutagen (CM): contains ≥ 0.1% carcinogen or mutagen cat. 1 (A or B); -reprotoxic (R): contains ≥ 0.3% reprotoxic cat 1 (A or B)
Cat. 2	-CM: contains ≥ 1% carcinogen or mutagen cat. 2; -R: contains ≥ 0.3% reprotoxic cat. 2
effects on or via lactation	R: contains ≥ 0.3% reprotoxic with effects on or via lactation
IARC classification of carcinogenic substances	
Group	Criteria
1	carcinogenic to humans
2A	probably carcinogenic to humans
2B	possibly carcinogenic to humans
3	not classifiable as to its carcinogenicity to humans
4	probably not carcinogenic to humans

Figura 2. Clasificación de la carcinogenicidad de las sustancias químicas según la Agencia Europea de Químicos.

El sulfato férrico (SF) y el Agregado Trióxido Mineral (MTA) suponen alternativas clínicas viables no invasivas al uso del formocresol (Lewis, 2009)¹⁵, siendo los únicos medicamentos que han dado buenos resultados clínicos a corto y largo plazo (Cochrane: Smail-Faugeron et al, 2014)⁶. El MTA obtiene un éxito clínico y radiológico similar e incluso superior (Shirvani y Asgary, 2014)¹⁶ al formocresol y al sulfato férrico. Pero, si se tiene en cuenta el coste de una pulpotomía para el paciente en nuestro medio, su precio continúa siendo elevado (Zealand et al., 2010)¹⁷.

1.2. Sulfato férrico

1.2.1. Uso en Odontología

El sulfato férrico es un compuesto químico inorgánico, de fórmula $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, con un pH inferior a dos. Se presenta como sal cristalina amarilla rómbica soluble en agua, o como líquido de color marrón rojizo; y se obtiene a partir de mineral de hierro, ácido sulfúrico “virgen”, oxígeno líquido y agua. Se produce por la reacción del ácido sulfúrico caliente con una solución de sulfato ferroso, utilizando un agente oxidante como ácido nítrico o peróxido de hidrógeno (Encyclopædia Britannica, 2014)¹⁸.

En el ámbito médico se viene utilizando desde hace más de un siglo como astringente y hemostático (Lemon, Steele y Jeansonne, 1993)¹⁹. Dentro de la odontología se utiliza en prostodoncia durante tallados; y en obturaciones cervicales o interproximales para lograr retracción gingival sólo o impregnado en hilos de retracción (Fischer, 1987; Bailey y Fischer, 1995)^{20,21} así como en cirugía periapical para controlar la hemorragia ósea (Gallini, Merlini y Fischer, 1986; Rubinstein y Kim, 1999; Jensen et al., 2010)²²⁻²⁴ y por último, es usado en pulpotomías (Fei et al., 1991; AAPD, 2014)^{3, 25} para lograr hemostasia tras la eliminación de la pulpa cameral.

Las pulpotomías con sulfato férrico presentan un éxito clínico y radiográfico, y erupción del premolar sucesor similares y en algunos casos superiores al formocresol (Fuks y Papagiannoulis, 2006; Markovic, Zivojinovic y Vucetic, 2005; Nadin et al., 2003; Casas et al., 2005)²⁶⁻²⁹ y tiene un coste bajo (Fuks, 2008)⁴. Tras más de dos décadas de aplicación de esta técnica (Fei, Udin y Johnson, 1991)²⁵, una

revisión sistemática de la evidencia científica disponible (Loh et al., 2004)¹⁰ y metaanálisis (Peng et al., 2007)¹², demuestran niveles de éxito clínico y radiográfico promedios del 91'6% y 73'5%, respectivamente, en seguimientos de al menos 1 año, similares o superiores a los obtenidos con formocresol.

No existen pautas de aplicación claras y consensuadas para la aplicación de sulfato férrico en pulpotomías: se han utilizado distintas concentraciones (15%, 20% y 22%, principalmente), distintos tiempos de aplicación que varían desde los 15 (Casas et al, 2003; Huth et al., 2005; Ibricevic y Al-Jame, 2003)³⁰⁻³² a los 5 minutos (Land, 1996; Ayo-Yusuf, Driessen y Botha, 2005)^{33, 34} o hasta el control de la hemorragia (Salako et al., 2003)³⁵; distintas pautas de lavado posterior con agua sola, spray de agua o secado con torunda de algodón. Existe un protocolo establecido para el Sistema Nacional de Salud inglés (NHS) que recomienda el sulfato férrico como material a usar en pulpotomías mediante aplicaciones de 15 segundos de sulfato férrico hasta un máximo de 2 aplicaciones. Si no se consigue hemostasia, aconsejan remover mayor cantidad de tejido pulpar y volver a aplicar otros 15 segundos hasta hemostasia. Si no se consiguiera con estas 3 aplicaciones, se procederá a realizar una pulpectomía o extracción de la pieza temporal (Patchett, Srinivasan y Waterhouse, 2006)³⁶.

En España, la presentación más extendida es Viscostat®, de la casa Ultradent. Viscostat® es una solución de sulfato férrico al 20%, con un pH de 1, de consistencia viscosa y color marrón. Cuenta con el sello de la FDA. Los fabricantes recomiendan la aplicación de éste en pulpotomías. Esta presentación en forma de gel parece ser más difícil de eliminar de la dentina que la solución acuosa (O'Keefe et al., 2005; Ultradent; Tarighi y Koroushi, 2014)³⁷⁻³⁹.

1.2.2. Mecanismo de acción

La utilización de sulfato férrico en pulpotomías en dientes temporales se basa en sus cualidades como procoagulante de las proteínas sanguíneas mediante la reacción con los iones férrico y sulfato; y hemostático por su pH ácido (Ibricevik, al-Jame, 2000; Srinivasan, Patchett y Waterhouse, 2006)^{36, 40}. Se forman tapones que ocluyen los capilares (Lemon, Steele, Jeansonne, 1993)¹⁹, lo cual previene y reduce la formación de coágulos, con una respuesta inflamatoria reversible de los tejidos blandos (Shaw et al., 1983)⁴¹. De ese modo se previene la reabsorción y se induce la precipitación de una barrera proteica. No hay constancia en la literatura dental o médica sobre efectos tóxicos o dañinos del sulfato férrico (Tarighi y Koroushi, 2014)³⁹.

Es necesario un pH ácido de la solución para mantener la efectividad y estabilidad de los agentes hemostáticos (Bailey y Fischer, 1995)²¹. Diversos autores consideran que el bajo pH de la solución puede interferir en la adhesión a la dentina que ha sido tratada con sulfato férrico, dependiendo o no del tiempo de exposición y de la concentración del agente hemostático (Ayo-Yusuf, Driessen y Botha, 2005; Kuphasuk et al., 2007; Land, 1994 y 1996; McNally, Kimmes, Barkmeier, 2008)^{32, 34, 42-44}. Tras su aplicación mediante frotado hasta la coagulación, se recomienda el lavado de la superficie con spray de agua durante 15 segundos para eliminar los posibles residuos, secando con spray de aire las superficies otros 15 segundos tras el lavado y/o la aplicación de enjuagues que contengan surfactantes como el digluconato de clorhexidina (Ultradent; Tarighi y Koroushi, 2014)^{38, 39}.

1.3. Restauración de molares pulpotomizados

El sulfato férrico es considerado un agente bactericida sin toxicidad sistémica que produce una curación evidente por formación de tejido fibroso. Como ocurre con el formocresol, no induce la formación de nueva dentina. El diente temporal se mantiene asintomático hasta su normal exfoliación. Pero para que se produzca dicha curación es fundamental que en la restauración posterior exista un buen sellado cavitario. En los procedimientos de pulpotomía, tiene una importancia fundamental el sellado marginal final⁴⁵ y la ausencia de microfiltración bacteriana (AAPD, 2014)³, siendo fundamentales para la supervivencia del tejido pulpar y la ausencia de radiolucidez periapical (Hafez et al., 2000; Zulfikaroglu, Atac y Cehreli, 2008)^{46, 47}.

La contaminación de las superficies adhesivas conduce a la microfiltración. El efecto de la microfiltración se ve como una discoloración, progresando desde los márgenes de las restauraciones estéticas. El concepto de adhesión a dentina “húmeda” lleva a algunos clínicos a asumir erróneamente que el absoluto control de los fluidos orales en las restauraciones adhesivas no es necesario. La adhesión “húmeda” a dentina quiere decir a dentina húmeda (con agua), limpia. La presencia de alguna humedad, limpia o de otro tipo (Borges et al., 2007)⁴⁸, como podría ser el caso de contaminada por restos del sulfato férrico aplicado en pulpotomías, entre la dentina imprimada y/o sellada con resina (capa híbrida) conducirá a un fallo de la adhesión con resina (Prabhakar y Bedi, 2008; Saunders y Saunders, 1994)^{49, 50}.

Actualmente, la mejora en las fuerzas adhesivas, resistencia y la estética de los materiales de resina compuesta han permitido un cambio en la selección de los materiales dentales para restaurar dientes primarios con lesiones cariosas extensas y poco tejido dentario de soporte (Baghdadi, 2003; Nakornchai, 2005)^{51, 52}.

Está justificado e indicado el uso de restauraciones de composite en molares temporales a los que se les ha practicado una pulpotomía y, por tanto, son una alternativa con calidad clínica para restaurar la anatomía y función de dichos molares temporales (Caceda, 2007)⁵³, aumentando la resistencia a la fractura de dichos dientes (El-Kalla y García-Godoy, 1999)⁵⁴ y suponiendo una solución estética superior al vidrio ionómero y compómeros (Pinto et al., 2014)⁵⁵.

La revisión sistemática en base a los criterios de Cochrane (Yengopal, 2009)⁵⁶ de los materiales usados para la restauración de dientes temporales no encontró diferencias significativas entre las distintas soluciones restauradoras, pero sólo 3 estudios clínicos aleatorizados cumplieron los requisitos exigidos para ser incluidos en la revisión. Las resinas compuestas muestran una supervivencia mayor que los cementos de ionómero de vidrio debido a sus mejores propiedades mecánicas en cuanto a resistencia al desgaste, mayor microdureza y superficie más lisa, lo cual determina un mejor comportamiento de las restauraciones de composite cuando se someten a estrés oclusal (mecánico) y químico. No obstante, el tamaño, extensión y tipo de preparación, así como el medio y determinadas características individuales como el riesgo de caries o factores socioeconómicos influyen asimismo en la longevidad de las restauraciones (Dos Santos et al., 2014)⁵⁷.

1.4. Efectos del SF en la dentina

La mayoría de los hemostáticos que se utilizan son ácidos, con valores de pH que van de 0,8 a 3 (Land, 1994; Tarighi, 2014)^{39, 43}. Este bajo pH es necesario para mantener la efectividad y estabilidad de los astringentes como el SF (Bailey y Fischer, 1995)²¹, pero puede producir efectos en la dentina en contacto.

Se ha observado en la dentina permanente expuesta a SF una remoción de la capa de barrillo dentinario (Woody, Miller y Staffanou, 1993; Kuphasuk, 2007; O'Keefe, 2005)^{37, 42, 58}, que va de parcial a completa, permaneciendo los túbulos dentinarios ocluidos (30 segundos), parcialmente ocluidos (2 minutos) o abiertos (5 minutos), según aumente el tiempo de contacto de la solución con los tejidos dentarios (Land, 1996)³³, pudiendo producirse con tiempos superiores a 5 minutos un grabado significativo de la dentina adyacente.

No obstante, los efectos de grabado se creen limitados (Ayo-Yusuf, Driessen y Botha, 2006)³⁴, debido según los fabricantes de Viscostat® a los agentes de recubrimiento que minimizan el efecto ácido y lo hacen menos agresivo que otros agentes hemostáticos (Bailey y Fischer, 1995)²¹.

1.5. Efectos del SF en la adhesión

Aunque no existe evidencia física directa de la responsabilidad del sulfato férrico (Astrigedent®) en ciertos casos clínicos de despegamiento de las restauraciones adhesivas, autores como Bertolotti⁵⁹ han sugerido esta hipótesis. En dentina permanente, la adhesión con sistemas de grabado total parece no verse afectada por el SF u otros astringentes (Kimmes et al., 2006; Kuphasuk et al., 2007)^{42, 60}. Cuando se utilizan adhesivos autograbadores, se encontró una reducción significativa en las fuerzas de adhesión cuando el sulfato férrico no era grabado antes de la aplicación del sistema adhesivo (O'Keefe, 2005)³⁷.

En la dentina temporal, los valores de las fuerzas adhesivas disminuyeron drásticamente tras la inmersión de las muestras en SF 48 horas tanto si se utilizan adhesivos de grabado total (Salama, 2005)⁶¹, como con el uso de autograbadores (Prabhakar y Bedi, 2008)⁴⁹.

Dado que continúan existiendo preocupaciones sobre los efectos de los hemostáticos en la adhesión (McNally, IADR, 2008; Fathpour, 2013; Tarighi, 2014)^{39, 44, 61}, se recomienda eliminar los posibles residuos mediante spray de aire-agua durante al menos 10 segundos si se ha usado un sistema de grabado total (Fischer, 1998; Fischer, 2003; McNally, 2008)^{44, 63, 64} o el uso de una solución que contenga surfactante tal como la clorhexidina al 2% si se utilizan sistemas autograbadores (Consepsis Scrub, Ultradent; Tarighi, 2014)^{38, 39}.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Por ello, nos planteamos la hipótesis de que la contaminación con Viscostat® aplicado a tiempos clínicos, podría inducir una desmineralización de la dentina primaria. Por otro lado, debido a su persistencia, residuos del producto podrían contaminar la dentina primaria, a pesar de la eliminación del mismo mediante lavado y/o aplicación de Clorhexidina. La contaminación de la dentina primaria por Viscostat® podría relacionarse con cambios fisicoquímicos en la superficie destinaría con una posible disminución de la fuerza de adhesión de distintos tipos de adhesivos a la dentina primaria, haciendo así peligrar la estabilidad de las restauraciones estéticas.

Las hipótesis nulas serían la ausencia de efectos evidenciables sobre la dentina primaria, la ausencia de alteraciones fisicoquímicas y la ausencia de alteración en las fuerzas adhesivas de los adhesivos convencionales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio experimental, transversal, in vitro se utilizaron 101 molares temporales, extraídos por prescripción ortodóncica o por caries. El criterio de inclusión fue que tuvieran un grosor suficiente de dentina remanente de al menos 1 mm, adecuada para la adhesión. Los pacientes tenían entre 8 y 12 años de edad, se encontraban en el período de dentición mixta tardía. Se obtuvo consentimiento informado de los menores y de sus padres o tutores legales, para que sus dientes fueran utilizados en esta investigación. Todos los molares se conservaron en una solución de timol 0'1% durante menos de un mes, hasta su uso. Esta investigación ha sido aprobada por el Comité Ético de Investigación Humana de la Universidad de Granada con número de registro 355 (Anexo I).

2.1. Pruebas preliminares

2.1.1. Determinación del pH

El pH del sulfato férrico Viscostat® (Ultradent Products; South Jordan, UT, USA) aportado por el fabricante en la ficha de datos de seguridad del producto es de 1. No obstante, se determinó el pH en una pequeña cantidad del producto a utilizar mediante el pH-metro Micro pH 2000 (Crisol, Alella, Spain).

2.1.2. Análisis elemental/Calorimetría

Para el microanálisis elemental por combustión se utilizaron 3 molares temporales extraídos por motivos ortodóncicos o por caries. Se eliminó el esmalte mediante fresa de diamante montada en turbina a alta velocidad, comprobándose bajo lupa a 40 aumentos (Olympus PT estereoscopio, Olympus Optical Co., Ltd., Tokio, Japan) que no quedara remanente de esmalte. Las muestras de dentina obtenidas se fijaron a un soporte mediante el uso de cera de abeja y fueron cortadas en láminas de 1mm de grosor en microtomo (Struers Accutom-50, Hard Tissue Microtome, Struers, Ballerup, Denmark), y posteriormente adelgazadas con discos de carburo de silicio de grano decreciente hasta obtener un grosor aproximado de 10 micras. A los dos especímenes de control no se les aplicó ningún tratamiento. El resto de especímenes fueron sumergidos en una solución de sulfato férrico al 20% Viscostat[®] durante una hora, procediendo a continuación al lavado con jeringa de spray de aire-agua durante 15 segundos y secado de las mismas con jeringa de aire comprimido durante 15 segundos. Todas las muestras se conservaron en estufa de calor a 37°C durante 24 horas y fueron trituradas en mortero de ágata para ser sometidas a análisis elemental por combustión en el Laboratorio de Análisis Elemental del Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada. Mediante este análisis se obtuvo la concentración de nitrógeno, carbono e hidrógeno en dentina temporal sin tratar y en dentina temporal tras la inmersión 1 hora en sulfato férrico al 20%.

Tabla 1. Grupos de estudio, materiales y procedimientos aplicados.

