



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA RESTAURADORA
AREA DE BIOMATERIALES DENTALES**

“ANÁLISIS MORFOESTRUCTURAL AL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO, DEL EFECTO GENERADO SOBRE DENTINA SANA, LUEGO DE UTILIZAR TRES ESTRATEGIAS DIFERENTES DE ADHESIÓN”

Daniel Esteban Segovia Collins

**TRABAJO DE INVESTIGACION
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Marcelo Bader M.

TUTORES ASOCIADOS

**Prof. Dr. Cristián Astorga M.
Dr. Pedro Terrazas S.**

**Santiago - Chile
2010**

*A mis padres, por comprometer
sus esfuerzos en la realización
de cada uno de mis proyectos...*

Agradecimientos

Quisiera agradecer a las siguientes personas que hicieron posible la realización de este trabajo:

- A mi tutor de tesis, Prof. Dr. Marcelo Bader, por su apoyo y excelente disposición para atender todas las inquietudes y problemáticas propias de este trabajo, como también por su cordialidad y buen sentido del humor, cualidades que estuvieron siempre presentes a lo largo de todo el proceso.
- Al personal de laboratorio de Microscopía Electrónica CESAT-ICBM, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en especial a la Prof. Nancy Olea, por su amabilidad y ayuda en el procesamiento de las muestras y manejo del microscopio electrónico.
- Al Laboratorio de Química de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, en especial al Prof. Ismael Yévenes, por facilitar reactivos e instrumental necesario para la preparación de las muestras.
- A aquellos funcionarios y docentes de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, con los cuales se generó no sólo una relación de respeto, sino también de amistad.
- A mis compañeros y amigos más cercanos, en especial a Gonzo, Guga y Panchito, por hacer el paso por la universidad una travesía llena de anécdotas y momentos memorables.
- A mi familia, por brindarme su incondicional apoyo, fuerza y comprensión, y ser los responsables de todos mis logros.
- De forma especial, quisiera agradecer a Macarena, por su inigualable cariño y ternura, a quién debo vivir una de las mejores etapas de mi vida.

Índice

▪ Introducción.....	1
▪ Marco Teórico.....	5
▪ Contracción de Polimerización de las Resinas Compuestas y su Efecto Sobre la Interface Adhesiva.....	5
▪ Adhesión.....	9
▪ La Dentina como sustrato Adhesivo.....	10
▪ Técnica de Hibridización por Grabado Ácido de la Dentina.....	14
▪ Técnica de Integración del Barro Dentinario mediante Sistemas Adhesivos Autograbantes.....	20
▪ Deterioro de la interface adhesiva.....	26
▪ Técnica de Desproteinización de la Dentina o Hibridación Reversa.....	28
▪ Objetivos.....	31
▪ Material y Método.....	33
▪ Resultados.....	42
▪ Discusión.....	51
▪ Conclusiones.....	61
▪ Sugerencias.....	63
▪ Referencias Bibliográficas.....	64

Resumen

Debido a la complejidad de la dentina como sustrato, la búsqueda de una adhesión menos sensible, más simplificada y más estable en el tiempo, sigue siendo un desafío. El objetivo de este estudio fue observar si existen diferencias morfológicas en el efecto generado sobre dentina sana, producto del acondicionamiento mediante la Técnica de Hibridización Convencional, la Técnica de Integración con un adhesivo autograbante, y la Técnica de Desproteización seguida de un adhesivo autograbante. Para ello, se obtuvo 6 discos de dentina preparados por una fresa de diamante, más 1 producido por fractura. Para observar la morfología de la superficie dentinaria, 3 discos fueron acondicionados siguiendo cada una de las técnicas nombradas anteriormente: 1.1 grabado ácido de la dentina; 1.2 autograbado de la dentina; 1.3 Desproteización de la dentina por la aplicación de NaOCl 10%. Para observar la morfología de la superficie adhesiva, los otros 3 discos fueron acondicionados y restaurados según las 3 estrategia de adhesión: 2.1 Aplicación de un sistema adhesivo de grabado y lavado Single Bond (3M ESPE, St. Paul MN, USA); 2.2 Aplicación de sistema autograbante Adper SE Plus (3M ESPE, St. Paul MN, USA); 2.3 Aplicación de sistema autograbante Adper SE Plus, sobre dentina desproteizada con NaOCl 10%. Posteriormente cada disco fue procesado para su observación en el MEB. Las imágenes obtenidas permitieron apreciar que existen diferencias morfológicas en la superficie dentinaria fresada, luego de que ésta es acondicionada por cada una de las 3 estrategias estudiadas. El grabado ácido provocó un efecto marcado, permitiendo la difusión del adhesivo dentro de los túbulos formando una superficie rica en tags de morfología uniforme. El sistema autograbante provocó un efecto tímido, permitiendo una infiltración poco homogénea del adhesivo generando menor cantidad de tags morfología variable. La aplicación NaOCl, produjo un efecto discreto sobre la superficie dentinaria, generando una morfología de la superficie adhesiva similar a la del sistema autograbante, pero produciendo un aumento significativo en la formación de tags. Aunque no fue objetivo de este estudio, se apreciaron estructuras de apariencia similar a los tags de resina, los cuales podrían ser artefactos de la técnica, debido a la persistencia de una vaina tubular de naturaleza orgánica luego del procesamiento de las muestras.

Introducción

Las resinas compuestas de aplicación directa corresponden a uno de los materiales restauradores estéticos de mayor uso en Chile,¹ debido a sus altas cualidades estéticas y su cómoda manipulación sobre las preparaciones cavitarias.^{2,3}

Dentro de los fenómenos asociados a las resinas compuestas, destacan la contracción de polimerización y la falta de unión específica a la estructura dentaria. La contracción de polimerización puede ser contrarrestada aplicando la resina en la cavidad mediante técnica incremental,^{4,5} y además procurando llevar a cabo un correcto fotocurado.^{6,7} Sin embargo, la adhesión sigue representando un punto débil para la longevidad de la restauración ya que, al no ser realizada eficazmente, permitiría la formación de brechas marginales y microfiltración.⁸

Buonocore en la década de los 50's, fue pionero en la realización de resinas acrílicas bajo el principio de adhesión que ha regido en los últimos tiempos.⁹ Este principio fundamental de la adhesión al sustrato dentario se basa en un proceso de intercambio, en el cual la porción inorgánica dentaria es reemplazada por resina sintética.

Debido a la naturaleza del esmalte, la adhesión a su estructura ha sido conseguida con relativo éxito.^{10,11} En cambio, la situación en dentina es distinta, ya que allí la adhesión es menos predecible y más problemática que en esmalte.

La ultraestructura e histología de la dentina es más compleja que la del esmalte, presentando un mayor porcentaje de contenido orgánico, actividad biológica, composición tubular, humedad, y también la presencia de una entidad denominada barro dentinario.^{12,13}

Para lograr la adhesión a dentina, la odontología adhesiva ha desarrollado dos grandes estrategias de acondicionamiento, dependiendo de cómo el adhesivo

interactúa con el barro dentinario: la técnica de grabado y lavado de la dentina, y la técnica de integración del barro dentinario al sustrato adhesivo.^{10,11}

En la técnica de grabado y lavado, la dentina es desmineralizada con ácido ortofosfórico generando la remoción del barro dentinario y produciendo la apertura de los túbulos dentinarios. A su vez, ocurre una remoción de la fase mineral de la superficie de la matriz dentinaria, exponiendo un entramado proteico compuesto principalmente por fibras colágenas mantenidas por puentes de hidrógeno dados por las moléculas de agua, que luego de la disolución de la fase mineral, ocupan los espacios interfibrilares. Sobre esta superficie acondicionada, el adhesivo fluye hacia el interior de los túbulos dentinarios y a los espacios interfibrilares, formando tags de resina y trabazón entre las fibras colágenas, generando retención micromecánica luego de ocurrida la polimerización.^{10,11}

Este proceso se ha definido como Técnica de Hibridación de la dentina, y es el mecanismo que dará lugar a tags de resina y a una zona híbrida que se interpone entre la estructura dentaria y la restauración.^{10,11,14,15} Este sistema de adhesión es el más utilizado, y ha demostrado tener altos valores de adhesión y sellado marginal.^{10,11}

No obstante, surge una dificultad clínica, puesto que si la dentina es desecada, el colágeno expuesto sin sustento mineral colapsará, obteniéndose una dentina inadecuada para la adhesión.^{14,16,17} Además se ha descrito en la literatura, que la profundidad de desmineralización lograda con el ácido ortofosfórico puede llegar a ser superior a la penetración del adhesivo, produciéndose entre ambos un espacio muerto que puede dar paso a una degradación hidrolítica de las fibras colágenas no hibridadas, luego de estar expuestas a fluidos por largos periodos de tiempo.^{18,19,20}

Es por ello que se plantea un procedimiento alternativo de acondicionamiento dentinario, como es la Técnica de Integración del barro dentinario al sustrato adhesivo.^{10,11} Ella se realiza por medio de la aplicación de un sistema adhesivo autograbante compuesto por monómeros ácidos funcionales, los

cuales tienen la capacidad de, tanto en esmalte como en dentina, imprimir y promover la difusión de monómeros dentro de las porosidades, al mismo tiempo en que la superficie es desmineralizada por ellos.^{21,22} Esto permite la eliminación del paso de grabado y lavado de la superficie, simplificando la técnica, además de promover una disolución parcial del barro dentinario, la cual permite generar una capa híbrida en la dentina subyacente, e incorporar en ella al barro dentinario y los minerales producidos en su disolución. Junto a una interacción micromecánica, también se han descrito interacciones de tipo iónico, las cuales ocurren entre los minerales incorporados al sustrato y los monómeros funcionales, efectuándose de esta forma una unión a nivel químico que favorecería la adhesión.²³

Sin embargo, algunos estudios *in Vitro* señalan que dichos adhesivos autograbantes no sólo obtienen menores valores de adhesión, sino que al comportarse como una membrana semi-permeable, permiten el movimiento de fluido dentinario a través de ella, lo que llevaría a una potencial degradación hidrolítica del adhesivo y del componente orgánico.^{10,19}

Debido a la complejidad del proceso de adhesión a dentina, los investigadores han estudiado otras estrategias adhesivas alternativas.

Una de ellas, consiste en conseguir una situación de adhesión semejante a esmalte, mediante la remoción del componente orgánico, tanto del barro dentinario como de la superficie de la matriz dentinaria, mediante un agente desproteinizante.^{24,25}

Para conseguir la desproteización de la superficie dentinaria, se ha planteado la utilización de hipoclorito de sodio, donde la eliminación de las fibras proteicas crearía espacios y porosidades en la fase mineral mayores que los espacios interfibrilares, hibridizándose la superficie libre de colágeno mediante la difusión del adhesivo a través de una superficie más hidrofílica y permeable.²⁶ Sobre esta superficie desproteizada y libre de barro dentinario, el componente mineral de la matriz dentinaria puede ser impregnado por un sistema adhesivo de autograbado,^{27,28} cuyos monómeros ácidos pueden difundir a través de la dentina

e incorporar minerales al sustrato adhesivo, ocupando su potencial químico y permitiendo que se forme una capa intermedia compacta entre el adhesivo y la dentina desproteinizada.

Dado los antecedentes señalados anteriormente, las estrategias de acondicionamiento utilizadas para lograr adhesión a dentina, debieran generar cambios morfológicos sobre la superficie dentinaria tratada, los cuales a su vez debiesen repercutir en la morfología de la interface adhesiva a nivel ultraestructural. Dichos cambios morfológicos serían las manifestaciones estructurales de los procesos que participan en la generación de la zona de interdifusión diente-resina.

Es por ello que el presente estudio busca observar, mediante la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), si existen diferencias morfológicas a nivel ultraestructural, luego de acondicionar la dentina mediante la técnica de hibridación convencional, la técnica de integración y la técnica de desproteinización de la dentina.

El siguiente trabajo corresponde a un estudio de tipo descriptivo, donde se utilizará la observación como método de investigación.

Marco Teórico

Contracción de Polimerización de las Resinas Compuestas y su Efecto Sobre la Interface Adhesiva

Los biomateriales restauradores son utilizados a diario en la clínica odontológica con el propósito de recuperar la funcionalidad integral de la pieza dentaria y mejorar su estética, así como también prevenir, detener o recuperar la pérdida parcial de su estructura.^{2,3}

Entre los biomateriales restauradores de aplicación directa, las resinas compuestas a base de dimetacrilato han sido ampliamente usadas en el mundo por más de treinta años,²⁹ y corresponden a uno de los materiales de mayor uso en Chile.¹ Esto se debe, en gran medida, a que poseen ciertas cualidades que destacan por sobre las de otros materiales restauradores, dentro de los que se pueden nombrar dar la posibilidad de homologar o imitar el color de los dientes, tener una adecuada manipulación y biocompatibilidad, así como también permitir realizar preparaciones biológicas más conservadoras según los cánones actuales de la odontología mínimamente invasiva.³⁰

En los últimos diez años, ha ocurrido un dramático mejoramiento en la formulación y composición de los agentes adhesivos como también de las resinas compuestas, hecho que ha incentivado a los odontólogos a inclinarse en la selección de dichos materiales para la realización de restauraciones en el sector anterior como posterior, en la medida que presenten una adecuada dureza y resistencia al desgaste, así como también permitan al operador lograr un adecuado contacto y contorno proximal.³¹ Sin embargo, las resinas compuestas presentan otros fenómenos adversos asociados a su manipulación, siendo el clínico quién debe ser capaz de controlarlos, como son la contracción de polimerización y la falta de unión específica a la estructura dentaria, siendo esta última realizada mediante una técnica adhesiva altamente sensible.

La contracción de polimerización en una resina compuesta fluctúa entre el 2% al 6% de su volumen,^{29,31,32} y es resultado de la conversión de moléculas monoméricas en una gran red de polímeros entrecruzados. Esta contracción induce stress y tensión en el complejo diente/restauración.³³

Además de la reducción volumétrica, el crecimiento y entrecruzamiento de las cadenas poliméricas también resulta en un incremento del módulo elástico.³⁴ En el transcurso de la polimerización, el módulo elástico del composite aumenta substancialmente hasta alcanzar un valor tal, que no permite la deformación plástica suficiente para compensar la reducción en volumen producto de su contracción. Luego de este estado, cualquier contracción adicional podría generar una cantidad de stress significativa tanto dentro del composite, como en la interface adhesiva entre las paredes cavitarias y la restauración.³²

Dentro de los factores involucrados en la contracción de polimerización de las resinas compuestas, existen aquellos inherentes a la composición y comportamiento visco-elástico de ellas, como también aquellos que dependen de los procedimientos clínicos, destacando entre éstos la configuración cavitaria, la forma de aplicación de la resina dentro de la preparación biológica y el método en que se lleva a cabo el proceso de fotocurado.

Para relacionar la configuración cavitaria de la preparación biológica, con el stress generado en la interface adhesiva producto de la contracción de polimerización del composite, resulta necesario referirse al “factor c”.

El factor de configuración cavitaria o “factor c”, es la razón o cociente entre el área de las superficies adheridas y el área de las superficies libres o no adheridas³⁵. Mientras mayor sea el factor c, mayor será el stress o tensión generado entre la resina, la pared cavitaria y la interface adhesiva. Este valor aumenta en aquellas cavidades que presenten la mayor cantidad de superficies adheridas, como en el caso las cavidades clase I. También se ha descrito que mientras más profunda sea la preparación, tanto el factor c como la profundidad de la dentina se conjugan para que los menores valores de fuerza adhesiva sean

registrados en el piso de la cavidad.^{36, 37} Además se ha señalado que el efecto del factor c en la adhesión también depende del tamaño de la cavidad, siendo más afectadas aquellas cavidades de mayor volumen que aquellas más pequeñas.³⁷

Como consecuencia de lo anterior, desarrollar una correcta técnica de manipulación y aplicación de la resina en la preparación biológica, puede transformarse en una herramienta útil para contrarrestar la generación adicional de stress como consecuencia de la contracción de polimerización, tanto en el composite como en la interface diente/restauración.

Diversos estudios señalan que en cavidades de mayor volumen, la aplicación del composite en un solo mono incremento resulta en menores valores de fuerza adhesiva, formación de brechas marginales y mayor contracción de polimerización.^{37,38,39} La técnica incremental se basa en la aplicación y polimerización de pequeñas capas de composite menores a 2mm de grosor, donde la reducción del volumen de cada incremento producto de su contracción, puede ser compensada por la aplicación del siguiente que viene a continuación,^{4,5} permitiendo también alcanzar una polimerización más completa de toda la restauración. De esta forma, para restauraciones en piezas posteriores, se puede realizar una técnica de reconstrucción por cúspides,^{5,40} donde el primer incremento de no más de 1-1,5 mm de grosor, es aplicado en una única superficie dentaria sin contactar con las paredes cavitarias opuestas, seguido de la aplicación de una serie de pequeños incrementos con forma de cuña en sentido apico-coronal, los cuales son condensados y esculpidos directamente en la preparación siguiendo la forma de la cúspide, mediante el uso de espátulas y talladores para composite. Al reconstruir cada cúspide por separado, se produce una disminución del factor c , lo que implica por ende, una disminución en el stress generado en la interface producto de la contracción de polimerización.^{5,40}

Como se señaló anteriormente, el modo empleado para llevar a cabo la fotopolimerización también afecta el comportamiento del composite. Se ha descrito que existen diferencias respecto a la contracción de polimerización, como también en el grado de conversión y entrecruzamiento de las cadenas poliméricas, los

cuales repercuten sobre las propiedades mecánicas del composite, en relación a la utilización de un determinado protocolo de fotocurado. Éste a su vez, es determinado por la intensidad, tiempo de exposición y total de energía aplicada durante el transcurso del proceso.^{41,42,43}

Entre los métodos de fotocurados más estudiados destacan el curado continuo o convencional, la fotopolimerización retardada y la fotopolimerización incremental.^{6,7}

En el primero, la intensidad de energía es mantenida de igual forma durante todo el fotocurado. En el segundo método, el curado se inicia con un “pulso” de corta exposición, interrumpido por uno o más minutos, para luego completar el curado con una mayor intensidad de energía. Finalmente, la fotopolimerización incremental, consiste en una exposición a una baja intensidad de energía en el primer periodo del curado, para luego continuar con la aplicación de una mayor intensidad hasta el término del proceso de fotopolimerización.⁶

Estos dos últimos protocolos también han sido llamados como “métodos de curado de inicio suave”, y se han desarrollado para disminuir y controlar en cierta medida la cantidad de stress generada como consecuencia de la polimerización. Sin embargo, pese a que algunos estudios señalan que con los métodos de curado de inicio suave existe menor contracción volumétrica y menor formación de brechas marginales,^{44,45} esto se llevaría a cabo a expensas de una reducción en el grado de conversión, largo y grado de entrecruzamiento de las cadenas poliméricas en la matriz, dando como resultado un composite con menores propiedades físicas y estabilidad en el tiempo, principalmente en aquellas restauraciones curadas por fotopolimerización retardada.^{6,7}

Según los antecedentes planteados anteriormente, el stress consecutivo a la contracción de polimerización de las resinas compuestas se convierte en uno de los principales mecanismos que vulnera la interface diente/composite. Al inicio del curado, la contracción del composite ejerce una fuerza de tracción sobre la pared cavitaria, la cual es resistida por adherencia gracias a la ayuda del sistema

adhesivo. A medida que transcurre la polimerización, el stress generado sobre la interface puede aumentar hasta el punto de superar la fuerza de adhesión, produciéndose de esta forma una separación o brecha en la interface.^{33,46}

Cualquier brecha en la interface debe ser considerada como una falla en la adhesión, siendo inaceptable para el éxito clínico de la restauración durante el tiempo. En consecuencia, no sólo es necesario llevar a cabo aquellos procedimientos que disminuyan o permitan controlar el stress generado por la polimerización, sino también lograr altos valores de adhesión y estabilidad entre las estructuras dentarias y los agentes adhesivos, que permitan mantener la integridad de la interface.

