

**Universidad CEU Cardenal Herrera**  
Departamento de Odontología



Estudio “*in vitro*” de la degradación de la interfase adhesiva resina-dentina creada mediante adhesivos con nanogeles aplicados en dentina pre-tratada con ácido anacárdico.

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Dña. Victoria Vivó Agulló

Dirigida por:

Dr. D. Salvatore Sauro

VALENCIA  
2016



TESIS DOCTORAL  
DÑA. Victoria Vivó Agulló  
2016





DR. SALVATORE SAURO

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada “Estudio *in vitro*” de la degradación de la interfase adhesiva resina-dentina creada mediante adhesivos con nanogeles aplicados en dentina pre-tratada con ácido anacárdico” de la que es autora Dña. Victoria Vivó Agulló, ha sido realizada bajo mi dirección, y reúne las condiciones científicas y formales para ser defendida ante el tribunal correspondiente, a fin de obtener el Grado de Doctora.

Y, para que conste a efectos oportunos, firmo la presente en Moncada a 2 de noviembre de 2016.

Fdo: Dr.D. Salvatore Sauro.



*Dedicado a mi hija y a mis padres, por su amor y*

*apoyo incondicional.*



## *AGRADECIMIENTOS*

A mi tutor y mentor, el profesor Salvatore Sauro, por su inestimable dirección, constante enseñanza, paciencia infinita, por su ayuda y su confianza, en este proyecto y en mí.

Al profesor Jeffrey W. Stansbury, del departamento de Química de Polímeros, de School of Dental Medicine de la Universidad de Colorado, Denver, USA, responsable de la formulación de los nanogeles, cedidos y empleados para la formulación de los adhesivos experimentales utilizados en este trabajo. Posibilitando, de ese modo, fomentar la colaboración Internacional con nuestra Univesidad CEU Cardenal Herrera.

Al profesor Victor Feitosa de la Facultad de Odontologia, Farmácia e Enfermagem de Fortaleza, Brasil, por su trabajo, junto al departamento de Química de su universidad, por realizar el procesamiento de la cáscara de nuez de marañón (CNSL), para extraer el ácido anacárdico utilizado en esta investigación.

Agradezco al servicio de Cirugía de la Clínica Universitaria de Odontología, de la Universidad CEU Cardenal Herrera por proporcionar los dientes necesarios para este estudio. En especial a la Dra. Raquel González Martínez, por tenerme siempre presente.



Al personal del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCSIE) de la Universidad de Valencia, por su profesionalidad, afabilidad y apoyo técnico, imprescindible en el desarrollo de esta investigación.

A los profesores Mar Jovani, a Pablo Fos, a Marta Ribelles, por sus directrices científicas y sus valiosos consejos en la revisión de la redacción de este trabajo.

A la profesora Arlinda Luzi, por su ánimo constante y su amistad.

A mi hermano Vicente y mi cuñada Cristina, quienes siempre tuvieron palabras de aliento, tan necesarias en los momentos de dificultad.

A Sergio, por su eterna sonrisa que ilumina mis días, por acompañarme y ayudarme en todo momento y siempre.

A Julia, mi hija, por ser mi luz y el motor que impulsa mi vida. Eres la persona que más ha sufrido mi ausencia y a quien más quiero en este mundo, por eso este trabajo va especialmente dedicado a ti.



# ÍNDICE



|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>                                   | <b>7</b>  |
| <b>2. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....</b>                      | <b>15</b> |
| <b>2.1.Descripción de los tejidos dentales.....</b>           | <b>15</b> |
| 2.2.1.Esmalte.....  | 15        |
| 2.2.2. Dentina.....   | 16        |
| <b>2.2. Principios de adhesión dental.....</b>                | <b>20</b> |
| 2.2.1. Adhesión al esmalte y a la dentina.....                | 27        |
| 2.2.2. El barrillo dentinario.....                            | 28        |
| 2.2.3. El proceso de hibridización.....                       | 31        |
| 2.2.4. Adhesión seca vs adhesión húmeda.....                  | 33        |
| <b>2.3. Sistemas adhesivos contemporáneos: clasificación</b>  |           |
| <b>y mecanismos de adhesión.....</b>                          | <b>37</b> |
| 2.3.1. Clasificación de los sistemas adhesivos.....           | 37        |
| 2.3.2. Adhesivos de grabar y lavar.....                       | 38        |
| 2.3.3. Sistemas adhesivos autoacondicionantes.....            | 39        |
| 2.3.4. Adhesivos de ionómero de vidrio.....                   | 42        |
| <b>2.4. Mecanismos de degradación de la capa híbrida.....</b> | <b>43</b> |
| 2.4.1. Degradación proteolítica de la matriz de colágeno..... | 45        |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.4.2. Degradación hidrolítica de la matriz de colágeno.....  | 49        |
| <b>2.5. Formulaciones de adhesivos basados en aditivos de nanogeles.....</b>  | <b>51</b> |
| <b>2.6. El ácido anacárdico.....</b>  | <b>54</b> |
| <b>2.7. Pruebas de evaluación de la adhesión a la dentina.....</b>  | <b>55</b> |
| <b>2.8. Análisis con Microscopio Electrónico de Barrido (MEB).....</b>  | <b>57</b> |
| <b>2.9. Análisis con microscopía confocal.....</b>  | <b>58</b> |
| <b>3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>  | <b>63</b> |
| <b>3.1. Objetivos.....</b>  | <b>63</b> |
| <b>3.2. Hipótesis.....</b>  | <b>64</b> |
| <b>4. MATERIAL Y MÉTODO.....</b>  | <b>67</b> |
| <b>4.1. Material.....</b>   | <b>67</b> |
| <b>4.2. Método.....</b>   | <b>70</b> |
| 4.2.1. Selección de las muestras dentales.....  | 70        |
| 4.2.2. Formulación de los grupos de estudio.....  | 71        |
| 4.2.3. Preparación cavitaria en los dientes seleccionados.....  | 74        |
| 4.2.4. Protocolo de adhesión y pre-tratamiento dentinario con anacárdico.....   | 75        |
| 4.2.5. Evaluación de la eficacia adhesiva (test de microtensión) y de la ultra-<br>morfología de fractura mediante MEB..... | 76        |

|  |            |
|--|------------|
| 4.2.6. Análisis fractográfico con estereomicroscopio y microscopía electrónica de barrido (MEB).....     | <b>82</b>  |
| 4.2.7 Análisis de la interfase resina-dentina con microscopía electrónica de barrido (MEB).....          | <b>84</b>  |
| 4.2.8 Análisis de la interfase resina-dentina con microscopía confocal.....                              | <b>85</b>  |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>  | <b>91</b>  |
| 5.1. Resultados de la eficacia adhesiva (test de microtensión).....                                      | <b>91</b>  |
| 5.2. Cuantificación del modo de fallo mediante estereomicroscopía y análisis de fractografía al MEB..... | <b>96</b>  |
| 5.3. Análisis de la interfase resina-dentina con microscopía electrónica de barrido.....                 | <b>105</b> |
| 5.4. Análisis de la interfase resina-dentina con microscopía confocal.....                               | <b>108</b> |
| <b>6. DISCUSIÓN.....</b>   | <b>117</b> |
| <b>7. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>131</b> |
| <b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>  | <b>135</b> |
| <b>9. ANEXOS.....</b>  | <b>163</b> |
| <b>9.1. Anexo I: Consentimiento informado para extracción de cordales....</b>                            | <b>163</b> |
| <b>9.2: Anexo II: Consentimiento informado para cesión de material biológico.....</b>                    | <b>168</b> |

**9.3. anexo IV: Datos estadísticos de adhesivos autoacondicionantes....170**

**9.4. Anexo V: Datos estadísticos para adhesivos de grabar y lavar.....173**

**9.5. Anexo VI: Documento de Comisión De Investigación y Ética.....177**

# *INTRODUCCIÓN*



## **1. INTRODUCCIÓN.**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la caries sigue siendo un problema importante de salud pública en los países más industrializados. Afecta a un 60-90% de los niños en edad escolar y la gran mayoría de adultos.<sup>1</sup>

La pérdida de minerales ocurre de forma progresiva e intermitente, con un patrón de progreso característico que puede llevar a la total destrucción de los tejidos dentarios coronarios y afectación pulpar irreversible cuando no se adoptan medidas terapéuticas.<sup>2</sup>

Durante los siglos XIX y XX se ampliaron considerablemente los conocimientos de las lesiones cariosas en áreas tan diversas como las ciencias básicas, la microbiología, los factores nutricionales, la ingeniería y la regeneración de tejidos. Esto permitió profundizar en aspectos como la prevención, diagnóstico, clasificación, actividad, control y tratamiento esta patología.<sup>3</sup> Esta corriente de información se generó gracias a la utilización de los primeros microscopios simples, creados por Antony van Leeuwenhoek, en 1677, a partir de lupas que permitían un incremento de hasta 200 veces el tamaño original. Con estos instrumentos se estudió la saliva de la cavidad oral humana.<sup>4</sup>

En los siglos siguientes el desarrollo de microscopios cada vez más potentes permitió estudiar los patógenos responsables de numerosas enfermedades, considerándose ese tiempo como la Edad de oro de la Microbiología. Debido a su facilidad de acceso, la cavidad oral humana es una de las comunidades microbianas mejor estudiadas. Posee una gran complejidad, en ella habitan

virus, protozoos, hongos, arqueas y más de 1000 especies bacterianas diferentes.<sup>5</sup>

En el año 1880 Willoughby Dayton Miller<sup>6</sup> definió la caries dental como una enfermedad mediada por bacterias. Cien años más tarde Walter Loesche<sup>7</sup> la definió como “infección endógena” debido a que las bacterias que se relacionan con su etiología forman parte de la microbiota natural del ser humano. Además postuló que la sola presencia de microorganismos no era suficiente para el desarrollo de la enfermedad, sino que existían otros factores que debían alterar la relación entre las bacterias y las bacterias con el huésped, para que la enfermedad se desarrolle.