GRUPOS	Tratamientos de la dentina			
	SEM/EDS y MO			SEM/EDS y μ TBS
	Viscostat™ (Ultradent Products, UT, USA)	Clorhexidina al 2% (Hibimax®, AstraZeneca, Madrid, Spain)	Acondicionamiento de la dentina	Adhesivo
SF	30 s, lavado con espray de agua durante 15 s.	No	No	No
Grupo 1	No	No	Ácido ortofosfórico al 37% (Dentaflux, José Ripoll SL, Madrid, Spain)	Excite® (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein)
Grupo 2	30 s, lavado con espray de agua durante 15 s.	No	Aplicado durante 15 s, lavado con agua destilada durante 15 s.	Aplicado, secado suavemente, polimerizado durante 20 s*
Grupo 3	30 s, lavado con espray de agua durante 15 s.	Aplicado con bolita de algodón durante un minuto. Sin lavado.	Secado suave.	Composición: < 11 % acrilato de ácido fosfórico ; < 15 % HEMA < 53 % Dimetacrilatos; < 20 % Alcohol; SiO ₂ , iniciadores, estabilizadores.
Grupo 4	No	No	Autograbador Adper Scotchbond (3M ESPE Dental Products, MN, USA) (primer): Líquido A. Aplicación, extendido durante 10 s, secado durante 10 s.	Autograbador Adper Scotchbond. Adhesivo ácido: Líquido B. Aplicado durante 10 s hasta que desaparece el color rosa (líquido A). Polimerización durante 10 s*.
Grupo 5	30 s, lavado con espray de agua durante 15 s.	No		Composición: UDMA, TEGDMA, TMPTMA (trimetacrilato hidrofóbico) HEMA, fosfatos, MHP (fosfatos de metacrilato). Nanorelleno de zirconia adhesiva. Sistema iniciador basado en canforoquinona.
Grupo 6	30 s, lavado con espray de agua durante 15 s.	Aplicado con bolita de algodón durante un minuto. Sin lavado.	Composición: Agua, HEMA, surfactante, colorante rosa)	

En las pruebas microquímicas (FT-IR and XRD), se aplicó Viscostat® durante una hora. * Lámpara Astralis 10 (700mW/cm²; Ivoclar/Vivadent, Schaan, Liechtenstein).

2.2. Efectos del SF en la dentina de molares temporales

2.2.1. Microscopía óptica (MO)

Con el fin de determinar los efectos del SF en la dentina primaria, se utilizaron 6 molares sanos. Se utilizaron dos molares para evaluar la descalcificación y otros dos para detectar la presencia de iones férricos residuales mediante microscopía óptica. A todos los dientes se les realizó una apertura cameral, utilizando una turbina a alta velocidad (Kavo Dental GMBH & Co., Biberach, Alemania) y una fresa de diamante número 30 con refrigeración por agua (Sonmez et al., 2008)⁶⁵. Cualquier resto de tejido pulpar remanente fue eliminado manualmente. En los especímenes experimentales, se aplicó SF en la cámara pulpar durante 30 segundos. Las muestras fueron lavadas profusamente con agua pulverizada durante 15 segundos. Un molar adicional sirvió para como control para cada técnica de tinción y no se aplicó ningún tratamiento en la dentina.



Imagen 1: Sulfato férrico Viscostat[®] (Ultradent Products; South Jordan, UT, USA).

Todos los especímenes se almacenaron en agua destilada a 37 ° C durante 24 h. Se obtuvieron dos cortes centrales de cada molar de aproximadamente 1 mm de grosor por medio de un microtomo de precisión (Accutom-50, Struers, Ballerup, Denmark). Las muestras se fijaron a un portaobjetos utilizando el adhesivo fotopolimerizable Technovit 7210VLC (Heraus Kulzer GMBH & Co., Werheim, Germany), después se sometieron a desgaste con discos de carburo de silicio (WS-Flex 18-B, Struers, Ballerup, Denmark) de grano decreciente: 800, 1000, 1200, 2500 y 4000 hasta obtener un grosor aproximado de 10 µm, tal como se describen Bolaños et al., 2006⁶⁶.



Imagen 2: Microtomo Struers Accutom-50.



Imágenes 3, 4, 5 y 6: Lámina de dentina tratada de 1mm de grosor. Adhesivo de cianocrilato Technovit 7210VLC, Rodaja de dentina de molar temporal obturada en portaobjetos. Portaobjetos con rodaja de dentina siendo fotopolimerizado. Medición del grosor para su desgaste.



Imágenes 7 y 8: Pulido de las muestras con discos de carburo de silicio (WS-Flex 18-B, Struers, Ballerup, Denmark) de grano decreciente: 800, 1000, 1200, 2500 y 4000 hasta 10 μm de grosor. Microscopio óptico.

La tinción tricrómica de Masson tiene una alta afinidad por los elementos catiónicos del colágeno tipo I mineralizado normalmente, que se tiñe de color verde. El grabado de la dentina con ácido ortofosfórico u otro compuesto ácido elimina estos elementos de las cadenas peptídicas de colágeno, lo que produce una coloración roja (Churukian, 2013)⁶⁷.

La tinción de Perls colorea selectivamente los iones férricos azules. El ferrocianuro de potasio cambia a ferrocianuro férrico o azul de Prusia en presencia de hierro férrico, por la acción del ácido clorhídrico que actúa para desencadenar la reacción (Lille, 1976)⁶⁸.

Todos los especímenes fueron examinados mediante MO (BH-2 Olympus, Tokio, Japan), a 100 aumentos, fotografiados con cámara acoplada al microscopio Olympus C35AD4 (Olympus, Tokio, Japan) y digitalizados con escáner Agfa Twin 1200 (AGFA Gevaert N.V., Mortsel, Belgium) y analizados con el software de imagen Tps Dig (Suny, Stony Brook, NY State University, USA).

En las muestras sometidas a la tinción de Masson se determinó:

- La continuidad de la banda roja: valorándola como +, ++ o +++ cuando se observaba en 1/3, 2/3 o la totalidad del campo óptico, respectivamente.
- La presencia de formaciones cónicas o imágenes en embudo en las entradas pulpares de los túbulos dentinarios: 1/3, 2/3 o 3/3 del campo óptico.
- Apertura de los túbulos dentinarios: +, ++ o +++ cuando se observaba en 1/3, 2/3 o la totalidad del campo óptico, respectivamente.
- Tinción de la dentina peritubular: en términos de Sí/No
- Grosor de la banda desmineralizada. Mediante el software de análisis de imágenes Tps Dig (Suny, Store Brook, NY State University, USA) se dividió en dos el campo óptico y se realizaron 3 medidas de la profundidad de dentina desmineralizada en una zona equidistante de 2 túbulos dentinarios contiguos, tomando como referencia una estructura conocida de 50 μm de longitud.

En las muestras en las que se aplicó la tinción de Perls se evaluó la presencia o ausencia de tinción azul y la entrada de dicha tinción en los túbulos dentinarios.

2.2.2. VP-SEM/EDS

Se procesaron tres molares: uno de control (dentina sin ningún tratamiento) y dos molares tratados con SF. Se eliminaron las raíces, y se obtuvieron superficies planas de dentina secundaria oclusal con fresa de diamante montada en turbina a alta velocidad (Kavo Dental GMBH & Co., Biberach, Alemania). Éstos se pulieron con discos de carburo de silicio (WS-Flex 18-C, Hermes Abrasivos Ltd., Virginia Beach, VA, EE.UU.), de tamaño de grano decreciente (800, 1000, 1200 y 2500). Se aplicó SF como se ha descrito anteriormente. No se colocaron obturaciones. Los especímenes fueron fijados durante 12 horas en una solución de glutaraldehído tamponado al 2'5% a 4°C, lavados en la misma solución durante 1 hora, en 3 recipientes diferentes consecutivamente, y en agua destilada durante 1 minuto. A continuación se deshidrataron en soluciones de etanol a distintas concentraciones durante 20 minutos (24, 50 y 75%), 30 minutos en una solución de etanol al 90% y 1 hora en una solución de etanol al 100%; y se sumergieron 10 minutos en una solución de hexametildisilazano (Perdigao et al., 1995)⁶⁹. Finalmente fueron montados en soportes de aluminio, y se realizó bombardeo iónico recubriéndolos con carbono en una atmósfera de argón (P = 0,1 torr).

Todos los análisis se realizaron en el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada con un microscopio electrónico de barrido de presión variable Zeiss DSM 950 Leo 1430VP (LEO Microscopía Electrónica Ltd, Cambridge, Reino Unido) equipado con un espectrómetro de energía dispersiva (EDS) Inca 350 V.17 (Oxford ISIS, Highway Combe, Inglaterra) que

opera a 20 kV. De cada superficie de la dentina se obtuvieron espectros microanalíticos en áreas seleccionadas de los especímenes: tres de dentina intertubular y el mismo número de dentina peritubular y de las entradas tubulares.

2.2.3. FT-IR

Se obtuvieron finas láminas de dentina coronal de aproximadamente 300 micras de diez molares primarios sanos (Microtomo Accutom 50, Struers, Ballerup, Denmark). La dentina se examinó bajo lupa a 40 aumentos (Olympus PT estereoscopio, Olympus Optical Co., Ltd., Tokio, Japan) y cualquier resto de esmalte fue eliminado con turbina a alta velocidad. Las láminas se obtuvieron puliendo con discos de papel de carburo de silicio manualmente las muestras hasta obtener un grosor de 120 micras aproximadamente (Calibre digital 350-MHN1-25-DM, Mitutoyo, Tokio, Japón). Dos o 3 láminas fueron asignadas aleatoriamente a cada uno de los grupos experimentales (Grupos 2, 3, 5 o 6; Tabla 1). Algunas permanecieron sin tratar y sirvieron para obtener el espectro de la dentina primaria. Además, dos espectros se incluyeron como controles: SF y 2% CHX.

En un estudio exploratorio previo no se detectaron cambios significativos en la estructura microquímica de la dentina tras la aplicación de sulfato férrico a tiempos clínicos. Por ello, en todos los grupos tratados con SF, las muestras se sumergieron en un vaso de precipitados de vidrio que contiene SF durante 1 h.

Las muestras tratadas se lavaron en agua destilada bajo agitación mecánica (ultrasonidos magnético MS3000,

BOECO, Hamburgo, Alemania) durante 1 min, 3 veces. El agua se cambió después de cada período de agitación. En los grupos 2 y 3, se aplicó ácido fosfórico (AF) al 37% en ambas superficies de las láminas de dentina durante 15 s, a continuación, se lavó durante 15 s. Se aplicó un primer de autograbado (grupos 5 y 6) en ambos lados de las láminas de dentina primaria durante 10 s y después se secaron suavemente. En los grupos 3 y 6, se aplicó CHX al 2% por inmersión durante 1 min, después se lavaron durante 15 s como se describió anteriormente.

Todos los especímenes permanecieron en un horno a 37 ° C durante 48 h, después se trituraron mediante el uso de mortero de ágata hasta obtener un polvo fino, que se separó en cuatro fracciones de tamaño 250, 200, 150 y 100 micras usando tamices de malla. Las fracciones de 150 y 200 micras fueron seleccionadas para el estudio. Se obtuvieron dos mg de cada polvo tratado pesándose en una balanza electrónica (AX26 DeltaRange microbalanza Mettler Toledo AG, Greifensee, Suiza), que se mezclaron con 95 mg de polvo de bromuro potásico. A continuación se prensaron a 8 toneladas métricas durante 3 minutos en una prensa SPECAC, para ser examinados mediante FTIR.

Los espectros de FTIR se analizaron en el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, en un espectrofotómetro Thermo Nicolet IR 200, utilizando el software EZ-OMNIC (Thermo Nicolet Corporation, Madison, WI, EE.UU.), en el modo de absorbancia en el rango de 400 a 4.000 cm^{-1} , resolución de 2 cm^{-1} , y 256 scans por muestra. Se utilizó una pastilla de referencia con una composición constante (95 mg de BrK) para corregir la línea de base y de fondo, correspondiente a dióxido de carbono y

agua. Las bandas espectrales fueron asignadas de acuerdo con la conocida de los espectros de dentina (Badiel y Berry, 1996; Chang y Tanaka, 2002)^{70, 71}.



Imágenes 9 y 10: Prensa SPECAC y espectrofotómetro Thermo Nicolet IR 200.

2.2.4. DRX

El resto de polvo de dentina tratada fue utilizado para su análisis mediante difracción de rayos X (DRX). Los espectros de difracción de rayos X se obtuvieron usando un difractómetro de cristal único de rayos X (Bruker D8 Advance, Bruker Óptica, Karlsruhe, Alemania) con un detector de dos dimensiones. Este equipo utiliza un pequeño haz de rayos X (0,5 mm) que permite analizar los puntos seleccionados de la muestra, por la radiación $\text{MoK}\alpha$. Los patrones de difracción se procesaron utilizando el software XRD2DScan (Alejandro Rodríguez Navarro, Universidad de Granada, España) para identificar los diferentes componentes minerales y orgánicos mediante la comparación con los espectros de referencia de la base de datos PDF2 (Centro Internacional de Difracción DataTM, Ph, EE.UU.).

2.3. Efectos del SF en la interfase adhesiva

2.3.1. Microscopía óptica (MO)

Para visualizar los efectos del acondicionamiento en la adhesión a la dentina primaria tratada con SF, se prepararon 24 molares primarios, 4 por grupo, tal como se describió anteriormente y se sometieron al procedimiento asignado a cada uno de los grupos experimentales 1 al 6 (Tabla 1). Los molares que iban a ser sometidos a la tinción de Masson (MD) se obturaron con Tetric EvoCeramTM (Ivoclar / Vivadent, Schaan, Liechtenstein), sin ninguna aplicación adicional de grabado ácido o adhesivo. En las muestras destinadas a ser sometidas a la tinción de Perls, la cavidad se obturó con Fuji II LC (GC Corp., Tokio, Japón).

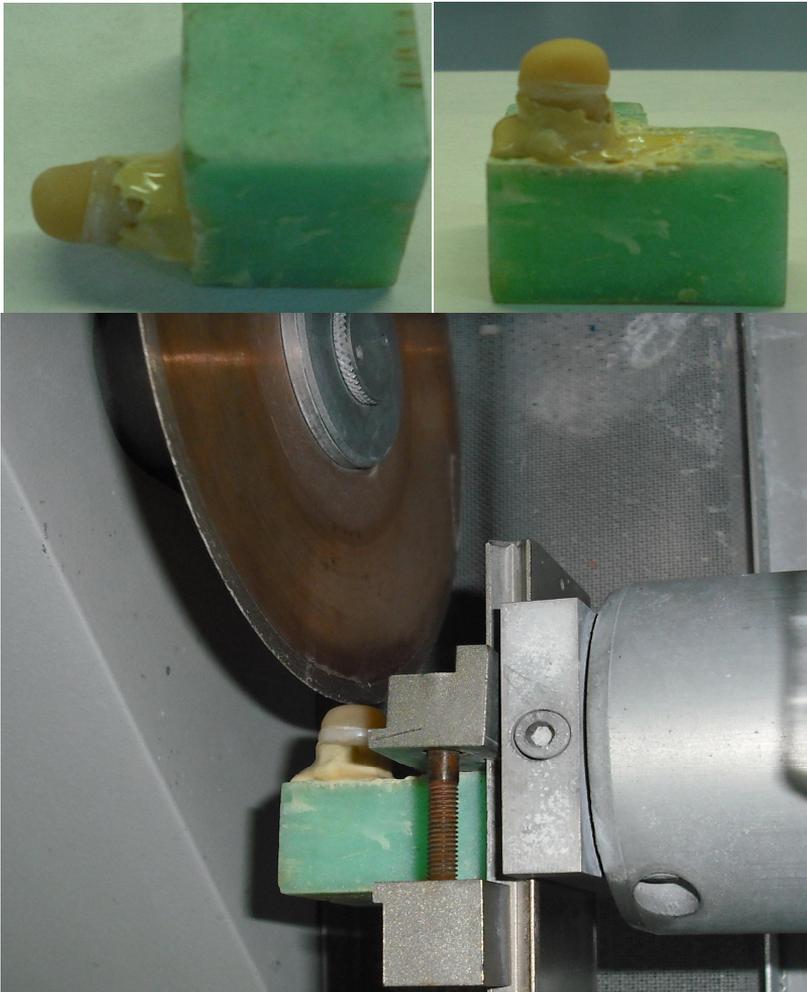
2.3.2. VP-SEM/EDS

Para examinar la interfase adhesivo-dentina primaria tratada con SF, se utilizaron 12 molares primarios adicionales (2 molares por grupo experimental, del 1 al 6). Se obtuvieron superficies planas de la dentina coronal intermedia como se describió anteriormente. La dentina se trató como se especifica en la Tabla 1, y los adhesivos se aplicaron y fotopolimerizaron con una lámpara halógena Astralis 10 (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein) a 700 mW/cm² durante 20 s. Se polimerizó un incremento, de unos 2 mm de espesor, de composite Tetric EvoCeramTM (Ivoclar / Vivadent, Schaan, Liechtenstein) durante 20 s. Las muestras se almacenaron en agua destilada, durante 24 horas a 37 ° C. Después, los molares fueron fijados a un soporte de acrílico con cera pegajosa (Kerr Corporation, Orange, CA, EE.UU.) y se cortaron en sentido mesiodistal para ser examinados bajo VP-SEM/EDS. Las superficies mediales de cada espécimen de muestra se procesaron tal como ha descrito anteriormente. Se seleccionó una superficie de cada molar para microanálisis.