Adhesión

En odontología, la adhesión consiste en la unión íntima y permanente entre los materiales de restauración y la estructura dentaria, que permite dar paso a una continuidad entre ambas superficies. Esta continuidad, debiera lograr un adecuado sellado de la restauración. La ausencia de esta continuidad generará microfiltración marginal, la cual consiste en el flujo clínicamente indetectable de bacterias, fluidos, iones y moléculas a través de la interface diente/restauración,⁸ siendo ésta la principal causa de tinciones, sensibilidad operatoria y caries secundaria.^{47,48}

Buonocore fue quien primero reportó que al acondicionar el esmalte con ácido fosfórico al 85%, mejoraba la retención mecánica de una resina acrílica sobre la estructura dentaria⁹. La interacción entre la resina y el esmalte es el resultado del grabado ácido de la estructura adamantina, el cual permite manifestar en plenitud la energía superficial del esmalte, facilitando la posterior infiltración de monómeros de resina dentro de las microporosidades generadas por la disolución parcial de su estructura cristalina. Dichos monómeros envuelven los cristales de hidroxiapatita expuestos previamente, generando, luego de la polimerización in situ, un efecto reológico y micromecánico.¹⁰

Desde entonces, el principio fundamental de la adhesión al sustrato dentario se basa en un proceso de intercambio, en el cual la porción inorgánica dentaria es reemplazada por resina sintética.⁴⁹

Este principio ha regido la adhesión a esmalte mediante el grabado ácido de su superficie y posterior aplicación del sistema adhesivo con gran éxito durante décadas.^{50, 10}

En términos generales, la estructura del esmalte se compone en un 98% de material inorgánico, cerca de un 2% de agua, y una pequeña fracción orgánica compuesta principalmente por proteínas.⁵¹ Dentro de la porción inorgánica, el componente más abundante es la hidroxiapatita. Su estructura histológica básica son los prismas del esmalte, quienes se presentan como varillas altamente mineralizadas que atraviesan todo su espesor desde el límite amelodentinario hasta la superficie libre, cuya sección transversal ha sido descrita semejante a un “ojo de cerradura”.¹²

Tanto la estructura como histología del esmalte, hacen de éste un sustrato amigable y reactivo para llevar a cabo el principio de la adhesión previamente mencionado, resultando en altos valores de resistencia adhesiva, bajos niveles de microfiltración y una adecuada estabilidad de la interface esmalte-resina durante el tiempo.¹⁰

Sin embargo, debido a las diferencias de composición e histología entre el esmalte y dentina, el proceso de adhesión sobre esta última involucra fenómenos más complejos y sensibles, acordes a la naturaleza del sustrato adhesivo.

La dentina como sustrato adhesivo

A diferencia del esmalte, la estructura de la dentina se compone de una matriz orgánica que representa aproximadamente un 30-40% de su volumen, un 20% de agua, y el resto en una fracción mineral, compuesta en su mayoría por cristales de hidroxiapatita y fosfato de calcio amorfo.^{52,53} Histológicamente, sus

unidades estructurales básicas son los túbulos dentinarios y la matriz dentinaria o intertubular.

La dentina es un tejido poroso densamente perforado por estructuras tubulares que alojan las prolongaciones citoplasmáticas de los odontoblastos situados en la periferia de la cámara pulpar: los túbulos dentinarios.^{54,58} Gracias a esto, la dentina no debe ser considerada como un tejido aislado, sino más bien como parte del complejo pulpo-dentinario.

La extensión de las prolongaciones odontoblásticas dentro de los túbulos excede el tercio medio de la dentina coronal, pudiendo incluso llegar hasta el límite amelo-dentinario.¹³ En la dentina próxima a la pulpa, existe un gran número de túbulos por unidad de superficie (aproximadamente 75.000 por mm^2), los cuales tienen un diámetro superior a 2,5 μm . A medida que los túbulos se aproximan al límite amelo-dentinario éstos disminuyen en número (15.000-20.000 por mm^2), así como también en diámetro, siendo éste cercano a 1 μm .⁵³

Entre el proceso o prolongación odontoblástica y la pared del tubo dentinario, se encuentra el espacio periprocesal. En su interior existen haces de fibras colágenas dispuestas tangencialmente al proceso odontoblástico. Algunos investigadores sugieren que en este espacio se alojan además las terminaciones nerviosas y la linfa dentinaria, las cuales se continúan con la fase fundamental del tejido conectivo pulpar.⁵³ En estado vital, la linfa dentinaria fluye en dirección centrífuga, debido a la presión pulpar positiva estimada en aproximadamente 11 mm Hg.⁵⁵ Este fluido no sólo le confiere una humedad propia a la dentina, que debe ser considerada a la hora de realizar los procedimientos adhesivos, sino que además participa en los procesos de transmisión del impulso nervioso, donde la dirección y sentido del flujo (desde o hacia el interior) depende de la naturaleza del estímulo.^{56,57}

En la mayoría de su recorrido, el lumen del tubo es forrado por una cubierta altamente mineralizada de dentina peritubular, la que contiene en su mayoría cristales de apatita y una pequeña matriz orgánica que prácticamente

carece de colágeno.^{13,53} Esta matriz orgánica está formada principalmente por sustancias como glicoproteínas, proteoglicanos y lípidos. Su fase mineral está compuesta por hidroxiapatita, magnesio, carbonatos de calcio y fosfato de calcio amorfo. Debido a que presenta una densidad mayor, la matriz peritubular vista en las microrradiografías se presenta más radiopaca que el resto de la matriz dentinaria, mostrándose como anillos aclarados en los cortes transversales o como delgadas franjas en los cortes longitudinales de los túbulos.⁵³

También se ha observado bajo microscopía electrónica de transmisión, la presencia de una vaina electrodensa que rodea el lumen del túbulo dentinario. Dicha estructura recibe el nombre de lámina límitans, y corresponde a la capa más interna e hipomineralizada de la dentina peritubular.⁵⁸ Su estructura se compone principalmente de lípidos y glicosaminoglicanos.^{58,59}

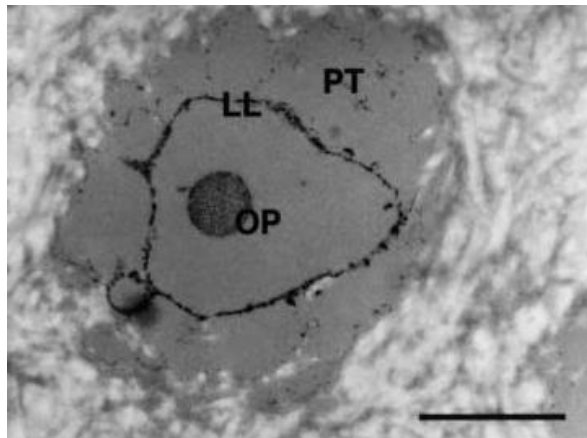


Figura 1. Corte transversal de un túbulo dentinario observado en Microscopía Electrónica de Transmisión. PT: Dentina Peritubular, LL: lamina límitans, OP: Prolongación Odontoblástica. Imagen tomada de Kunihiko Yoshida y cols 2002.⁵⁸

El resto de la matriz ubicada entre los túbulos recibe el nombre de matriz intertubular. Su fase mineral está compuesta principalmente por cristales de apatita de menor tamaño (aproximadamente 5x30x100nm), en comparación a los encontrados en esmalte, y contienen entre un 4-5% de carbonatos comparada con las hidroxiapatitas.¹³ Los principales componentes de la matriz orgánica son las fibras de colágeno tipo I y los proteoglicanos, quienes son producidos por los

odontoblastos durante su formación. Otra minoría de proteínas no colágenas, tales como las sialoproteínas dentinarias, fosfoforinas, proteínas morfogenéticas de hueso y factores de crecimiento insulínicos tipo I y II, completan la matriz orgánica.⁶⁰ El uso de diferentes técnicas de microscopía, en la que destacan la microscopía electrónica de transmisión y barrido, así como la microscopía de fuerza atómica, revelan una compleja red de estructuras fibrilares y globulares que constituyen un andamio en el tejido dentinario, donde posteriormente el mineral es depositado y precipitado durante el proceso de dentinogénesis, conformando de esta forma la dentina.⁶¹

El colágeno tipo I representa el esqueleto de la matriz orgánica de la dentina, en donde se ha demostrado que el ensamblaje de las fibras colágenas constituye una intrincada red de fibras de aproximadamente 70-90 nm de diámetro, conectadas con ramas menores de fibras proteicas no colágenas de aproximadamente 20-40 nm de diámetro.⁶¹ Por su parte, los proteoglicanos y las fosfoproteínas representan el principal constituyente de las proteínas no colágenas de la dentina,¹³ siendo responsables de estabilizar la estructura fibrilar colágena y del arreglo tridimensional de la matriz dentinaria, debido a su capacidad de llenar espacios, unir y organizar moléculas de agua, y repeler moléculas de carga negativa.⁶²

La estructura tubular y la presencia de fluido dentinario, hacen de la dentina un sustrato permeable,¹⁴ en donde el flujo transdental influye no sólo físic-químicamente sobre los sistemas adhesivos, sino que además el constante dinamismo dado por los fenómenos de difusión multidireccional del fluido, puede afectar biológicamente la interface diente-adhesivo, provocando sensibilidad post-operatoria, y también deterioro de las estructuras orgánicas comprometidas en la adhesión a través del tiempo.

Además, cuando la estructura dentaria es cortada por una fresa u otro instrumento, los componentes residuales forman una capa de unos cuantos micrones de grosor, adosada íntimamente a la superficie. Esta capa recibe el nombre de barro dentinario y no sólo cubre la superficie de la matriz dentinaria,

sino que además ocluye la entrada de los túbulos dentinarios, reduciendo así la permeabilidad dentinaria.¹¹ Su grado de unión a la dentina subyacente ha sido estimado en cerca de 5 MPa.¹³ El barro dentinario es poroso y permeable gracias a la presencia de canales sub-micrométricos que permiten el paso de fluido dentinario a través de él. Su composición básica consta de hidroxiapatita, fragmentos de colágeno alterado amorfo y por colágeno desnaturalizado en forma coloidal. Su grosor, rugosidad, densidad y grado de unión a la superficie dentaria subyacente, depende en gran medida del tipo de instrumento que la formó, así como de la profundidad y ubicación en la dentina.¹⁸

Como el barro dentinario constituye una verdadera barrera física, éste debe ser disuelto o volverse permeable, para que los monómeros del adhesivo puedan tomar contacto directamente con la superficie dentinaria subyacente. A pesar de las diferentes clasificaciones de los sistemas adhesivos, las estrategias de adhesión actuales dependen exclusivamente de cómo los adhesivos dentales interactúan con el barro dentinario. Una estrategia involucra adhesivos de grabado y lavado, en la cual se remueve el barro y la hidroxiapatita superficial de la dentina subyacente, mediante el grabado y acondicionamiento con ácido. La segunda estrategia involucra adhesivos autograbantes, quienes permeabilizan al barro dentinario sin removerlo completamente, incorporándolo como estrato adhesivo.¹¹

Considerando que ambas técnicas difieren entre sí en forma significativa, se desarrollarán a continuación.

Técnica de Hibridización por Grabado Ácido de la Dentina

En esta estrategia adhesiva, la dentina es grabada mediante la aplicación de un ácido, generalmente ácido ortofosfórico, el cual disuelve y remueve el barro dentinario, así como desmineraliza la mayoría de la hidroxiapatita superficial de la dentina subyacente. El grabado ácido remueve el barro dentinario que previamente ocluía la entrada de los túbulos, aumentando la permeabilidad intratubular, y además desmineraliza la matriz intertubular en una profundidad de hasta 2-7 μm , descubriendo la trama colágena fibrilar, generando permeabilidad

intertubular.^{14,63} Luego de retirado el ácido mediante un profuso lavado con agua, eliminando después el exceso de esta última, se aplica una mezcla de monómeros de resina disueltos en un solvente (orgánico o acuoso), que infiltran la dentina previamente grabada. Los monómeros de resina difunden a través de las fibras colágenas por los espacios que antes estaban ocupados por minerales, y luego reemplazados por agua, conformándose una unidad interconectada entre el adhesivo y el sustrato dentinario poroso, conocida como capa híbrida o zona de interdifusión diente-resina.^{11,14}

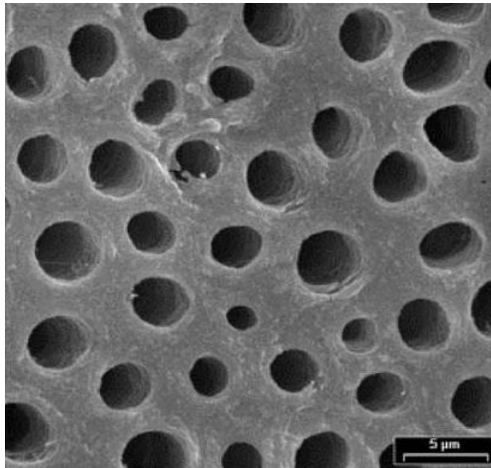


Figura 2. Superficie dentinaria acondicionada con ácido ortofosfórico al 35% por 15 seg, observada al Microscopio Electrónico de Barrido. Nótese la total remoción del barro dentinario y los tapones que bloqueaban los túbulos, descubriéndose la matriz intertubular y la entrada de los túbulos. Imagen tomada de S.A. Oliveira y cols.2003.⁶³

La difusión de adhesivo dentro de los túbulos dentinarios y su posterior polimerización in situ, dará lugar a prolongaciones resinosas llamadas tags que, asumiendo que se encuentran adheridos a las paredes del túbulo dentinario, permitirán el sellado tubular, previniendo la microfiltración y la sensibilidad dentinaria, además de proveer una fuente adicional de retención.^{64,15,14} Respecto a la difusión de monómeros a través de los espacios interfibrilares, es preferible que dicho proceso sea realizado de forma poco profunda y uniforme, que profunda y poco homogénea. De ésta forma, conseguir una adecuada permeabilidad interfibrilar y una uniforme infiltración de los monómeros que dan lugar a una capa híbrida compacta, se relaciona con altos valores de resistencia adhesiva.^{10,14}

Como los sistemas adhesivos de grabado y lavado son aplicados sobre el colágeno y los proteoglicanos de la matriz desmineralizada de la dentina, mantener la integridad estructural de estos componentes durante y después del grabado, debiera mejorar considerablemente la estabilidad final de la capa híbrida.¹⁹ Es por ello que el tiempo de grabado ácido de la dentina resulta clave para la creación de un sustrato adhesivo suficientemente permeable, pero además molecularmente estable.

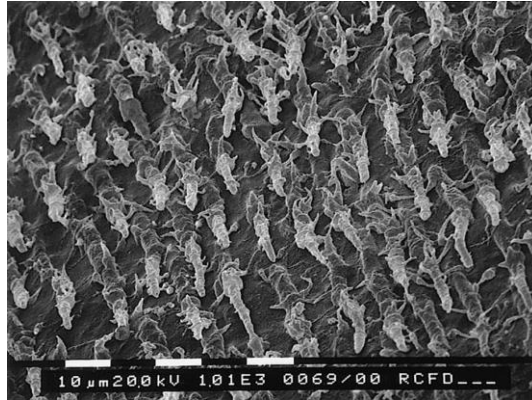


Figura 3. Superficie adhesiva de un sistema de grabado y lavado, vista al Microscopio Electrónico de Barrido. Se observan prolongaciones resinosas, llamadas tags, que siguen la forma del lumen de los túbulos dentinarios. Imagen tomada de M. Ferrari y cols 2001.⁶⁴

De esta forma, algunos investigadores han encontrado un correcto marcaje inmunohistoquímico en el colágeno y los proteoglicanos de la matriz dentinaria, luego de grabar la dentina por 15 segundos con ácido Ortofosfórico al 35%.⁶⁵ Una aplicación por un tiempo superior a 15 segundos, produce una mayor desmineralización y exposición de la matriz, pero a su vez, produce alteraciones en el marcaje inmunohistoquímico, lo que sugiere una alteración estructural de dichas proteínas en la matriz.⁶⁷

La incorporación de colágeno o proteoglicanos estructuralmente alterados en la capa híbrida, puede significar una degradación temprana de ésta, incluso antes de que sea formada, puesto que estas proteínas se encuentran molecularmente desestabilizadas con anterioridad a la impregnación con el adhesivo. Por dicha razón, el sobre grabado debe ser evitado, no sólo para evitar

una impregnación dispareja del adhesivo sobre la matriz⁶⁶, sino también para mantener su integridad estructural.¹⁹

La discrepancia entre la profundidad de desmineralización y la penetración del adhesivo representa un hecho desfavorable en esta técnica adhesiva, en cuanto se generan áreas con diferentes grados de hibridación, siendo las fibras de los sectores más profundos de la capa híbrida y aquellas de la matriz desmineralizada subyacente las más afectadas.⁶⁷ Esta infiltración incompleta y dispareja de los monómeros de resina sobre la matriz dentinaria desmineralizada, ha sido estudiada con la ayuda de inmunohistoquímica mediante marcaje con anticuerpos anti-colágeno tipo I, donde la capa híbrida creada por sistemas de grabado ácido muestra un débil marcaje en la parte superior, y un intenso marcaje en las áreas más profundas. Las fibras colágenas de la parte superficial de la capa híbrida se observan debidamente impregnadas o encapsuladas con adhesivo, previniendo el marcaje, mientras que las áreas más profundas muestran un mayor número de fibras colágenas expuestas o desnudas que permanecen parcialmente disponibles para la unión con el anticuerpo.⁶⁷ Este hecho confirma la hipótesis que sostiene que para sistemas adhesivos de grabado ácido, existen distintos niveles de interacción resina-colágeno, dependiendo del grado de penetración del adhesivo dentro de la matriz dentinaria desmineralizada.¹⁹ Una penetración menor de los monómeros comparada con la profundidad de desmineralización alcanzada por el grabado ácido, dará paso a un espacio vacío entre la zona más profunda de la capa híbrida y la matriz desmineralizada no hibridizada conocida como hiato sub-micrométrico⁶⁸. Esta región representa un punto débil en la adhesión, puesto que ahí se dará paso a la degradación o deterioro de la capa híbrida con el paso del tiempo.¹⁹

Junto a este hecho desfavorable, existen otros fenómenos que condicionan la correcta infiltración y difusión de los monómeros de resina dentro de los espacios interfibrilares dejados por la disolución de los cristales de apatita en la matriz dentinaria previamente grabada, repercutiendo directamente en la estabilidad e integridad de la capa híbrida. Entre los fenómenos más estudiados están el rol de la humedad dentinaria dentro del sustrato adhesivo, así como el

tipo de solvente y el efecto de su incorporación en forma residual dentro de la capa híbrida.

La humedad de la dentina y su manejo durante los diferentes pasos del procedimiento adhesivo, es sin duda el parámetro más sensible. Además de la humedad intrínseca de la dentina, se suma el exceso de agua dejado por el lavado o enjuague del ácido luego del procedimiento de grabado. Mantener un suficiente grado de humedad luego del grabado y lavado es esencial para evitar el colapso de las fibras colágenas desmineralizadas y proveer de una trama colágena porosa adecuada para la infiltración de los monómeros adhesivos⁶⁹. Por otro lado, un exceso de agua lleva a una disolución de los monómeros adhesivos, en la cual se inhibe su progresión a través de la matriz desmineralizada e interfiere con su correcta polimerización.⁷⁰

Una vez grabada la dentina, La porosidad de la superficie húmeda desmineralizada es mantenida por los puentes de hidrógeno propios de las moléculas de agua que se encuentran rodeando las triples hélices de las fibras colágenas. Dichos puentes de hidrógeno se forman en relación a los grupos peptídicos de la fibra colágena, previniendo el contacto directo entre las cadenas proteicas. La pérdida de agua resta estabilidad a la estructura de las fibras colágenas, dando paso a una contracción y colapso de ellas, dejándolas en forma compacta.⁷¹ De esta manera, luego de un corto periodo de exposición al aire, la superficie de la matriz desmineralizada se vuelve suave y homogénea, producto de la compactación de las fibras colágenas colapsadas, disminuyendo en gran medida su porosidad y volviéndose un sustrato difícil de infiltrar para los monómeros adhesivos.⁷¹ La necesidad de contar con un sustrato poroso estabilizado por moléculas de agua, dio paso a la “adhesión húmeda”.