Bajo esa premisa, en los años 60, Paul Keyes,<sup>8</sup> propuso un simple y revolucionario modelo según el cual la caries sería producida por tres factores etiológicos: huésped, microorganismos y dieta. Desde entonces y con el incremento del saber, los modelos de multicausalidad se han vuelto cada vez más complejos. A esa definición de etiología multifactorial se han añadido fundamentos como las ciencias básicas, la microbiología, la histopatología de los tejidos dentales, los factores genéticos, la ingeniería y reparación tisular, las ciencias sociales y el comportamiento.

El tratamiento actual de esta patología comienza con la estimación de los factores de riesgo, la adopción de medidas preventivas, (individuales o comunitarias), la realización de un diagnóstico veraz, distinguiendo las superficies sanas de las enfermas, el conocimiento del grado de compromiso estructural, estableciendo también el grado de actividad para distinguir si es una lesión activa o detenida, y la realización del diagnóstico diferencial con otro tipo

de alteraciones. En base a todos estos datos ha de ser el clínico quien seleccione el tratamiento indicado, ya sea la intervención sin invasión, el tratamiento conservador con mínima invasión y el posterior seguimiento del caso para mejorar el pronóstico del diente a largo plazo.<sup>1,2</sup>

El tratamiento restaurador de los dientes, en la actualidad, se lleva a cabo gracias a la interacción entre el material restaurador y la estructura dentaria mediante el uso de un sistema adhesivo. Esto permite que tanto mecánica como biológicamente y funcionalmente, el diente y su material restaurador, funcionen como una unidad.

A lo largo de la historia han sido empleados distintos materiales de relleno y diversas técnicas, de tal manera que la Odontología Conservadora también ha sufrido una importante evolución en los últimos cien años.<sup>9</sup>

En el año 1917, G V Black, publicó la primera edición de un manual de Odontología Restauradora, donde dejó asentadas las reglas para la restauración de lesiones cariosas.<sup>10</sup> Los conceptos establecidos entonces fueron utilizados durante muchos años para el tratamiento de las lesiones de caries mediante técnicas de remoción mecánica.

Hasta finales del siglo XIX, la Odontología Restauradora, se desarrollaba a expensas de nuevos materiales para cubrir las cavidades de los dientes careados pero no se había conseguido realizar una interacción entre éstos y la estructura dental. Es a partir de esta interrelación entre el diente y el material restaurador cuando se podría hablar del comienzo de la "Era adhesiva" en la Odontología.<sup>9</sup>

El empleo de los materiales de composite junto con las técnicas adhesivas ha revolucionado actualmente la práctica dental. El potencial estético, el manejo, y el desgaste de las obturaciones de composite han mejorado considerablemente. Su unión al diente permite ser más conservadores con la estructura dentaria. Sin embargo, tan importante es cubrir los requerimientos estéticos, funcionales y la preservación de los tejidos, como lo es conseguir su durabilidad a largo plazo. La remoción mecánica de la caries, elimina el tejido afectado para sustituir parte de la estructura dental por un material inorgánico, compuesto de monómeros de resina que se entrelazan micromecánicamente en microporosidades creadas en el lugar de reemplazo.<sup>11</sup>

El mecanismo de unión de los adhesivos actuales puede considerarse como un proceso de intercambio. La difusión de monómeros es el mecanismo primario para obtener esa retención micromecánica. Recientemente las evidencias han corroborado el importante papel de las interacciones químicas adicionales en la interfase de unión del biomaterial con el diente, especialmente respecto a la estabilidad de la adhesión.<sup>11,12</sup>

El adhesivo formará una unión con el diente y con el material de restauración. Las características particulares de los sistemas adhesivos, su composición, y su manejo clínico, van a influir en su interacción con el sustrato. También se verá incluido el comportamiento del material, su capacidad de adhesión, fuerza y durabilidad de la restauración a lo largo del tiempo. La longevidad de las restauraciones está relacionada con la degradación de estos materiales. La degradación de la interfase resina-dentina en los sistemas adhesivos viene condicionada por la absorción de agua en la matriz del polímero.<sup>13</sup> Pero éste no es el único mecanismo de degradación. La mayoría de los monómeros de la

resina que constituye el adhesivo, son ésteres de ácido metacrílico y otros derivados. Estos ésteres son susceptibles de ser degradados por enzimas, esterasas, presentes en los fluidos corporales, como la saliva o el fluido dentinario.

Recientes trabajos han mostrado que la saliva contiene suficiente actividad de las enzimas esterasas para atacar las resinas de los composites.<sup>14</sup> Esto dará lugar a la pérdida de estructura de estos materiales a lo largo del tiempo. Como consecuencia se producirán fallos de adhesión en la interfase resina-dentina, responsable de unir los materiales de restauración a los tejidos dentales (esmalte y dentina). El objetivo principal de muchos de los estudios es el interés creciente de comprender qué parámetros influyen en la formación de una unión estable y duradera entre los sistemas adhesivos y el diente.<sup>15</sup>



# *REVISIÓN DE LA LITERATURA*



## **2. REVISIÓN DE LA LITERATURA**

### **2.1. Descripción de los tejidos dentales**

#### **2.2.1. Esmalte**

El esmalte es un tejido epidérmico mineralizado. Estructuralmente está constituido por dos unidades básicas, los prismas cilíndricos de esmalte y la sustancia interprismática que los rodea. Las células que lo originan son los ameloblastos. En su maduración, los ameloblastos desarrollan una extensión citoplasmática, el proceso o fibra de Tomes, responsable de segregar la matriz proteica del esmalte al tiempo que inicia la mineralización y orientación de los cristales de esmalte.<sup>16</sup> Cuando se ha finalizado la formación de esta estructura y el esmalte ha alcanzado su espesor predeterminado pierden su función; así pues el esmalte no constituye un tejido por definición sino una estructura cristalina.<sup>17</sup>

En su composición el esmalte está compuesto por un 96% de su peso de hidroxiapatita, en forma de cristales muy rígidos, y más del 86% del volumen. En una pequeña proporción está compuesto por matriz orgánica, que consta de 1-2% en peso de proteínas de desarrollo del esmalte, conocidas como enamelinas y que se encuentran unidas a los cristales de hidroxiapatita.<sup>18,19</sup> El esmalte no contiene colágeno, la única metaloproteinasa identificada en esta estructura es MMP-20.<sup>20</sup> El 4-12% de su peso lo compone el agua, localizada en la red de microporos que se abren hacia la superficie externa y hacia los espacios intercristalinos.<sup>21</sup> El esmalte es el responsable de la apariencia estética de los dientes. Se trata de una superficie consistente que actúa protegiendo la dentina y la pulpa. Debido a su composición mineral y a su localización en el medio bucal

es susceptible de padecer desmineralización ácida, sufrir atricción, desafíos químicos y bacterianos, o fracturas debido a cargas oclusales.

### **2.2.2. Dentina**

La dentina es un tejido conjuntivo avascular y mineralizado compuesto por un 50-70% de volumen de carbo-hidroxiapatita [HAP:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ]. El tamaño de cristal de la dentina (5nm 30nm 100nm) es más pequeño que en el esmalte, con menos calcio, pero también contiene 4-5% de carbonatos. La dentina también contiene un 30% de componente orgánico que está representado por un 90% de colágeno tipo I, unas cantidades mínimas de colágeno tipo III y tipo V, y 10% de proteínas no colágenas ricas en agua, ligadas químicamente, tales como proteoglicanos, fosfolípidos y enzimas. El 20% del volumen de la dentina está compuesta por agua, no ligada químicamente, como el fluido intratubular.<sup>22</sup>

Las proteínas no colágenas son capaces de unirse selectivamente a diferentes superficies en los cristales de apatita. La matriz de dentina está constituida por una red compleja de las estructuras fibrilares y globulares. Durante la dentinogénesis el colágeno tipo I, los proteoglicanos y otras proteínas no colágenas menores completan su porción orgánica. Estas proteínas se sintetizan y segregan por los odontoblastos, y tras la organización estructural en la capa de dentina secundaria, la mineralización se produce por los cristales de hidroxiapatita. La dentinogénesis y el desarrollo de la mineralización son fenómenos complejos que requieren un activo control enzimático. Varias proteinasas, pertenecientes a la familia de las metaloproteinasa (MMP) de la matriz, se cree que desempeñan un papel crucial en estas etapas.<sup>23</sup>

La dentina se caracteriza por la presencia de largos túbulos microscópicos, con un diámetro interior aproximado de 0,8 a 2,5  $\mu\text{m}$ . Los odontoblastos se sitúan en

el interior de los túbulos dentinarios con el cuerpo celular en la periferia de la pulpa y la prolongación en el túbulo. Una de su función principal es regular la mineralización y segregar matriz orgánica. En la dentina madura estos procesos odontoblásticos se extienden hasta 1/3 del espesor de la dentina. Los túbulos ocupan el 10 % del volumen dentinario, en el interior de estos túbulos se encuentra el fluido intratubular.<sup>24,25</sup>

El movimiento de este fluido, cuando existen áreas de dentina expuesta, es responsable de producir sensibilidad dentinaria.<sup>26</sup>

Existe una diferencia entre la humedad intrínseca de la dentina superficial y profunda.<sup>27</sup> Se ha sugerido que esta discrepancia puede ser responsable de producir fuerzas de adhesión entre dentina y resina menores en áreas más profundas.