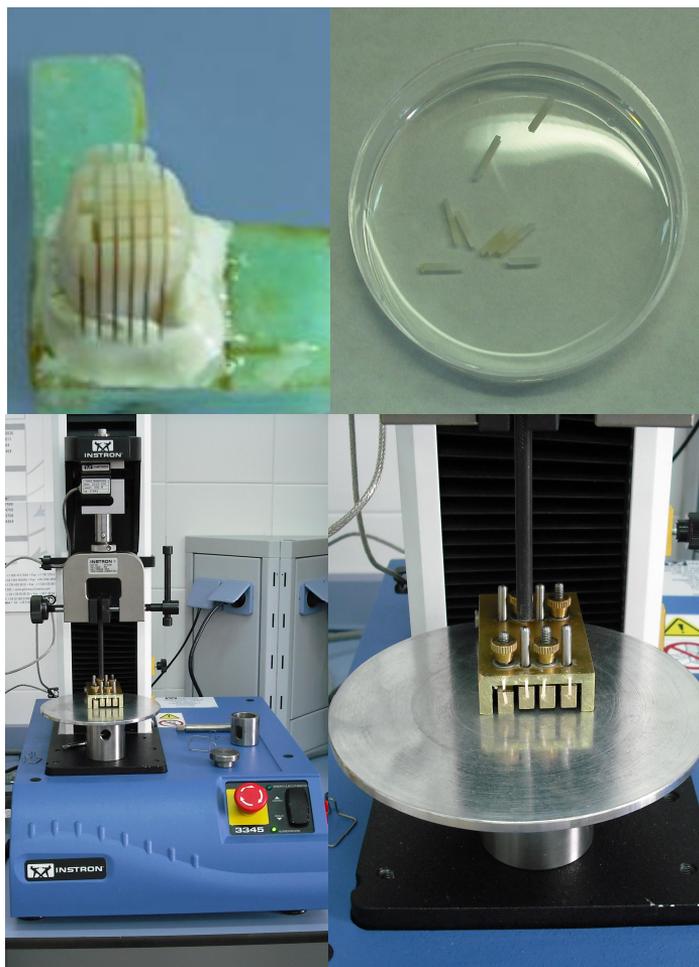
2.3.3. Microtensión por compresión (μ TBS)

Se procesaron 42 molares temporales (siete por grupo, grupos 1 a 6) de la misma manera que la descrita para el análisis VP-SEM / EDS. Para comprobar la resistencia de la unión, se añadieron dos incrementos adicionales de composite hasta construir un cilindro de resina de unos 5 mm de alto (color A1) y otro similar (color A4) en el lado apical, tras la limpieza de las cámaras pulpares con cucharillas excavadoras. De este modo se dio consistencia a los especímenes, ya que al tratarse de dientes temporales el remanente de dentina y por tanto de diente era escaso para su manipulación tanto al cortarlo como a la hora de manejar las barritas para la prueba de microtensión.

Los especímenes se conservaron 24 horas en ambiente húmedo a 37°C en estufa de calor, reproduciendo así en parte las condiciones intraorales. La metodología seguida en este ensayo ha sido descrito en otros estudios previamente (Ozök et al., 2004; Bolaños et al., 2006)^{66, 72}.



Imágenes 11, 12 y 13: Montaje de los cilindros con los especímenes en soporte mediante cera y corte de los mismos en micrótopo Struers Accutom-50.

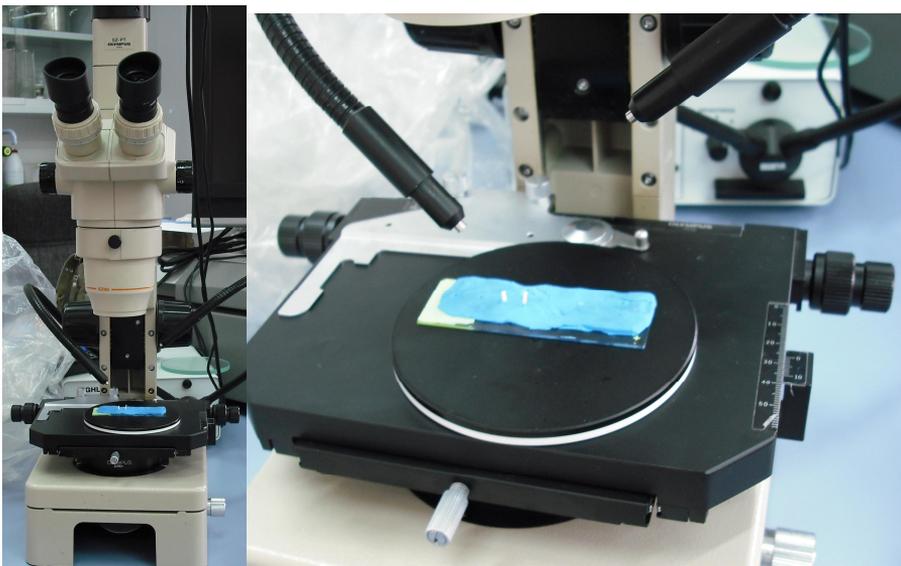


Imágenes 14, 15, 16 y 17: Barritas de 1 mm² de composite-dentina-composite, conservación de las mismas en humedad. Instron 3345 con soporte y mordaza con las barritas de dentina durante la prueba de microtensión por compresión.

Los cilindros que contenían los especímenes que iban a someterse a la prueba de microtensión por compresión se cortaron en el microtomo Accutom-50 en barritas de alrededor de 1 mm². Las barritas de composite/ dentina / composite obtenidas de cada espécimen fueron fijadas con un gel adhesivo de cianoacrilato (Henkel Adhesivos SL,

Barcelona, España) a una mordaza y se sometieron a pruebas de microtensión por compresión (Instron 3345, Instron Corporation, Norwood, MA, EE.UU.) a una velocidad de cruce constante (0,5 mm / min), siguiendo el diseño de Ozök et al. (2004)⁷², hasta que se produce el despegamiento.

Las superficies fracturadas fueron examinadas a 40 aumentos en un estereoscopio (Olympus PT, Olympus Optical Co., Ltd., Tokio, Japón) para determinar el modo de fallo. Las fracturas fueron clasificadas como adhesivas, mixtas, o cohesivas resina o de cohesivas en dentina. Sólo se consideraron las superficies fracturadas adhesivas o mixtas para el análisis estadístico (Scherrer, Cesar y Swain, 2010)⁷³.



Imágenes 18 y 19: Lupa estereoscópica Olympus PT, donde se colocaron las barras de muestra para el análisis de la superficie de fractura.

Análisis estadístico

Se utilizó el software SPSS 12.05 (SPSS, Chicago, IL) para el análisis estadístico. Una vez comprobada la normalidad (test de Kolmogorov-Smirnov) de la distribución de datos, se aplicó un modelo factorial de análisis de la varianza ANOVA (sistema adhesivo: grabado total o auto-grabado, tratamiento de la dentina: ninguno, SF o SF + CHX). Se utilizó un ANOVA con un factor para realizar la comparación entre los grupos que utilizan el mismo sistema adhesivo. El test de Tukey permitió realizar múltiples comparaciones post-hoc entre grupos. Se utilizó el test *t* de Student para comparar las medias entre los adhesivos. La prueba de Chi cuadrado se aplicó para comparar el modo de fallo entre los grupos de estudio. Se consideraron significativos valores de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Pruebas preliminares

3.1.1. Determinación del pH

En la medición del pH de Viscostat[®] se obtuvo un valor de 0,69.



Imágenes 20 y 21: pH-metro Micro pH 2000 (Crisol, Alella, Spain):
pH=0'69 para Viscostat[®].

3.1.2. Análisis elemental/Calorimetría

Muestra 1: dentina: N 3'5%, C 11'88%, H 2'89%.

Muestra 2: dentina: N 3'41%, C 11'79%, H 2'92%.

Muestra 3: dentina + sulfato férrico 1h: N 2'99%, C 9'37%, H 2'61%.

Se produce una disminución del contenido de nitrógeno, carbono e hidrógeno de las muestras tras la inmersión de las mismas en sulfato férrico durante 1 hora, esta disminución es más marcada en el contenido de carbono (2'5% menos).

3.2. Efectos del SF en la dentina primaria

3.2.1. Microscopía óptica

3.2.1.1. Tinción tricrómica de Masson

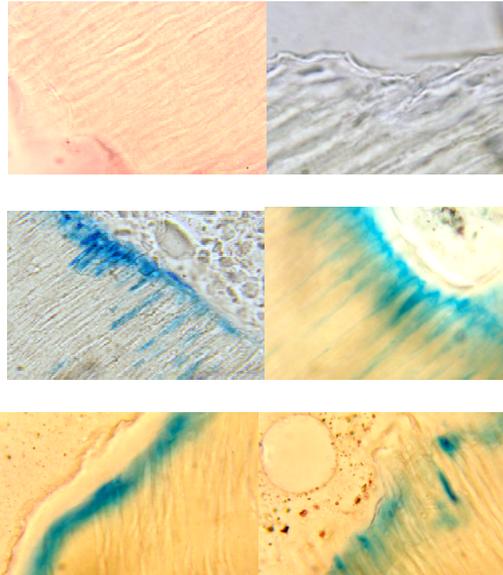
Tal como puede observarse en las imágenes 22 a la 27, la aplicación de SF produjo una desmineralización de la dentina subyacente en las muestras tratadas. Dicha desmineralización se caracteriza en la tinción de Masson como una banda roja en todas las muestras excepto en las de control, que aparece tanto en las muestras en las que se aplicó sólo sulfato férrico (Imágenes 24 y 25), como en aquellas en las que se aplicó clorhexidina (imágenes 26 y 27), frente a las muestras de control en las que dicha banda no está presente (imágenes 22 y 23).



Imágenes 22-24: Dentina control, dentina tratada con SF y dentina tratada con SF y clorhexidina, respectivamente, sometidas a la tinción de Masson y visualizadas bajo Microscopía óptica.

3.2.1.2. Tinción de Perls

La tinción de Perls revela la presencia de iones férricos (Fe^{3+}) que se muestran como una banda azul en la dentina intertubular y peritubular. En todas las muestras tratadas con SF se observó tinción azul. Con frecuencia (2/3 de cada campo visual) penetraba en el interior de la luz tubular. La distribución de los iones férricos fue irregular. No son arrastrados por el lavado con spray de agua. En los especímenes tratados con SF y clorhexidina continúa observándose tinción azul, demostrando esta última no elimina totalmente la solución de SF, pues se detectan iones férricos tras su aplicación.



Imágenes 25-30: 25 y 26 corresponden a dentina control sin tratamiento: la tinción de Perls no detecta iones férricos libres; 27 y 28 muestran dentina tratada con SF y lavada con spray de aire y agua: puede observarse tinción azul peri e intertubular que penetra en la luz tubular; 29 y 30 se aprecia dentina tratada con SF y CHX: la tinción azul corresponde a iones férricos libres, que la clorhexidina no ha sido capaz de eliminar totalmente.

3.2.2. VP-SEM/EDS

En las imágenes de microscopía electrónica de barrido de presión variable de dentina tratada con SF durante 30 segundos no se observó capa de barrillo dentinario. Se visualizaron las entradas tubulares abiertas y ocluidas parcialmente por tapones de barrillo. Se detectó hierro en la superficie de dentina, especialmente en las entradas tubulares.

El microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EDS) de la superficie de dentina mostró la presencia de Ca,

C, P, Mg y Fe en las muestras tratadas con SF durante 30 segundos. Además se detectaron cantidades menores de Na y Zn.

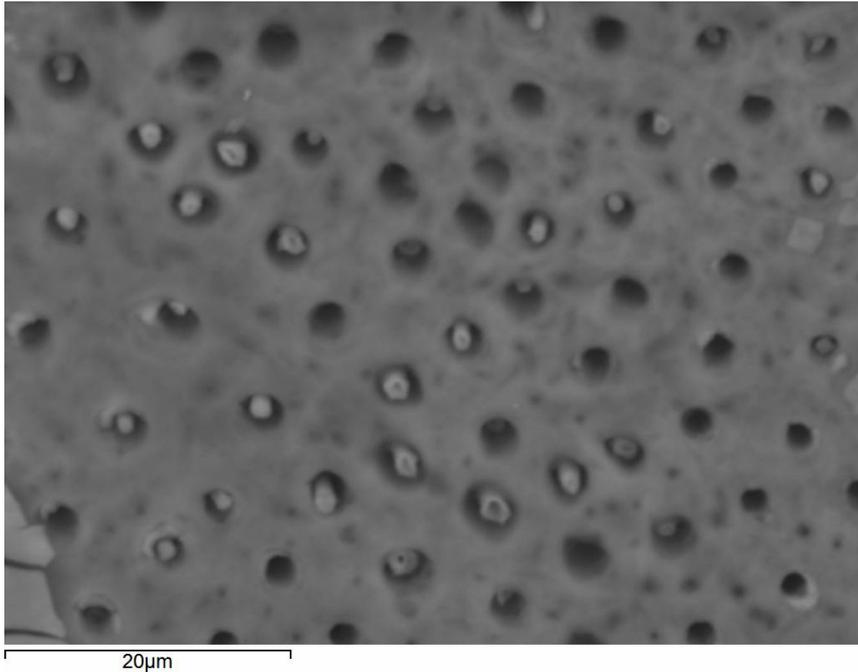
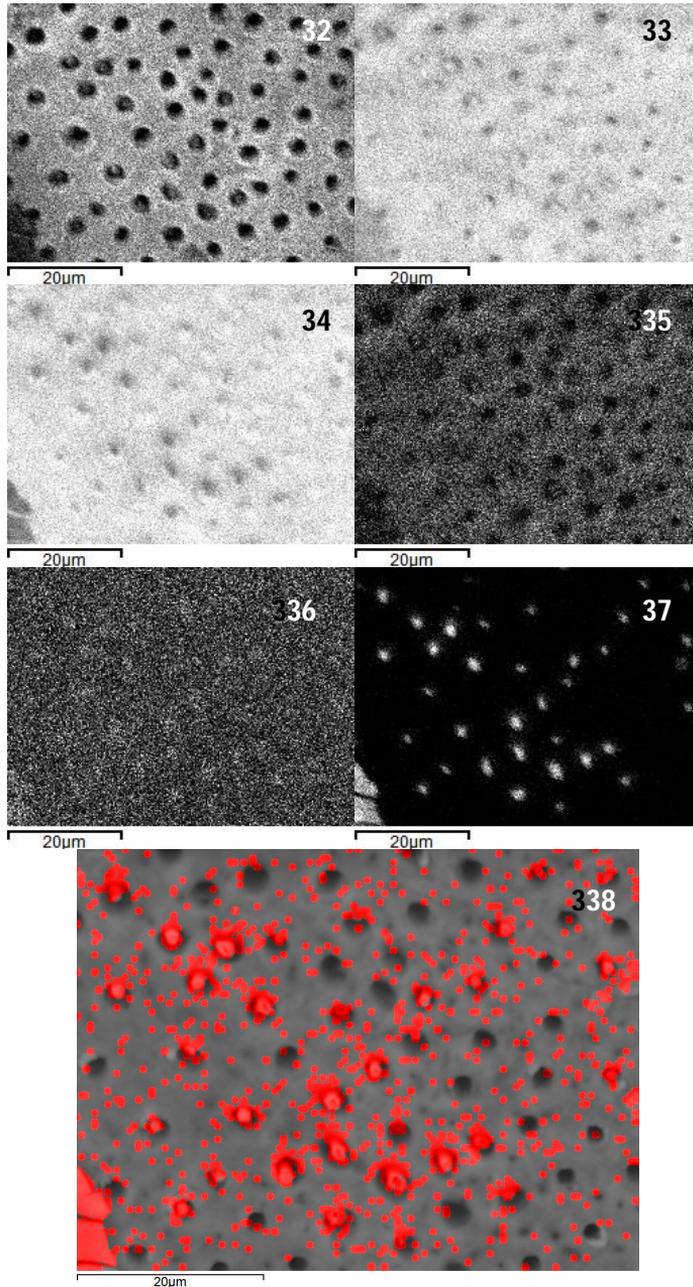


Imagen 31: Superficie de dentina tratada con SF visualizada con VP-SEM/EDS. No hay capa de barrillo, sí tapones ocluyendo algunos túbulos dentinarios.



Imágenes 32-38: Mapping de superficie de dentina tratada con SF y visualizada mediante VP-SEM/EDS. Las imágenes resaltan respectivamente los contenidos de C (32), P (32), Ca (34), Mg (35), Zn (36); y Fe (37). La imagen 38 corresponde a la suma de los espectros anteriores, resaltando el contenido de hierro en rojo.