El grado de humedad ideal necesario para llevar a cabo el procedimiento adhesivo varía ampliamente entre los sistemas adhesivos y depende de sus solventes. La capacidad de estos solventes de formar puentes de hidrógeno con los péptidos de las fibras colágenas determina su capacidad de reexpandir y

mantener la dentina desmineralizada en un estado apto para la infiltración de los monómeros adhesivos.⁷²

Los sistemas adhesivos pueden usar como solventes acetona, etanol, etanol-agua, o agua⁷³. El solvente a base de acetona es un excelente vehículo para los monómeros adhesivos, y puesto a que se evapora rápidamente, éste puede ser eliminado en gran medida del sustrato adhesivo una vez aplicado. Sin embargo, la acetona es incapaz de re-expandir la dentina con cierto grado de sequedad,⁷⁴ debido a que deshidrata químicamente el sustrato desmineralizado mediante un proceso de difusión. Cuando la acetona es aplicada sobre la dentina, el agua difunde desde la dentina húmeda hacia la acetona, en la medida que ésta difunde hacia la matriz desmineralizada. En dentina poco húmeda, si la acetona se volatiliza rápidamente junto a las moléculas de agua del sustrato desmineralizado, ocurre una contracción de las fibras colágenas provocando que los monómeros imprimantes no consigan penetrar en los espacios dentro de la trama colágena, y por ello, generen una menor difusión a la esperada dentro de la matriz desmineralizada, resultando en menores valores de fuerza adhesiva.⁷⁵

Es por ésta razón que los solventes a base de acetona requieren de una dentina con mayor grado de humedad, pues de esta forma se consigue una completa infiltración de los monómeros previo a la volatilización de toda la porción acuosa del sustrato.⁷⁵

En el caso de los solventes a base de agua, debido a que esta molécula posee la mayor capacidad de generar puentes de hidrógeno, tiene una gran capacidad de reexpandir las fibras de la matriz desmineralizada y mantener permeable el sustrato durante la difusión de los monómeros, razón por la cual puede aplicarse sobre dentina con poca humedad.⁷² Esta tolerancia a una pobre humedad lo convierte en un solvente menos sensible comparado con aquel a base de acetona, sin embargo requiere de un mayor tiempo clínico para lograr evaporarse y evitar ser incorporado dentro de la capa híbrida.⁷⁶ Un comportamiento similar ocurre con aquellos solventes que mezclan etanol y agua en distintos porcentajes.⁷⁶ Aquellos solventes a base de etanol, consiguen un

efecto intermedio comparados con aquellos a base de acetona por un lado, y aquellos a base de agua por el otro.⁷³

Idealmente, el solvente y el agua deben ser removidos completamente del adhesivo antes del fotocurado, para lo cual se debe otorgar un adecuado tiempo de evaporación.⁷⁶ La incorporación de solvente dentro de la capa híbrida provocará bajos valores de adhesión,⁷⁷ en la medida que esto generará una pobre polimerización de los monómeros adhesivos, y por ende, dar paso a una separación de la interface adhesiva y a fracturas cohesivas producto de la contracción de polimerización en algunas áreas, así como también microporos dentro de la interface que proveerán canales de difusión para moléculas de agua que solubilizarán los monómeros hidrofílicos no curados, dando paso a la degradación hidrolítica de la interface adhesiva.⁷⁶

El hecho de compatibilizar todos los procedimientos clínicos realizados durante el proceso restaurador, con los requerimientos mínimos necesarios para el proceso de adhesión a nivel microestructural, hacen de esta estrategia adhesiva una técnica altamente sensible, donde el número de pasos y las condiciones ideales no siempre presentes para llevarla cabo, aumentan la probabilidad de cometer errores y provocar una falla adhesiva dentro de la interface.

Este hecho ha incentivado a los clínicos a preferir cada vez más el uso de sistemas adhesivos que utilicen la menor cantidad de pasos y que requieran de condiciones clínicas menos sensibles para llevar a cabo la adhesión.

Técnica de Integración del Barro Dentinario mediante Sistemas Adhesivos Autograbantes

En el contexto de la búsqueda de una técnica adhesiva menos sensible, se genera esta estrategia que no requiere de pasos separados para acondicionar y grabar el sustrato dentario, dado que utiliza sistemas adhesivos autograbantes, los cuales poseen monómeros ácido funcionales que son capaces de acondicionar e imprimir simultáneamente la dentina, mediante la infiltración y disolución parcial

del barro dentinario y la hidroxiapatita de la dentina subyacente. De esta forma, el barro dentinario pasa a ser parte del sustrato adhesivo, permitiendo conseguir una zona híbrida que incorpora adhesivo, minerales, barro residual y matriz dentinaria desmineralizada.^{10,11,21,22}

El adhesivo autograbante corresponde a una mezcla de monómeros hidrofílicos e hidrofóbicos, disueltos en un solvente que puede ser acuoso, o bien orgánico como es el caso de la acetona y el alcohol. Los grupos carboxílicos y fosfatos de los monómeros hidrofílicos (entre los que destacan 4-META, 10-MDP y 2-fenil-P) actúan como donadores de protones en la desmineralización parcial tanto del barro dentinario, como de la dentina subyacente, y también poseen un potencial de unión iónica con el calcio de la hidroxiapatita residual que forma parte del sustrato adhesivo.^{78,79,80} Los monómeros hidrofóbicos como el bis-GMA y UDMA son responsables de las propiedades mecánicas del adhesivo.⁸¹

El uso de sistemas autograbantes resulta atractivo pues pueden ser aplicados sobre dentina seca, y requieren sólo de su aplicación y posterior secado, sin sumar un paso extra de lavado.⁸² El colapso del colágeno desmineralizado producto del secado en la técnica de grabado ácido, ahora es prevenido en la medida que el barro dentinario y la superficie dentinaria subyacente son desmineralizados e infiltrados, donde posteriormente el adhesivo es polimerizado in situ.⁸³ La incorporación del barro como sustrato adhesivo mantiene una oclusión parcial o total de la apertura de los túbulos por parte de los denominados smear plugs,²¹ reduciendo la permeabilidad transdental del fluido dentinario y por ende previniendo la sensibilidad post-operatoria.⁸⁴ Además, el potencial de enlaces iónicos entre los monómeros funcionales y la hidroxiapatita conferirían una unión química adicional a la unión micro mecánica lograda por la infiltración del adhesivo a través del barro dentinario y la dentina subyacente.^{10,85,86} Por último, al existir un acondicionamiento e infiltración de los monómeros funcionales simultáneamente, se generaría una capa híbrida compacta y uniforme, evitando la formación de un hiato sub-micrométrico entre el fondo de la zona híbrida y las fibras colágenas no hibridizadas.¹⁰

Así, el mecanismo de integración del barro dentinario también asume una difusión de monómeros ácidos más allá del barro, llegando hasta la superficie dentinaria intacta y mineralizada. Sin embargo, la capacidad de los monómeros ácidos de atravesar el barro e hibridizar la dentina correctamente se ve influenciada por el tipo de barro dentinario.⁸⁷ Algunos autores señalan que existen diferencias en términos de resistencia adhesiva al realizar la técnica sobre distintos tipos y grosores de barro dentinario (que puede ir de 0.9 a 2.6 μm),⁸⁸ los cuales pueden ser generados por distintos tipos de instrumentos rotatorios. Los valores más altos de resistencia adhesiva fueron conseguidos sobre barro dentinario relativamente delgado, producido por fresas de carbide, y los menores sobre barro de mayor grosor producidos por piedras diamantadas.⁶³

Por otro lado, la acidez de los monómeros del sistema autograbante influirá, en gran medida, en su capacidad de atravesar el barro dentinario e hibridizar la dentina subyacente. En virtud de lo anterior, los sistemas de autograbado pueden ser clasificados según su acidez y agresividad sobre el sustrato, siendo éstos “fuertes” o “suaves”.¹⁰

Los sistemas de autograbado denominados “fuertes”, usualmente tienen un pH de 1 o incluso menor. Su alta acidez resulta en un efecto desmineralizante más bien profundo. Sobre esmalte, producen un patrón de grabado que rememora a aquel conseguido por el ácido ortofosfórico.²¹ En dentina, el barro dentinario y los smear plugs son disueltos completamente, y más aún, la dentina subyacente es desmineralizada, donde el colágeno es expuesto y prácticamente toda la hidroxiapatita circundante es disuelta. De esta forma, el mecanismo de adhesión que rige los sistemas autograbantes “fuertes” se rige básicamente por el fenómeno de difusión, similar a lo ocurrido con la estrategia de hibridación por grabado ácido.¹⁰

Sin embargo, estos sistemas han sido documentados con bajos valores de adhesión y fallas adhesivas preliminares al testeo.⁸⁹ Esto puede deberse a que dichos sistemas necesitan de una cantidad suficiente de agua que permita proveer de un medio para la ionización de los monómeros ácidos. Por ello, también una

cantidad importante de solvente acuoso puede permanecer dentro de la interface adhesiva, la cual difícilmente puede ser removida por completo, siendo responsable de una polimerización inadecuada de los monómeros.

Por otro lado, los sistemas autograbantes denominados “suaves” tienen un pH cercano a 2, y desmineralizan la dentina sólo a una profundidad de 0.5-1 μ m. Esta desmineralización superficial ocurre solo parcialmente, manteniendo la hidroxiapatita residual aún adosada al colágeno. No obstante, se genera una superficie suficientemente porosa que permite obtener enclavamiento por medio de la hibridización. La capa híbrida resultante es mucho menos gruesa que la producida por los sistemas autograbantes “fuertes”, pero se ha demostrado que este hecho es menos importante en consideración con la efectividad adhesiva conseguida. La preservación de la hidroxiapatita dentro de la capa híbrida sub-micrométrica podría servir como receptora de una unión química adicional, como ya se ha mencionado anteriormente. Además, mantener la hidroxiapatita alrededor del colágeno podría también protegerlo contra los procesos de hidrólisis, y por ende, de una degradación temprana de la interface adhesiva.¹⁰

Otros sistemas más nuevos, que tienen un pH de 1.5 no caben en ninguna de las clasificaciones anteriormente nombradas, y pueden ser considerados como adhesivos de agresividad “moderada”. Acorde a las estrategias de adhesión mediante grabado y lavado, así como a los sistemas autograbantes “fuertes”, lo observado clásicamente es la formación de una zona híbrida sobre un sustrato con dos áreas definidas: una superior, completamente desmineralizada, y una base parcialmente desmineralizada. En ambas, la transición desde la trama colágena expuesta a la dentina no grabada es bastante brusca. En los sistemas autograbantes “moderados” previamente nombrados, la región más profunda de la capa híbrida alcanza un máximo de 1 μ m aun manteniendo la hidroxiapatita circundante, provocando que la transición de la capa híbrida a la dentina no grabada subyacente sea más gradual. Estos adhesivos son más ácidos que los “suaves”, en los cuales se puede conseguir una mejor retención micromecánica, pero aún manteniendo el potencial de adhesión química.¹⁰

Además, la interacción química entre los monómeros funcionales y el colágeno ha sido estudiada por resonancia nuclear magnética (RMN), relacionando la fuerza de adhesión a dentina a la fuerza de adhesión entre estos dos elementos.^{90,91} Estos estudios han reportado cambios en la configuración química de los monómeros y el colágeno, los que sugieren una adhesión química adicional a la interacción entre las sales cálcicas, generadas por la disolución de la hidroxiapatita, y los monómeros funcionales.⁹²

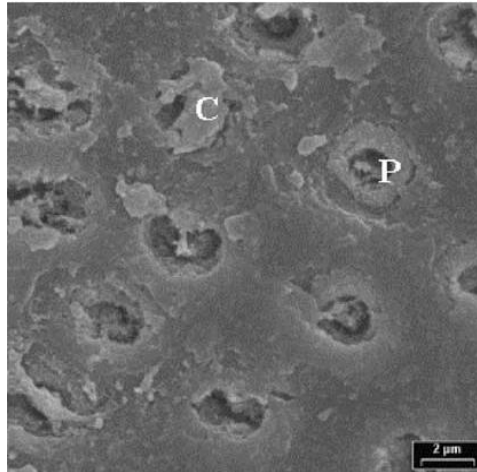


Figura 4. Superficie dentinaria sobre la cual fue aplicado un sistema adhesivo autograbante, vista al Microscopio Electrónico de Barrido. Se observa una remoción parcial de barro dentinario, que consigue manifestar casi completamente la matriz intertubular. Se aprecia la persistencia de smear plugs que ocuyen total o parcialmente la entrada de los túbulos. Imagen tomada de Oliveira v cols.2003.⁶³

Sin embargo, extrapolando los procesos microestructurales involucrados en la adhesión con los resultados obtenidos en las pruebas de resistencia adhesiva (tanto para la técnica de hibridización con grabado ácido como para la técnica de integración con sistemas autograbantes), los sistemas adhesivos de grabado y lavado de tres pasos siguen siendo el gold standar de la adhesión al sustrato dentario. Seguido de éste, se encuentran los sistemas de grabado y lavado en dos pasos y los sistemas autograbantes en dos pasos, no encontrándose diferencias significativas entre estos últimos. Los menores valores de adhesión fueron encontrados en aquellos sistemas autograbantes de un paso.^{10,84} Esto sugiere que la simplificación de la técnica no siempre va acompañada del éxito en le

generación de una interface adhesiva sin puntos débiles, ni estructuralmente estable.

Entre los fenómenos negativos de los sistemas autograbantes, cabe señalar que la naturaleza altamente hidrofílica de los monómeros ácidos, como la alta concentración de agua requerida para su ionización, determina que este material se comporte como una barrera semi-permeable, permitiendo el movimiento de agua a través de la interface adhesiva, que potencialmente llevará a una degradación hidrolítica.^{93,94,95}

Además se ha visto nanofiltración entre los espacios interfibrilares de la matriz mineralizada debajo de la zona híbrida. Algunos estudios señalan que en el proceso de autograbado, la actividad o capacidad ácida de los monómeros funcionales puede ser detenida por la reacción de neutralización o capacidad buffer del componente mineral, o bien por la propia polimerización.⁹⁶ Este fenómeno alteraría la correcta difusión de los monómeros a través de los espacios interfibrilares de la dentina mineralizada subyacente, ya que al perder parte de su capacidad ácida, se generarían espacios interfibrilares de menor tamaño, los cuales serían ocupados parcialmente por sales cálcicas insolubles producidas por la disolución de la hidroxiapatita, y que finalmente provocarían un efecto “colador” que impediría la infiltración de los co-monómeros no ácidos de mayor tamaño dentro de las pequeñas microporosidades. Además, se ha observado la existencia de una dentina mineralizada con cierta porosidad debajo de la zona híbrida ya polimerizada. Dicho fenómeno, se produciría por la acumulación de componentes hidrofílicos ácidos pero no polimerizables, que continuarían desmineralizando parcialmente la dentina, por debajo de la zona híbrida ya polimerizada.⁹⁵

Estos fenómenos ponen en cuestionamiento el principio del autograbado, en donde se sostiene que ocurre una disolución e infiltración simultánea de la dentina, condición necesaria para generar una capa híbrida uniforme y estructuralmente estable a través del tiempo.

Deterioro de la interface adhesiva

Independiente de la estrategia adhesiva empleada, hibridización por grabado ácido o integración por sistemas autograbantes, la interface adhesiva puede sufrir procesos degenerativos que harán fracasar la adhesión en un mediano plazo. También es sabido que la capa híbrida es particularmente susceptible a la degradación cuando el margen cavo-superficial no descansa sobre esmalte.⁹⁷

Como ha sido revisado anteriormente, entre los principales factores que representan un eslabón débil en el proceso adhesivo destacan tanto la generación de un hiato sub-micrométrico y la generación de una hibridización incompleta de la matriz desmineralizada, como también un exceso de solvente no volatilizado del sustrato adhesivo, una polimerización incompleta e incluso la propia naturaleza hidrofílica de los monómeros adhesivos que componen la zona híbrida. La manifestación de cada uno de ellos o todos en conjunto, generará que la interface adhesiva se comporte como una membrana semi-permeable, que dará paso a la nanofiltración.⁹⁴

Como membrana semi-permeable, la interface adhesiva permite el flujo de agua de un lado a otro a través de ella aun después de haber sido polimerizada, e incluso en ausencia de brechas marginales.²⁰ El flujo de agua ha sido estudiado con la ayuda de un trazador de tamaño nanométrico, como es el caso del nitrato de plata, en donde las vías o canales por donde pasa el agua, productos microbianos y enzimáticos, son marcados, haciéndose de esta forma evidentes al análisis con microscopía electrónica.⁹³ Este proceso es conocido como nanofiltración, y es el responsable de la degradación de la capa híbrida mediante la hidrólisis tanto de los monómeros adhesivos, como de las fibras colágenas y el componente orgánico que forman parte del sustrato adhesivo.

Dentro de los patrones de nanofiltración observados, existen aquellos de forma reticular descritos como “arboles de agua”, los cuales corresponden canales por donde ocurre la difusión de agua, como también aquellos donde se aprecian

áreas moteadas de mayor tamaño, que representan micro dominios dentro de la interface que contienen principalmente grupos hidrofílicos o ácidos.⁹⁸ Contrario a esto, los monómeros hidrófobos tienen un bajo grado de adsorción de agua dentro de la capa híbrida formada. De esta forma, la degradación hidrolítica se relaciona con el grado de hidrofiliidad y adsorción de agua, pues dicho proceso ocurre sólo en presencia de estos dos últimos.⁹⁹

La hidrólisis es un proceso químico que rompe los enlaces covalentes entre los polímeros, mediante la adición de agua a los enlaces ésteres, resultando en una pérdida parcial de la masa total de la resina. Este proceso es la principal razón por la cual ocurre una degradación de la resina dentro de la capa híbrida, contribuyendo a una disminución en los valores de resistencia adhesiva y pérdida del sellado hermético de la adhesión.¹⁰⁰

La hidrólisis también es responsable de la degradación de la matriz colágena expuesta a la nanofiltración. En la medida que ocurre la nanofiltración, la hidrólisis de la porción resinosa de la zona híbrida continúa, dando paso a canales o poros de mayor tamaño, que filtran agua y componentes enzimáticos bacterianos con actividad proteolítica.¹⁹

Además, desde que se determinó que la nanofiltración puede ocurrir en ausencia de brechas marginales,²⁰ se ha señalado que la degradación de la matriz colágena no hibridizada puede ser resultado de la actividad proteolítica de enzimas provistas por el hospedero, en ausencia de bacterias.^{101,102} La evidencia de actividad colagenolítica/gelatinolítica sobre matrices colágenas parcialmente desmineralizadas, son una prueba indirecta de la existencia de metaloproteinasas en dentina humana, que podrían tener un rol en la degradación del colágeno y la patogénesis de la caries.^{19,103}

La necesidad de contar con un sustrato adhesivo estable, ha llevado a algunos autores a desarrollar y plantear nuevos mecanismos de adhesión, que permitan evitar la mayoría de los fenómenos adversos vistos previamente. Esta

situación, a dado paso a un nuevo esquema de tratamiento adhesivo, que será analizado a continuación.

Técnica de Desprotección de la Dentina o Hibridación Reversa

Como se ha señalado anteriormente, la dentina representa un sustrato complejo, debido a su alto componente orgánico, composición tubular, humedad, permeabilidad y presencia de barro dentinario. Independiente de la técnica empleada, la generación de una dentina desmineralizada que exponga su entramado colágeno como sustrato adhesivo, no está exenta de dificultades y fracasos en términos adhesivos, debido a que los componentes de la capa híbrida, especialmente el orgánico, carecen de estabilidad mecánica y biológica confiable dentro de la interface adhesiva durante la vida de una restauración de resina compuesta.