Estudios realizados por Goracci y cols.,<sup>27</sup> explican que puede ser debido a la insolubilidad de algunos monómeros de dimetacrilato, tales como Bis-GMA (bisfenol glicidil metacrilato), TEGDMA (triethylenglicol dimetacrilato) y UDMA (dimetacrilato de uretano) en la dentina saturada con agua.<sup>27</sup> El lumen de los túbulos está rodeado por una dentina densa hipermineralizada. La dentina entre los túbulos se conoce como dentina peritubular o intratubular. La cantidad de fibrillas de colágeno mineralizadas y otras proteínas presentes en la dentina peritubular es de aproximadamente el 30% en peso, mientras que el colágeno es representa el 10 %. La humedad intrínseca de la dentina, así como la presencia de colágeno, disminuye la energía superficial, por lo que hace que las uniones resina-dentina sean difíciles y no produzcan una superficie adecuada para atraer el material de restauración.<sup>28,29</sup> Como consecuencia, la durabilidad

de las uniones resina con dentina son menores en comparación con los enlaces de resina con esmalte.<sup>30,31</sup>

Con el tiempo la dentina peritubular hipermineralizada aumenta su espesor, mientras que la dentina intertubular primaria se mantiene relativamente estable. Dependiendo de la localización de la dentina podemos encontrar dos tipos de sustrato con características ligeramente distintas. La dentina superficial, cerca de la unión amelodentinaria (dentina mantelar) y la dentina profunda, próxima a la pulpa del diente. En la dentina superficial se encuentran túbulos largos, con el tiempo las paredes se van mineralizando lo que disminuye el lumen de los túbulos. Estos lúmenes constituyen el 4% del área de superficie dentinaria. A una profundidad de 250 µm de la dentina superficial se encuentran una serie de interconexiones y canalículos entre los túbulos. Estos canalículos se extienden hacia la dentina intertubular de modo que este sistema de túbulos interconectados y llenos de líquido sirven como intercambio de minerales, liberación de biomoléculas y medio de transporte.<sup>32</sup>

Tras una preparación cavitaria, cuando se acondiciona la dentina para unirla con el material, la dentina peritubular, altamente mineralizada, se solubilizará primero y creará túbulos abiertos que facilitarán la interconexión del adhesivo con el sustrato. La dentina profunda es diferente a la superficial. Sus túbulos dentinarios son de mayor diámetro y la distancia entre ellos es menor. La dentina peritubular es inferior o está ausente. En volumen hay un 12 % de dentina intertubular y un 80% de volumen de diámetro tubular.<sup>33,34</sup>

Esto hace que en este sustrato la dentina sea mucho más permeable y húmeda. La respuesta biológica y clínica de la dentina va a depender de su composición, cantidad y volumen de cristales mineralizados, matriz orgánica de colágeno,

volumen tubular celular y fluido. Esta respuesta será diferente si se produce en dentina superficial o profunda. También influyen factores como la edad del diente y traumatismos sufridos.<sup>34</sup>

Existen factores que pueden comprometer la función protectora de los túbulos dentinarios. Cuando la capa externa, de esmalte o cemento es removida, bien por una preparación cavitaria, por un trauma, erosión, abrasión o atricción, estos túbulos quedan expuestos de modo que existe una comunicación con el medio oral. Cuando se realiza una preparación cavitaria, los restos de detritus que se originan de la preparación disminuye en parte esa exposición. Esa capa de restos o detritus es lo que se conoce como barrillo dentinario.<sup>35</sup>

La dentina es de naturaleza elástica y constituye una base para el esmalte friable. La integridad de la dentina está condicionada por la propia integridad del esmalte que puede verse comprometido por los procesos anteriormente referidos. Al contrario que el esmalte, más homogéneo, la dentina es más variable en su composición, debido a ello existirán diferencias de permeabilidad, humectabilidad, zonas de hipermineralización, que complican los estudios comparativos de los sistemas adhesivos. La dentina, además, no se considera un material inerte. Como respuesta defensiva tiene la capacidad de crear dentina terciaria, cuando es agredida o desmineralizada. Es capaz de sufrir modificaciones por envejecimiento y enfermedades fisiológicas, y este proceso afecta a la biomecánica y bioquímica de la dentina.<sup>34</sup> Cuando hay metabolitos cariosos, toxinas o productos bacterianos que llegan al tejido pulpar, se activan esos mecanismos defensivos que tratan de sellar los túbulos. La barrera protectora de la pulpa depende de la impermeabilidad de los túbulos. Por esta relación tan íntima entre ambos sustratos se habla de complejo dentino-pulpar.<sup>36</sup>

Aunque las funciones fisiológicas de las metaloproteinasas en la dentina no se entienden bien, se ha sugerido que participan en la formación de dentina peritubular terciaria y en la liberación de factores de crecimiento de la dentina.<sup>23</sup>

Los cambios en la matriz de colágeno intertubular contribuyen a estas respuestas estructurales, mediados por metaloproteasas y catepsinas de cisteína, otra familia de proteasas presentes en la dentina y el complejo dentino-pulpar. Tanto las metaloproteinasas como las catepsinas se han relacionado con procesos de degradación de la matriz extracelular de la dentina, en procesos fisiológicos y patológicos. Dentro de la cavidad oral las catepsinas se han asociado con la progresión de caries y el fracaso de las restauraciones adhesivas en el tiempo. Estudios de las propiedades adhesivas de las interfases resina-dentina y de la nanofiltración se han mostrado herramientas importantes para estudiar la longevidad de los adhesivos en el medio oral.<sup>37-39</sup>

Los trabajos muestran que la nanofiltración ocurre con diferente severidad en los distintos sistemas adhesivos. La mayoría de los materiales se muestran eficientes justo después de su aplicación, sin embargo su comportamiento de unión a lo largo del tiempo en presencia de agua varía considerablemente.<sup>40,41</sup>

## 2.2. Principios de adhesión dental

La palabra adhesión, deriva del latín “*adhaerere*” que significa “pegarse a”. Se define como el estado en que dos superficies se mantienen unidas mediante fuerzas o energías interfaciales basadas en mecanismos químicos, mecánicos o ambos, con mediación de un adhesivo. Se refiere también a fuerzas o energías entre moléculas en una interfase que une dos fases.<sup>42</sup>

En el año 1955, el Dr. Buonocore introdujo los primeros conceptos fundamentales para la adhesión de materiales a base de resina a un sustrato duro, como el esmalte.<sup>43</sup> Se basó en el uso industrial que hacían del ácido ortofosfórico. Este ácido se utilizaba para mejorar la adhesión de pinturas y revestimientos de resinas a superficies de metal. Buonocore pensó que también podría utilizarse en el esmalte dental para mejorar la adhesión de los materiales restauradores. Comprobó que el empleo de ácido ortofosfórico al 85% para acondicionar químicamente el esmalte, formaba microporosidades en las que la resina líquida se infiltraba, creando proyecciones de resina de tamaño nano y micrométrico, tras la polimerización.<sup>44</sup> Este trabajo supuso un gran cambio en la metodología de tratamiento de las lesiones cariosas. Los métodos mecánicos de retención de las obturaciones hasta entonces empleados, fueron sustituyéndose por métodos más conservadores y menos agresivos con los tejidos. De modo que con la "Odontología Adhesiva" los conceptos de grandes preparaciones fueron sustituidos por técnicas de preparación mínimas y menos invasivas. El éxito de Buonocore con la adhesión de resina al esmalte, tratado previamente con grabado ácido, lo llevó a tratar de la misma forma la dentina. Este intento no tuvo el mismo éxito debido a la pobre humectación de las resinas disponibles en aquel tiempo y al desconocimiento de la dentina como sustrato. A partir de entonces la adhesión de los materiales a los tejidos dentales ha sido y es objeto de numerosas investigaciones.<sup>45</sup>

Pero fue un año antes del descubrimiento de Buonocore, en 1949, cuando Oskar Hagger, el "padre de los modernos adhesivos dentales" desarrolló el primer sistema adhesivo mediante la incorporación de ácido glicerofosfórico dimetacrilato (GPDM) en un sellador líquido para cavidades (SEVRITION®;

patente suiza No 278946, 1951) junto con un material a base de resina restauradora.<sup>46,47</sup>

Este sistema fue capaz de crear una zona de interacción entre la dentina y el material de restauración. Esto se demostró primero mediante el examen histológico que realizaron Kramer y cols.<sup>48</sup>, en el año 1952. Posteriormente, la presencia de una interfase se confirmó mediante análisis con microscopio electrónico de transmisión (TEM). Las imágenes mostraron que estos sistemas a base de resina solamente penetraron pocas micras (3  $\mu\text{m}$ ) en la dentina.<sup>47</sup> Nakabayashi denominó a esta zona como capa híbrida, ya que no era ni de resina ni de dentina, sino una combinación de ambos.<sup>49</sup>