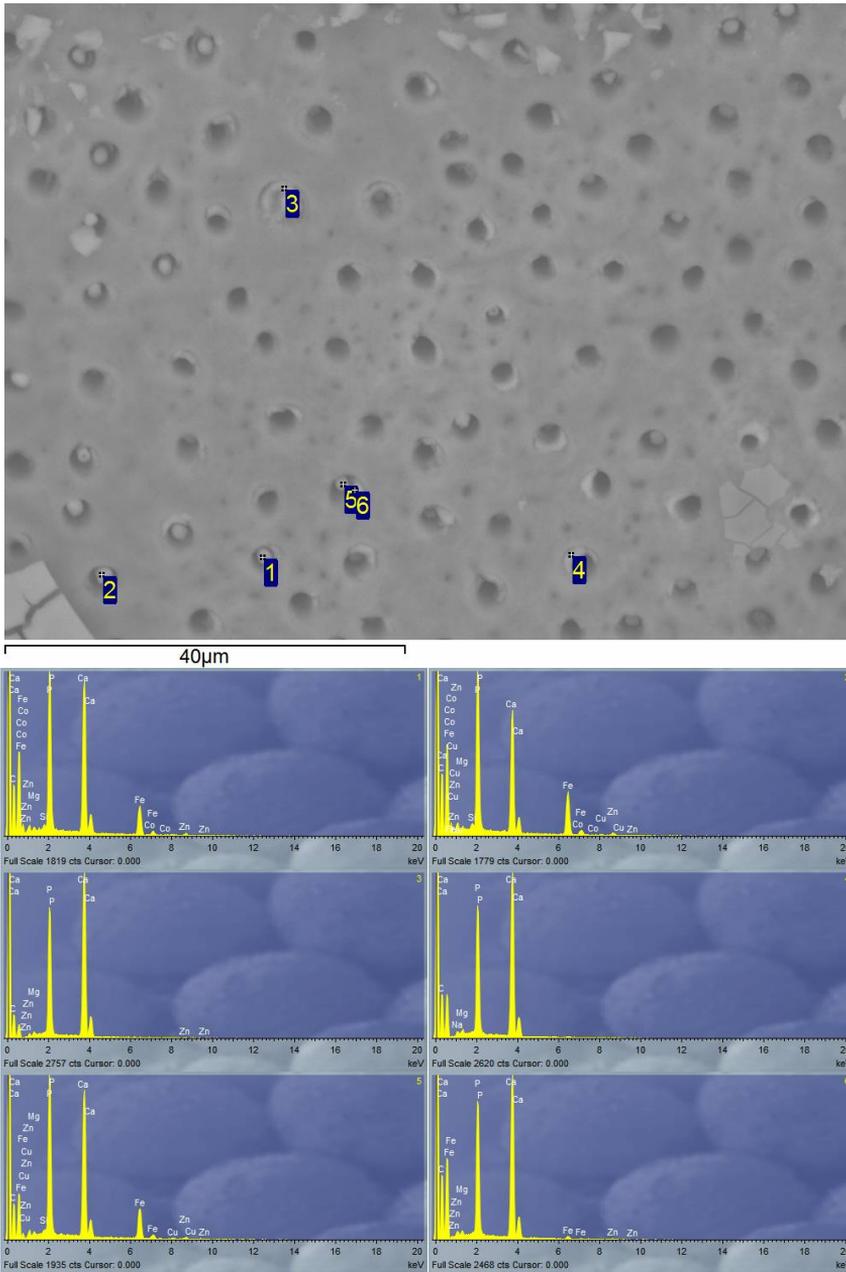


Imagen 39: Superficie de dentina tratada con SF y visualizada mediante VP-SEM/EDS. Figuras 1-6: Microanálisis por EDS que mostró Ca, P y Mg en todos los puntos seleccionados. Determinó además la presencia de Fe en el interior de los túbulos dentinarios -espectros 1, 2, 5 y 6-.

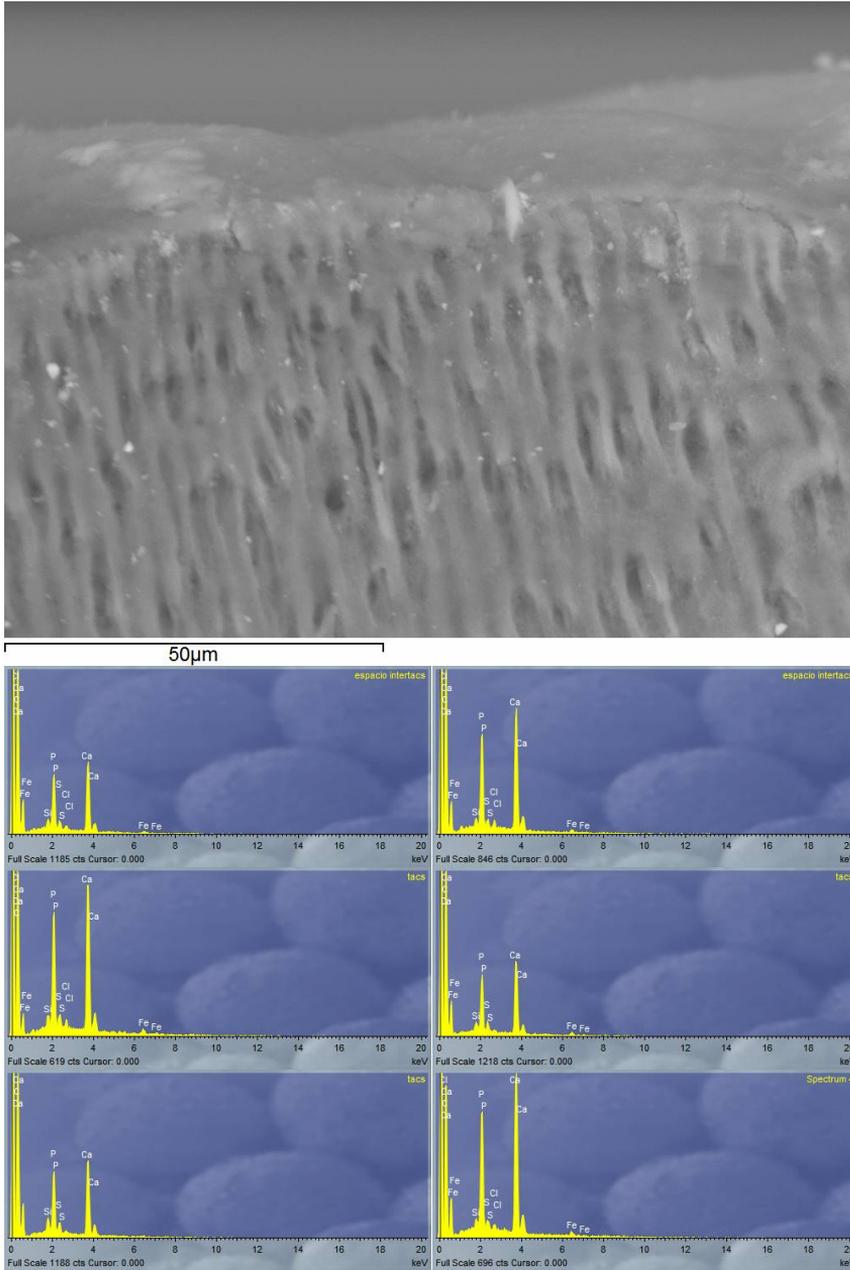


Imagen 40: Corte sagital de dentina tratada con sulfato férrico visualizada bajo VP-SEM y su análisis mediante EDS (figuras 7-12): no se observa capa de barrillo, sí tags en los túbulos dentinarios. El microanálisis elemental revela la presencia de C, Ca, P, Fe; así como menores cantidades de Mg y Si.

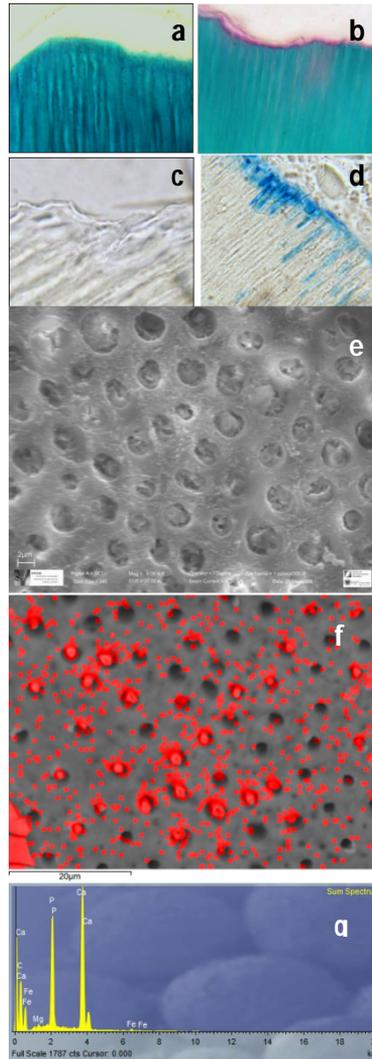


Figura 13: Composición de imágenes de dentina control (a y c) y dentina tratada con SF (b y d), sometida a las tinciones de Masson (a y b) y Perls (c y d), visualizada mediante microscopía óptica. La dentina tratada con sulfato férrico muestra una zona de desmineralización que penetra en la luz tubular (b) frente a la imagen de control (a); iones férricos resaltados en azul formando una banda en la superficie y en el interior de los túbulos (d). Imágenes e y f de VP-SEM/EDS muestran la superficie de dentina tratada con SF con los túbulos dentinarios abiertos y parcialmente ocluidos por barrillo, resaltando en rojo el contenido de hierro y microanálisis elemental (g) de dicha superficie.

3.2.3. FT-IR

Las bandas que se observan en espectrofotometría de infrarrojos son un conjunto de números de onda, que contienen un pico o número de onda principal que se relaciona con las moléculas que constituyen los grupos funcionales de materiales orgánicos como la dentina (Wang, 2002). Los picos detectados y utilizados en este trabajo correspondían a los componentes, que se muestran en la tabla 2: hidróxido ν (OH^-) en 3.500 a 2.900 cm^{-1} ; componente orgánico: amida I, amida II y amida III en 1655, 1560 y 1280 a 1380 cm^{-1} , respectivamente; componentes inorgánicos: carbonatos ν (CO_3^{2-}) en 1459-1420 cm^{-1} y fosfatos, ν_3 (PO_4^{3-}) y ν_1 (PO_4^{3-}) a números de onda 1097, 1035 y 960 cm^{-1} , respectivamente.

<i>POSICIÓN DE LA BANDA (cm^{-1})</i>	<i>ASIGNACIÓN</i>
3500-2900	ν (OH^-)
1655	$\delta(\text{OH}^-)$, amida I
1560	Amida II
1459-1420	$\nu(\text{CO}_3^{2-})$
1280-1380	Amida III
1097, 1035	$\nu_3(\text{PO}_4^{3-})$
960	$\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$

Tabla 2: Principales bandas que aparecen en la dentina y números de onda a las que se detectan y grupos funcionales a los que caracterizan.

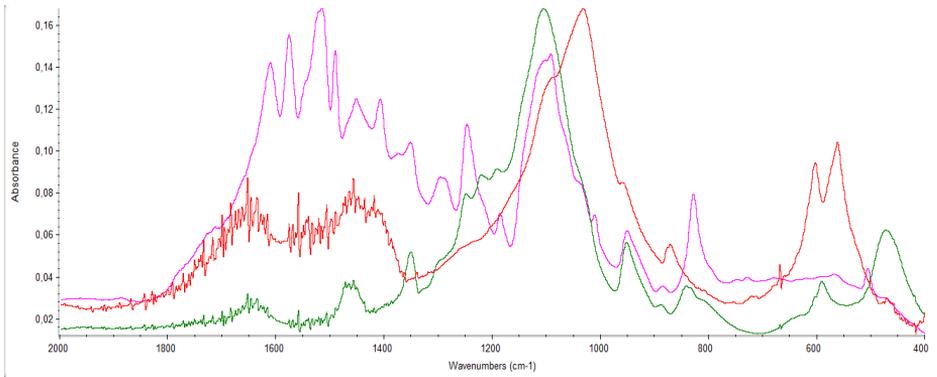


Figura 14: Espectros obtenidos mediante FTIR, correspondientes a clorhexidina, SF y dentina control sin ningún tratamiento.

Los espectros obtenidos se analizan en modo de absorbancia, se suavizan corrigiendo la línea base y el fondo, correspondiente a los grupos hidróxido y al agua. El espectro correspondiente a dentina control muestra las bandas fosfato a 960 y 1035 cm⁻¹, como muestra un fragmento de dicho espectro en la siguiente figura:

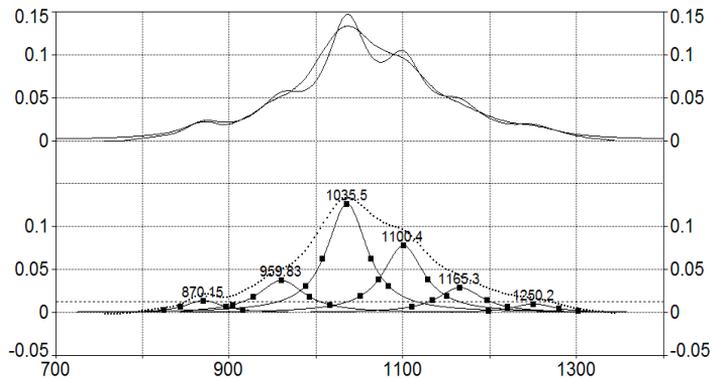


Figura 15: Fragmento del espectro FTIR de dentina control.

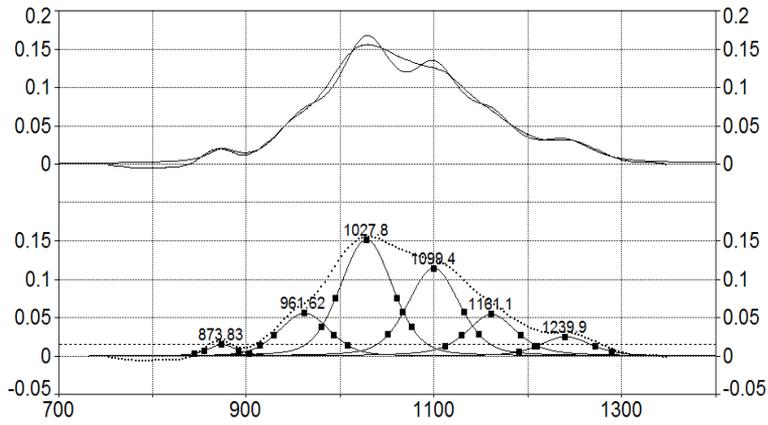


Figura 16: Fragmento del espectro FTIR de la muestra del grupo 2.

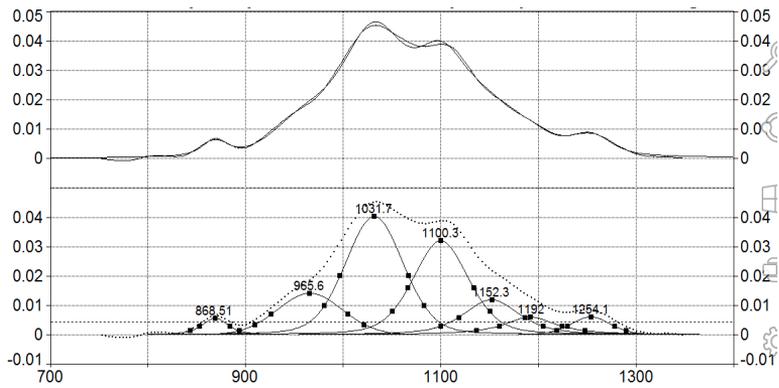


Figura 17: Fragmento del espectro FTIR de la muestra del grupo 3.

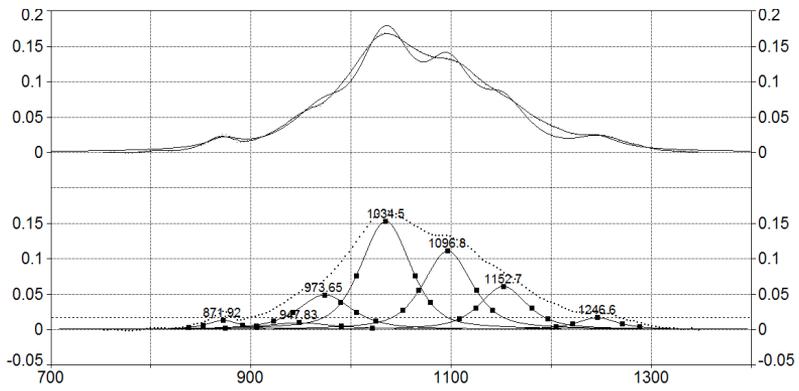


Figura 18: Fragmento del espectro FTIR de la muestra del grupo 5.

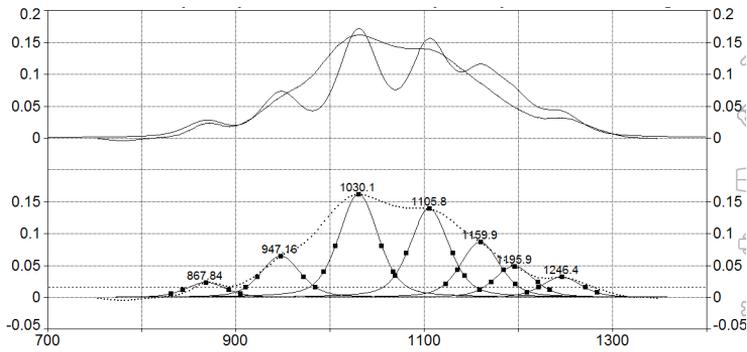


Figura 19: Fragmento del espectro FTIR de la muestra del grupo 6.