Para evitar incorporar al sustrato adhesivo componentes sensibles a la técnica o con poca estabilidad estructural, algunos autores han sugerido la remoción total del colágeno de la matriz dentinaria desmineralizada previamente mediante un agente desproteizante,²⁴ como el hipoclorito (NaOCl), en tanto esta zona representa el punto débil del proceso adhesivo.¹⁰⁴

El objetivo de este procedimiento es generar un sustrato adhesivo hidrofílico, rico en minerales, y con porosidades de mayor tamaño, mediante la remoción del barro con el grabado ácido de la dentina utilizando ácido ortofosfórico, seguida de la remoción de la matriz colágena desmineralizada mediante desproteización con NaOCl. Este sustrato de aspecto “apolillado”,²⁴ tendría un comportamiento similar al esmalte, donde la hibridación se llevaría a cabo sobre una superficie libre de colágeno, con mayor porosidad y permeabilidad, facilitando la difusión del adhesivo a través de la superficie.²⁴ Dicho procedimiento constituye la técnica de desproteización de la dentina o hibridación reversa.²⁵

El principal objetivo de la remoción del colágeno y otras proteínas, es poder superar la sensibilidad de los procesos adhesivos dados por la técnica de grabado ácido, facilitando el acceso de los monómeros adhesivos a un sustrato más permeable, con una mayor área de contacto y menor sensibilidad al contenido acuoso,¹⁰⁵ ya que el grado de reactividad y energía superficial de la hidroxiapatita comparada con la del colágeno, es menor en este último.¹⁰⁶

Las soluciones de hipoclorito han sido usadas ampliamente en diversos procedimientos dentales, basados en su acción desproteinizante inespecífica y bactericida.¹⁰⁷ La concentración y tiempo de aplicación del hipoclorito con mayor desempeño como agente desproteinizante, ha sido estimada en una solución de NaOCl al 10% aplicada por 1 minuto a temperatura ambiente.¹⁰⁸

En relación a lo anterior, algunos autores señalan que al aplicar una solución de NaOCl sobre la superficie dentinaria cubierta con barro dentinario, ocurre un aumento de la fracción “componente mineral/componente orgánico” del sustrato, como también una reducción en el grosor del barro dentinario debido a la disolución de la fase orgánica.¹⁰⁹

Sin embargo, el uso de NaOCl con fines adhesivos es controversial. Dependiendo de la metodología de testeo empleada y/o la composición específica de cada adhesivo, la aplicación de hipoclorito sobre dentina previamente grabada podría afectar positivamente¹¹⁰, negativamente^{111,112} o no influir^{113,114} en los valores de resistencia adhesiva.

En el contexto de lograr adhesión sobre un sustrato aparentemente desproteinizado, poco se sabe del efecto de dicho acondicionamiento dentinario sobre el efecto de los sistemas de autograbado.

Como ha sido mencionado previamente, los sistemas de autograbado buscan incorporar al barro dentinario y a la dentina subyacente como parte del sustrato adhesivo. Además, se ha demostrado que existen interacciones de tipo iónico entre los monómeros funcionales y el componente mineral incorporado al

sustrato. No obstante, la capacidad de llevar a cabo esta tarea se ve fuertemente influenciada por el grosor y grado de compactación del barro dentinario, constituyendo una verdadera barrera física para los monómeros funcionales.

De esta forma, una superficie dentinaria que conste de una fracción mineral aumentada y un barro dentinario más adelgazado, gracias a la acción de un agente desproteinizante como el NaOCl, podría significar un sustrato más adecuado para la posterior aplicación de un sistema autograbado, en tanto fuese más fácil de penetrar y sea también químicamente más reactivo. Sin embargo, son pocos los estudios que han considerado esta alternativa adhesiva.²⁸

En virtud de los antecedentes señalados anteriormente, las estrategias de acondicionamiento utilizados para lograr adhesión a dentina, debieran generar cambios morfológicos a nivel ultraestructural que determinan el modo en que la resina adhesiva interactúa dentro del sustrato dentinario, así como la forma en que se consigue la zona de interdifusión diente-resina. Es por ello que el presente estudio busca observar mediante la microscopía electrónica de barrido, si existen diferencias morfológicas a nivel ultraestructural, luego de acondicionar la dentina mediante la Técnica de Hibridación Convencional, la Técnica de Integración y la Técnica de Desproteización de la dentina seguida de un sistema autograbante.

El siguiente trabajo corresponde a un estudio de tipo descriptivo, donde se utilizará la observación como método de investigación.

Objetivo General

Observar mediante Microscopía Electrónica de Barrido, si existen diferencias morfológicas en el efecto generado sobre dentina sana, producto del acondicionamiento mediante la Técnica de Hibridización por grabado con ácido ortofosfórico, la Técnica de Integración con un adhesivo autograbante, y la Técnica de Desprotección seguida de un adhesivo autograbante.

Objetivos específicos

1. Analizar al microscopio electrónico de barrido, la imagen de la superficie dentinaria no fresada.
2. Analizar al microscopio electrónico de barrido, la imagen de la superficie dentinaria fresada.
3. Analizar al microscopio electrónico de barrido, la imagen de la superficie dentinaria fresada, acondicionada mediante grabado ácido y lavado.
4. Analizar al microscopio electrónico de barrido, la imagen de la superficie dentinaria fresada, luego de aplicar y lavar un sistema adhesivo autograbante.
5. Analizar al microscopio electrónico de barrido, la imagen de la superficie dentinaria fresada, acondicionada mediante un agente desproteínizante.
6. Analizar al microscopio electrónico de barrido, la imagen de la superficie de contacto de un adhesivo de grabado y lavado aplicado sobre dentina fresada sin acondicionar.
7. Analizar al microscopio electrónico de barrido, la imagen de la superficie de contacto de un adhesivo de grabado y lavado aplicado sobre dentina

fresada, luego de ser tratada con la Técnica de Hibridización con ácido ortofosfórico.

8. Analizar al microscopio electrónico de barrido, la imagen de la superficie de contacto de un adhesivo autograbante aplicado sobre dentina fresada, luego de ser tratada con la Técnica de Integración.
9. Analizar al microscopio electrónico de barrido, la imagen de la superficie de contacto de un adhesivo autograbante aplicado sobre dentina fresada y tratada con la Técnica de Desproteinización.
10. Comparar morfológicamente los cambios producidos sobre la superficie dentinaria, producida por las tres estrategias de adhesión.
11. Comparar morfológicamente los cambios producidos sobre la superficie adhesiva, producida por las tres estrategias de adhesión.

Material y Método

En el presente estudio descriptivo, se utilizó la observación como método de investigación.

La parte experimental del trabajo fue realizada en el laboratorio de Biomateriales Dentales de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Para ello, se utilizaron siete terceros molares recientemente extraídos, sanos, sin caries. Los dientes recién extraídos fueron colocados en una solución de suero fisiológico isotónico 0.9% en un recipiente cerrado, a temperatura ambiente.

Limpieza

A todos los dientes se les removió los restos de ligamento periodontal con ayuda de una cureta y fueron lavados con agua potable. Posteriormente, todas las superficies fueron limpiadas con agua y piedra pómez, por la acción de escobillas rotatorias de copa blanda para contrángulo.

Preparación de la muestra

En uno de los dientes, se realizó un corte de cuña que permitió provocar una fractura nítida que eliminó toda la cara oclusal, descubriéndose la superficie dentinaria. Luego de exponer la superficie dentinaria oclusal mediante una fractura, sobre la mitad de superficie se realizó un desgaste mediante una piedra diamantada con forma de rueda grano grueso de alta velocidad (marca FAVA modelo 3053 G) y abundante refrigeración, mientras que en la otra mitad de la superficie no se realizó ninguna clase de desgastes ni preparación. De esta forma se obtuvo dos superficies diferentes para un mismo diente, una superficie con dentina sana no fresada y otra superficie con dentina fresada y barro dentinario.

A los 6 dientes restantes, se les eliminó la totalidad de la cara oclusal mediante un desgaste que abarcó todo el espesor del esmalte y su anatomía,

utilizando una piedra diamantada forma de rueda de alta velocidad (modelo 3053 G marca FAVA) y abundante refrigeración, obteniéndose una superficie oclusal plana. La piedra diamantada fue recambiada por cada 2 dientes, ocupándose un total de 3 piedras diamantadas para generar 6 superficies planas. Obtener superficies oclusales planas que involucraban un desgaste más allá del límite amelodentinario, permitió trabajar en dentina con semejante nivel de profundidad en todas las muestras. Además se realizó un desgaste con una piedra cilíndrica diamantada de alta velocidad (tamaño 0.16 marca SS White) y abundante refrigeración en toda la periferia de las pieza dentarias, obteniéndose un muñón con una superficie oclusal plana, centrada, y de 5 mm de diámetro aproximadamente en cada diente. Luego, mediante el uso de un disco de carborundum y abundante refrigeración, se cortó a nivel de la base de cada muñón obteniéndose entonces seis discos de dentina de 2 ± 0.5 mm de grosor y 5 ± 1 mm de diámetro, y marcados en su base para distinguir dicha superficie de la superficie oclusal fresada que será analizada. Finalmente, en el centro de cada disco, se aplicó y polimerizó una línea de composite Filtek p60 (3M ESPE, St.Paul MN, USA) sin técnica adhesiva, con el propósito de obtener dos superficies dentinarias separadas una de otra.

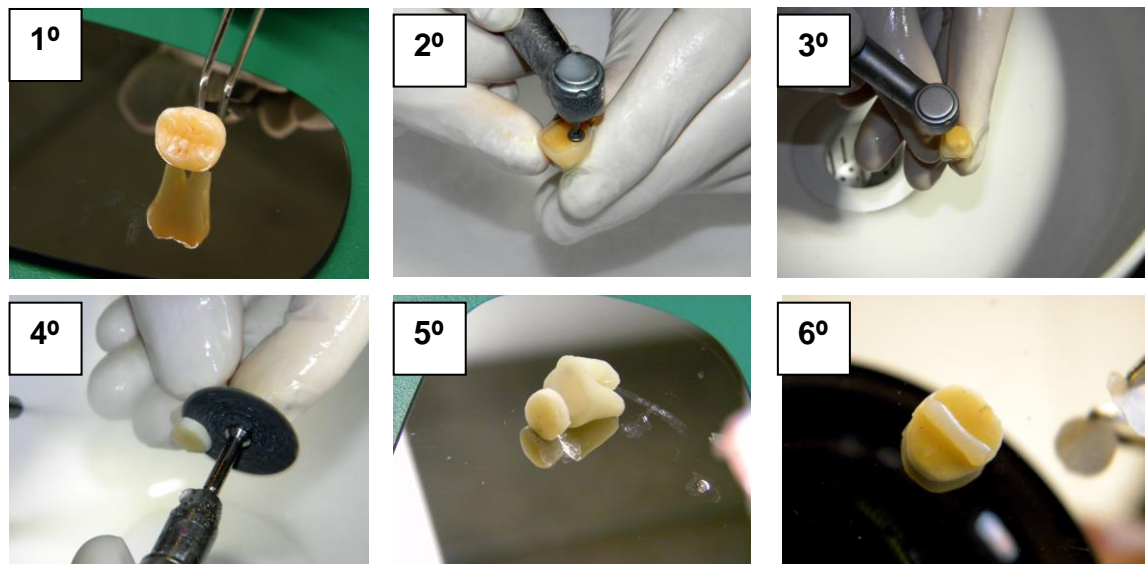


Figura 5. Obtención del disco dentinario.



Figura 6. Sistemas Adhesivos empleados para realizar las técnicas adhesivas sobre los discos dentinarios obtenidos previamente.

Para observar el efecto generado por las diferentes estrategias adhesivas sobre las estructuras dentarias, se utilizó el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) para analizar tanto la superficie dentinaria como la interface adhesiva por separado:

1. Tratamiento de la superficie dentinaria

Según los objetivos planteados anteriormente en este estudio, las superficies dentinarias que fueron observadas bajo el MEB recibieron los siguientes tratamientos:

1.1 Acondicionamiento de la dentina mediante grabado ácido y lavado

Para ello, se utilizó uno de los discos de dentina obtenidos en la etapa de preparación, dividido en dos superficies por una línea de composite:

- A una de estas mitades se le retiró el exceso de humedad con la ayuda de papel absorbente, y fue acondicionada aplicando ácido ortofosfórico en gel al 37% durante 15 segundos, que luego fue lavado por el doble de tiempo, vale decir, otros 30 segundos.

- La otra mitad de la superficie no recibió acondicionamiento alguno.

1.2 Acondicionamiento de la dentina mediante sistema adhesivo autograbante

Para ello, se utilizó un segundo disco de dentina obtenido en la etapa de preparación, dividido en dos superficies por una línea de composite:

- A una de las superficies en que estaba dividido el disco, se le retiró el exceso de humedad con la ayuda de papel absorbente, y se le aplicó el sistema autograbante Adper™ SE Plus (3M ESPE, St. Paul, MN 55144 USA), lote nº 8BC, según las siguientes instrucciones del fabricante: aplicación del líquido A con pincel microbrush por la superficie durante 20 segundos, seguido de la aplicación del líquido B con pincel microbrush por 20 segundos (hasta quitar el tinte fucsia tornasol del líquido A). Luego, se aplica un suave chorro de aire presurizado libre de humedad durante 10 segundos. A continuación, se aplica otra capa del líquido B por la superficie durante 20 segundos y se sopla suavemente por otros 10 segundos. Finalmente, en vez de polimerizarlo, el adhesivo fue retirado de la superficie sumergiendo el disco de dentina en etanol al 100% por 5 minutos, y luego lavado y enjuagado con agua destilada por 1 minuto.
- La otra mitad de la superficie no recibió acondicionamiento alguno.

1.3 Acondicionamiento de la dentina mediante agente desproteinizante

Para ello, se utilizó un tercer disco de dentina obtenido en la etapa de preparación, dividido en dos superficies por una línea de composite:

- A una de las mitades se le retiró el exceso de humedad con la ayuda de papel absorbente, y se acondicionó aplicando NaOCl al 10% por 1 minuto, que luego fue lavado y enjuagado por otro minuto.

- La otra mitad de la superficie no recibió acondicionamiento alguno.

2. Tratamiento de la superficie adhesiva

Según los objetivos planteados anteriormente en este estudio, las superficies dentinarias recibieron las siguientes técnicas de acondicionamiento y adhesión, que fueron plasmadas en la superficie del adhesivo que estuvo en contacto con la dentina.

2.1 Técnica de Hibridación

Para ello, se utilizó uno de los discos de dentina obtenidos en la etapa de preparación, dividido en dos superficies por una línea de composite:

- A una de las superficies se le retiró el exceso de humedad con la ayuda de papel absorbente, y fue acondicionada mediante la aplicación de ácido ortofosfórico en gel al 37% durante 15 segundos, que luego fue lavado por el doble de tiempo, vale decir, 30 segundos. Seguido del lavado, se procedió a secar la dentina con papel absorbente, procurando mantener la humedad propia de la dentina. Finalmente, sobre ella se utilizó como agente adhesivo, Adper Single Bond 2 ® (3M ESPE, St. Paul, MN 55144 USA), lote n°8TB, según indicaciones del fabricante, esto es, aplicándolo y frotándolo con un pincel microbrush suavemente en toda la superficie durante 15 segundos. Luego, con la jeringa triple, se sopló suavemente con un chorro aire presurizado libre de humedad durante 5 segundos. Una segunda capa de adhesivo fue aplicada de igual forma, se sopló suavemente, y se polimerizó por 20 segundos con una lámpara de fotocurado marca 3M ESPE Elipar. Posteriormente se colocaron 2 mm composite Filtek p60 (3M ESPE) el siguiente protocolo: técnica incremental sobre toda la superficie del adhesivo, polimerizando cada incremento por 20 segundos, finalizando la restauración fotopolimerizando por 40 segundos.

Finalmente se marcó la restauración para diferenciarla de la superficie que contactó con el adhesivo, y por ende con la dentina.

- La superficie de la otra mitad, no recibió ninguna clase de acondicionamiento. Sobre esta superficie dentinaria no acondicionada se aplicó el mismo sistema adhesivo, Adper Single Bond 2® (3M ESPE), con el mismo procedimiento explicado anteriormente. Posteriormente se colocaron 2 mm composite Filtek p60 (3M ESPE) según el mismo protocolo.

2.2 Técnica de Integración:

Para ello, se utilizó otro de los discos de dentina obtenidos en la etapa de preparación, dividido en dos superficies por una línea de composite:

- A una de las superficies se le retiró el exceso de humedad con la ayuda de papel absorbente, y se le aplicó el sistema autograbante Adper™ SE Plus (3M ESPE, St. Paul, MN 55144 USA) según instrucciones del fabricante, y polimerizado por 20 segundos. Posteriormente se colocaron 2 mm composite Filtek p60 (3M ESPE) según el mismo protocolo utilizado anteriormente.
- La otra mitad fue tratada con la técnica de hibridación mediante el grabado de la superficie dentinaria con ácido ortofosfórico en gel al 37%, seguida de la aplicación del sistema adhesivo Adper Single Bond 2 de la misma forma en que se realizó la técnica de hibridación. Posteriormente se colocaron 2mm composite Filtek p60 (3M ESPE) mediante el mismo protocolo empleado en las muestras anteriores.

2.3 Técnica de Desprotección seguida de sistema autograbante

Para ello, se utilizó otro de los discos de dentina obtenidos en la etapa de preparación, dividido en dos superficies por una línea de composite:

- A una de las superficies se le retiró el exceso de humedad con la ayuda de papel absorbente, y se acondicionó aplicando NaOCl al 10% por 1 minuto, que luego fue lavado y enjuagado por otro minuto. Luego del lavado, se secó con papel absorbente, y se le aplicó el sistema autograbante Adper™ SE Plus (3M ESPE) según instrucciones del fabricante, y polimerizado por 20 segundos. Posteriormente se colocaron 2 mm composite (Filtek p60 3M ESPE) según el mismo protocolo utilizado anteriormente.
- A la otra superficie se le retiró el exceso de humedad con la ayuda de papel absorbente, y se le aplicó solamente el sistema autograbante Adper™ SE Plus (3M ESPE) según instrucciones del fabricante, el que fue polimerizado por 20 segundos. Posteriormente se colocaron 2 mm composite Filtek p60 (3M ESPE) mediante el mismo protocolo empleado anteriormente.

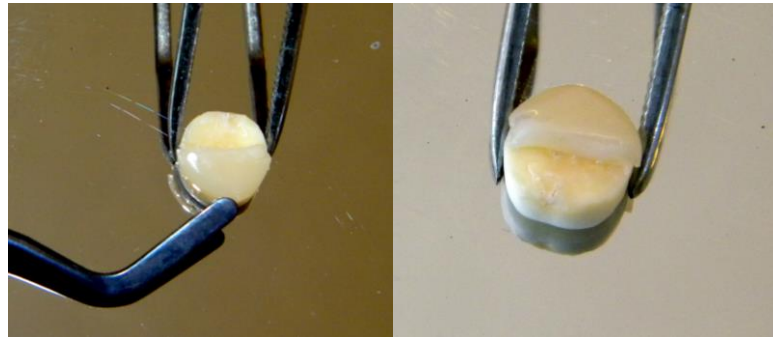


Figura 7. Restauración de una de las mitades del disco, luego de recibir una de las estrategias de adhesión planteadas anteriormente.

Procesamiento de las muestras para observación al MEB

Los 3 discos de dentina que fueron acondicionados según el ítem 1, más aquel producido por una fractura, fueron fijados en glutaraldehído 3% en una solución buffer fosfato de sodio 0.1 M pH 7.3 por 12 horas a 4°C. A continuación, los discos fueron lavados en agua destilada por 1 hora. Luego, se deshidrataron en baños seguidos con grados incrementales de etanol: etanol 50% por 15 minutos, al 70% por 15 minutos, al 90% por 30 minutos y al 100% por 1 hora.

Finalmente los especímenes fueron transferidos a una solución de óxido de propileno que se volatilizó luego de secar al aire por 15 minutos.

Los otros 3 discos de dentina que fueron acondicionados y restaurados en el ítem 2, estos fueron procesados de tal forma que se permitiera observar la superficie de contacto del adhesivo a modo de “impresión” o negativo de la superficie dentinaria acondicionada, mediante la eliminación de todo el tejido dentario. Con el fin de eliminar el componente mineral, los discos fueron colocados en una solución de HCl 1N a temperatura ambiente por 48 horas, cambiando la solución a las 24 horas. Luego, las muestras fueron lavadas en agua destilada por 1 hora, para eliminar la solución ácida. Para eliminar todo el contenido orgánico de la dentina, las muestras fueron sumergidas en una solución de NaOCl al 7% por 24 horas, y luego lavadas con agua destilada por otra hora.¹⁵ A continuación, las muestras fueron colocadas en una solución de peróxido de Hidrógeno al 9% por 2 horas, y posteriormente lavadas con agua destilada por 30 minutos.