Por otra parte, Eick y cols.,<sup>50</sup> utilizando microscopía electrónica de barrido, confirmaron cómo los monómeros penetraban en la dentina. Sin embargo, existía una capa de frotis que cubría ambos lados de las uniones adhesivas, de modo que la resistencia de unión era en realidad la medida de las fuerzas de cohesión de esa capa de frotis. Eso suponía valores muy bajos.<sup>51</sup> Otro inconveniente era que el material formulado por el Dr. Hagger, cuando era utilizado en un medio húmedo, era inestable y se descomponía.<sup>9</sup>

Entre los años 1960 y 1970 se utilizaron estos tipos de adhesivos y se definieron como agentes de unión de primera y segunda generación. Un sistema típico de primera generación contenía un monómero funcional NPG-GMA (N-(2-hidroxi-3metacriloxipopil)-N-fenilglicina), capaz de generar una unión de 2-3 MPa. Los de segunda generación por lo general contenían un monómero ácido de fosfato-éster, tal como fenil-P[2-(metadona-croxi) metil fenil fosfato de hidrógeno] y un monómero de resina hidrófilo (HEMA: metacrilato de hidroxietileno) con etanol como disolvente. Su mecanismo de acción se basaba en crear interacciones

electrostáticas, entre los grupos fosfato de los monómeros con los iones de calcio dentro de la capa de barrillo, que podían alcanzar una fuerza de adhesión de 5-6 MPa. Estas uniones no podían soportar las fuerzas de contracción de polimerización (12-15 MPa) necesarias para la polimerización de estos sistemas.<sup>52</sup> El resultado era, por tanto, una desadaptación de los márgenes de la cavidad que derivaba en filtración bacteriana.<sup>44,53</sup>

En la década de 1980 se introdujo la tercera generación de agentes de unión. Estos sistemas empleaban un tratamiento previo con ácido ortofosfórico al 37%, para eliminar completamente la capa de frotis y desmineralizar la matriz de dentina subyacente a una profundidad de 8-10 nm, en un intento de aumentar la resistencia de unión. Sin embargo, aún estaban por debajo de las fuerzas de contracción de polimerización.<sup>54</sup> El rendimiento a lo largo del tiempo de estos sistemas adhesivos se veía afectado por la degradación, de modo que con el tiempo, derivaba en decoloración, microfiltración y aparición de caries secundarias.<sup>45</sup> Se comprobó que el ataque con un ácido fuerte, como el ortofosfórico, desmineralizaba la dentina a una profundidad mayor de la que los monómeros eran capaces de infiltrar. Por otra lado, con demasiada frecuencia, los clínicos realizaban un sobre-secado de la dentina, lo que conducía a un colapso de las fibrillas de colágeno.

En un intento de mejorar la infiltración, Kanca introdujo la técnica de adhesión húmeda que se justificará en capítulos posteriores.<sup>55</sup>

En la década de 1990 aparecieron los sistemas adhesivos de cuarta generación. Éstos constaban de una solución de ataque, un imprimador (cebador), y un adhesivo. El cebador hidrófilo podía penetrar en los túbulos dentinarios grabados y el adhesivo hidrófobo podía unirse a éste. De este modo se lograban mejores

uniones. En este momento de la historia, hubo una revolución importante en la Odontología Adhesiva. De hecho, la quinta generación de adhesivos se desarrolló a finales de 1990, mediante la combinación del imprimador y adhesivo en una misma botella, simplificando los pasos de unión de tres a dos pasos.

En la década del año 2000 se presentaron una nueva clase de adhesivos. Fueron llamados adhesivos autograbantes o autoacondicionantes. En estos sistemas, el uso de ácido fosfórico fue eliminado. Su efecto se sustituyó mediante la incorporación de ácidos funcionales suficientes en los imprimadores, o cebadores. De ese modo eran capaces de grabar y cebar la dentina de forma simultánea. Después se aplicaba, por separado, un adhesivo hidrofóbico para generar la unión.<sup>56,57</sup>

Los últimos adhesivos, conocidos como “todo en uno” y adhesivos universales combinan el reactivo de ataque, imprimación y adhesivo en una única solución. Éstos pueden ser utilizados tanto con ácido ortofosfórico o como adhesivo autoacondicionante.

Actualmente sólo están disponibles dos clases de adhesivos para aplicación clínica; Los adhesivos de grabar y lavar, y los adhesivos autoacondicionantes. Se incluyen los materiales de ionómero de vidrio en la categoría de autoacondicionantes.<sup>57</sup>

Con el tiempo se ha visto cómo los conceptos del Dr. Hagger han sido adoptados por los investigadores actuales para generar nuevos adhesivos dentales con un rendimiento más duradero. Actualmente, después de muchos años de aceptación de que la clave de éxito de los adhesivos dentales es la retención micromecánica resultante del grabado ácido de la dentina y el esmalte, los conceptos modernos sobre adhesión a dentina están firmemente basados en las

concepciones originales del Dr. Hagger. La unión se puede lograr a través de interacciones moleculares entre los adhesivos y la superficie de los dientes.<sup>45,47</sup>

En el año 1992 Allen,<sup>58</sup> se refirió a cuatro teorías para explicar la adhesión:

1. Teoría mecánica, según la cual la adhesión se origina por una interconexión del adhesivo en las irregularidades creadas en la superficie del sustrato. Se produce de este modo una retención micromecánica. Además de ser necesaria esa formación de microretenciones el adhesivo debe ser capaz de penetrar en ellas. El poder de relleno del adhesivo está directamente relacionado con su viscosidad.
2. Teoría de adsorción. El modelo de adsorción explica el fenómeno de la adhesión a partir de conceptos como ángulo de contacto, mojado y tensión superficial. La adsorción de los sistemas adhesivos al diente va a ser diferente según sean aplicados en esmalte o dentina.
3. Teoría de la difusión. Defiende que la adhesión se produce cuando polímeros de ambos lados atraviesan la interfase y se conectan con moléculas del otro lado. Para que las cadenas poliméricas formen zonas de anclaje y adhesión los polímeros han de ser compatibles. La movilidad y grado de penetración de los polímeros viene determinada por su peso molecular.
4. Teoría electrostática. Se refiere a las uniones electrostáticas que van a producirse entre cargas electrostáticas de signo opuesto.

En Odontología, nos encontramos tres sustratos diferentes: El material de restauración, el adhesivo y el diente. De ese modo, cuando se aplican las

técnicas adhesivas se forman dos interfases: adhesivo-diente y material de restauración-adhesivo. Para que dos materiales se adhieran es necesario que establezcan una relación cercana e íntima. Es decir, que tengan gran humectabilidad. La humectabilidad de una superficie con un líquido viene caracterizada por el ángulo de contacto entre una gota en la superficie.<sup>59</sup> Existe una humectabilidad completa cuando todo el líquido se extiende completamente en la superficie, o bien el ángulo de contacto es próximo a 0°. Otro factor que influye para poder alcanzar una humectabilidad alta es la energía superficial entre el adhesivo y el sustrato. La energía del adhesivo debe ser inferior a la del sustrato. La adhesión en esmalte es fácil de conseguir ya que tiene una elevada energía superficial debido a su alta composición de hidroxiapatita. La adhesión a dentina, sin embargo, es más compleja porque tiene una energía superficial baja. Es por ello que para conseguir una buena adhesión en dentina es necesario pre-tratar la superficie dentinaria, como se ha expuesto con anterioridad.<sup>60</sup>

Para conseguir la adhesión en Odontología se recomienda realizar el siguiente proceso; en primer lugar acondicionar el sustrato para alterar su morfología y/o estructura química; a continuación aplicar un imprimador para conseguir que el sustrato sea más receptivo al adhesivo y por último aplicar el adhesivo que se deberá unir al material restaurador. Estos tres pasos, como ya se ha visto, no siempre se dan de forma diferenciada, puede hacerse alguno de forma simultánea o faltar alguno de ellos en función del sistema adhesivo que se aplique.<sup>61,62</sup>

### **2.2.1. Adhesión al esmalte y a la dentina**

La Odontología Restauradora va encaminada a conseguir procedimientos cada vez menos invasivos. La filosofía actual persigue conservar la mayor estructura dental posible mediante procedimientos de mínima intervención.<sup>63</sup> La técnica adhesiva, además de permitir este tipo de procedimientos permite recuperar la función, la anatomía y la estética debido a que se emplean materiales del color del diente.

La adhesión a esmalte es un proceso relativamente fácil y probado como un procedimiento clínico fiable y duradero. Los sistemas adhesivos actuales en la unión a este sustrato obtienen cada vez mejores resultados en pruebas de laboratorio y tienen una comprobada eficacia clínica.<sup>42, 46, 59</sup> Sin embargo, la adhesión a dentina no ofrece los mismos resultados como queda demostrado en los estudios realizados por Fortin y cols.,<sup>64</sup> y Van Meerbeek y cols.<sup>65</sup>

La mayor causa de preocupación actual en la Odontología Restauradora es conseguir una buena unión a largo plazo.<sup>20, 37</sup>

La situación ideal sería la completa infiltración de la resina en la dentina desmineralizada. Sin embargo, rara vez se completa la infiltración y sustitución de toda el agua por la resina. Se crean nano-porosidades y microporosidades dentro de las capas híbridas, donde las fibras de colágeno se encuentran desprotegidas. Además se produce en la capa híbrida el proceso de degradación, hidrolítica y proteolítica, que será explicado con detalle en un apartado posterior.