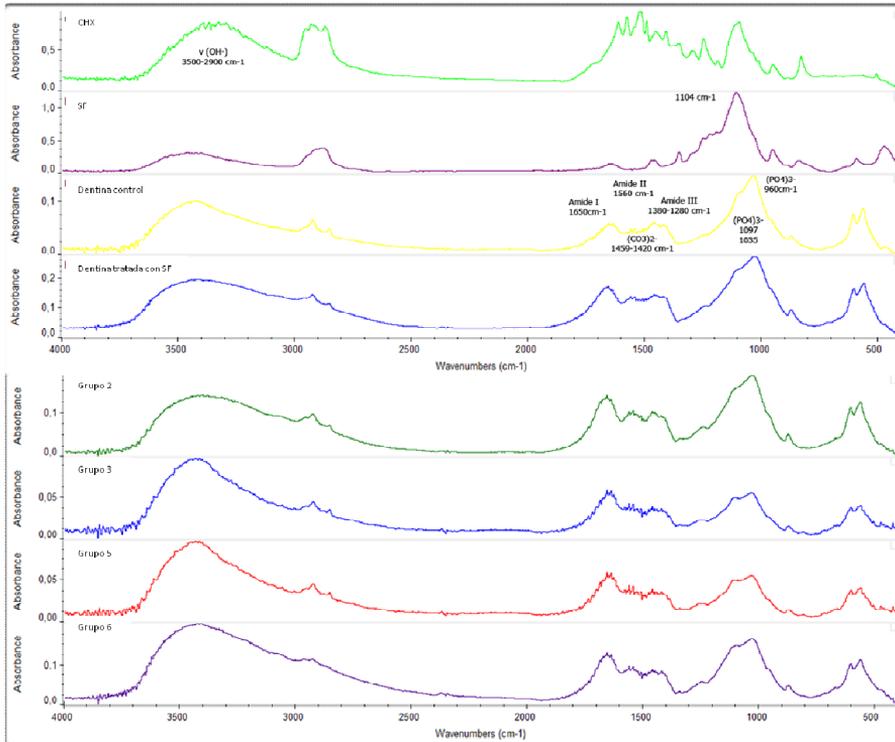


Figura 20: Espectros correspondientes a clorhexidina, sulfato férrico, dentina control sin tratamiento, dentina tratada con SF 1 h, y los grupos 2, 3, 5 y 6. El segundo registro correspondiente al SF muestra las bandas sulfato típicas a 1104 y 630 cm^{-1} , que aparecen también en todos los grupos tratados con SF, así como un aumento en las bandas de las amidas I y II a $1650\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$, sobre todo en los grupos tratados con clorhexidina (3 y 6), pues se superponen al espectro de clorhexidina y una disminución de la banda de amida III.

En el espectro control de FT-IR (dentina primaria sin ningún tratamiento químico), se observaron diferentes bandas que corresponden a grupos químicos de hidroxiapatita. El espectro de SF mostró las bandas de sulfato típicas $\nu_3(\text{SO}_4^{2-})$ a 1104 cm^{-1} y $\nu_4(\text{SO}_4^{2-})$ a 613 cm^{-1} .

Tras la aplicación de SF durante 1 hora, los espectros de todos los grupos de dentina tratada demostraron el aumento de la absorbancia en la bandas de amida I (1655cm^{-1}) y amida II (1560 cm^{-1}), y una ligera disminución de la absorbancia de la banda amida III ($1280\text{-}1380\text{ cm}^{-1}$).

Se detectaron bandas de sulfato (SO_4^{-2}) libre adsorbido, mostrándose como picos a 1104 cm^{-1} y 630 cm^{-1} , más pronunciados en las muestras tratadas con CHX (grupos 3 y 6) que en los grupos 2 y 5, sin CHX, donde se muestra como un ligero hombro.

La banda de amida II (1560 cm^{-1}) también fue más evidente en los grupos 3 y 6, superpuesta a las bandas espectrales de CHX.

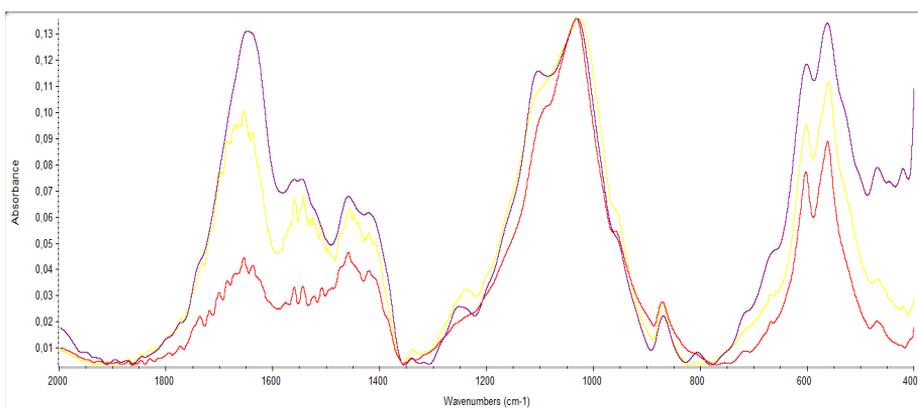


Figura 21: Comparativa de un fragmento de los espectros de FTIR de dentina control (rojo), grupo 2 (amarillo) y grupo 3 (morado). Puede observarse cómo hay un mayor pronunciamiento en las bandas de sulfato (SO_4^{-2}) libre adsorbido a 1104 cm^{-1} y 630 cm^{-1} y la banda de amida I a 1650 cm^{-1} en el grupo 3.

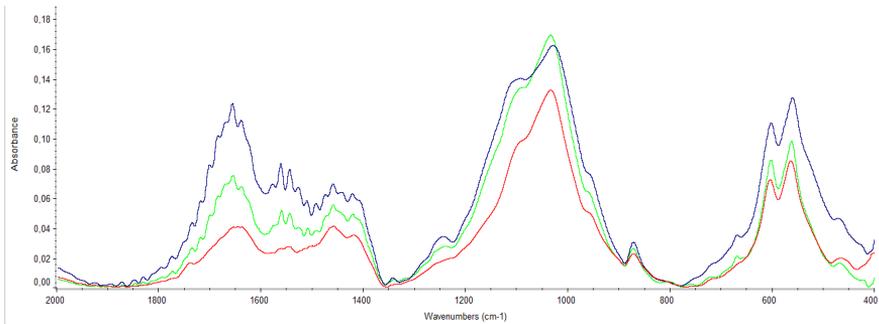


Figura 22: Comparativa de un fragmento de los espectros de FTIR de dentina control (rojo), grupo 5 (verde) y grupo 6 (azul). En los grupos 5 y 6 se observan las bandas de sulfato a 1104 y 630 cm^{-1} , así como un aumento en las bandas de amida I (1650 cm^{-1}) y II (1560 cm^{-1}), más marcada en el grupo tratado con clorhexidina (grupo 6).

3.2.4. DRX

La DRX nos permitió explorar cualquier posible alteración de la estructura cristalina de la dentina primaria en las condiciones experimentales del estudio. El SF deshidratado fue identificado como parabutlerita. Después de 1 h de exposición a SF, el hallazgo más relevante fue la presencia de yeso junto a los cristales de hidroxiapatita. El yeso fue evidente en la dentina tratada con SF y, en una cantidad menor, en el resto de los grupos, aunque era más escasa en el grupo 3:

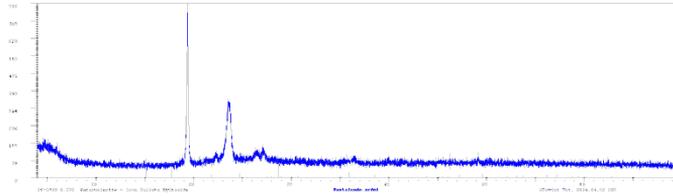


Figura 23: Espectro de DRX del SF Viscostat®.

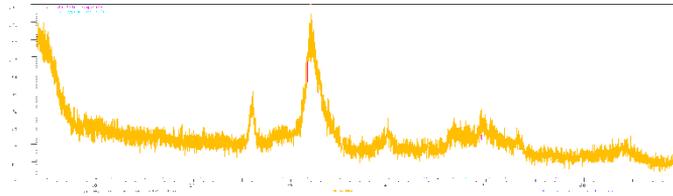


Figura 24: Espectro de DRX de dentina control.

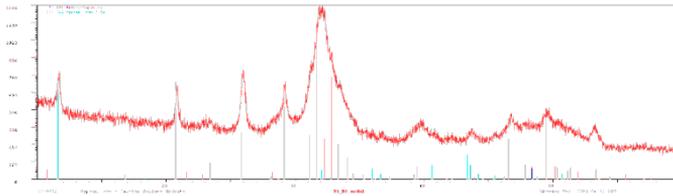


Figura 25: Espectro de DRX de dentina tratada con SF.

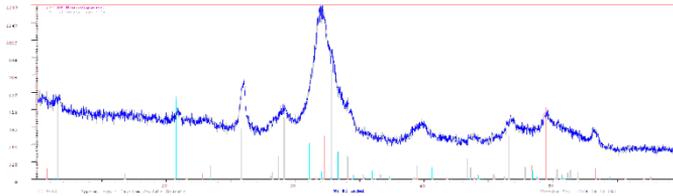


Figura 26: Espectro de DRX del grupo 2.

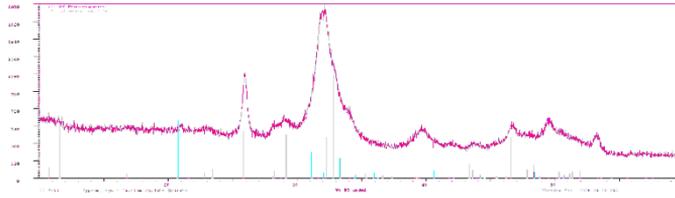


Figura 27: Espectro de DRX del grupo 3.

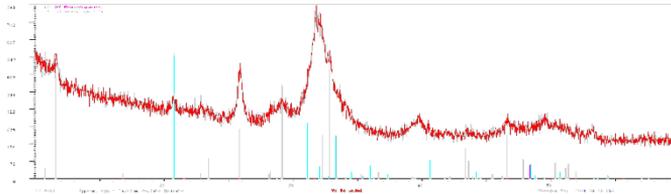


Figura 28: Espectro de DRX del grupo 5.

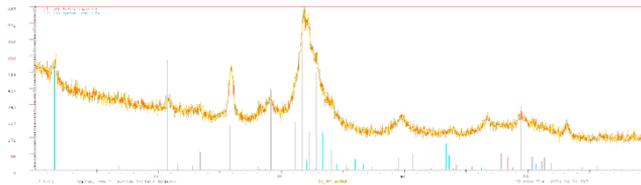


Figura 29: Espectro de DRX del grupo 6.

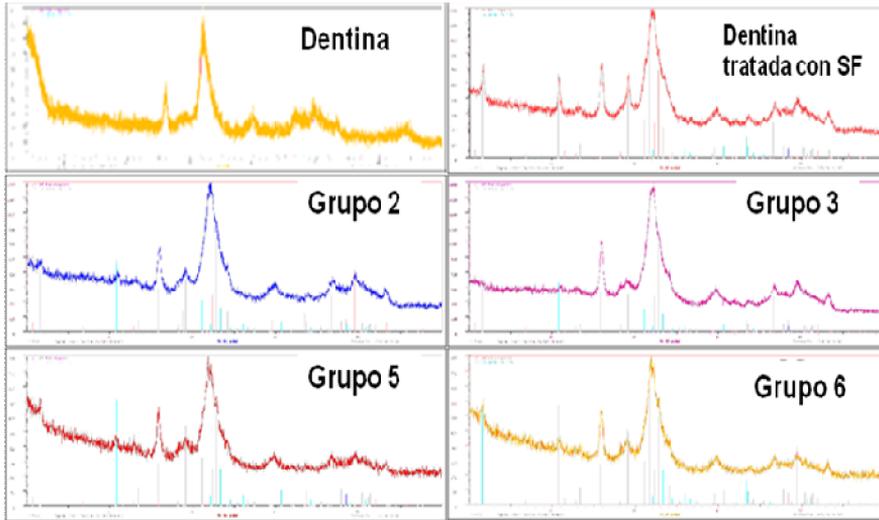


Figura 30: Composición con los espectros de DRX de los distintos grupos, así como el grupo control de dentina sin tratamiento y dentina tratada únicamente con SF. Las principales diferencias entre los grupos se producen en el contenido de yeso que es mayor en la dentina sola y en la dentina tratada con SF, frente al grupo 3 que presenta poco yeso; y el resto de grupos que presentan muy poco yeso. En todos los grupos se detectó hidroxiapatita.

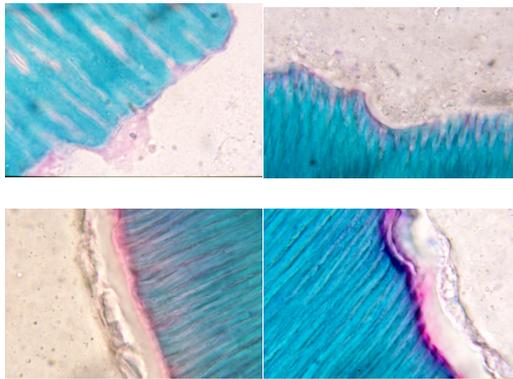
3.3. Efectos del SF en la interfase adhesiva

3.3.1. Microscopía Óptica

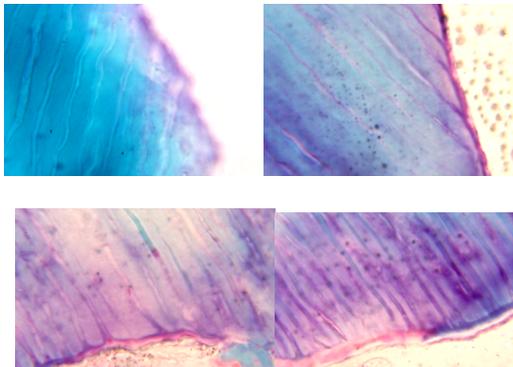
3.3.1.1. Tinción tricrómica de Masson

En cuanto a las observaciones sobre las características del área de desmineralización y de la superficie de dentina en contacto con el SF y los distintos agentes adhesivos, se han valorado la continuidad de la

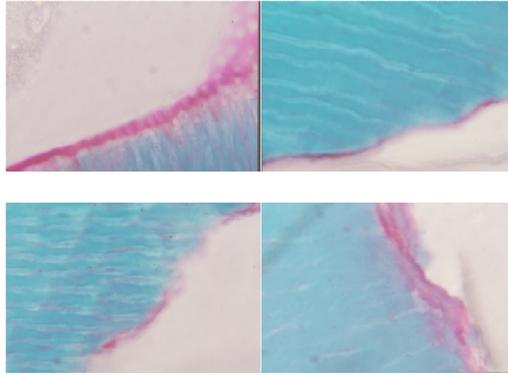
banda roja, presencia de formaciones cónicas o imágenes en embudo en las entradas pulpares de los túbulos dentinarios, apertura de los túbulos dentinarios y tinción de la dentina peritubular en cada muestra. Se encontró que dos tercios de las entradas tubulares estaban abiertas, continuando la banda roja en el interior de las paredes tubulares, produciendo las típicas imágenes en embudo.



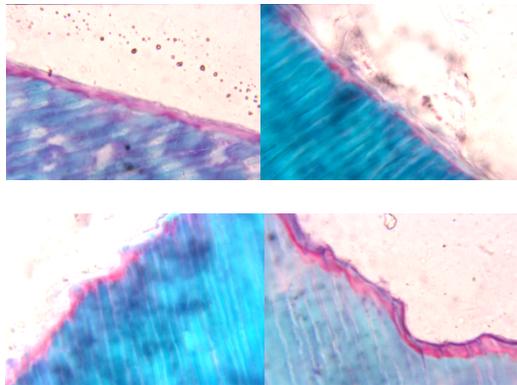
Imágenes 41-44: Grupo 2.



Imágenes 45-48: Grupo 3.



Imágenes 49-52: Grupo 5.



Imágenes 53-56: Grupo 6

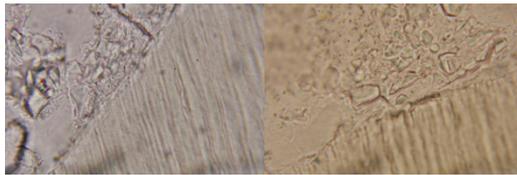
3.3.1.2. Tinción de Perls

En los grupos de grabado total, se detectó tinción por el colorante azul de Prusia (ferrocianuro de hierro) en los especímenes tratados con SF y ácido a los que no se había aplicado clorhexidina (grupo 2), mostrando un patrón en banda alrededor de la dentina circumpulpar que había estado en contacto con el SF; y penetrando dicha tinción en el interior de los túbulos dentinarios. Sin embargo, en las muestras a las que se aplicó clorhexidina tras el grabado

total no se encontró tinción azul o ésta fue muy escasa, sólo en el interior de algunos túbulos.