Los discos de resina obtenidos a partir del procesamiento anterior, fueron deshidratados en baños seguidos con grados incrementales de etanol al 50%, al 70%, al 90% y al 100% por 5 minutos cada baño.

Finalmente las 7 muestras a analizar en el MEB, fueron previamente secadas a 37°C durante 24 horas con calor seco, luego montadas en soporte ad-hoc adheridas con tintura de plata, y finalmente metalizadas con paladio-oro 10nm de espesor en un sputter marca Polaron, modelo E-500, UK, 1992.



Figura 8. Muestras montadas en Sputter para recibir baño oro-paladio

Los especímenes fueron observados y luego fotografiados al Microscopio Electrónico de Barrido marca Zeiss, modelo DSM 940, Alemania, 1990. El MEB cuenta con un potencial de aceleración de 5 a 30 Kv, con un poder de magnificación de X20.000, y provista de una cámara fotográfica digital marca Canon. Este microscopio se encuentra en el laboratorio de Microscopía Electrónica CESAT-ICBM, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Cada muestra fue observada con aumentos de 500X, 1000X, 2000X y 5000X, tomándose fotografías en cada observación.

Para llevar a cabo el análisis morfométrico de algunas estructuras, se utilizó el software para Windows TpsDig versión 2.0 (Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, USA, 2004). Dicho software fue descargado de su sitio oficial.¹¹⁵

Las imágenes obtenidas en el MEB fueron analizadas comparativamente entre sí, para analizar si existen diferencias en las estructuras morfológicas obtenidas.

Resultados

I. Análisis de la Micro Morfología de la Superficie Dentinaria

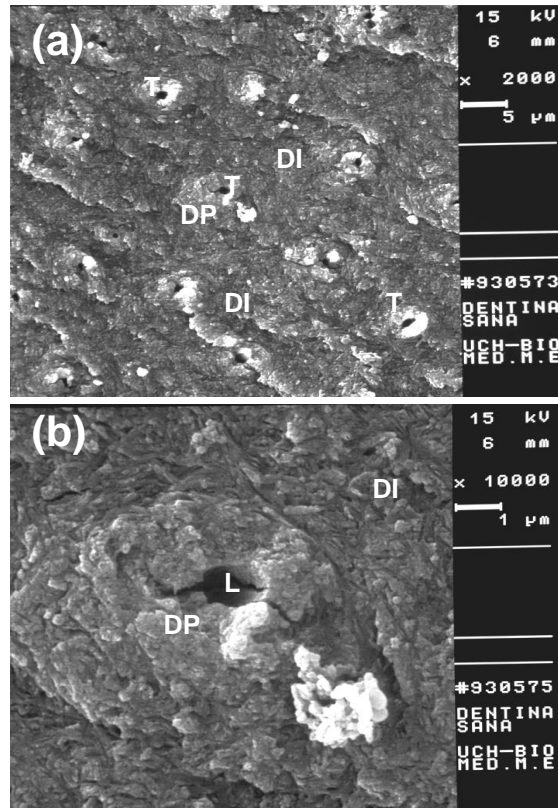


Figura 9. Morfología representativa de la dentina sana sin fresar: En (a) se aprecian los túbulos dentinarios (T) dispersos sobre la matriz dentinaria. Éstos se observan como regiones circulares rodeadas por un halo aclarado de mayor densidad electrónica: la dentina peritubular (DP). El resto de la matriz corresponde a la dentina intertubular (DI), apreciándose con una densidad electrónica distinta respecto de la dentina peritubular, debido a que esta última presenta un mayor grado de mineralización. En (b) se observa un túbulo dentinario a mayor aumento (X10000), donde la entrada al lumen del túbulo (L) se encuentra totalmente despejada, sin trazas ni obliteraciones; la superficie de la matriz de la dentina peritubular e intertubular está constituida por pequeños gránulos, que corresponden a cristales de hidroxiapatita y fosfato de calcio amorfo sujetos sobre una matriz proteica.

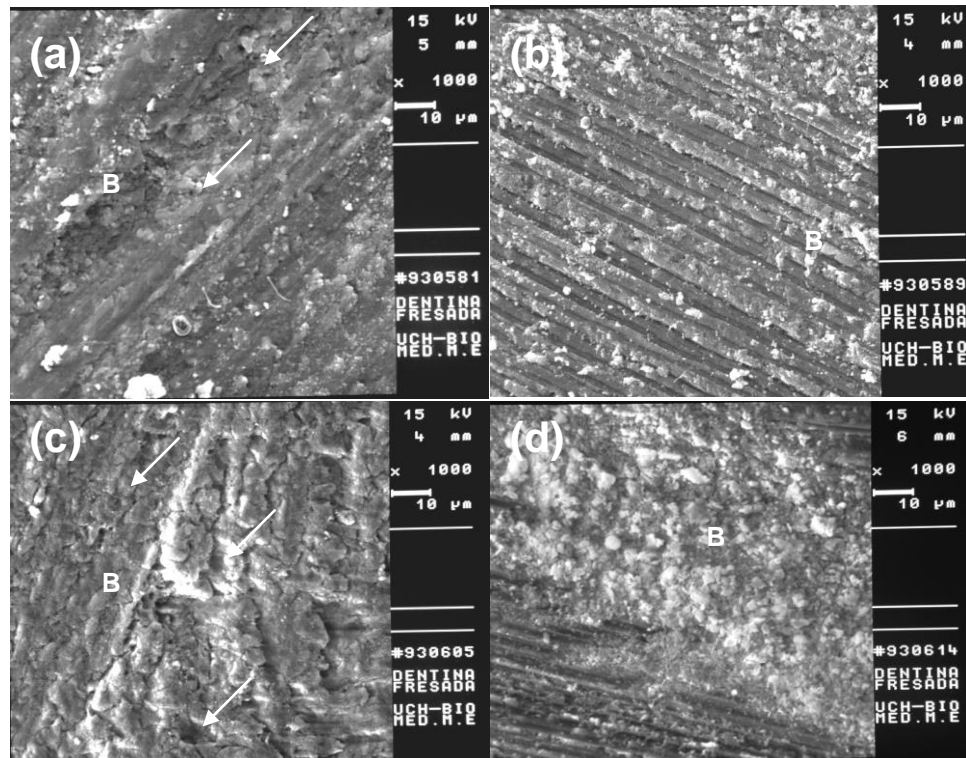


Figura 10. Morfología representativa de la dentina fresada sin acondicionar en cada uno de los especímenes: En (a), (b), (c) y (d) se aprecia que tanto la matriz dentinaria peritubular e intertubular, como la entrada de los túbulos dentinarios, se encuentra cubierta por una capa restos de origen dentario adosada íntimamente a la superficie, producidos por el paso de instrumental rotatorio: el barro dentinario (B). Para una misma fresa, se aprecia la formación de distintos tipos de rayas o marcas producidas sobre la superficie dentinaria, así como distintos tipos de barro dentinario, observándose fino en (a), grueso en (c), y en forma de virutas en (b) y (d). En (a) y (c) las flechas muestran al barro dentinario ocluyendo la entrada de los túbulos dentinarios.

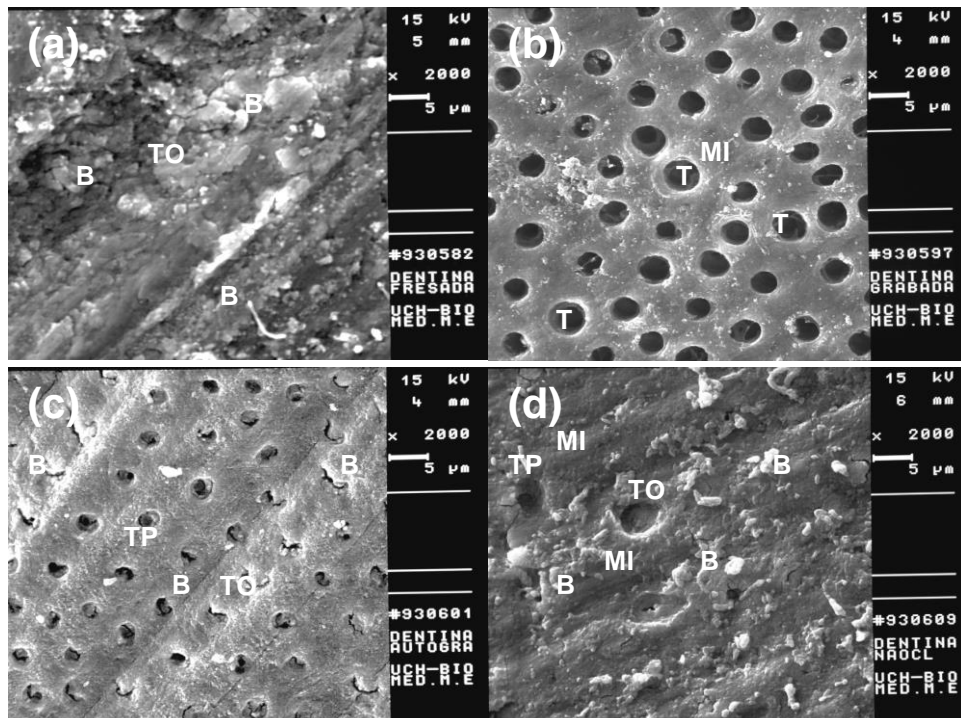


Figura 11. Morfología representativa del efecto generado por tres diferentes tipos de acondicionamiento sobre dentina fresada. (a) Sin acondicionamiento, (b) Grabado con ác. Ortofosfórico 37% x 15s, (c) Autograbante, (d) Desproteínización con NaOCl 10% x 1min: En (a), el barro dentinario (B) se encuentra adosado íntimamente a la superficie de la matriz peritubular e intertubular, apreciándose también túbulos dentinarios ocluidos (TO). Comparados con (a), tanto en (b), (c) y (d) se aprecia que la superficie dentinaria es afectada por el acondicionamiento. En (b), el efecto es marcado, consiguiéndose una remoción completa del barro dentinario y los smear plugs, mediante un patrón de acondicionamiento definido y homogéneo en toda la superficie, lográndose apreciar la matriz intertubular (MI), como también una apertura total de la entrada de los túbulos (T). En (c), el efecto es parcial, consiguiéndose una penetración débil del autograbante a través del barro dentinario y los smear plugs, mediante un patrón definido pero menos homogéneo en ciertas áreas, apreciándose una superficie rugosa, así como túbulos dentinarios parcialmente ocluidos (TP). En (d), el efecto es discreto, con un patrón de acondicionamiento poco definido, donde el barro se aprecia parcialmente desintegrado adosado irregularmente a la matriz dentinaria, junto a detritos residuales, apreciándose además túbulos ocluidos y otros parcialmente ocluidos.

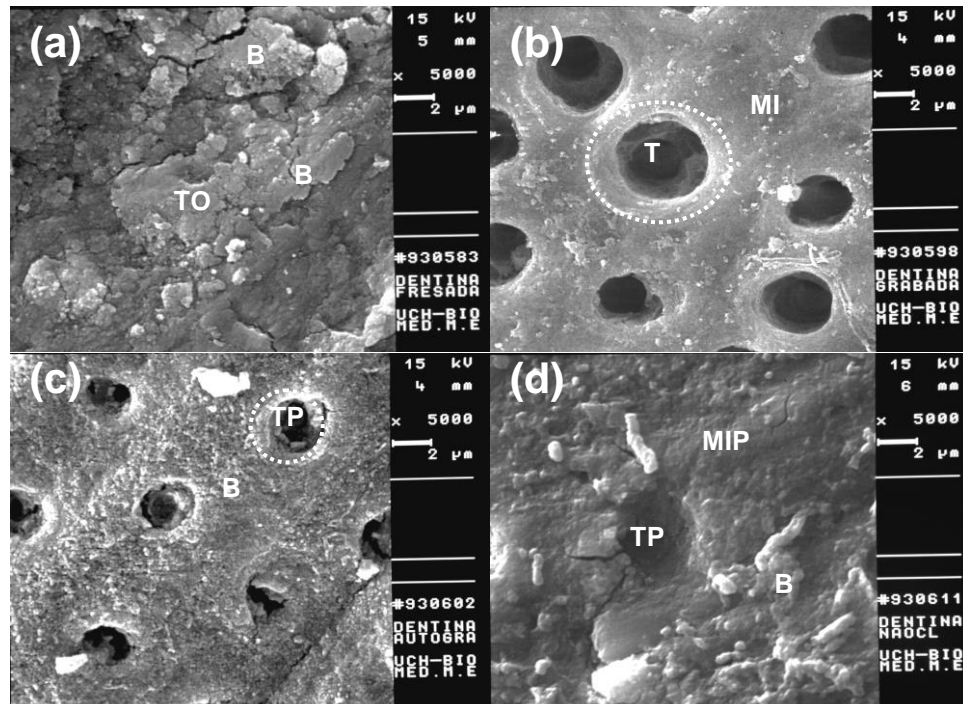


Figura 12. Magnificación (X5000) de la morfología representativa del efecto generado por tres diferentes tipos de acondicionamiento sobre dentina fresada. (a) Sin acondicionamiento, (b) Grabado con ác. Ortofosfórico 37% x 15s, (c) Autograbante, (d) Desproteínización con NaOCl 10% x 1min: En (a), el barro dentinario (B) cubre la matriz dentinaria peri e intertubular, así como la entrada del túbulo (TO). En (b), existe una remoción completa del barro y smear plugs, apreciándose la matriz intertubular (MI) y el ensanchamiento de la entrada de los túbulos producto de una desmineralización a expensas de la dentina peritubular, desde la periferia hacia el centro, logrando un “efecto embudo” (línea punteada). En (c), se observa una disolución parcial del barro dentinario y smear plugs, que no permite apreciar claramente la matriz intertubular, mostrándose ésta como una superficie rugosa. La presencia de smear plugs que no fueron removidos por el autograbante, así como una dentina peritubular levemente desmineralizada, genera una oclusión parcial (TP) y un ensanchamiento menor en la entrada del túbulo comparada con (b). En (d), el barro dentinario no fue desintegrado ni removido completamente, apreciándose una matriz intertubular parcialmente descubierta (MIP), en cuya superficie es posible apreciar grumos, así como detritos residuales. Se aprecia una oclusión parcial de la entrada del túbulo (TP), pero no se observa un ensanchamiento a expensas de la dentina peritubular.

II. Análisis de la Micro Morfología de la Interface Adhesiva

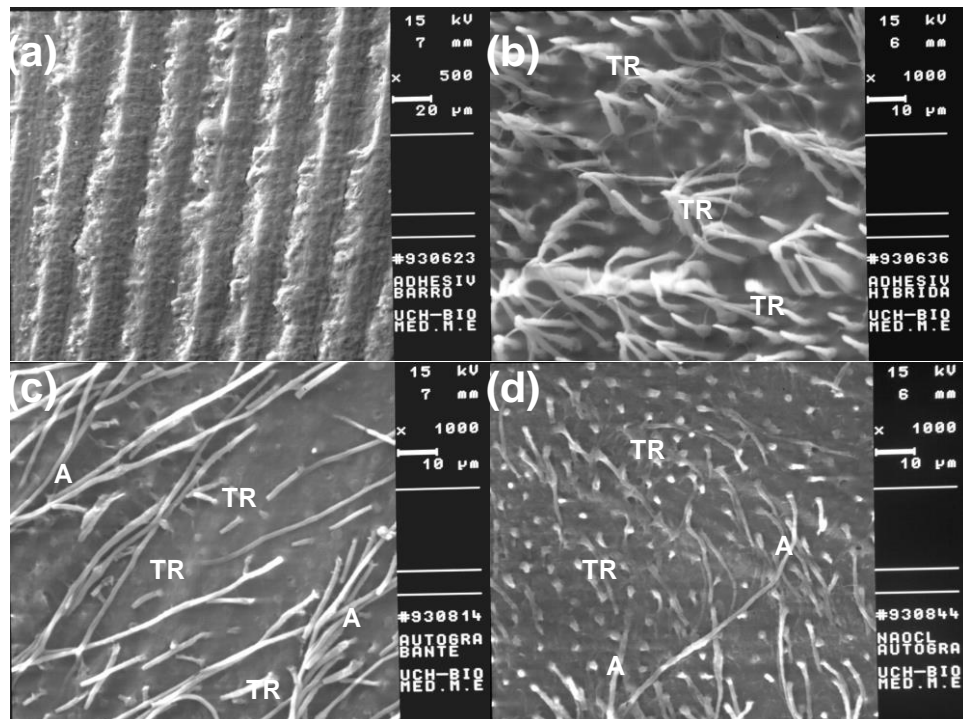


Figura 13. Morfología representativa de las superficies adhesivas de restauraciones de resina compuesta realizadas con tres estrategias de adhesión sobre dentina fresada: (a) sin acondicionamiento, (b) Hibridización, (c) Integración, (d) Desproteinización/Autograbado: En (a) (X500) se aprecia la impresión del adhesivo sobre la superficie del barro dentinario y las rayas generadas durante el fresado. A diferencia de (a), en (b), (c) y (d), se observa la aparición de nuevas estructuras que nacen de la superficie adhesiva en forma de prolongaciones resinosas producto de la penetración de adhesivo hacia el interior de los túbulos. Estas estructuras reciben el nombre de tags de resina (TR). En (b), se aprecia una penetración homogénea del adhesivo hacia el interior de los túbulos, observándose una alta densidad de tags por campo. En (c), se aprecia una penetración desigual del adhesivo hacia el interior de los túbulos, observándose una menor densidad de tags por campo comparada con (b) y (d). En (d), se aprecia una penetración menos homogénea y una densidad de tags por campo menor comparada con (b), pero mayor que en (c). En (c) y (d) se aprecian estructuras sinuosas que nacen de la superficie adhesiva, semejante a los tags, de decenas de micrones de longitud y distinta densidad electrónica, que descansan colapsadas sobre la superficie, consideradas como artefactos de la técnica (A).