### 2.2.2. El barrillo dentinario

Como se ha expuesto anteriormente, para que exista buena adhesión se precisa una íntima relación entre el adhesivo y el sustrato; por ello, uno de los primeros fallos en los primeros adhesivos que se desarrollaron fue no tener en cuenta que cuando se realiza la preparación cavitaria en dentina, permanece cubierta por barrillo dentinario, o como se denomina en inglés "*smear layer*".<sup>35</sup> El barrillo dentinario es una capa de restos granulares, o detritus, que cubren la dentina intertubular así como los orificios de los túbulos, creada a consecuencia de la preparación mecánica de la dentina con instrumental rotatorio.<sup>50, 51</sup>

Las partículas de barrillo tienen un diámetro de 0,05-0,1  $\mu\text{m}$  y penetran en los túbulos formando unas indentaciones o "*tags*" de 1 y 20  $\mu\text{m}$  de profundidad.<sup>66</sup>

Esta capa de frotis en su composición es dentina cortada y pulverizada, restos de esmalte y cemento, saliva, bacterias y restos del tallado. Además contiene gran cantidad de fibras de colágeno cortadas y mineralizadas. Es una película que queda adherida a la superficie y no puede removerse con el aire o agua del equipo.<sup>67</sup>

Ya se ha expuesto con anterioridad que los primeros sistemas adhesivos que se empleaban al principio se unían directamente al barrillo dentinario, pero no penetraban a través de él. Con estos agentes el valor máximo obtenido con fuerzas de cizallamiento eran muy bajos de 5 MPa.<sup>52,69</sup> El avance en los conocimientos sobre adhesión dio a conocer que, como parte de los procedimientos de restauración requeridos por la Odontología Adhesiva, la capa de frotis debía ser eliminada, modificada o impregnada por la resina para permitir la unión entre el diente y el material de restauración.<sup>67</sup>

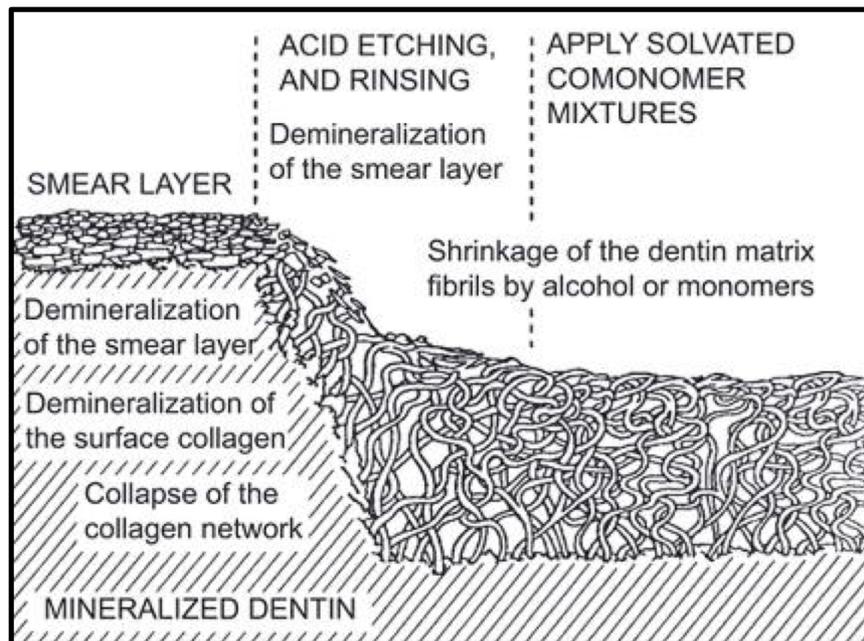
Las dos opciones que se aplicaron entonces fue introducir sistemas que eliminaran el barrillo dentinario o sistemas que lo modificaran para que los adhesivos penetraran a través de él (sistemas adhesivos autoacondicionantes). Ambos han obtenido buenos resultados.<sup>70</sup>

Los sistemas autoacondicionantes atraviesan el barrillo hasta llegar a la matriz dentinaria, incorporándolo al propio mecanismo adhesivo.<sup>71,72</sup>

En cualquier caso, estas sustancias que se emplean para remover el barrillo disuelven parte de la superficie dentinaria y quedan expuestas muchas fibras de colágeno desmineralizado. El colágeno es el estrato que debe ser infiltrado por las resinas. Para conseguir una correcta adhesión entre la resina y la dentina es necesario un pretratamiento de la misma. Este grabado, como paso de acondicionamiento, se realiza también en esmalte, con numerosas ventajas terapéuticas.<sup>74,75</sup>

El efecto que va a producir el tratamiento ácido en la dentina es una serie de cambios morfológicos, como la disolución del barrillo dentinario, descalcificación de dentina intertubular y peritubular y ensanchamiento de los túbulos dentinarios. Esta desmineralización ha de permitir la penetración de la resina pero no producir colapso de las fibras de colágeno desmineralizado. Este colapso sucede cuando se seca con aire en exceso la superficie e impide la infiltración de la resina.<sup>76,77</sup>

En la figura 1 se representa con un dibujo la capa de frotis tras el corte de la dentina con instrumental rotatorio.



**Figura 1** - Esquema que ilustra la capa de frotis tras el corte de la dentina (lado izquierdo). Los sistemas adhesivos de grabado total no sólo eliminan la capa de barrillo, también todos los minerales presentes entre las fibrillas de colágeno en la matriz dentinaria. Después de aclarar, las fibrillas de colágeno, con aspecto que recuerdan a los espaguetis, se suspenden en agua. Tomado de Pashley 2003.<sup>69</sup>

El grabado ácido transforma, por tanto, una superficie sólida en una porosa, disminuyendo su efecto en profundidad.<sup>78</sup>

La profundidad de desmineralización de la dentina intertubular es entre 5 y 7  $\mu\text{m}$ .

Se ha comprobado que cuando la resina no alcanza toda la superficie de dentina desmineralizada se compromete la adhesión.<sup>75</sup>

La interacción entre dentina y acondicionador va a depender del agente que se aplique, de su composición, temperatura, humedad y carga,<sup>79-82</sup> de su pH, tiempo de aplicación, osmolaridad,<sup>83</sup> y de su concentración.<sup>84</sup>

Una vez se ha expuesto la matriz de colágeno, los monómeros hidrofílicos de la resina han de ser capaces de difundir a través de ella. Para eso es necesario

que la estructura de colágeno no esté colapsada sino que presente un aspecto flotante y esponjoso (figura 2).<sup>73,77</sup>



**Figure 2** - Imagen SEM que muestra el aspecto de la dentina previamente grabada con ácido ortofosfórico y posteriormente secada con aire. Se observa el colapso que sufren las fibrillas de colágeno, formando así una capa impermeable. Esta situación compromete severamente la infiltración de la resina en la zona desmineralizada. Tomada de Nakabayashi y cols.<sup>73</sup>

### **2.2.3. El proceso de hibridización.**

El término de capa híbrida fue propuesto por primera vez por Nakabayahi,<sup>49</sup> en 1982, para describir la creación de una estructura que se forma cuando la dentina es infiltrada por la resina. Esta capa es el resultado de la difusión de los monómeros dentro de la dentina grabada y su posterior polimerización.<sup>73,85,86</sup>

Se conoce como hibridación, o formación de capa híbrida, el “proceso de interconexión de la resina con la dentina desmineralizada, que proporciona retención micromecánica con el colágeno”. Según Nakabayahi,<sup>49</sup> la dentina

desmineralizada debe ser de aproximadamente 1.2 micras para que se produzca una perfecta difusión del adhesivo.

Existe todavía controversia sobre qué parámetros son importantes para conseguir una adhesión eficaz. Como ya se ha expuesto, la desnaturalización del colágeno por un acondicionamiento agresivo ha sido descrita como una causa de fallo de adhesión a lo largo del tiempo.<sup>87</sup> La formación de un gel impermeable sobre el colágeno, por desnaturalización y colapso del mismo, puede impedir la penetración de la resina en la dentina desmineralizada.<sup>73</sup>

Para removerlo Fortin y cols.,<sup>64</sup> propusieron la aplicación de hipoclorito de sodio débil, procedimiento no muy utilizado en la práctica clínica. Otro parámetro que preocupa es que, al acondicionar con un ácido agresivo, se cree una superficie desmineralizada profunda y que la resina no sea capaz de penetrar hasta allí, disminuyendo de este modo la durabilidad de la adhesión.<sup>88</sup>

También influye en la resistencia y durabilidad de la adhesión el grado de polimerización de la resina que se infiltra en la dentina, que además puede ser reservorio de liberación de monómeros con el consiguiente efecto citotóxico.<sup>89,90</sup>

El agua o residuos de solvente puede interferir con una hibridación adecuada. En la capa híbrida hay agua, y cuando se utiliza un sistema húmedo de adhesión el adhesivo también la contiene. Los restos de acetona, etanol o agua, utilizados como solventes, pueden permanecer y afectar a la polimerización de la resina en la capa híbrida. La humedad en el medio oral afecta negativamente a la adhesión.<sup>91,92</sup>