En las muestras de MO que fueron sometidas a la tinción de Perls a las que se aplicaron autograbadores (grupos 5 y 6) se observó una clara banda de tinción azul, así como la presencia de colorante en el interior de los túbulos, afectando por tanto a la dentina peri e intertubular. Por tanto, los ácidos débiles del sistema autograbador, que no se lavan y la aplicación de clorhexidina no fueron capaces de eliminar los iones férricos.

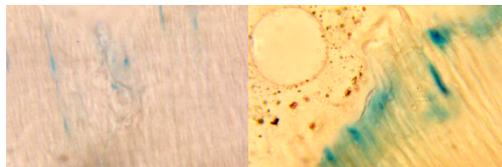
En ninguno de los controles, que no habían sido tratados con SF (grupos 1 y 4) se visualizó coloración azul con la tinción de Perls.



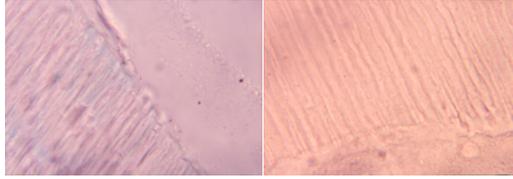
Imágenes 57 y 58: Grupo 1.



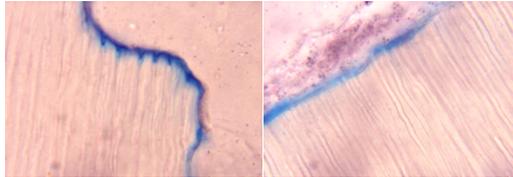
Imágenes 59 y 60: Grupo 2.



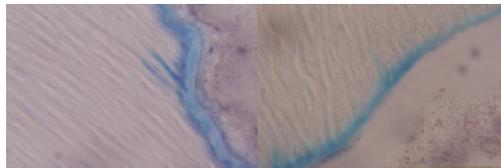
Imágenes 61 y 62: Grupo 3.



Imágenes 63 y 64: Grupo 4.



Imágenes 65 y 66: Grupo 5.



Imágenes 67 y 68: Grupo 6.

3.3.2. VP-SEM/EDS

Las imágenes de VP-SEM en los grupos de grabado total mostraron la formación de tags y los efectos evidentes del ácido fosfórico al 37% (15 s de grabado) sobre la dentina primaria, produciendo interfases gruesas con bordes festoneados. Los datos de microanálisis elemental por EDS de la parte inferior de la capa híbrida sugieren un alto grado de desmineralización. Se encontraron C, Ca, P, O y una discreta presencia de Si. En el grupo 3 se observaron además picos de S.

Con el uso de adhesivo autograbador, la capa híbrida obtenida fue fina y regular. En el grupo 5, se detectó hierro

(Fe) tanto en la parte superior de la capa híbrida como en la dentina intertubular y en la interfase tag/dentina peritubular e incluso en el interior de la luz tubular (Fig. 4; grupo 5 A, B y C). En el grupo 6, el pico de Fe no fue tan alto como en el grupo 5, y su distribución era más irregular. No obstante, permaneció tras el lavado con clorhexidina.

Cl y S estaban presentes con frecuencia en la parte superior de la dentina. Otros elementos fueron Mg, S y Si. El Pt como componente de adhesivos autograbadores se detectó con frecuencia en los grupos 4, 5 y 6; también se encontraron W, Yb y Ba.

Los resultados concuerdan con los observados con microscopía óptica, como puede observarse en la siguiente figura.

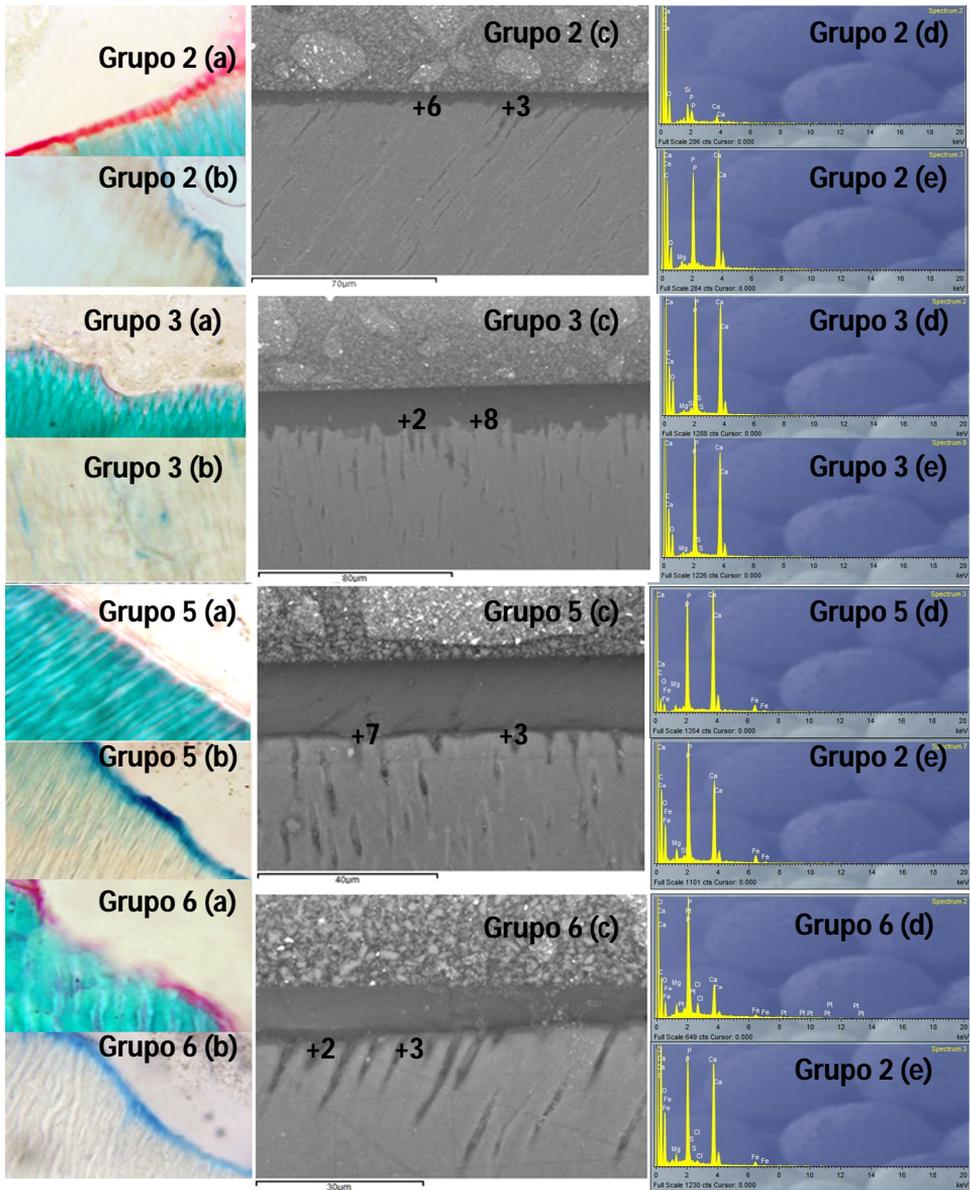


Figura 31 : Composición que muestra los grupos tratados con SF y sistemas adhesivos de grabado total y autograbadores con y sin clorhexidina, sometidos a la tinción de Masson y de Perls y visualizados mediante microscopía electrónica, así como bajo VP-SEM/EDS y microanálisis elemental de los puntos seleccionados.

3.3.3. Microtensión por compresión (μ TBS)

La tabla 3 muestra los resultados de la prueba de microtensión por compresión/ μ TBS. Los fallos pre-test no se incluyeron en el análisis estadístico. Éstos se produjeron en todos los casos en la superficie adhesiva (superficie pulpar) no tratada con SF, identificada con composite de un tono más oscuro. Supusieron un 11'8% del total de los especímenes, y se eliminaron del estudio.

No se produjeron fallos adhesivos en ninguno de los grupos tratados con SF, independientemente del sistema adhesivo utilizado. Los fallos se clasificaron en adhesivos y mixtos (adhesivos y cohesivos en resina).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las muestras tratadas y los grupos de control. Sí aparecieron diferencias entre grupos de grabado total y autograbadores al introducir la variante de la aplicación de clorhexidina, lo cual se demostró mediante modelo factorial de análisis de varianza ANOVA ($p < 0,05$) y de la interacción del sistema adhesivo con el tratamiento ($p = 0,001$) en la microtensión por compresión/ μ TBS.

Además las comparaciones post hoc mostraron que el sistema de auto-grabado dio valores de fuerza de adhesión más altos que el sistema de grabado total ($p < 0,05$). El test de Tukey mostró fuerzas adhesivas significativamente mayores ($p < 0,02$) cuando se utilizó CHX (grupo 3) con respecto al grupo control (grupo 1).

Las comparaciones entre grupos de adhesivos de autograbado mostraron diferencias significativas, con un mejor rendimiento del adhesivo en el grupo de control (grupo 4) con respecto a los grupos 5 ($p < 0,05$) y 6 ($p < 0,05$), que presentaron valores de fuerza de adhesión similares. Las comparaciones entre los sistemas adhesivos en el grupo de grabado total revelaron diferencias significativas sólo en el grupo de control, con mejores valores de fuerza de adhesión cuando se utilizó el sistema de auto-grabado ($p < 0,001$).

Test μ -TBS							Patrones de fractura			
Tratamiento	Grabado total			Autograbado			Grabado total		Autograbado	
	Grupo (n)	Media (DT)	FPT	Grupo (n)	Media (DT)	FPT	A	M	A	M
Control	1 (44)	12.35(4.12)a 2	2	4 (34)	17.58(5.52)b1	7	26	18	10	24
SF	2 (36)	12.76(5.36)1,2	5	5 (38)	14.26(7.08)2	7	0	36	0	38
SF+CHX	3 (46)	15.80(7.61)1	1	6 (40)	13.96(4.87)2	5	5	41	15	25
Total	(126)	13.73(6.11)a		(112)	15.16(6.06)b		Chi ² =62.78; p<0.001			

Tabla 2. Resultados de los tests de μ -TBS (MPa) y comparación entre grupos. Grupo (n). media (DT: desviación típica). FPT: fallos pretests. Frecuencia de los patrones de fractura y comparación entre éstos. Las letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre las filas. Los diferentes números indican diferencias estadísticamente significativas entre las columnas. A: Fallo adhesivo; M: Fallo mixto: adhesivo o cohesivo.

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

El SF puede influir en la adhesión bien por su bajo pH que podría afectar a la superficie^{34, 43} y a la estructura mineral de la dentina; o bien por permanecer éste o sus derivados tras el lavado, afectando a largo plazo, produciendo tinción y filtración en la interfase^{20, 38}.

El SF utilizado en este trabajo (ViscoStat®) tenía un pH de aproximadamente 0,7, similar al obtenido por Land et al. (1994)⁴³. La alta acidez de los astringentes y hemostáticos no debería resultar automáticamente en un grabado de la estructura dentinaria⁴³. Un pH bajo es necesario para mantener la efectividad y estabilidad de todos los químicos astringentes.

Algunos autores²¹ defienden que Viscostat® contiene más aglutinantes y agentes de recubrimiento que otras formulaciones de SF, que minimizan el efecto ácido disminuyendo los efectos negativos en la dentina; y que hacen que se mantengan los tapones de barrillo dentinario incluso con tiempos de exposición muy superiores a los recomendados por el fabricante y que difieren también de los tiempos de aplicación clínicos (exposición de hasta 8 minutos). Estas observaciones no coinciden con las obtenidas en el presente estudio y discrepan también con las de otros estudios realizados con distintos tiempos de aplicación de SF en dentina permanente. Los hallazgos de Ayo-Yusuf et al.³⁴ y los de Land et al.^{33, 43} muestran diferencias en los efectos del SF en la superficie de dentina en función del tipo de fluido empleado tras prolongados tiempos de exposición (1-5 minutos).

Además, Fischer⁶³ defiende en la patente que el agente químico que reduce la acidez del SF en Viscostat™ es

un agente de recubrimiento que se une de forma débil al hemostático. Postula que dicho agente hemostático, que es sílice (Si_2O), se une al SF formando una sal férrica, terminando con grupos de silanol (SiOH) en la superficie de las partículas. Los grupos hidróxidos del silanol tienen afinidad por los iones hidronios presentes en la solución acuosa de sal férrica, uniéndose a éstos débilmente. La unión de dicho hidrógeno podría en teoría ayudar a disminuir la naturaleza agresiva ácida de la solución de sales férricas, aumentando esta actividad si es compuesto es agitado. También defiende que la sílice actúa como una esponja por sus propiedades mecánicas, absorbiendo físicamente al agente hemostático. La solución contiene también una macromolécula de polietilenglicol que actúa como lubricante, siendo un agente de recubrimiento orgánico, supresor del potencial ácido mientras está unido al SF. Así, al pasar la solución de la jeringa que la conserva a la jeringa aplicadora ("Dentoinfusor"), el SF se separaría del vehículo químico que lo transporta, produciendo hemostasia, pero siendo posteriormente en teoría menos reactivo sobre el diente que otras presentaciones de SF.

Al tratarse el SF de un agente ácido, se podría esperar que su aplicación antes de la adhesión produzca una mayor desmineralización, o haga ésta más profunda que si sólo se aplicara ácido. Este hecho dificultaría la adecuada infiltración de monómero, quedando fibras de colágeno expuestas en la base de la capa híbrida⁷⁴, que podrían estar expuestas a degradación a largo plazo⁷⁵. Las fibras de colágeno infiltradas incompletamente pueden sufrir degradación hidrolítica y enzimática, incluyendo aquella derivada de las metaloproteasas de la matriz a lo largo del tiempo⁷⁶.

Según estudios anteriores^{33, 34}, usando una misma presentación de este agente, los efectos del SF en la dentina permanente varían según el tiempo de aplicación. Con el objetivo de reproducir las condiciones que se dan en la práctica clínica, Viscostat[®] se debería aplicar durante 15 segundos, pues éste es el tiempo recomendado para

producir hemostasia en la realización de pulpotomías. En el presente estudio, el tiempo de aplicación de SF fue de 30 segundos, el doble de lo recomendado; no obstante, se ha usado este tiempo de exposición intencionalmente, con el objetivo de maximizar sus efectos y la posibilidad de contaminación. La aplicación de SF durante 30 segundos refleja una situación clínica en la que podría ser necesaria una segunda amputación de la pulpa o aplicación de SF³⁶. Si la finalidad del estudio es explorar la capacidad del material (SF) para desmineralizar la dentina en contacto con el mismo, puede ampliarse el tiempo de aplicación, tal como realizaron otros estudios sobre la influencia del SF en unión a la dentina primaria, en los que se sumergieron las muestras de dentina en solución acuosa SF 15% durante 48 horas⁴⁹. En la dentina permanente se ha investigado con diferentes períodos de exposición a SF al 15%, que van desde 30 s a 5 min^{34, 43}; o al 20% en gel de SF, de 20 s³⁷ a 1 min⁴². Las comparaciones entre los resultados obtenidos por los distintos autores deben realizarse teniendo en cuenta variables como la presentación y el tiempo de aplicación del agente.

Los fabricantes de Viscostat[®] ³⁸ recomiendan la aplicación del producto mediante el uso del “Dentoinfusor”. Se trata de una jeringa con un pincel de aplicación en la salida que facilita la colocación del material en el sitio requerido. El uso de este dispositivo, junto con la naturaleza viscosa de la presentación, actúa disminuyendo la contaminación de las superficies. No obstante, en la realización de pulpotomías en molares temporales el tamaño de la cámara y de las entradas radiculares pulpares, y la edad del paciente, dificultan que no se produzca contaminación de la superficie dentinaria. En el presente trabajo se aplica SF en toda la superficie de dentina disponible para la adhesión.

Es necesario que el SF se aplique en el sitio deseado para que se obtenga una adecuada hemostasia. Tras ésta, el

lavado con spray de aire-agua por sí sólo o combinado con la aplicación de clorhexidina debería eliminar completamente los restos de material o de los posibles subproductos del mismo. La contaminación de las superficies adhesivas conduce a la microfiltración. Esta microfiltración se aprecia en forma de tinción, que progresa por los márgenes de las restauraciones estéticas. Si bien es deseable para la adhesión que la dentina esté hidratada, un exceso de humedad o la presencia de residuos conducirá sin duda a un fracaso en la formación de la capa híbrida y por tanto en la unión de la superficie de dentina con la resina compuesta²¹.

El sellado cavitario depende de la adecuada adhesión, en relación con el sustrato y los sistemas adhesivos; y con la ausencia de crecimiento bacteriano en la interfase. El SF tiene propiedades antibacterianas⁷⁷ deseables para el éxito de la pulpotomía a corto plazo, y de ésta y de la restauración a largo plazo. Este efecto antibacteriano, podría sumarse al de la clorhexidina⁷⁸, asegurando el éxito de la restauración a largo plazo, si los valores de las fuerza adhesivas son adecuados.