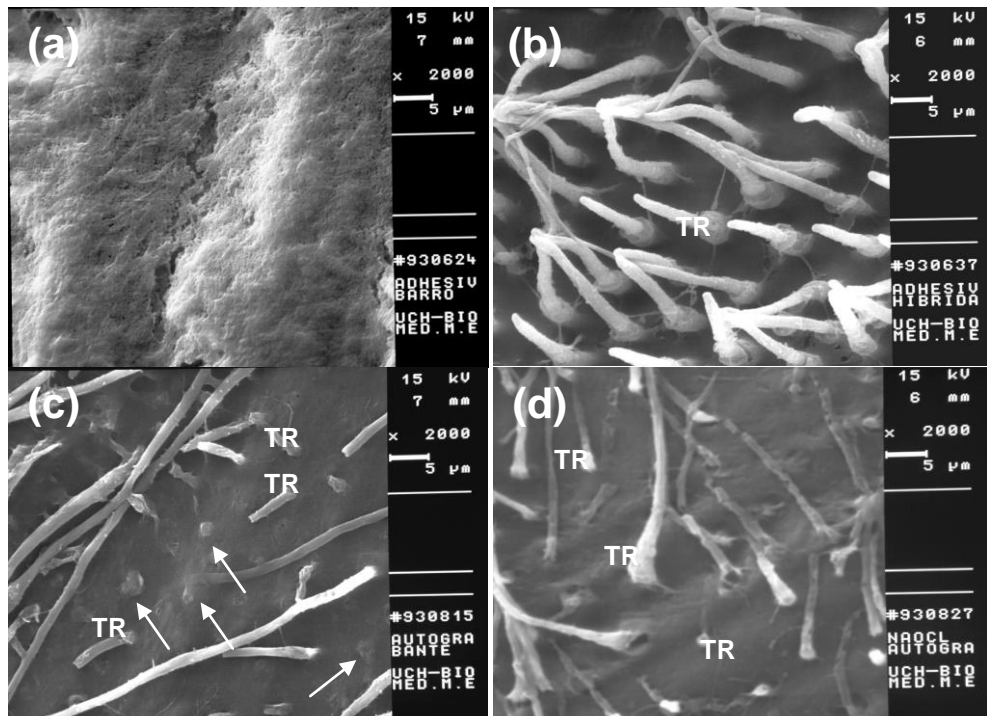


Figura 14. Magnificación (x2000) de la morfología representativa de las superficies adhesivas de restauraciones de resina compuesta realizadas con tres estrategias de adhesión sobre dentina fresada: (a) sin acondicionamiento, (b) Hibridización, (c) Integración, (d) Desproteinización/Autograbado: Al observar con mayor aumento, se aprecia que en (a) se impresiona fielmente la morfología del barro dentinario, mostrándose como una superficie irregular con total ausencia de tags de resina. En (b), se aprecia una penetración homogénea del adhesivo hacia el interior de los túbulos, observándose tags (TR) de apariencia y morfología similar, con longitudes entre 10 y 15 μm . En (c), se aprecia una penetración tímida y desigual del adhesivo hacia el interior de los túbulos, observándose tags de morfología variable, que no superan los 10 μm . También se aprecian brotes circulares de adhesivo que no alcanzaron a penetrar hacia los túbulos (flecha). En (d), se aprecia una penetración más discreta y asimétrica del adhesivo dentro de los túbulos comparada con (b), pero a su vez más eficaz que en (c). La morfología de los tags es semejante a la observada en (c)

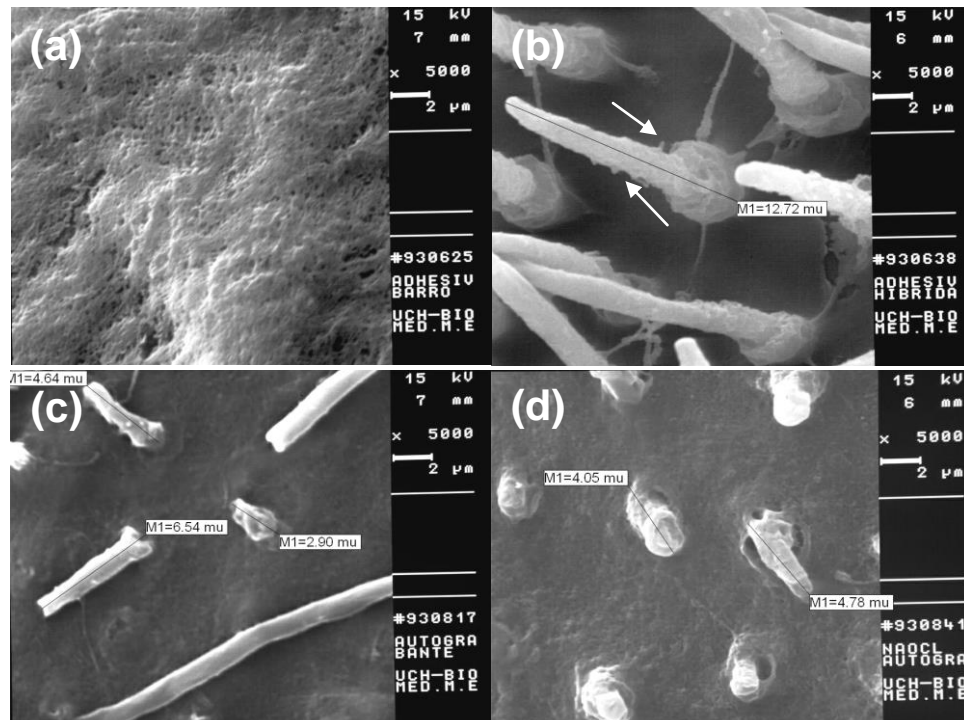


Figura 15. Morfología representativa de los tags de resina, en tres diferentes estrategias de adhesión sobre dentina fresada: (a) sin acondicionamiento, (b) Hibridización, (c) Integración, (d) Desproteínización/Autograbado: En (a), la impresión del barro dentinario sobre el adhesivo muestra una superficie irregular y porosa, en la que no se aprecian tags. En (b), se aprecia que el tag tiene tres segmentos: la base, el cuerpo y el extremo. La base es amplia, y se va haciendo cónica en la medida que se llega al cuerpo del tag, como si fuera un embudo. El cuerpo es cilíndrico, apreciándose pequeñas prolongaciones laterales (flechas). El extremo es más fino que el cuerpo, y posee un contorno redondeado. La superficie del tag es irregular en toda su extensión, y tienen una longitud aproximada de 12 μm . En (c), la base del tag es mucho menos amplia y alta que (b), dando la apariencia de que el cuerpo del tag es quien aflora de la superficie. El cuerpo es cilíndrico y de superficie irregular, terminando finalmente con un extremo truncado o plano. Su longitud no supera los 7 μm . En (d), la base del tag es levemente más amplia que en (c), pero mucho menos definida y de menor envergadura que en (b). Se aprecia además interrumpida por espacios vacíos, sin material resinoso. Así como en (c), el cuerpo es cilíndrico, de superficie irregular y de extremo truncado o plano. La longitud de los tags es similar a la observada en (c).

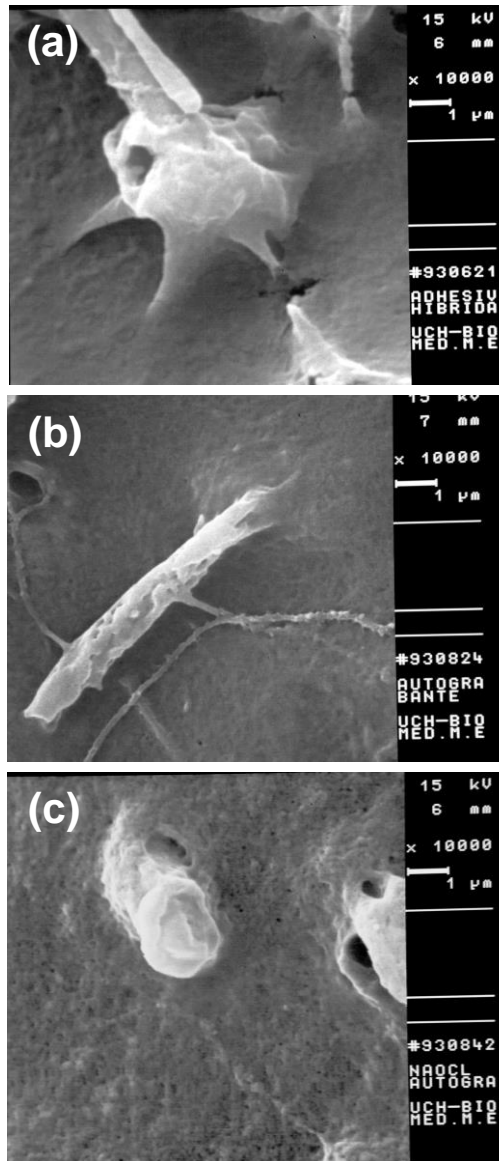


Figura 16. Morfología representativa de la superficie de la capa híbrida, en tres diferentes estrategias de adhesión sobre dentina fresada: (a) Hibridización, (b) Integración, (c) Desproteinización/Autograbado: En (a), la superficie de la capa híbrida se aprecia regular y suavemente texturizada, similar a una superficie alfombrada. Tanto en (b) como en (c), la superficie de la capa híbrida se aprecia tapizada por pequeñas porosidades, mostrando un aspecto más áspero e irregular comparado con (a).

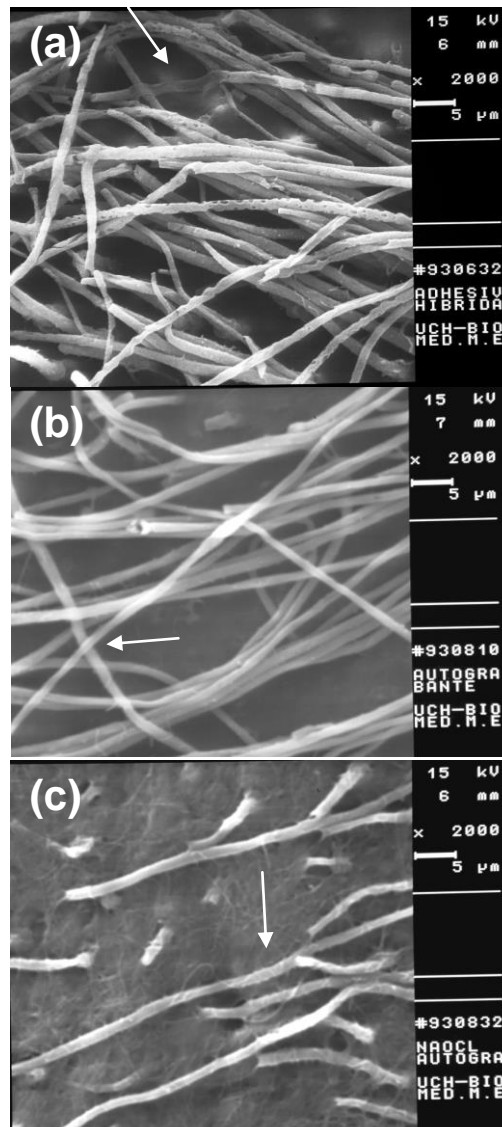


Figura 17. Morfología representativa de los artefactos de la técnica observados en cada uno de los especímenes analizados bajo el microscopio electrónico de barrido: (a) Hibridización, (b) Integración, (c) Desproteización/Autograbado: Tanto en (a), (b) y (c) es posible apreciar estructuras sinuosas que nacen de la superficie adhesiva, de decenas de micrones de longitud, que descansan colapsadas sobre la superficie (flechas). Es posible apreciar en (a) que algunas de estas estructuras presentan superficies de aspecto apolillado y ahuecado. La diferencia de electrodensidad y cierta translucidez dista del aspecto sólido observado en los tags anteriormente descritos.

Discusión

La dentina es un sustrato altamente complejo, debido a su gran componente orgánico, estructura tubular, humedad, permeabilidad y presencia de barro dentinario.¹³ El barro dentinario es considerado una barrera física que limita el proceso de adhesión a dentina. Es por eso que los principios actuales de adhesión consideran que éste debe ser tratado mediante una remoción total, parcial, o bien incorporándolo al sustrato adhesivo.^{10,11}

Para llevar a cabo dicha tarea, las estrategias de adhesión incluyen acondicionadores que interactúan con el barro y la matriz dentinaria, los cuales generan cambios a nivel micro estructural, que permiten generar un sustrato apto para la infiltración del adhesivo.

En dicho contexto, el presente estudio analizó y comparó morfológicamente bajo microscopio electrónico de barrido (MEB), el efecto de tres estrategias diferentes de adhesión sobre dentina sana fresada. Las estrategias estudiadas fueron: técnica de hibridación o grabado ácido de la dentina, técnica de integración del barro dentinario mediante sistema autograbante y técnica de desprotección de la dentina seguida de sistema autograbante. Para observar qué cambios morfológicos existen en la dentina luego de ser acondicionada por estos tres mecanismos, y qué repercusión tienen dichos cambios sobre la morfología del componente resinoso que toma contacto con ella, tanto la superficie dentinaria como la superficie adhesiva fueron analizadas separadamente al MEB.

Como se ha descrito en la literatura, cualquier estrategia de adhesión a dentina está en función del barro dentinario generado por los procesos de corte y desgaste de la superficie dentaria durante la realización de una preparación biológica. En la generación del barro dentinario existen factores que influyen en su morfología, siendo principalmente el tipo de instrumental rotatorio (fresas de carbide o piedra diamantadas) y la ubicación dentro del espesor dentinario los más determinantes.⁶³ Dichos hallazgos fueron confirmados en este estudio, notándose que tanto la superficie de la matriz dentinaria como la entrada de los túbulos,

obtenidos por un corte transversal en fractura (Figura 9), fueron cubiertos por una corteza de barro dentinario producido por el paso de una piedra diamantada de grano grueso (Figura 10). La generación de distintos tipos de barro por una misma fresa, permite inferir que en una preparación biológica conviven sustratos con áreas morfológicamente distintas, donde el efecto logrado por la aplicación de un acondicionador bajo las mismas condiciones, puede ser más significativo en unas que en otras. Los sistemas autograbantes son puntualmente más sensibles a éste fenómeno.²¹

En la tarea de lograr un sustrato apto para la adhesión, el análisis de las imágenes obtenidas en este estudio permitió sostener que cada una de las tres estrategias de acondicionamiento modificó la morfología de la superficie dentinaria fresada en distintos grados (Figura 11).

En el caso de la técnica de hibridación, el patrón de grabado homogéneo da cuenta de un efecto marcado, que independiente de la morfología irregular, diferentes grosores y grados de compactación del barro en diferentes áreas sobre una misma superficie, generó la remoción prácticamente total del barro dentinario y smear plugs, provocando la apertura total de los túbulos y el descubrimiento de la matriz intertubular (Figura 11b y 12b). Estas observaciones concuerdan con los trabajos de Oliveira y cols (2003)⁶³, y Montes y cols (2005)²⁴. La apertura de los túbulos fue acompañada de un ensanchamiento a expensas de la dentina peritubular, en forma de “embudo”, dado por los diferentes patrones de desmineralización entre la dentina peritubular y la dentina intertubular. Según Montes y cols (2005)²⁴, esta diferencia entre los patrones de desmineralización puede ser explicada por las diferencias estructurales entre ambas matrices, en donde un mayor componente orgánico de la dentina intertubular ayudaría a disminuir la difusión ácida a través del componente mineral, mientras que en la otra, un mayor componente mineral permitiría fácilmente la difusión ácida desde esta superficie hacia dentro del túbulo. Este mecanismo explicaría la existencia de áreas porosas alrededor de los túbulos, lo que sugiere que fueron grabadas desde adentro. Además, este autor observó tres diferentes áreas dentro de la matriz desmineralizada intertubular: una externa compacta y colapsada, una intermedia

más porosa, y una más profunda que presenta espacios anchos y pocas fibras colágenas. Pese a que la preparación de las muestras fue muy similar, dichas observaciones no fueron apreciadas en este estudio, debido a diferencias entre los cortes de los especímenes observados en este estudio (en sección transversal de los túbulos), mientras que los otros autores analizaron imágenes en sección longitudinal.

Un efecto menos marcado se observó cuando fue aplicado el sistema autograbante sobre la superficie fresada, mostrándose más sensible a la diversidad morfológica del barro dentinario en la medida que éste solo consiguió penetrarlo débilmente, sin conseguir exponer la matriz intertubular y exhibiendo diversos grados de oclusión tubular por smear plugs, en distintos sectores de una misma superficie (Figura 11c y 12c). Además, no existieron diferencias morfológicas significativas en relación a los patrones de desmineralización de la dentina peritubular e intertubular, contrario a lo observado con el grabado ácido, por lo que no fue posible observar un ensanchamiento mayor de la entrada de los túbulos, ni tampoco en efecto “embudo”. Esto concuerda con las imágenes obtenidas de los trabajos tanto de Oliveira y cols, y Montes y cols, que muestran superficies tratadas con un sistema autograbante (Clearfil Se Bond, Kuraray Co Ltd, Japan) en donde es posible apreciar un patrón de autograbado más efectivo, en tanto se consigue descubrir prácticamente toda la matriz intertubular, desmineralizándola a una profundidad de $0.5\mu\text{m}$, pero a su vez consiguiendo sólo una remoción parcial de los smear plugs, sin lograr ensanchamiento a expensas de la dentina peritubular. Otros estudios han mostrado una profundidad de penetración del autograbado aún mayor, logrando formar una capa híbrida cercana a los $1.5\mu\text{m}$. Las diferencias encontradas en este estudio pueden deberse tanto a la agresividad del sistema autograbante empleado, como al tipo y grosor del barro dentinario generados en el procesamiento de las muestras. Cabe señalar que en este estudio no se midió la penetración del autograbante dentro del barro ni la dentina subyacente, sino que se evaluó el efecto sobre la morfología de la superficie dentinaria.

Clearfil SE Bond es considerado el gold estándar de los sistemas autograbantes¹⁰. Este tiene un pH cercano a 2, y es clasificado como un adhesivo de agresividad “suave”. Por otro lado, el sistema autograbante utilizado en este estudio, Adper SE Plus tiene un pH relativamente bajo (cerca de 1), perteneciendo de esta forma a la familia de sistemas autograbantes de agresividad “fuerte”.¹¹⁶ Al comparar las imágenes obtenidas en este estudio (Figura 12c) con la obtenida por Oliveira y cols. (Figura 4), se aprecia que Clearfil SE Bond tuvo un efecto levemente mayor que el sistema utilizado por este estudio, pues consiguió descubrir casi en su totalidad la matriz intertubular, mientras que Adper SE Plus solo consiguió disolver parcialmente el barro dentinario, sin ser posible la observación la matriz intertubular que yacía bajo el barro. Pese a que el sistema ocupado por este estudio es más agresivo que el primero, tuvo un efecto menos marcado sobre la superficie dentinaria fresada. Esto permite inferir que las características morfológicas del barro dentinario fueron diferentes en ambos estudios, y que la piedra diamantada grano grueso ocupada en este estudio generó un barro dentinario más grueso y compacto en comparación al formado con los desgastes usados en la metodología ocupada por Oliveira y cols, quién ocupó fresas de carbide. Este fenómeno concuerda con lo planteado por otros investigadores, quienes sostienen que piedras diamantadas con mayor rugosidad generarían una corteza más gruesa de barro dentinario comparadas con aquellas producidos por fresas de carbide, hecho que estaría asociado a una menor capacidad de infiltración de los monómeros y bajos valores de fuerza adhesiva.¹¹⁷

Por otra parte, luego de acondicionar la superficie dentinaria con NaOCl se produjo en efecto discreto sobre el barro dentinario, manifestado por un patrón poco definido e irregular, en donde fue posible observar fragmentos de barro dentinario, grumos sobre la superficie de matriz intertubular y smear plugs parcialmente removidos (Figura 11d y 12d). Este débil efecto también fue observado en otro estudios,^{118,28} en donde no es posible apreciar cambios morfológicos sustanciales entre la superficie cubierta normalmente con barro dentinario, comparada con aquella con cierto grado de desproteización, sugiriendo que para lograr una completa remoción del sustrato orgánico con concentraciones cercanas al 10%, se requiere de aproximadamente de 30

minutos, tiempo clínico inviable en la práctica real.¹¹⁹ Tampoco fue posible apreciar un aumento del componente mineral como han señalado otros autores.¹⁰⁹

Sin embargo, el hipoclorito posee un efecto oxidante sobre la matriz orgánica de la dentina, que induce alteraciones moleculares y estructurales sobre el colágeno y los glicosaminoglicanos cuando éste es aplicado por un tiempo clínico razonable.^{108,120} Este fenómeno podría explicar que exista una relativa desorganización del barro dentinario, observándose formación de virutas, una remoción parcial de los smear plugs, y también grumos sobre la superficie intertubular, en la medida que este agente remueva al menos parcialmente el componente orgánico de dichas estructuras (Figura 11d y 12d). También se puede inferir que los grumos sobre la superficie podrían corresponder a restos proteicos desnaturalizados en forma coloidal y amorfa.¹⁰⁴ En este estudio, tampoco fue posible la observación a nivel morfológico del aumento de la fracción mineral por sobre la orgánica en el sustrato, como ha sido señalado por otros autores.¹⁰⁹

En este estudio también se determinó que existe una congruencia morfológica entre los cambios microestructurales de la superficie dentinaria acondicionada, con aquellos observados en la superficie adhesiva que toma contacto con ella.