A pesar de los avances alcanzados por los adhesivos dentinarios, los trabajos de Hashimoto y cols.,<sup>91</sup> demuestran una posible degradación de la unión de la resina compuesta a los tejidos del diente a lo largo del tiempo en presencia de

agua. La reducción de la resistencia de la unión de los sistemas adhesivos a dentina es atribuida a la degradación de las fibrillas colágenas y/o de la resina adhesiva. Factores como la viscosidad o la solución del adhesivo pueden también dificultar la infiltración del agente de unión. La degradación hidrolítica de los polímeros sintéticos es un evento previsible.<sup>93</sup>

Las formulaciones de adhesivos hidrófilos han permitido mejorar la unión de restauraciones estéticas directas a la superficie de dentina, rica en agua. La hibridación depende de la capacidad de la resina adhesiva para desplazar el agua y evitar el colapso de la red de colágeno desmineralizada.<sup>91</sup>

Aun siendo relativamente hidrófilo, esas formulaciones son todavía miscibles con agua, y es común la separación de las fases inducida por agua antes y durante la polimerización.<sup>92</sup>

Son necesarios más trabajos de investigación acerca de estos factores que determinan la calidad de la capa híbrida y la estabilidad de la adhesión resina-dentina en el medio oral.<sup>91,92,93</sup>

#### **2.2.4. Adhesión seca vs adhesión húmeda**

Como se ha expuesto en capítulos anteriores, la humedad es un factor que influye de forma directa en la adhesión al sustrato.<sup>91,92</sup>

En el esmalte la situación ideal es que exista una condición seca. Pero en dentina es deseable que exista alguna cantidad de humedad. La humedad presente en la dentina, previa a la incorporación de los sistemas adhesivos, tiene un papel fundamental en la permeabilización de los monómeros de la resina en la dentina grabada con ácido fosfórico. Sin cierta cantidad de agua el colágeno de la matriz dentinaria que se expone tras el grabado ácido se colapsa.<sup>73,76,91,94</sup>

Cuando esto sucede se impide que los monómeros adhesivos penetren de forma efectiva y se compromete la formación de la capa híbrida.<sup>73</sup>

Por todo ello, cuando se acondiciona de modo simultáneo esmalte y dentina es difícil conseguir un medio ideal para ambos. Si tras la aplicación y el lavado del ácido se realiza un secado excesivo con aire, la fase líquida se evapora, perdiéndose su volumen inicial cerca de 2/3.<sup>95</sup> En estas condiciones se forma lo que se denomina zona híbridoide.<sup>96</sup> El adhesivo en este caso penetra de forma superficial y alrededor de los túbulos dentinarios. Los valores de resistencia de unión son inferiores, en comparación con el substrato húmedo.<sup>97-99</sup> Por todo ello, nació la necesidad de realizar la “técnica de adhesión húmeda”.<sup>55</sup> Afortunadamente el proceso de deshidratación es reversible mediante el humedecimiento de la superficie con agua.<sup>97</sup>

Dependiendo de la composición de los sistemas adhesivos su comportamiento será distinto frente a la humedad presente en la dentina. Los adhesivos que contienen acetona como disolvente son menos efectivos cuando se enfrentan a un substrato seco, que aquellos que están compuestos a base de agua.<sup>98,100</sup>

En la adhesión seca se mantiene la superficie del sustrato seca y está indicado aplicar un sistema adhesivo basado en agua o solución de agua/alcohol que expande la red de colágeno colapsada. Así los monómeros de resina difunden de una forma eficaz.<sup>99</sup> Los adhesivos sin agua en la composición son, por tanto, indicados para aplicarlos con una técnica de adhesión húmeda.

Con el protocolo de adhesión húmeda se va a mantener cierto mojado de la superficie acondicionada y se emplean sistemas adhesivos basados en acetona con capacidad para buscar agua.<sup>55</sup> Es imprescindible que tras el acondicionamiento ácido, la red de fibras de colágeno desprotegida de la matriz

mineral mantenga un aspecto de esponja, permitiendo así la interdifusión de los monómeros de resina. Cuando queda cierta cantidad de agua en los espacios interfibrilares la matriz de colágeno permanece suelta.<sup>101</sup>

A nivel clínico, con una técnica de adhesión húmeda se observa una superficie brillante e hidratada. El exceso de humedad se elimina con un pellet de algodón o aire suave. El acondicionador se disuelve en el agua y se vuelve menos eficaz. En un estudio realizado por Tay y cols.,<sup>102</sup> estudiaron el comportamiento de los monómeros de los acondicionadores hidrofílicos disueltos en solventes, como etanol o acetona. Observaron que ayudaban a desplazar el agua y a que el monómero penetraba hasta los túbulos dentinarios abiertos y a través de la red de colágeno.

La forma de aplicación del adhesivo también influye en su eficacia de unión. De forma general se aconseja que éstos sean frotados en la superficie de la dentina mediante pinceles para facilitar la penetración de los monómeros en la dentina.<sup>103</sup> Es importante controlar la evaporación del solvente presente en los adhesivos, los adhesivos que contienen solventes menos volátiles (agua/etanol) precisan más tiempo para que el solvente y el agua residual sean evaporados. Los datos obtenidos en los estudios realizados por Cardoso y cols.,<sup>104</sup> en 2005, concluyeron que cuanto más tiempo dejaban los adhesivos en la superficie dentinaria, mayores eran los valores de resistencia de unión observados.

Un exceso de agua también va a tener un efecto negativo en la infiltración del adhesivo. El estudio de Tay y cols.,<sup>102</sup> en 1996, ilustró y definió el espectro micromorfológico en la interfase dentina-resina en diferentes condiciones de humedad. Cuando existe agua remanente y ésta no ha podido ser desplazada, compete con la resina y parece ser que ese exceso de humedad va a producir

separación de las fases de los componentes, hidrofílicos e hidrofóbicos, del monómero. Se observaron mediante microscopio electrónico de transmisión (MET) esas zonas híbridas densas de aspecto de ampolla o globular. Con los datos obtenidos de este estudio se concluyó que la técnica de adhesión húmeda es altamente sensible. Necesita una cantidad precisa de humedad. La dentina no debe quedar muy mojada, ni demasiado seca para evitar la separación de fases. La dilución del material, además, dificulta la polimerización dentro de la capa híbrida.<sup>105</sup>

A nivel clínico, para evaporar el solvente y el agua, se requiere realizarlo de un modo cuidadoso, se debe evitar reducir en exceso el espesor de adhesivo cuya consecuencia sería un perjuicio para la formación de la capa híbrida. Se aconseja aplicar el aire comprimido a una distancia de 20 cm durante 10 segundos. Cuando se aplica a una distancia menor el aire incorpora oxígeno dentro de la capa de adhesivo, que inhibe la polimerización.<sup>106</sup>

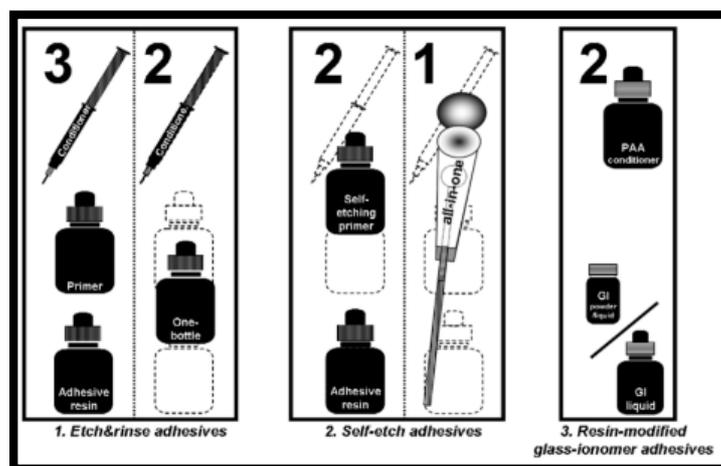
Las capas de adhesivos menos polimerizadas absorben más agua a lo largo del tiempo y, como consecuencia, se degradan. La tasa de evaporación de los solventes que contienen los adhesivos también va a estar influenciada por factores extrínsecos, como la temperatura y la humedad relativa del aire. El aislamiento absoluto reduce la humedad y crea mejores condiciones para que los solventes puedan ser evaporados.<sup>107</sup> Otro inconveniente al que se enfrenta el clínico es la posible evaporación de solvente (acetona) del bote de imprimador. Es necesaria una manipulación cuidadosa. Se ha propuesto etanol para mejorar la solubilidad del monómero y su capacidad para desplazar el agua. Evitaría la separación de la interfase y mejoraría la conversión de la capa adhesiva.<sup>108</sup> Estudios a largo plazo muestran que la combinación de etanol con técnicas de

adhesión húmeda y monómeros hidrofílicos promueven interfases adhesivas más fiables.<sup>92</sup>

### 2.3. Sistemas adhesivos contemporáneos: clasificación y mecanismos de adhesión.

#### 2.3.1. Clasificación de los sistemas adhesivos.

Los adhesivos dentinarios se pueden clasificar atendiendo a numerosos criterios. Anteriormente se ha expuesto una clasificación por “generaciones”, basándose en la cronología de aparición de los distintos sistemas adhesivos. Esta clasificación resulta útil cuando se quiere contextualizar su aparición, componentes y modo de utilización dentro de un marco histórico. Sin embargo esta clasificación no es universalmente aceptada. Cada año surgen gran número de nuevos materiales, de modo que esta clasificación puede resultar confusa. Hoy en día, la manera más clara de clasificar los adhesivos es la establecida por Van Meerbeeck y cols.,<sup>57</sup> que establecieron una clasificación basada en la estrategia de adhesión y número de etapas de aplicación (Figura 3).