Las diferentes técnicas analíticas utilizadas en el presente estudio permiten caracterizar microquímica y estructuralmente la superficie de dentina que ha estado en contacto con el SF y con los distintos sistemas adhesivos, con y sin clorhexidina, y determinar los efectos de la combinación de todos estos productos en la superficie dentinaria y en la adhesión con resinas compuestas.

La banda roja observada en los especímenes sometidos a la tinción de Masson y observados bajo MO corresponde a la red de colágeno expuesto⁶⁷ y revela el efecto desmineralizador del SF en la dentina de molares temporales. La dentina observada era circumpulpar, donde los restos de pulpa se habían eliminado manualmente mediante cucharilla excavadora. Es posible que permanecieran algunos restos no visibles

macroscópicamente de la capa de odontoblastos y predentina, zona que es rica en colágeno⁴⁸ y podría ser más sensible a la tinción de Masson.

El uso de la ME y las técnicas de espectroscopía de rayos X marcaron un avance tecnológico en la instrumentación, pues ambas técnicas combinadas son ideales para detallar la morfología e identificar la composición de la superficie de dentina (Gwinnet)⁷⁹. Dentro de las limitaciones de estas técnicas, como son: la presencia de una capa de contaminación que podría impedir la detección de ciertos elementos de número atómico (Z) alto, como el hierro; o la aparente concentración de elementos atribuible al secado; son técnicas relativamente rápidas y no destructivas³⁴.

Un aumento de los picos de C con respecto a los de Ca y P, indican la presencia de un mayor componente orgánico⁴⁸, observable en los espectros de EDS; correspondiéndose, por tanto, con la desmineralización de la dentina. Estos hallazgos en el presente estudio, concuerdan con los observados con el resto de técnicas analíticas; y demuestran la capacidad del SF para desmineralizar de dentina de molares temporales, afectando a su estructura microquímica. Podemos negar, por tanto, la hipótesis nula.

Un estudio similar al presente³⁴, documentó mediante MEB la presencia de una capa de precipitado amorfo en la superficie de dentina permanente tras la aplicación de SF de 1 a 5 minutos; así como la formación de cristales en la dentina peritubular tratada con SF y grabada con ácido ortofosfórico. Estos hallazgos difieren de lo observado en nuestro estudio. Estas discrepancias pueden atribuirse a la preparación de las muestras, al menor tiempo de exposición al SF, o a diferencias en el sustrato. En nuestro estudio una fina capa de barrillo podría estar presente debido al pulido de la superficie antes de ser tratada con los agentes a estudiar. El tiempo de exposición al SF fue de 30 segundos y la

dentina, a diferencia de la usada en el estudio de Ayo-Yusuf et al.³⁴, correspondía a dentina coronal de molares temporales, que se espera tenga un menor contenido mineral.

La identificación de restos de hierro se efectuó mediante el uso de microscopía óptica con la tinción de Perls y VP-SEM/EDS y mapeo de la superficie contaminada de dentina primaria. Ambas técnicas detectaron la presencia de iones férricos en la superficie dentinaria, en las entradas tubulares y, con el uso de MO, en el interior de los túbulos, demostrando que este elemento permanece tras el lavado del agente hemostático Viscostat[®] con spray de agua.

Al no haber encontrado diferencias entre los espectros de las muestras de polvo tratadas y las de control al aplicar SF a tiempos clínicos (30 s)⁸⁰, se amplió intencionalmente el tiempo de aplicación de SF, sumergiendo los especímenes en la solución durante 1 hora, para determinar mediante FTIR si el agente es capaz de producir cambios en la estructura molecular de la dentina. Principalmente, se detectaron nuevas bandas de absorbancia espectral correspondientes al sulfato libre, adsorbido sobre la dentina, y un aumento de la amida I y amida II con una reducción relativa de la banda amida III con respecto al control.

Los cambios en las bandas de amida I y III, podrían indicar cambios secundarios en la estructura de la hélice de colágeno de la dentina y / o ruptura de algunas uniones intrafibrilares⁸¹. El pico de la banda amida II, se solapa con picos espectrales de CHX, en torno a $1450-1645\text{ cm}^{-1}$, por lo que debe interpretarse con cautela, como muestra un estudio previo con CHX⁸².

La detección de bandas de sulfato (SO_4^{2-}) libre adsorbido, a 1104 cm^{-1} y 630 cm^{-1} , podrían deberse a la composición de la solución de clorhexidina utilizada⁸³, en concreto al colorante rojo de la misma, azorrubina, pues

estos picos fueron más pronunciados en las muestras tratadas con CHX (grupos 3 y 6) que en las no tratadas (grupos 2 y 5).

Las muestras de polvo para DRX también provenían de especímenes sumergidos en SF durante una hora. Sirvieron para determinar la formación de nuevos compuestos. Se encontraron nuevos picos identificados como yeso (sulfato de calcio dihidratado) en la dentina tratada con SF en comparación con las muestras de control. Dicho compuesto puede corresponder al precipitado amorfo descrito por Ayo-Yusuf et al³⁴ y que estos autores especularon que podría corresponder a fosfato cálcico. La detección de sulfato de calcio fue menor en el grupo 3, esto podría deberse a que la clorhexidina y el ácido fosfórico³⁷ produzcan una mayor limpieza de los subproductos del SF. Aunque, como se ha comentado al hablar de la FTIR, el colorante de la presentación de clorhexidina utilizada actuó como una fuente externa de sulfato, éste permanecería adsorbido sobre la superficie y no formaría compuestos, o en caso de formarlos, éstos no serían detectables mediante DRX.

No se identificaron compuestos férricos con DRX; lo que parece corroborar la adsorción de Fe en la superficie de la dentina.

Los tests adhesivos de microtensión por compresión (μ TBS) fueron introducidos por Sano et al.⁸⁴ Estos tests utilizan una interfase adhesiva del orden de 1mm^2 , lo cual ofrece una distribución del estrés más uniforme que los tests convencionales, y suelen ser usados para comparar diferentes sistemas adhesivos⁸⁵.

Las ventajas del uso de tests de microtensión por compresión superan ampliamente a los inconvenientes de este método⁸⁶. En este ensayo, además de la mejor

distribución de la fuerza aplicada, podemos destacar el mejor aprovechamiento de la muestra, ya que se trata de molares temporales cuya superficie de dentina para la adhesión es pequeña, y con el uso de esta técnica se obtiene un mayor número de especímenes.

Cuando se utilizan sistemas adhesivos de grabado total, el SF no empeora los valores de microtensión por compresión obtenidos en dentina permanente⁶⁰. Estos resultados coinciden con los encontrados en el presente trabajo al aplicar SF y un sistema de grabado total a la dentina de molares temporales.

Sin embargo, cuando se trata de evaluar los efectos del SF en las fuerzas adhesivas obtenidas con sistemas autograbadores, los resultados son que el hemostático empeora la adhesión⁴⁹, al menos cuando se utilizan autograbadores considerados "suaves". Los sistemas adhesivos de auto-grabado "fuerte", como el utilizado en este estudio, tienen un pH que debería ser lo suficientemente bajo como para promover la disolución del barrillo dentinario y acondicionamiento del tejido mineralizado (Ferrari, 1997)⁸⁷, y deberían disolver también el SF y sus productos de reacción, formando una capa híbrida similar a los adhesivos de grabado total. Mine et al.⁸⁸ describen el comportamiento de Adper Scotchbond SE siendo más parecidos al de los adhesivos de auto-grabado "intermedio-fuerte", con un pH entre 1 y 2⁸⁹. También se podría esperar que la capa híbrida fuera más gruesa al producirse un "sobre-grabado" por la aplicación de dos agentes ácidos (SF y primer del sistema autograbador). Por el contrario, los hallazgos de VP-SEM muestran una capa híbrida fina y la presencia de iones férricos, como subproductos del SF remanentes, que podrían influir en los peores resultados de microtensión por compresión obtenidos en los grupos tratados con SF y sistema autograbador al comparar los con los controles de autograbador.

Además del pH de los materiales aplicados, varios factores afectan a la adhesión a dentina in vitro^{89, 90}; tales

como el tipo y edad del diente, el grado de mineralización dentinaria, la superficie de dentina disponible para la adhesión, el tipo de test de fuerza adhesiva, el medio de conservación, la humedad ambiental relativa en los sustratos y las condiciones de testado. Todo ello explicaría una desviación estándar alta y rangos amplios obtenidos en los valores de fuerzas adhesivas⁹¹.

Las diferencias en los valores de fuerzas adhesivas entre los dientes temporales y los permanentes se relacionan con diferencias en la estructura y composición química; en concreto, con el menor contenido mineral (Johnsen et al)⁹² y la menor concentración de calcio y fósforo (Courson et al)⁹³ de la dentina peri e intertubular que se ha observado en la dentina temporal. Asimismo, se ha atribuido a que presenta menores concentración (Nor et al)⁹⁴ y diámetro tubulares (Koutsi et al.)⁹⁵, y por tanto menor permeabilidad; al mayor contenido acuoso, por la proximidad pulpar; y a diferencias en la reactividad a las soluciones ácidas (Burrow et al)⁹⁶.

En el presente trabajo se usaron primeros y segundos molares temporales. Se espera, por tanto, una gran variabilidad en el contenido mineral y cristalinidad, coincidiendo con lo observado por otros autores, que han documentado que los cambios en el contenido mineral de los dientes primarios podría ser mayor que en los dientes permanentes⁴⁸.

El ácido ortofosfórico usado en este estudio se aplicó durante 15 segundos, aunque algunos autores aconsejan disminuir el tiempo de exposición de la dentina temporal al grabado ácido por el menor contenido mineral de la misma⁹⁷,⁹⁸ que produciría una alta susceptibilidad de este sustrato a los agentes grabadores en comparación con los dientes permanentes⁹⁹, y a su mayor susceptibilidad al grabado ácido^{92, 97, 100}.

Se especula que se produciría una capa híbrida de menor grosor con una penetración de la resina más completa¹⁰¹, teoría refutada por otros autores⁹⁴ que encontraron que la capa híbrida en dentina temporal era comparativamente más gruesa que la producida en la dentina permanente y que la reactividad de la dentina temporal es similar a la de la dentina permanente, primando la calidad sobre el grosor de la capa híbrida. Luego, la mayor profundidad de desmineralización de la dentina primaria utilizando los mismos tiempos de grabado ácido que en dientes permanentes podría facilitar la degradación de la adhesión resina-diente, arriesgando la longevidad de la restauración.

La reducción del tiempo de aplicación del ácido ortofosfórico podría mejorar los resultados de las fuerzas de adhesión a largo plazo¹⁰², pero no hay un acuerdo total sobre sus beneficios directos en las mismas^{66, 74, 96, 102, 103}.

El menor grosor de la capa híbrida observado con VP-SEM al combinar SF y adhesivos autograbadores se correspondió con una reducción significativa de la fuerza adhesiva, así como con la presencia de Fe y la formación de yeso, más marcadas. Al aplicar un sistema autograbador sobre dentina tratada con SF, el remanente de iones férricos se detectó principalmente acumulado en las entradas tubulares. Cuando además se aplicó CHX, ésta solución pudo, mediante su acción catiónico quelante⁷⁵, dispersar parcialmente los residuos férricos, mostrando los especímenes del grupo 6 una menor acumulación de hierro. Éste, permanecería en forma de iones férricos, adsorbido en la superficie de dentina, sin formar compuestos con la dentina subyacente. No se obtuvo en el presente estudio una restauración de los valores de microtensión por compresión al introducir la variable de la aplicación de CHX cuando se utilizan autograbadores, en contra de lo observado por otros autores³⁷.

No se conoce la concentración de clorhexidina en la dentina temporal en el presente trabajo. Una elevada

concentración de este antiséptico, mucho mayor que aquella que inhibe las MMPs¹⁰⁴, al tratarse de un compuesto que no es desplazado por el HEMA ni por el etanol de los adhesivos autograbadores⁸², podría afectar a la estabilidad de la capa híbrida¹⁰⁵, produciendo el fallo de las restauraciones a largo plazo.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. El SF desmineralizó la dentina primaria y se mantuvo en la superficie de la dentina después del lavado y persistió incluso después del lavado con CHX durante 1 min o el acondicionamiento para el proceso adhesivo.
2. Los cambios elementales demuestran la presencia de Fe adsorbido sobre la superficie de la dentina.
3. Los cambios microquímicos consistieron en la desmineralización de la superficie de la dentina, y después de un tiempo de aplicación largo, la presencia de sulfato libre y yeso, y la afectación de la estructura molecular del colágeno.
4. El SF disminuyó la fuerza adhesiva del adhesivo de auto-grabado a la dentina pero no del adhesivo de grabado total.

RELEVANCIA CLÍNICA

El sulfato férrico es un agente de desmineralización potente y este hecho debe ser tenido en cuenta para el procedimiento adhesivo.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Rodd HD, Waterhouse PJ, Fuks AB, Fayle SA, Moffat MA. Pulp therapy for primary molars. *Int J Paediatr Dent.* 2006; 16 (Suppl. 1): 15–23.
2. ADA: Glossary of Dental Clinical and Administrative Terms. [Internet]. American Dental Association ©2015 [consultado 1 de febrero de 2015] Disponible en: <http://www.ada.org/en/publications/cdt/glossary-of-dental-clinical-and-administrative-ter#p>.
3. American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on Pulp Therapy for Primary and Immature Permanent Teeth Clinical Guidelines Reference Manual 2014; 36: 242-50.
4. Fuks AB. Vital pulp therapy with new materials for primary teeth: new directions and treatment perspectives. *J Endod.* 2008; 34 (suppl): S18-S24.
5. Fuks AB. Current concepts in vital primary pulp therapy. *Eur J Paediatr Dent.* 2002; 3: 15-20.
6. Smaïl-Faugeron V, Courson F, Durieux P, Muller-Bolla M, Glennly AM, Fron Chabouis H. Pulp treatment for extensive decay in primary teeth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 ; 6 :8.
7. Smaïl-Faugeron V, Fron Chabouis H, Durieux P, Attal JP, Muller-Bolla M, Courson F. Development of a core set of outcomes for randomized controlled trials with multiple outcomes--example of pulp treatments of primary teeth for extensive decay in children. *PLoS One.* 2013; 8: e51908.

8. Durmus B, Tanboga I. In vivo evaluation of the treatment outcome of pulpotomy in primary molars using diode laser, formocresol, and ferric sulphate. *Photomed Laser Surg.* 2014; 32:289-95.
9. Deery, C. Formocresol and ferric sulfate have similar success rates in primary molar pulpotomy. In carious primary molars does a pulpotomy performed with ferric sulphate, compared with formocresol, result in greater clinical/radiographic success? *Evid Based Dent.* 2005; 6: 70.
10. Loh A, O'Hoy P, Tran X, Charles R, Hughes A, Kubo K, Messer LB. Evidence-based assessment: evaluation of the formocresol versus ferric sulfate primary molar pulpotomy. *Pediatr Dent.* 2004; 26: 401-9.
11. Peng L, Ye L, Tan H, Zhou X. Evaluation of the formocresol versus mineral trioxide aggregate primary molar pulpotomy: a meta-analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102: e40-4.
12. Peng L, Ye L, Guo X, Tan H, Zhou X, Wang C, Li R. Evaluation of formocresol versus ferric sulphate primary molar pulpotomy: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2007; 40: 751-7.
13. Rao A, Rao A, Shenoy R. Mineral trioxide aggregate--a review. *J Clin. Pediatr Dent.* 2009; 34: 1-7.
14. Marsh GM, Morfeld P, Collins JJ, Symons JJ. Issues of methods and interpretation of the National Cancer Institute formaldehyde cohort study. *J Occup Med Toxicol.* 2014; 22: 1-9.

15. Lewis B. The obsolence of formocresol. Br Dent J. 2009; 207: 525-8.

16. Shirvani A, Asgary S. Mineral trioxide aggregate versus formocresol pulpotomy: a systematic review an meta-analysis of randomized clinical trials. Clin Oral Invest. 2014; 18: 1023–30.

17. Zealand CM, Briskie DM, Botero TM, Boynton JR, Hu JC. Comparing gray mineral trioxide aggregate and diluted formocresol in pulpotomized human primary molars. Pediatr. Dent. 2010; 32: 393-9.

18. Encyclopædia Britannica. Iron compounds. [Internet] [consultado el 1 de julio de 2014]. Disponible en: <http://global.britannica.com/EBchecked/topic/294242/iron-Fe/3562/Compounds#ref93315>

19. Lemon RR, Steele PJ, Jeansonne BG. Ferric sulfate hemostasis: effect on osseous wound healing. Left in situ for maximum exposure. J Endod. 1993; 19:170-3.

20. Fischer DE. Tissue management: a new solution to an old problem. Gen Dent. 1987; 35: 178-82.

21. Bailey JH, Fischer DE. Procedural hemostasis and sulcular fluid control: a prerequisite in modern dentistry. Pract Periodontics Aesthet Dent. 1995; 7:65-75.