De esta forma, la superficie adhesiva que toma contacto con dentina fresada no acondicionada, imprimió fielmente su morfología, en donde fue posible observar una superficie con marcas generadas por el paso de la piedra de diamante, como también una superficie irregular que reprodujo la morfología de la corteza del barro dentinario (Figuras 13a y 14a). Además, contrario a lo observado en el resto de las superficies acondicionadas, esta superficie fue la única que no generó prolongaciones hacia el interior de los túbulos o tags de resina. Este hecho está de acuerdo con los principios de adhesión que sostienen los investigadores, señalándose que para poder llevar a cabo dicho proceso, el barro deber ser total o parcialmente removido, o bien ser incorporado al sustrato adhesivo.^{10,11}

La técnica de Hibridación Convencional produjo la formación de tags de similar longitud, de gran densidad por área y uniformemente distribuidos (Figura 13b, 14b y 15b). Su base cónica se ajusta a la morfología del efecto embudo dado por el patrón de grabado de la dentina peritubular, permitiendo inferir que el tag de resina toma íntimo contacto con las paredes del túbulo, formando incluso prolongaciones laterales de bajo calibre. Su extremo redondeado y afinado podría deberse a la viscosidad y tensión superficial del adhesivo, que, en estado semi-líquido, difunde por un lumen tubular aparentemente permeable manteniendo su cohesión. Consecutivamente, producto de la polimerizado in situ dentro del túbulo, el adhesivo cambia de un estado semi-líquido a uno sólido, pero manteniendo su forma original. La morfología de los tags de resina analizadas en este estudio es similar a la encontrada en otros trabajos.⁶⁴

La morfología de la superficie de la capa híbrida en esta estrategia se apreció homogénea y suavemente texturizada (Figura 16a), permitiendo inferir que dicha superficie no impresionó un sustrato irregular y rugoso, en el caso de la impresión del barro dentinario observado en la Figura 6a, sino más bien un sustrato microporoso como lo es la matriz intertubular desmineralizada. Este fenómeno concuerda con otros estudios y es relacionado con los mejores resultados de adhesión en comparación con otras estrategias.^{10,11}

La aplicación de Adper SE Plus, un sistema autograbante de agresividad “fuerte” (pH 1), sobre una superficie dentinaria cubierta por barro dentinario, dio paso a la formación de una superficie adhesiva menos homogénea, y con una menor densidad de tags, en comparación con el sistema de grabado y lavado (Figura 13c y 14c). Dichos tags mostraron diferentes longitudes, e incluso, se logró apreciar insinuaciones de adhesivo que pudieron alcanzar sólo la entrada de los túbulos. Este hallazgo concuerda también con las observaciones de otros estudios,¹²¹ donde se muestra que al aplicar un sistema autograbante sobre barro dentinario grueso, se obtienen tags de menor longitud y en menor número. Este fenómeno, es congruente con lo observado en la superficie dentinaria autograbada, permitiendo inferir que la desoclusión parcial de lo smear plugs disminuye la permeabilidad tubular al adhesivo, impidiendo la correcta difusión de

este último a través del túbulo e influyendo directamente en la longitud de los tags. La morfología de los tags observados (Figura 15c) podría ser explicada por diferentes factores. Su base es más cilíndrica y delgada, en comparación con la base amplia y conoidal encontrada en la estrategia de grabado y lavado, debido a la ausencia del efecto embudo producido por patrón de grabado de la dentina peritubular. La irregularidad de la superficie del tag podría ser explicada por la incorporación de estructuras provenientes del barro dentinario, como también por su baja viscosidad y cohesividad, que podrían generar un aspecto más amorfo. Su extremo truncado permitiría inferir que, al difundir, desmineralizar e infiltrar simultáneamente dentro del lumen tubular, existirían estructuras intratubulares que se comportan como barreras de difusión, restando permeabilidad tubular, e impidiendo que el adhesivo alcance un mayor grado de penetración.

La superficie de la capa híbrida obtenida por el autograbante se apreció más áspera y con porosidades de mayor tamaño (figura 16b), comparada con la morfología de la capa híbrida obtenida por la técnica de grabado y lavado. Este aspecto podría deberse a la impregnación del barro dentinario, similar a lo observado en la Figura 12c, e incorporación de estructuras provenientes del mismo barro, como también por una alta incorporación de solvente residual al sustrato adhesivo producto de su volatilización incompleta.

Cuando el sustrato del sistema autograbante Adper SE Plus fue modificado mediante la aplicación previa de una solución de NaOCl al 10%,(Técnica de Desproteínización o Hibridación reversa por autograbado) tanto la morfología de los tags como la morfología la superficie de la capa híbrida fue similar a la obtenida luego de autograbar directamente sobre barro dentinario (Figura 15d y 16c). Sin embargo, al realizar la desproteínización previo a la aplicación del autograbante, se observó un significativo incremento en la densidad de tags por área (Figura 13d), permitiendo inferir que aunque el efecto desproteínizante alcanzado por el NaOCl fue discreto (Figura 11d), sería suficiente para desorganizar o debilitar al barro dentinario y los smear plugs,^{122,28} facilitando de esta forma la penetración e infiltración de los monómeros ácidos a través de ellos,

aumentando la permeabilidad tubular de la superficie y, por ende, aumentando el número de tags.

Sin embargo, este proceso va acompañado de la incorporación de componentes orgánicos y proteicos desnaturalizados dentro del sustrato adhesivo, que pueden ir en desmedro de la estabilidad de la capa híbrida. Además dichos residuos desnaturalizados podrían interferir en la correcta infiltración de los monómeros en la matriz intertubular.

También se ha descrito que la oxidación producida sobre el sustrato luego de la aplicación del NaOCl, genera radicales libres dispersos en la superficie de la matriz dentinaria, los cuales compiten con los iniciadores de la reacción de fotopolimerización del adhesivo, resultando entonces en cadenas más cortas y polimerización incompleta de los monómeros adhesivos. Este proceso sería responsable de la disminución en la resistencia adhesiva señalada por algunos autores.^{113, 123}

En el contexto de la adhesión de los sistemas autograbantes sobre dentina acondicionada por NaOCl, un estudio reciente²⁸ reportó que existen diferencias significativas en los valores de resistencia adhesiva, cuando esta estrategia es realizada sobre dentina sana o sobre dentina cariada. Cuando la dentina sana fue acondicionada con NaOCl, se produjo una disminución en los valores de resistencia adhesiva, mientras que en dentina cariada, esta estrategia de acondicionamiento no generó variaciones significativas en dichos valores. También, tanto para dentina sana como cariada, un mayor tiempo de exposición al NaOCl produjo menores valores de resistencia adhesiva, comparados a aquellos logrados por un corto periodo de acondicionamiento. Finalmente, la aplicación de un agente reductor (como una sal sódica ácida) que revierta el efecto oxidante del NaOCl, produjo un incremento en los valores de resistencia adhesiva para ambos grupos.²⁸

En virtud de los antecedentes entregados anteriormente, en la medida que el efecto desproteínizante y antimicrobiano del NaOCl sea llevado a cabo

eficientemente, y más aún si su efecto negativo sobre la polimerización puede ser revertido por la acción de un elemento reductor, la aplicación de un agente desproteínizante como el NaOCl podría resultar en una práctica interesante, debido a la manifestación de algunos efectos que podrían resultar beneficiosos sobre un sustrato complejo como la dentina, se encuentre o no afectada por caries. Sin embargo, la aplicación de NaOCl como acondicionador dentinario ha entregado resultados controversiales y poco concluyentes, por lo que su uso en la práctica clínica sigue siendo no aconsejable. De esta forma, resulta necesario seguir realizando estudios que evalúen si el acondicionamiento dentinario mediante NaOCl provoca una mejoría sobre los procedimientos adhesivos, minimizando los riesgos de fracaso dentro de la interface adhesiva, al mismo tiempo que su uso muestre un comportamiento inocuo sobre las estructuras bucales.

Aunque no fue objetivo de este estudio, también fue posible apreciar la existencia de estructuras filamentosas sinuosas de apariencia poco sólida que nacen de la superficie adhesiva (Figura 17), y que inducen a una mala interpretación de la morfología de los tags. Estas estructuras corresponderían a un artefacto de la técnica, pues, como ha sido objeto de revisión, la formación y morfología de los tags puede ser explicada por diversos procesos que guardan coherencia entre el sustrato y el adhesivo.

Las estrategias de acondicionamiento generan cambios sobre la superficie dentinaria, y estos a su vez, sobre la superficie adhesiva. La literatura en general, así como también este estudio, señalan que existen diferencias entre cada uno de los tipos de acondicionamientos dentinarios, los que en consecuencia, debiesen generar una morfología distinta para cada una. Contrario a esto, dichas estructuras fueron normalmente observadas en cada una las estrategias adhesivas empleadas, en donde el largo de las estructuras podía llegar a decenas de micrones de longitud, superando ampliamente la longitud esperada por el tipo de efecto producido sobre la dentina acorde a la estrategia empleada. El recorrido sinuoso e incluso angulado, el aspecto ahuecado y apolillado, la diferencia de electrodensidad y cierta translucidez dista de la morfología sólida de los tags

apreciada en este estudio, como también por otros investigadores.¹⁵ Otros investigadores han realizado similares observaciones, y han señalado que dichas estructuras no son de naturaleza resinosa, como es el caso de los tags, sino que podrían corresponder a una vaina tubular de naturaleza orgánica como la lámina limitans.⁵⁸ Se ha señalado que los glicosaminoglicanos que componen la lámina limitans son resistentes a los ácidos fuertes, como el HCl, y también al NaOCl.

Cabe señalar, que el tipo de procesamiento de la muestra ocupado por esos autores¹⁵, no sólo fue prácticamente igual al empleado en este estudio, sino que es una de las más utilizadas en la literatura para la evaluación de la interface diente-adhesivo. De esta forma, la longitud y el aspecto colapsado de las estructuras se deberían a la permanencia de la lámina limitans, y a una falta de sustento proporcionado por la dentina peritubular, la cual fue completamente desintegrada. El aspecto apolillado se debería a una parcial desintegración de la lámina limitans producida por los agentes oxidantes como el NaOCl y el peróxido de hidrógeno, ocupados en las técnicas de procesamiento para la observación al microscopio.

Por esta razón, resulta necesario complementar las técnicas de microscopía electrónica con otras que permitan la observación de la interface adhesiva con la menor cantidad de artefactos y sesgos, los cuales suelen inducir a errores de interpretación que podrían generar una mala comprensión de los fenómenos involucrados en el proceso de adhesión a la estructura dentaria.

Conclusiones

Dentro de las limitaciones de este estudio, se pudo concluir lo siguiente:

- Las tres estrategias de acondicionamiento utilizadas sobre dentina sana fresada, modificaron la morfología de esta última en distintos grados.
- Los cambios morfológicos producidos por las tres estrategias de adhesión sobre dentina fresada, generaron cambios congruentes en la morfología de las respectivas superficies adhesivas observadas.
- La Técnica de Hibridación por grabado ácido produjo un efecto marcado sobre la superficie dentinaria fresada, el cual generó una remoción total del barro dentinario y los smear plugs, mediante un patrón definido y homogéneo. Este sustrato dio paso a la generación de una alta densidad de tags distribuidos en forma pareja y morfológicamente uniformes, como también una capa híbrida suavemente texturizada y regular.
- La Técnica de Integración por sistema autograbante produjo un efecto tímido sobre la superficie dentinaria fresada, el cual generó una remoción parcial del barro dentinario y los smear plugs, mediante un patrón definido pero poco homogéneo. Este sustrato dio paso a la generación de tags en baja densidad, disparejamente distribuidos y de morfología variable, como también una capa híbrida de mayor porosidad y aspecto irregular.
- La técnica de Desproteínización por NaOCl seguida de un sistema autograbante produjo un efecto discreto sobre la superficie dentinaria fresada, el cual generó una débil remoción y desintegración del barro dentinario y smear plugs, mediante un patrón poco definido e irregular. No hubo mayor variación en la morfología de la capa híbrida y los tags de resina respecto a la Técnica de Integración, sin embargo éstos últimos aumentaron considerablemente en densidad por campo.

- La preparación de la muestra para la observación de estructuras adhesivas al Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) genera artefactos propios de la técnica, los cuales fueron apreciados como estructuras filamentosas que dan una apariencia de “falsos tags”.

Sugerencias

- Realizar un estudio en el que se compare la resistencia adhesiva de restauraciones de resina compuesta, realizadas según la Técnica de Hibridación por Grabado Ácido, Técnica de Integración por Sistema Autograbante, y la Técnica por Desproteínización o Hibridación Reversa por Autograbado, con y sin la aplicación de un agente reductor.

- Realizar un estudio en el que se compare la microfiltración marginal de restauraciones realizadas según la Técnica de Hibridación por Grabado Ácido, Técnica de Integración por Sistema Autograbante, y la Técnica por Desproteínización o Hibridación Reversa por Autograbado.

- Realizar un estudio en el que se compare la nanofiltración y envejecimiento de la interface adhesiva de restauraciones de resina compuesta realizadas según la Técnica de Hibridación por Grabado Ácido, Técnica de Integración por Sistema Autograbante, y la Técnica por Desproteínización o Hibridación Reversa por Autograbado.

- Realizar un estudio en el que se compare la morfología de la interface adhesiva de restauraciones realizadas según la Técnica de Hibridación por Grabado Ácido, Técnica de Integración por Sistema Autograbante, y la Técnica por Desproteínización o Hibridación Reversa por Autograbado, utilizando otras técnicas de microscopía, así como otros procesamientos que permitan eliminar la generación de artefactos propios de la técnica.

- Realizar estudios en situaciones clínicas reales, sobre dentina sana y dentina afectada con lesiones de caries.

Referencias Bibliográficas

-
- ¹ Ehrmantraut, M., Bader, M. (1994). "Polimerización de Resinas Compuestas a través de Estructuras Dentarias". Rev Fac Odont U Chile. 12 (2): 22-27
- ² Anusavice, K.J. (2003). "Informatics Systems to Assess and Apply Clinical Research on Dental Restorative Materials". Adv Dent Res. 17; 43-48
- ³ Lutz, F.U., Krejci I, Besek M. (1997). "Operative dentistry: the missing clinical standards". Pract Periodont Aesthet Dent. 9(5):541-8
- ⁴ Loguercio AD, Reis A, Ballester RY. (2004). "Polymerization shrinkage: effects of constraint and filling technique in composite restoration". Dent Mater 20(3):236-43
- ⁵ Liebenberg WH. (1996) "Successive cusp build-up: an improved placement technique for posterior direct resin restorations". J Can Dent Assoc 62(6):501-7
- ⁶ Dewaelea, M., Asmussenc, E., Peutzfeldt, A., Munksgaard, E., Benettid, A., Finnéa, G., Leloupe, G., Devauxa, J. (2009). "Influence of curing protocol on selected properties of light-curing polymers: Degree of conversion, volume contraction, elastic modulus, and glass transition temperature". Dent Mater 25(12):1576-84
- ⁷ Benetti AR, Asmussen E, Munksgaard EC, Dewaele M, Peutzfeldt A, Leloup G, Devaux J. (2009)."Softening and elution of monomers in ethanol". Dent Mater 25(8):1007-13
- ⁸ Kidd EAM. (1976). "Microleakage: a review." J Dent 4(5):199-206
- ⁹ Buonocore, MG.(1955). "A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces". J Dent Res 34(6) 849-853
- ¹⁰ Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas .,Vijay P, Van Landuyt K, Lambrechts P, Vanherle G. (2003). "Buonocore Memorial Lecture: Adhesion to enamel and dentin:Current status and future challenges." Oper Dent 28(3) 215-235
- ¹¹ Perdigão, J. (2007). "New developments in dental adhesion." Dent Clin North Am. 51(2):333-57
- ¹² Abramovich, A. (1999). "Histología y embriología dentaria". Buenos Aires. Editorial Panamericana. 2º Edición. 314 p. Cap 6, 118-152
- ¹³ Marshall, Jr. G.W., Marshall, S.J., Kinney, J.H., Balooch, M. (1997). "The dentine substrate: structure and properties related to bonding." J Dent; 25:441-58

-
- ¹⁴ Pashley DH, Carvalho RM. (1997). "Dentine permeability and dentine adhesion." *J Dent.* 25(5):355-72
- ¹⁵ Giachetti L, Bertini F, Scaminaci Russo D. (2004). "Investigation into the nature of dentin resin tags: A scanning electron microscopic morphological analysis of demineralized bonded dentin". *J Prosthet Dent* 92(3):233-8
- ¹⁶ Ferrari M, Tay FR. (2003). "Technique sensitivity in bonding to vital, acid-etched dentin." *Oper Dent* 28(1):3–8
- ¹⁷ Grégoire G, Guignes P, Nasr K.(2009) "Effects of dentine moisture on the permeability of total-etch and one-step self-etch adhesives." *J Dent* 37(9):691-699
- ¹⁸ Breschi L, Perdigão J, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Lopes M. (2003) "Immunocytochemical identification of type I collagen on etched human dentin". *J Dent Res* 82(4):764-9
- ¹⁹ Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. (2008). "Dental adhesion review: Aging and stability of the bonded interface" *Dent Mater* 24(1):90-101
- ²⁰ Perdigão J, Lambrechts P, van Meerbeek B, Tomé AR, Vanherle G, Lopes AB. (1996). "Morphological field emission-SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin." *Dent Mater* 12(4):262-71
- ²¹ Tay FR, Pashley DH.(2001). "Aggressiveness of contemporary self-etching systems.I: Depth of penetration beyond dentin smear layers." *Dent Mater* 17(4): 296-308
- ²² Harada N, Nakajima M, Pereira PNR, Yamaguchi S, Ogata & Tagami J. (2000). "Tensile bond Strength Of a Newly Developed One-bottle Self-Etching Resin Bonding System to Various dental Substrates." *Dent in Japan* 36:47-53
- ²³ Vaidyanathan J, Vaidyanathan TK, Kerrigan JE. (2007). "Evaluation of intermolecular interactions of self-etch dentin adhesive primer molecules with type 1 collagen: computer modeling and in vitro binding analysis". *Acta Biomaterialia* 3(5):705–14
- ²⁴ Montes MA, de Goes MF, Sinhorette MA. (2005). "The in vitro morphological effects of some current pre-treatments on dentin surface: a SEM evaluation." *Oper Dent.* 30(2):201-12
- ²⁵ Prati C, Chersoni S, Pashley DH. (1999). "Effect of removal of surface collagen fibrils on resin-dentin bonding." *Dent Mater* 15(5):323-31

-
- ²⁶ Inaba D, Duschner H, Jongebloed W, Odellius H, Takagi O, Arends J. (1995). "The effects of a sodium hypochlorite treatment on demineralized root dentin." *Eur J Oral Sci.* 103(6):368-74
- ²⁷ Vongphan N, Senawongse P, Somsiri W, Harnirattisai C. (2005). "Effects of sodium ascorbate on microtensile bond strength of total-etching adhesive system to NaOCl treated dentine." *J Dent* 33(8):689–695
- ²⁸ Taniguchi G, Nakajima M, Hosaka K, Iwamoto N, Ikeda M, Foxton RM, Tagami J. (2009). "Improving the effect of NaOCl pretreatment on bonding to caries-affected dentin using self-etch adhesives." *J Dent* 37(10): 769 –775
- ²⁹ Braga RR, Ferracane JL. (2004). "Alternatives in Polymerization Contraction Stress Management" *ev. Oral Biol Med* 15(3); 176-84
- ³⁰ Tsitrou EA, Helvatjoglu-Antoniades M, van Noort R. (2010). "A preliminary evaluation of the structural integrity and fracture mode of minimally prepared resin bonded CAD/CAM crowns" *J Dent* 38(1):16-22
- ³¹ Deliperi S, Bardwell D. (2002). "An alternative method to reduce polymerization shrinkage in direct posterior composite restorations" *J Am Dent Assoc* 133(10):1387-1398
- ³² Ferracane JL. (2005). "Developing a more complete understanding of stresses produced in dental composites during polymerization" *Dent Mater* 21(1):36-42
- ³³ Davidson CL, De Gee AJ, Feilzer AJ. (1984). "The competition between the composite-dentin bond strength and the polymerization contraction stress." *J Dent Res* 1984 63(12) :1396–9
- ³⁴ Dauvillier BS, Feilzer AJ, de Gee AJ, Davidson CL. (2000). "Viscoelastic parameters of dental restorative materials during setting." *J Dent Res* 79:818-823
- ³⁵ Yoshikawa T, Sano H, Burrow MF, Tagami J, Pashley DH. (1999). "Effects of Dentin Depth and Cavity Configuration on Bond Strength". *J Dent Res* 78(4):898-905
- ³⁶ Yoshikawa T, Sano H, Burrow MF, Takatsu T, Yoshiyama M, Ciucchi B, et al. (1996). "Cavity bonding: effect of dentin depth. In: Dentin/pulp complex." *Proceedings of the International Conference on Dentin/Pulp Complex 1995 and the International Meeting on Clinical Topics of Dentin/Pulp Complex.* Tokyo: Quintessence Publishing Co., Ltd., pp. 357-358
- ³⁷ He Z, Shimada Y, Tagami J. (2007). "The effects of cavity size and incremental technique on micro-tensile bond strength of resin composite in Class I cavities." *Dent Mater* 23(5):533-8