**Figura 3** - Esquema de la clasificación de adhesivos propuesta por Van Meerbeeck y cols.<sup>57</sup> Los adhesivos se dividen según su estrategia de adhesión y número de etapas de aplicación.

De este modo quedan divididos en tres grupos principales:

**1. Adhesivos de grabar y lavar.**

- a. De tres pasos.
- b. De dos pasos.

**2. Adhesivos de auto-grabado, también llamados autoacondicionantes.**

- a. De dos pasos.
- b. De un paso.

**3. Adhesivos de ionómero de vidrio modificados con resina.**

**2.3.2. Adhesivos de grabar y lavar**

Esta estrategia de adhesión, en su forma más convencional, implica tres pasos. La aplicación del ácido y aclarado del mismo, seguido de la aplicación de un acondicionante y, finalmente, del adhesivo. En la forma simplificada se combina el segundo y el tercer paso. Es decir, tras el grabado ácido y aclarado se aplica el agente de unión, acondicionador y adhesivo, que se encuentran en un único frasco. Esta técnica de grabar y lavar sigue siendo el método más eficaz para lograr una unión eficiente y estable al esmalte. Con el grabado se produce una disolución selectiva de los cristales de hidroxiapatita. Para ello se emplea ácido fosfórico a concentraciones que oscilan entre el 30 y el 40%. A continuación se coloca la resina que se infiltra y envuelve los cristales de hidroxiapatita. En la dentina, este tratamiento de ácido fosfórico expone una red microporosa de colágeno, que casi se encuentra privada de hidroxiapatita, la resina se infiltra en esa red de fibrillas de colágeno expuestas. Con esta técnica la difusión del imprimador, o acondicionador, es más crítica. Cuando se utiliza un adhesivo en

base a acetona, es obligatorio emplear la técnica de unión húmeda “*wet union*”<sup>102</sup>

Por el contrario, cuando se emplea un suave secado de la dentina, la unión es más eficaz si se utilizan adhesivos a base de agua/etanol, pero la dentina no tiene que quedar totalmente seca para evitar el colapso total del colágeno.<sup>109,110</sup>

### **2.3.3. Sistemas adhesivos autoacondicionantes.**

Probablemente, en lo que se refiere a la facilidad de uso y la sensibilidad de la técnica el enfoque más prometedor es el empleo de sistemas adhesivos autoacondicionantes. No necesitan una fase de grabado y aclarado, reduciendo así el tiempo de aplicación clínica. También se reduce el riesgo de cometer errores durante la aplicación y manipulación. Otra ventaja que ofrece esta técnica es que la infiltración de la resina se produce simultáneamente con el proceso de “autograbado”, por lo que el riesgo de discrepancia entre ambos procesos es menor. Con este tipo de adhesivos, el barrillo dentinario no es eliminado completamente y se incorpora dentro de la unión. La interfase se vuelve más hidrófila y, por tanto, más propensa a la degradación hidrolítica.<sup>109,111</sup>

En el enfoque de los adhesivos autoacondicionantes, ya sean de uno o dos pasos, el efecto de autograbado se atribuye a grupos carboxílicos o fosfatos ácidos agregados a monómeros de la resina hidrófila.

Dependiendo de la agresividad del grabado se subdividen en adhesivos autoacondicionantes “fuertes” y adhesivos autoacondicionantes “suaves”. Generalmente los adhesivos “fuertes” tienen un pH de 1 o inferior. En el esmalte, este tipo de adhesivo, obtiene un patrón similar al que se obtiene con un tratamiento de grabar y lavar.<sup>112</sup>

En dentina el colágeno está expuesto y prácticamente todos los cristales de hidroxiapatita están disueltos. En consecuencia, el mecanismo de unión de estos adhesivos es a base de difusión, similar al que se produce con un enfoque de grabar y lavar. Los adhesivos autoacondicionantes “débiles” tienen alrededor de un pH 2 y la dentina se desmineraliza únicamente a profundidad de  $\sim 1\mu\text{m}$ . Esta desmineralización superficial se produce sólo parcialmente, manteniendo hidroxiapatita unida al colágeno. Pero crea suficiente porosidad para establecer una unión micromecánica que forme la hibridación. La capa híbrida que se forma con este tipo de adhesivos tiene un menor espesor que la que se obtiene con sistemas autoacondicionantes “fuertes” o con la técnica de grabar y lavar, pero se ha demostrado que esto no tiene importancia respecto a la fuerza de unión.<sup>112-</sup>

115

La hidroxiapatita que queda preservada en el interior de la capa híbrida puede servir como receptora para formar uniones químicas adicionales.<sup>116</sup>

Los monómeros basados en ácidos carboxílicos como el 4-MET (ácido trimetílico 4-metacrioxietil) y monómeros basados en fosfatos, como el fenil-P (4-metacriloxi etil de ácido trimetílico), y 10-MDP (10-metacriloxidecilsfosfato dihidrogenado) tienen un alto potencial de unión al calcio residual de la hidroxiapatita.<sup>115</sup> Se ha demostrado que el número de carbonos de los monómeros funcionales tiene relación con el buen rendimiento del material adhesivo. Esta longitud influye más en el enlace iónico que en su hidrofiliidad. Estos monómeros de cadena larga, como el 10-MDP, han demostrado jugar un papel clave tanto en la unión inicial, como la durabilidad de la interfase adhesiva comparados con adhesivos de monómeros funcionales de cadena más corta.<sup>117</sup>

Por todas las particularidades antes descritas se plantea que este tipo de adhesivos autoacondicionantes resultan más ventajosos comparados con los de grabar y lavar. Con ellos se logra una unión que puede ayudar a prevenir y retrasar la filtración marginal. El reto es conseguir que las uniones químicas de los monómeros funcionales sean estables dentro de un entorno hidrófilo a largo plazo. Mantener la hidroxiapatita alrededor del colágeno también puede protegerlo frente a la hidrólisis y por tanto frente a la degradación de la unión.<sup>37,93,118</sup>

El problema que han presentado los adhesivos autoacondicionantes “débiles” es su pobre potencial para adherirse a esmalte, pero con el desarrollo de monómeros con un mayor potencial de unión a este tejido se ha mejorado el rendimiento de esta unión. Con la formulación de sistemas autoacondicionantes con pH aproximado de 1.5, a los que se les ha denominado “intermedios”, se ha conseguido una mejor retención micromecánica comparada con los autoacondicionantes “suaves” y conservan la capacidad de establecer las interacciones moleculares deseables. Producen una capa híbrida típica, con una región más profunda que contiene hidroxiapatita y una transición más gradual respecto a la dentina no afectada y no tan abrupta como la que se obtiene con sistemas adhesivos agresivos o de grabar y lavar. En comparación con los “suaves”, tienen una mejor retención, tanto en dentina como en esmalte. La hidroxiapatita residual de la capa profunda puede servir para futuras uniones químicas.

Del mismo modo que los sistemas de grabar y lavar los sistemas autoacondicionantes pueden clasificarse según sus pasos de aplicación, dividiéndose en sistemas de dos pasos y de un solo paso “*all in one*”. Los de dos

pasos se presentan en dos soluciones, un frasco con el agente autoacondicionador (monómeros acídicos y agentes imprimadores) y otro con el agente de unión. Los de un solo paso tienen los tres productos en un único envase. Los sistemas adhesivos de un único paso tienen una cómoda manipulación clínica pero presentan fuerzas adhesivas inferiores cuando se comparan con autoacondicionantes de más pasos o de grabar y lavar.<sup>119</sup>

Además su elevada hidrofiliidad los convierte en membranas permeables. La presencia de agua acelera la degradación de la adhesión en la interfase diente-resina.<sup>119</sup>

Algunos autores defienden colocar dos o más capas de adhesivo para prevenir la evaporación del imprimador y evitar de este modo que no se acondicione de forma correcta. Además como estos sistemas no suelen contener relleno, forman capas muy delgadas que no cubren la dentina de forma eficaz y crean una capa híbrida débil.<sup>120</sup>

#### **2.3.4. Adhesivos de ionómero de vidrio.**

Los ionómeros de vidrio permanecen como los únicos materiales que son auto-adhesivos al tejido dental sin necesidad de un tratamiento previo. Aunque esto no es del todo cierto, ya que se ha comprobado que un pretratamiento previo con ácido poliacrílico aumenta su eficiencia.<sup>106,121</sup>

Sin embargo, se ha comprobado que este ácido, a pesar de ser enjuagado, deja una fina capa de unas 0,5 micras de espesor. Esta capa, a la que se refieren como “fase de gel”, permanece unida a la superficie del diente a pesar del lavado con agua.<sup>107,118,122</sup>

Los adhesivos de ionómero de vidrio pueden aplicarse en uno o dos pasos. El acondicionamiento adicional con ácido poliacrílico tiene relevancia, sobre todo cuando se emplean fresas de diamante corte grueso en la preparación de la cavidad, ya que queda una espesa capa de frotis. En este caso, se aplica un acondicionador de ácido poliacrílico, un ácido débil, que desmineraliza parcialmente la dentina, dejando así cristales de hidroxiapatita unidos a las fibrillas de colágeno como receptores de la unión química adicional. Este ácido se aplica durante 10-20 segundos y se enjuaga. A continuación se seca con aire de forma suave para no deshidratar la superficie. El efecto que se produce es una eliminación del material residual producido por el corte y la creación de microporosidades que aumentan el área donde, no sólo se producirá la retención micromecánica, sino también se aumentará la interacción química. De modo que la adhesión al tejido del diente de este tipo de materiales se produce por estas dos vías.