22. Gallini G, Merlini C, Fischer D. Ferric sulfate in minor oral surgery. Dent Cadmos. 1986; 54: 81-91.

23. Rubinstein R, Kim S. Short-term observation of the results of endodontic surgery with the use of a surgical operation microscope and super-EBA as root-end filling material. *J Endod.* 1999; 25:43-8.

24. Jensen SS, Yazdi PM, Hjørting-Hansen E, Bosshardt DD, von Arx T. Haemostatic effect and tissue reactions of methods and agents used for haemorrhage control in apical surgery. *Int Endod J.* 2010; 43: 57-63.

25. Fei AL, Udin RD, Johnson R. A clinical study of ferric sulfate as a pulpotomy agent in primary teeth. *Pediatr Dent.* 1991; 13: 327-32.

26. Fuks AB, Papagiannoulis L. Pulpotomy in primary teeth: review of the literature according to standardized criteria. *Eur Arch Paediatr Dent* 2006; 7: 64-71.

27. Markovic D, Zivojinovic V, Vucetic M. Evaluation of three pulpotomy medicaments in primary teeth. *Eur J Paediatr Dent* 2005; 6: 133-8.

28. Nadin G, Goel BR, Yeung CA, Glenn AM. Pulp treatment for extensive decay in primary teeth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003; 1: 1-45.

29. Casas MJ, David J. Kenny J, Peter L. Judd PL, Johnston H. Do We Still Need Formocresol in Pediatric Dentistry? *J Can Dent Assoc.* 2005; 71: 749-51.

30. Casas MJ, Layug MA, Kenny DJ, Johnston DH, Judd PL. Two-year outcomes of primary molar ferric sulfate

pulpotomy and root canal therapy. *Pediatr Dent.* 2003; 25: 97-102.

31. Huth KC, Paschos E, Hajek-Al-Khatar N, Hollweck R, Crispin A, Hickel R, et al. Effectiveness of 4 Pulpotomy Techniques-Randomized Controlled Trial. *J Dent Res.* 2005; 84: 1144-8.

32. Ibricevic, H, Al-Jame, Q. Ferric sulphate and formocresol in pulpotomy of primary molars: long term follow-up study. *Eur J Paediatr Dent.* 2003; 4: 28-32.

33. Land MF, Couri CC, Johnston WM. Smear layer instability caused by hemostatic agents. *J Prosthet Dent.* 1996; 76: 477-82.

34. Ayo-Yusuf OA, Driessen CH, Botha AJ. SEM-EDX study of prepared human dentine surfaces exposed to gingival retraction fluids. *J Dent.* 2005; 33: 731-9.

35. Salako N, Joseph B, Ritwik P, Salonen J, John P, Junaid TA. Comparison of bioactive glass, mineral trioxide aggregate, ferric sulfate, and formocresol as pulpotomy agents in rat molar. *Dent Traumatol.* 2003; 19: 314-20.

36. Patchett CL, Srinivasan V, Waterhouse PJ. Is there life after Buckley's formocresol? Part II – Development of a protocol for the management of extensive caries in the primary molar. *Int J Paediatr Dent.* 2006; 16: 199-206.

37. O'Keefe KL, Pinzon LM, Rivera B, Powers JM. Bond strength of composite to astringent-contaminated dentin using self-etching adhesives. *Am J Dent.* 2005; 18: 168-72.

38. Ultradent Products Inc. ViscoStat® & ViscoStat® Wintermint ferric sulfate coagulative hemostatic agents INST.

[Internet]. Ultradent Products Inc.; © 2015 [consultado 21 de junio 2015]. Disponible en: <https://www.ultradent.com/es/Productos-Dentales/Manejo-de-Tejidos/Hemostaticos/ViscoStat-20-Ferric-Sulfate-Gel/Pages/default.aspx>

39. Tarighi P, Khoroushi M. A review on common chemical hemostatic agents in restorative dentistry. *Dent Res J*. 2014; 11: 423–8.

40. Ibricevic H, al-Jame Q. Ferric sulfate as pulpotomy agent in primary teeth: Twenty month clinical follow-up. *J Clin Pediatr Dent*. 2000; 24: 269-72.

41. Shaw DH, Krejci RF, Kalkwarf KL, Wentz FM. Gingival response to retraction by ferric sulfate (Astringedent). *Oper Dent*. 1983; 8: 142-7.

42. Kuphasuk W, Harnirattisai C, Senawongse P, Tagami J. Bond strengths of two adhesive systems to dentin contaminated with a hemostatic agent. *Oper Dent*. 2007; 32: 399-405.

43. Land MF, Hoaenstiel SF, Sandrik JL. Disturbance of the dentinal smear layer by acidic hemostatic agents. *J Prosthet Dent*. 1994; 72: 4-7.

44. McNally S, Kimmes N, Barkmeier W. Hemostatic agent rinse time effect on composite to Dentin Bond [Internet] IADR 2008: IADR 86^o General Session and Exhibition; 2008 Jul 1-5; Toronto, Ontario; [consultado el 20 de junio de 2015]. Disponible en: <https://iadr.confex.com/iadr/2008Toronto/techprogramforcd/A104342.htm>.

45. Camp JH. Tratamiento endodóntico en pediatría. En Cohen S, Burn R, editores. Vías de la Pulpa. 8ª ed. España. Hartcourt, 2002: 439-59.

46. Hafez AA, Kopel HM, Cox CF. Pulpotomy reconsidered: application of an adhesive system to pulpotomized permanent primate pulps. Quintessence Int. 2000; 31: 579-89.

47. Zulfikaroglu BT, Atac AS, Cehreli Z. Clinical performance of Class II adhesive restorations in pulpectomized primary molars: 12-month results. J Dent Child (Chic). 2008; 75: 33-43.

48. Borges AFS, Bittar RA, Kantovitz KR, Correr AB, Martin AA, Puppim Rontani RM. New perspectives about molecular arrangement of primary and permanent dentin. Appl Surf Sci. 2007; 254: 1498-505.

49. Prabhakar AR, Bedi S. Effect of glutaraldehyde and ferric sulphate on shear bond strength of adhesives to primary dentin. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2008; 26: 109-13.

50. Saunders WP, Saunders EM. Coronal leakage as a cause of failure en root-canal therapy. Endod Dent Traumatol. 1994; 10: 105-8.

51. Baghdadi ZD. Bond strengths of Dyract AP compomer material to dentin of permanente and primary molars: Phosporic acid versus nonrinse conditioner. J Dent Child. 2003; 70:145-52.

52. Nakornchai S, Harnirattisai C, Surarit R, Thiradilok S. Microtensile bond strength of a total-etching versus self-

etching adhesive to caries-affected and intact dentin in primary teeth. *J Am Dent Assoc.* 2005; 136: 477-83.

53. Caceda JH. The use of resin-based composite restorations in pulpotomized primary molars. *J Dent Child (Chic).* 2007; 74: 147-50.

54. El-Kalla IH, García-Godoy F. Fracture strength of adhesively restored pulpotomized primary molars. *J Dent Child.* 1999; 66: 238-42.

55. Pinto Gdos S, Oliveira LJ, Romano AR, Schardosim LR, Bonow ML, Pacce M, et al. Longevity of posterior restorations in primary teeth: results from a paediatric dental clinic. *J Dent.* 2014; 42: 1248-54.

56. Yengopal V, Harneker SY, Patel N, Siegfried N. Dental fillings for the treatment of caries in the primary dentition. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009; 15: CD004483.

57. Dos Santos Pinto G, Correa Oliveira LJ, Romano AR, Rocha Schardosim LA, Menezes Bonow ML, Pacce M, et al. Longevity of posterior restorations in primary teeth: Results from a paediatric dental clinic. *J Dent.* 2014; 42: 1248–54.

58. Woody RD, Miller A, Staffanou RS. Review of the pH of hemostatic agents used in tissue displacement. *J Prosthet Dent.* 1993; 70: 191-2.

59. Bertolotti R. *Adhesion Dentistry Newsletter* 1998; 17.

60. Kimmes NS, Olson TL, Shaddy RS, Latta MA. Effect of ViscoStat and ViscoStat Plus on composite shear bond strength in the presence and absence of blood. *J Adhes Dent.* 2006; 8: 363-6.

61. Salama FS. Influence of zinc-oxide eugenol, formocresol, and ferric sulfate on bond strength of dentin adhesives to primary teeth. *J Contemp Dent Pract.* 2005; 3: 14-21.

62. Fathpour K, Khoroushi M. Effect of trichloroacetic acid hydrogel on self-etch adhesive bond strength to dental tissues. *J Contemp Dent Pract.* 2013; 14: 375-80.

63. Fischer DE. Tissue management needs for adhesive dentistry now and in the future. *Dent Clin North Am.* 1998; 42: 595-606.

64. Fischer DE. Update to procedural hemostasis and sulcular fluid control. *Pract Proced Aesthet Dent* 2003; 15: 781-3.

65. Sonmez D, Sari S, Çetinbas T. A Comparison of four pulpotomy techniques in primary molars: a long-term follow-up. *J Endod.* 2008; 34: 950-5.

66. Bolaños-Carmona V, González-López S, Briones-Luján T, De Haro-Muñoz C, De La Macorra JC. Effects of etching time of primary dentin on interface morphology and microtensile bond strength. *Dent Mater.* 2006; 22: 1121-9.

67. Churukian CJ. Methods of the histochemical stains and diagnostic application, web ed 2. [Internet] University of Rochester Medical Center, New York, USA: 2009; [consultado 22 de enero 2013]. Disponible en: <http://www.urmc.rochester.edu/path/zqu/StainsManual/index.html>.
68. Lillie RD. Histopathologic technic and practical histochemistry, ed 4. New York: McGraw-Hill, 1976: 507.
69. Perdigao J, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Vanherle G, Lopes AL. Field emission SEM comparison of four postfixation drying techniques for human dentin. *J Biomed Mater Res*. 1995 Sep; 29 (9): 1111-20.
70. Badiel CB, Berry EE. Spectra structure correlations in hydroxy and fluorapatite. *Spectrochim Acta* 1996; 22: 1407-16.
71. Chang MC, Tanaka J. FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. *Biomaterials*. 2002 Dec; 23: 4811-8.
72. Özok AR, Wu MK, De Gee AJ, Wesselink PR. Effect of dentin perfusion on the sealing ability and microtensile bond strengths of a total-etch versus an all-in-one adhesive. *Dent Mater*. 2004; 20: 479-86.

73. Scherrer SS, Cesar PF, Swain MV. Direct comparison of the bond strength results of the different test methods: A critical literature review. *Dent Mater.* 2010; 26: e78-93.

74. Ricci HA, Sanabe ME, De Souza Costa CA, Hebling J. Bond strength of two-step etch-and-rinse adhesive systems to the dentin of primary and permanent teeth. *J Clin Pediatr Dent.* 2010; 35: 163-8.

75. 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.* 2000; 79: 1385-91.

76. Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res.* 2004; 83: 216-21.

77. Çinar C, Odabas ME, Akca G, Işık B. Antibacterial effect of a new haemostatic agent on oral microorganisms. *J Clin Exp Dent.* 2012 ; 4: e151–5.

78. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2 year in vitro study. *Dent Mater.* 2010; 26: 320-5.

79. Gwinnett AJ. Smear layer: morphological considerations. *Oper Dent.* 1984; 3: 2–12.

80. Rodríguez-Priego E, Bolaños-Carmona MV, González-López S, Briones-Luján MT. Effects of chlorhexidine on the

dentin of ferric sulphate pulpotomized primary teeth [abstract END 170]. Clin Oral Invest. 2009; 67: 111-2.

81. Ritts AC, Li H, Yu Q, Xu C, Yao X, Hong L, Wang Y. Dentin surface treatment using a non-thermal argon plasma brush for interfacial bonding improvement in composite restoration. Eur J Oral Sci. 2010; 118: 510–6.

82. Kim J, Uchiyama T, Carrilho M, Agee KA, Mazzoni A, Breschi L, et al. Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. Dent Mater. 2010; 26: 771-8.

83. Astra Zeneca Farmaceútica España. Hibimax 5% solución concentrada 100 mL. [Internet]. [consultado 20 de enero de 2015] Disponible en: <http://nomenclator.org/medicamento/hibimax-5-500ml-solucion-concentrada.html>.

84. Sano H, Yoshikawa T, Pereira PN, Kanemura N, Morigami M, Tagami J, et al. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo. J Dent Res. 1999; 78: 906-11.

85. Beloicaa M, Goraccib C, Ramos Carvalhoc CA, Radovicd I, Margvelashvilie M, Vulicevicf ZR, et al. Microtensile vs Microshear Bond Strength of All-in-One Adhesives to Unground Enamel. J Adhes Dent. 2010; 12: 427-33.

86. Armstrong S, Geraldeli S, Maiab R, Araújo Raposo LH, Soares CJ, Yamagawaa J. Adhesion to tooth structure: A critical review of “micro” bond strength test methods. Dent Mater. 2010; 26: e50–62.

87. Ferrari M, Goracci G, Garcia-Godoy F. Bonding mechanism of three one-bottle systems to conditioned and unconditioned enamel and dentin. *Am J Dent.* 1997; 10: 224-30.

88. Mine A, De Munck J, Cardoso M V, Van Landuyt KL, Poitevin A, Kuboki T, et al. Bonding effectiveness of two contemporary self-etch adhesives to enamel and dentin. *J Dent.* 2009; 37: 872-83.

89. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL. State of the art of self-etch adhesives. *Dent Mater.* 2011; 27: 17-28.

90. Cardoso MV, De Almeida Neves A, Mine A, Coutinho E, Van Landuyt K, De Munck J, et al. Current aspects on bonding effectiveness and stability in adhesive dentistry. *Aust Dent J.* 2011; 56: 31-44.

91. Perdigão J, Sezinando A, Monteiro PC. Effect of substrate age and adhesive composition on dentin bonding. *Oper Dent.* 2013; 38: 267-74.

92. Johnsen DC. Comparison of primary and permanent teeth. In: Avery JK, editor. *Oral Development and Histology.* Philadelphia (PA): BC Decker; 1987: 180-90.

93. Courson F, Bouter D, Ruse ND, Degrange M. Bond strength of nine current dentin adhesive systems to primary and permanent teeth. *J Oral Rehabil.* 2005; 32: 296-303.

94. Nör JE, Feigal RJ, Dennison JB, Edward CA. Dentin bonding: SEM comparison of the resin–dentin interface in primary and permanent teeth. *J Dent Res.* 1996; 75: 1396-403.

95. Koutsi V, Noonan RG, Horner JA, Simpson MD, Matthews WG, Pashley DH. The effect of dentin depth on the permeability and ultrastructure of primary molars. *Pediatr Dent.* 1994; 16: 29-35.

96. Burrow MF, Nopnakepong U, Phrukkanon S. A comparison of microtensile bond strengths of several dentin bonding systems to primary and permanent dentin. *Dent Mater.* 2002; 18: 239-45.

97. Osorio R, Aguilera FS, Otero PR, Romero M, Osorio E, García-Godoy F, et al. Primary dentin etching time, bond strength and ultra-structure characterization of dentin surfaces. *J Dent.* 2010; 38: 222-31.

98. Sardella TN, Alves De Castro FL, Sanabe M E, Hebling J. Shortening of primary dentin etching time and its implication on bond strength. *J Dent.* 2005; 33: 355-62.

99. Shashikiran ND, Gunda S, Subba Reddy VV. Comparison of resin–dentine interface in primary and permanent teeth for three different durations of dentine etching, *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2002; 20: 124–31.

100. 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: 569-76.

101. De Araujo FB, García-Godoy F, Issáo M. A comparison of three resin bonding agents to primary tooth dentin. *Pediatr Dent.* 1997; 19: 253-7.

102. Sanabe ME, Kantovitz KR, Costa CA, Hebling J. Effect of acid etching time on the degradation of resin-dentin bonds in primary teeth. *Am J Dent.* 2009; 22: 37-42.

103. Pimenta RA, Resende Penido CVS, De Almeida Cruz R, Alves JB. Morphology of the dentin on primary molars after the application of phosphoric acid under different conditions. *Braz Oral Res.* 2010; 24: 323-8.

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

105. De Munck J, Mine A, Van Den Steen PE, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, et al. Enzymatic degradation

of adhesive–dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. *Eur J Oral Sci* 2010; 118: 494-501.

7. ANEXOS

ANEXO I: INFORME FAVORABLE DE APROBACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN POR EL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA



Universidad de Granada
Vicerrectorado de Política
Científica e Investigación

COMISIÓN DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA

La Comisión de Ética en Investigación de la Universidad de Granada, oído el informe preliminar del Presidente del Comité en Investigación Humana, emite informe favorable a la metodología en la investigación titulada "Efectos del sulfato férrico en la dentina de molares temporales" que dirige D./Dña. Victoria Bolaños Carmona, quedando registrada con el nº: 355.

Granada a 18 de febrero de 2010

LA PRESIDENTA

Fdo: M^a Dolores Suárez Ortega

LA SECRETARIA

Fdo: M^a Luisa Calvache Quesada