-
- ³⁸ Nikolaenko SA, Lohbauer U, Roggendorf M, Petschelt A, Dasch W, Frankenberger R. (2004). "Influence of C-factor and laying technique on microtensile bond strength to dentin." *Dent Mater* 20(6):579-85
- ³⁹ Nayif MM, Nakajima M, Foxton RM, Tagami J. (2008). "Bond strength and ultimate tensile strength of resin composite filled into dentine cavity; effect of bulk and incremental filling technique". *J Dent* 36(3):228-34
- ⁴⁰ Klaff D. (2001). "Blending incremental and stratified layering techniques to produce an esthetic posterior composite resin restoration with a predictable prognosis". *J Esthet Restor Dent* 13(2):101-13
- ⁴¹ Peutzfeldt A, Asmussen E. (2005). "Resin composite properties and energy density of light cure". *J Dent Res* 84 (7): 659–662
- ⁴² Asmussen E, Peutzfeldt, A. (2003). "Two-step curing: influence on conversion and softening of a dental polymer". *Dent Mater* 19 (6):466–470
- ⁴³ Calheiros FC, Kawano Y, Stansbury JW, Braga RR. (2006). "Influence of radiant exposure on contraction stress, degree of conversion and mechanical properties of resin composites". *Dent Mater* 22 (9): 799–803
- ⁴⁴ Silikas N, Eliades G, Watts DC. (2000) "Light intensity effects on resin-composite degree of conversion and shrinkage strain". *Dent Mater* 16(4):292–6
- ⁴⁵ Sahafi A, Peutzfeldt A, Asmussen E. (2001). "Effect of pulse-delay curing on in vitro wall-to-wall contraction of composite in dentin cavity preparations". *Am J Dent* 14 (5):295–6
- ⁴⁶ Charton C, Colon P, Pla F. (2007). "Shrinkage stress in light-cured composite resins: Influence of material and photoactivation mode". *Dent Mater* 23 (8) 911–920
- ⁴⁷ Camps J, Dejou J, Remusat M, About I. (2000). "Factors influencing pulpal response to cavity restorations". *Dent Mater* 16 (6):432–40
- ⁴⁸ Eick JD, Welch FH. (1986). "Polymerization shrinkage of posterior composite resins and its possible influence on postoperative sensitivity" *Quint Int* 17(2):103-11
- ⁴⁹ Van Meerbeek B, Vargas M, Inoue S, Yoshida Y, Peumans M, Lambrechts P & Vanherle G (2001). "Adhesives and cements to promote preservation dentistry" *Oper Dent* (6): 119-144
- ⁵⁰ Robert L. Erickson, Wayne W. Barkmeie' and Mark A. Latta. (2009). "The role of etching in bonding to enamel: A comparison of self-etching and etch-and-rinse adhesive systems". *Dent Mater* 25(11): 1459-1467

-
- ⁵¹ Abramovich, A. (1999). "Histología y embriología dentaria". Buenos Aires". Editorial Panamericana. 2º Edición. 314 p. Cap 6, p 118-152
- ⁵² Kinney JH, Marshall Jr GW, Marshall SJ. (1994). "Three-dimensional mapping of mineral densities in carious dentin: theory and method". *Scanning Microsc* 8(2):197–205
- ⁵³ Abramovich, A. (1999). "Histología y embriología dentaria". Buenos Aires. Editorial Panamericana. 2º Edición. 314 p. Cap 3 Dentina, pags 42-74
- ⁵⁴ Zaslansky P, Zabler S, Fratzl P. (2010). "3D variations in human crown dentin tubule orientation:A phase-contrast microtomography study". *Dent Mater* 26(1):1-10
- ⁵⁵ Vongsavan N, Matthews B. (1992). "Fluid flow through cat dentine in vivo". *Arch Oral Biol*.37(3):175-85
- ⁵⁶ Pashley DH, Matthews WG, Zhang Y, Johnson M. (1996). "Fluid shifts across human dentin in vitro in response to hydrodynamic stimuli". *Arch Oral Biol* 41(11): 1065–1072
- ⁵⁷ Hashimoto M, Ito S, Tay FR, Svizero NR, Sano H, Kaga M, Pashley DH. (2004). "Fluid movement across the resin–dentin interface during and after bonding". *J Dent Res* 83 (11): 843–848
- ⁵⁸ Yoshihara K, Yoshihara N, Ejiri S, Iwaku M, Ozawa H. (2002). "Odontoblast processes in human dentin revealed by fluorescence labeling and transmission electron microscopy". *Histochem Cell Biol* 118(3):205–212
- ⁵⁹ Thomas HF. (1984). "The lamina limitans of human dentinal tubules." *J Dent Res* 63(8):1064–1066
- ⁶⁰ Dahl T, Sabsay B, Veis A. (1998). "Type I collagen-phosphoryn interactions: specificity of the monomer–monomer binding." *J Struct Biol* 123(2):162–8
- ⁶¹ Van Meerbeek B, Vargas M, Inque S, Yoshida Y, Perdigao J, Lambrechts P, Vanherle G.(2000). "Microscopy investigations. Techniques, results, limitations". *Am J Dent* 13:13D–8D
- ⁶² Oyarzun A, Rathkamp H, Dreyer E. (2000). "Immunohistochemical and ultrastructural evaluation of the effects of phosphoric acid etching on dentin proteoglycans." *Eur J Oral Sci* 108:546–54
- ⁶³ Oliveira SS, Pugach MK, Hilton JF, Watanabe LG, Marshall SJ, Marshall GW Jr.(2003). "The influence of the dentin smear layer on adhesion: a self-etching primer vs. a total-etch system". *Dent Mater* 19(8):758-67

-
- ⁶⁴ Ferrari M, Cagidiaco MC, Vichi A, Mannocci F, Mason PN, Mjör IA. (2001). "Bonding of all-porcelain crowns: structural characteristics of the substrate." *Dent Mater* 17(2): 156-164
- ⁶⁵ Breschi L, Perdigão J, Gobbi P, Mazzotti G, Falconi M, Lopes M. (2003) "Immunocytochemical identification of type I collagen on etched human dentin" *J Biomed Mater Res* 66(4):764-9
- ⁶⁶ Tay FR, Pashley DH, Yoshiyama M. (2002). "Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives." *J Dent Res* 81(7):472–6
- ⁶⁷ Breschi L, Prati C, Gobbi P, Pashley DH, Mazzotti G, Teti G. (2004) "Immunohistochemical analysis of collagen fibrils within the hybrid layer: a FEISEM study." *Oper Dent* 29(5):538–46
- ⁶⁸ Perdigão J, Lambrechts P, van Meerbeek B, Tomé AR, Vanherle G, Lopes AB. (1996). "Morphological field emission-SEM study of the effect of six phosphoric acid etching agents on human dentin." *Dent Mater* 12(4):262-71
- ⁶⁹ Ferrari M, Tay FR. (2003). "Technique sensitivity in bonding to vital, acid-etched dentin." *Oper Dent* 28(1):3–8
- ⁷⁰ Grégoire G, Guignes P, Nasr K. (2009). "Effects of dentine moisture on the permeability of total-etch and one-step self-etch adhesives." *J Dent* 37(9):691– 699
- ⁷¹ El Feninat F, Ellis TH, Sacher E, Stangel I. (2001). "A tapping mode AFM study of collapse and denaturation in dentinal collagen" *Dent Mater* 17 (4): 284-288
- ⁷² Manso AP, Marquezini L Jr, Silva SM, Pashley DH, Tay FR, Carvalho RM. (2008) "Stability of wet versus dry bonding with different solvent-based adhesives". *Dent Mater* 24(4): 476–482
- ⁷³ Holmes RG, Rueggeberg FA, Callan RS, Caughman F, Chan DC, Pashley DH, Looney SW. (2007) . "Effect of solvent type and content on monomer conversion of a model resin system as a thin film". *Dent Mater* 23(12):1506–1512
- ⁷⁴ Pashley DH, Agee KA, Nakajima M, Tay FR, Carvalho RM, Terada RS, Harmon FJ, Lee WK, Rueggeberg FA. (2001). "Solvent-induced dimensional changes in EDTA-demineralized dentin matrix." *J Biomed Mater Res* 56 (2):273–81
- ⁷⁵ Reis A, Loguercio A, Carvalho R, Grande R. (2004). "Durability of resin interfaces: effects of surface moisture and adhesive solvent component." *Dent Mater* 20(7):669–76
- ⁷⁶ Yiu Yiu CK, Pashley EL, Hiraishi N, King NM, Goracci C, Ferrari M, Carvalho RM, Pashley DH, Tay FR. (2005). "Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation." *Biomaterials* 26(34):6863 – 72

-
- ⁷⁷ Dickens SH, Cho BH. (2005). "Interpretation of bond failure through conversion and residual solvent measurements and Weibull analyses of flexural and microtensile bond strengths of bonding agents." *Dent Mater* 21(4):354–64
- ⁷⁸ De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, Van Meerbeek B. (2005). "A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results". *J Dent Res* 84(2):118–32
- ⁷⁹ Perdiago J, Gomes G, Gondo R, Fundingsland JW. (2006). "In vitro bonding performance of all-in-one adhesives. Part I. Microtensile bond strengths". *J Adhes Dent*. 8(6):367-73
- ⁸⁰ Van Meerbeek B, Van Landuyt K, De Munck J, Hashimoto M, Peumans M, Lambrechts P, Yoshida Y, Inoue S, Suzuki K. (2005). "Technique-sensitivity of contemporary adhesives." *Dent Mater* 24(1):1–13
- ⁸¹ Peumans M, Kanumilli P, De Munck J, Van Landuyt K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. (2005). "Clinical effectiveness of contemporary adhesives: a systematic review of current clinical trials." *Dent Mater* 21(9):864–81
- ⁸² Gordan VV, Vargas MA, Cobb DS, Denehy GE. (1997). "Evaluation of adhesive systems using acidic primers". *Am J Dent*. Oct;10(5):219-23
- ⁸³ Nakabayashi N, Saimi Y. (1996). "Bonding to intact dentin." *J Dent Res* 75(9):1706-15
- ⁸⁴ Knobloch LA, Gailey D, Azer S, Johnston WM, Clelland N, Kerby RE. (2007). "Bond strengths of one- and two-step self-etch adhesive systems". *J Prosthet Dent* 97(4):216-22
- ⁸⁵ Yoshida Y, Van Meerbeek B, Nakayama Y, Snauwaert J, Hellemans L, Lambrechts P, Vanherle G, Wakasa K. (2000). "Evidence of chemical bonding at biomaterial-hard tissue interfaces." *J Dent Res* 79(2):709-14
- ⁸⁶ Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, Inoue S, Tagawa Y, Suzuki K, De Munck J, Van Meerbeek B. (2004). "Comparative study on adhesive performance of functional monomers". *Jour of Dent Res* 83 (6): 454–458
- ⁸⁷ Ogata M, Harada N, Yamaguchi S, Nakajima M, Pereira PN, Tagami J. (2001). "Effects of different burs on dentin bond strengths of self-etching primer bonding systems". *Oper Dent* 26(4):375–82
- ⁸⁸ Tani C, Finger WJ. (2002). "Effect of smear layer thickness on bond strength mediated by three all-in-one self-etching priming adhesives". *J Adhes Dent*. 4(4):283-9

-
- ⁸⁹ Inoue S, Vargas MA, Abe Y, Yoshida Y, Lambrechts P, Vanherle G, Sano H, Van Meerbeek B. (2001). "Microtensile bond strength of eleven contemporary adhesives to dentin." *J Adhes Dent* 3(3):237-45
- ⁹⁰ Nishiyama N, Suzuki K, Komatsu K, Yasuda S, Nemoto K. (2002). "A ¹³C NMR study on the adsorption characteristics of HEMA to dentinal collagen." *J Dent Res* 81(7):469-71
- ⁹¹ Nishiyama N, Asakura T, Suzuki K, Komatsu K, Nemoto K. (2000). "Bond strength of resin to acid-etched dentin studied by ¹³C NMR: interaction between N-methacryloyl-omega-aminoacid primer and dentinal collagen." *J Dent Res* 79(3):806-11
- ⁹² Vaidyanathan J, Vaidyanathan TK, Kerrigan JE. (2007). "Evaluation of intermolecular interactions of self-etch dentin adhesive primer molecules with type 1 collagen: computer modeling and in vitro binding analysis." *Acta Biomaterialia* 3(5):705-14
- ⁹³ Tay FR, Pashley DH. (2003). "Water treeing--a potential mechanism for degradation of dentin adhesives." *Am J Dent* 16(1):6-12
- ⁹⁴ Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Carvalho RM, Itthagarun A. (2002). "Single-step adhesives are permeable membranes." *J Dent* 30(7-8):371-82
- ⁹⁵ Carvalho RM, Chersoni S, Frankenberger R, Pashley DH, Prati C, Tay FR. (2005). "A challenge to the conventional wisdom that simultaneous etching and resin infiltration always occurs in self-etch adhesives." *Biomaterials* 26(9):1035-42
- ⁹⁶ T. Maeda, K. Yamaguchi, T. Takamizawa, A. Rikuta, K. Tsubota, S. Ando, M. Miyazaki. (2008). "pH Changes Of Self-Etching Primers Mixed With Powdered Dentine". *J Dent* 36 (8) 606-610
- ⁹⁷ De Munck J, Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Suzuki K, Lambrechts P, Vanherle G. (2003). "Four-year water degradation of total-etch adhesives bonded to dentin." *J Dent Res* 82(2):136-40
- ⁹⁸ Tay FR, Pashley DH, Yoshiyama M. (2002). "Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives". *J Dent Res* 81(7):472-6
- ⁹⁹ J. Malacarne, R. Carvalho, M. de Goes, N. Svizero, D. Pashley, F. Tay, C. Yiu, M. Carrilho. (2006). "Water sorption/solubility of dentinal adhesives resins." *Dent Mater* 22(10):973-80

-
- ¹⁰⁰ Tay FR, Pashley DH, Suh BI, Hiraishi N, Yiu CK. (2005). "Buonocore memorial lecture. Water treeing in simplified dentin adhesives—deja vu?". *Oper Dent* 30(5):561–79
- ¹⁰¹ Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Weller RN, Monticelli F, Osorio R. (2006). "Self-etching adhesives increase collagenolytic activity in radicular dentin." *J Endod* 32(9):862–8
- ¹⁰² Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjäderhane L, Tay FR, Pashley DH. (2006). "Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives". *Eur J Oral Sci* 114(2):160–6
- ¹⁰³ Pashley DH, Tay FR, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho RM, Ito S. (2004). "Collagen Degradation by Host-derived Enzymes during Aging." *J Dent Res* 83(3): 216-21
- ¹⁰⁴ Perdigão J, Lopes M, Geraldeli S, Lopes GC, García-Godoy F. (2000). "Effect of a sodium hypochlorite gel on dentin bonding." *Dent Mater* 16(5):311-23
- ¹⁰⁵ Inaba D, Duschner H, Jongebloed W, Odelius H, Takagi O, Arends J. (1995). "The effects of a sodium hypochlorite treatment on demineralized root dentin." *Eur J Oral Sci* 103(6):368-74
- ¹⁰⁶ Attal JP, Asmussen E, Degrange M. (1994). "Effects of surface treatment on the free surface energy of dentin." *Dent Mater* 10(4):259-64
- ¹⁰⁷ Marshall Jr GW, Yucel N, Balloch M, Kinney JH, Habelitz S, Marshall SJ. (2001) "Sodium hypochlorite alterations of dentin and dentin collagen." *Surf Sci* 491(3): 444-55
- ¹⁰⁸ Tanaka J, Nakai H. 1993. "Application of root canal cleaning agents having dissolving abilities of collagen to the surface treatment for enhanced bonding of resin to dentin." *Dent Mater* 12(2):196-208
- ¹⁰⁹ Mountouris G, Silikas N, Eliades G. (2004). "Effect of sodium hypochlorite treatment on the molecular composition and morphology of human coronal dentin." *J Adhes Dent* 6(3):175–82
- ¹¹⁰ Saboia Vde P, Pimenta LA, Ambrosano GM. (2002). "Effect of collagen removal on microleakage of resin composite restorations." *Oper Dent* 27(1):38-43
- ¹¹¹ Shinohara MS, Bedran-de-Castro AK, Amaral CM, Pimenta LA. (2004). "The effect of sodium hypochlorite on microleakage of composite resin restorations using three adhesive systems." *J Adhes Dent* 6(2):123-7

-
- ¹¹² Nataya Vongphan, Pisol Senawongse, Waraporn Somsiri, Choltacha Harnirattisai. (2005). "Effects of sodium ascorbate on microtensile bond strength of total-etching adhesive system to NaOCl treated dentine." *J Dent* 33(8): 689–695
- ¹¹³ Lai SC, Mak YF, Cheung GS, Osorio R, Toledano M, Carvalho RM, Tay FR, Pashley DH. (2001). "Reversal of compromised bonding to oxidized etched dentin". *J Dent Res* 80(10):1919-24
- ¹¹⁴ Saboia Vde P, Almeida PC, Rittet AV, Swift EJ Jr, Pimenta LA. (2006). "2-year Clinical evaluation of sodium hypochlorite treatment in the restoration of non-carious cervical lesions: a pilot study." *Oper Dent* 31(5):530-5
- ¹¹⁵ <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>. Sitio Oficial Descarga Software TpsDig 2.0
- ¹¹⁶ Mine A, De Munck J, Cardoso MV, Van Landuyt KL, Poitevin A, Kuboki T, Yoshida Y, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. (2009). "Bonding effectiveness of two contemporary self-etch adhesives to enamel and dentin." *J Dent* 37 (11):872–883
- ¹¹⁷ Ermis RB, De Munck J, Cardoso MV, Coutinho E, Van Landuyt KL, Poitevin A, Lambrechts P, Van Meerbeek B. (2008). "Bond strength of self-etch adhesives to dentin prepared with three different diamond burs." *Dent Mater* 24(7):978–85.
- ¹¹⁸ Sauro S, Mannocci F, Toledano M, Osorio R, Pashley DH, Watson TF. (2009). "EDTA or H3PO4/NaOCl dentine treatments may increase hybrid layers' resistance to degradation: a microtensile bond strength and confocal-micropermeability study" *J Dent* 37(4):279–288
- ¹¹⁹ Sauro S, Mannocci F, Tay FR, Pashley DH, Cook R, Carpenter GH, Watson TF. (2009). "Deproteinization effects of NaOCl on acid-etched dentin in clinically-relevant vs prolonged periods of application. A confocal and environmental scanning electron microscopy study." *Oper Dent* 34(2):166-73
- ¹²⁰ Oyarzún A, Cordero AM, Whittle M. (2002). "Immunohistochemical evaluation of the effects of sodium hypochlorite on dentin collagen and glycosaminoglycans." *J Endod.* 28(3):152-6
- ¹²¹ Kenshima S, Francci C, Reis A, Loguercio AD, Rodrigues L. (2006) "Conditioning effect on dentin, resin tags and hybrid layer of different acidity self-etch adhesives applied to thick and thin smear layer." *J Dent* 34(10):775–783
- ¹²² Sincler C, Guenka R. (2006). "Influence of dentin pre-treatment with NaOCl on the morphology of adhesive interface of self-etching adhesive systems." *Applied Surface Science* 253(4):1929–1933
- ¹²³ Rueggeberg FA, Margeson DH. (1990). "The effect of oxygen inhibition on an unfilled/filled composite system." *J Dent Res* 69(10):1652–8