#### **2.4. Mecanismos de degradación de la capa híbrida**

La degradación de la capa híbrida de resina-dentina es un problema clínico frecuente que disminuye la durabilidad de las restauraciones dentales a base de resina.

La capa híbrida, como se expuso en apartados anteriores, es el resultado de la infiltración de resinas adhesivas en la dentina desmineralizada mediante acondicionadores acídicos, de modo que se obtiene una estructura compuesta por colágeno tipo I y proteoglicanos envueltos en las cadenas de polímeros.<sup>124,125</sup>

Lo ideal sería obtener una red tridimensional de polímero y colágeno que produzca una unión continua y duradera entre el adhesivo y el sustrato dentinario. Sin embargo, la unión adhesiva entre las resinas y dentina tiene una vida útil corta, con una media de 6 años de duración, debido a la aparición de caries secundarias producidas por un fracaso en la adhesión.<sup>127</sup>

Las enzimas colagenolíticas endógenas conducen a la degradación proteolítica y la hidrofiliidad de los adhesivos dentales causa la degradación hidrolítica. Pocas de las estrategias de prevención que han dado resultados satisfactorios están disponibles para su uso actual. La clorhexidina, un inhibidor general de las metaloproteinasas (MMPs) y las captescinas de cisteína, es el método más probado para disminuir la degradación de la capa híbrida. Se han probado otros inhibidores de enzimas como alternativa y los agentes de reticulación podrían hacer matrices orgánicas de la capa híbrida más resistentes.<sup>128</sup> La técnica de unión húmeda con etanol también ha obtenido resultados satisfactorios.<sup>47,108</sup>

El empleo de agentes remineralizantes biomiméticos es muy prometedor y pueden ser una parte importante del futuro de la Odontología.<sup>128</sup> Desgraciadamente, la infiltración incompleta de los sistemas adhesivos en la dentina desmineralizada, sobre todo cuando se utiliza un enfoque de grabar y lavar, representa un claro problema desafiando el éxito clínico de las restauraciones dentales a base de resina.<sup>124</sup>

La mayoría de los sistemas adhesivos producen muy buenas fuerzas de unión inmediata, pero a largo plazo la fuerza de unión disminuye.<sup>128</sup> La infiltración completa de la resina en la dentina sería la situación ideal porque el grabado con ácido fosfórico también descubre y activa las proteínas endógenas de la matriz dentinaria, como metaloproteinasas de la matriz y captepsina cisteína.<sup>129</sup>

Sin embargo, la infiltración completa y la sustitución de toda el agua por la resina prácticamente no se produce, creando así las lagunas dentro de la capa híbrida dejando las fibras de colágeno desprotegidas.

Se han identificado dos mecanismos principales que explican la degradación de la capa híbrida: la degradación intrínseca o proteolítica de la matriz orgánica y la degradación hidrolítica, o extrínseca, de la matriz de resina. Aunque ambos mecanismos están relacionados entre sí, la acción de estos procesos individuales deriva en la disminución de la durabilidad de las uniones de resina-dentina y reducen el pronóstico favorable del diente.<sup>130</sup>

#### **2.4.1. Degradación proteolítica de la matriz de colágeno**

Como se mencionó anteriormente, la mayor parte de la sustancia orgánica en la dentina es el colágeno y la porción restante de sustancia orgánica, alrededor de 10%, está compuesta de proteínas no colágenas, incluyendo proteoglicanos, fosfolípidos y enzimas.<sup>128</sup> Últimamente, las enzimas dentinarias endógenas, especialmente metaloproteinasas (MMPs) y catepsinas cisteína, han recibido una gran atención por su potencial papel en la degradación de la capa híbrida. Las metaloproteinasas derivadas de la matriz dentinaria (MMP 2, 8, 9 y 20) son una familia de endopeptidasas estructuralmente relacionadas, Zn dependientes, que son activadas durante los procedimientos de grabado ácido por el bajo pH y por la presencia de iones metálicos como el Calcio (Ca) y el Zinc (Zn).<sup>47,131</sup> Presentan un prodominio, necesario para su activación, un dominio catalítico con una zona de unión al Zn, con zonas ricas en cisteína necesarias para unirse a las proteínas y clibarlas. Presentan una región bisagra y un dominio

hemopexínico.<sup>128</sup> Se dividen en 6 grupos, basados en su homología estructural y su especificidad de sustrato: colagenasas (MMP-1, MMP-8, MMP-13 y MMP-18), gelatinasas (MMP-2 , y MMP-9), estromelisininas (MMP-3, MMP-10 y MMP-11), metaloproteinasas transmembrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 y MMP-25 ) y el otro grupo (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-22, MMP-23, MMP-27 y MMP-28).<sup>47</sup>

Las enzimas presentes en la dentina mineralizada durante la formación del diente, desempeñan muchas funciones fisiológicas, como la angiogénesis, la remodelación tisular y dentinogénesis. Pero también parecen estar implicadas en la degradación proteolítica patológica del colágeno, así como, en la enfermedad periodontal, caries de la dentina y la degradación de la capa híbrida.<sup>132</sup>

Mazzoni y cols.,<sup>133</sup> mediante análisis inmunohistoquímico, confirmaron que las metaloproteinasas (MMP-2) y (MMP-9) se encuentran en la red de colágeno orgánico de la dentina. Se ha comprobado que potencialmente pueden desempeñar un papel importante en la destrucción de la materia orgánica dentinaria. Toda la literatura reciente se ha centrado en estos dos tipos de metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9. Las metaloproteinasas en su estado natural típico se presentan como zimógenos inactivos y, por tanto, es necesario un cambio en su morfología química para activarlas.

La actividad enzimática de estas enzimas es inhibida por factores tisulares endógenos (TIMP), que son segregados por los odontoblastos. La acción de los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas es sólo un mecanismo que se ha

postulado como responsable de controlar la actividad funcional de las mismas. También se han sugerido otros mecanismos, como el control genético.<sup>125</sup>

Los inhibidores tisulares de MMPs se unen naturalmente a éstas cuando se encuentran en su forma latente, e inhiben su activación y, por tanto, su actividad como la hidrólisis y la proteólisis. Se han identificado dos inhibidores tisulares diferentes para cada una de las metaloproteinasas implicadas. El inhibidor tisular TIMP-1, que se une a la metaloproteinasa MMP-9 y el inhibidor TIMP-2, que se une a la metaloproteinasas MMP-2.<sup>134</sup>

Sulkala y cols.,<sup>135</sup> confirmaron que tanto el ácido fosfórico, como los ácidos suaves presentes en los monómeros de las resinas ácidas, son capaces de inhibir o desplazar los inhibidores tisulares enzimáticos. De ese modo permiten que las metaloproteinasas se activen. Sin embargo se necesitan más estudios para comprender por completo este mecanismo de inhibición, conocimiento que ayudaría a tomar medidas para prevenir la degradación de la capa híbrida. Nishitani y cols.,<sup>136</sup> presentaron pruebas que también evidencian una actividad colagenolítica y gelatinolítica patológica mediada por las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9, dentro de la dentina previamente tratada. Esto se comprobó con adhesivos de grabar y lavar y con adhesivos autoacondicionantes. En este estudio se observó que el ácido fosfórico al 37% que se utiliza en sistemas de grabar y lavar, tenía un pH lo suficientemente bajo como para inactivar temporalmente algunas de las metaloproteinasas endógenas. El ácido ortofosfórico expondría más fibras durante la desmineralización y activaría la acción de las MMPs rápidamente. Los adhesivos autoacondicionantes son también suficientemente ácidos para activar la actividad gelatinolítica y colagenolítica de estas enzimas. Sin embargo, estos adhesivos dejan las fibrillas

de colágeno parcialmente cubiertas con apatita residual y esto proporcionaría más resistencia a la degradación comparado con los adhesivos de grabar y lavar.

Mazzoni y cols.,<sup>137</sup> mostraron, utilizando análisis de zimografía, que la actividad gelatinolítica puede deberse a un proceso de dos pasos. Este proceso comienza con la desmineralización inicial y la exposición de las fibrillas de colágeno y, a continuación, la acidez de los sistemas de unión puede causar la activación de las enzimas de forma secundaria. Este estudio también proporcionó evidencias de que la actividad proteolítica y gelatinolítica que destruye las fibrillas de colágeno, comienza por la parte inferior de la capa híbrida, en particular, si no está completamente infiltrada con resina. Por lo tanto, como la mitad inferior se degrada, el aumento de fluido dentinario fluiría y podría conducir a la degradación hidrolítica en las regiones superiores de la misma.

Las catepsinas de cisteína también se han postulado como causa de la degradación de la capa híbrida, aunque existe mucha menos literatura disponible sobre estas enzimas. Son un grupo de 11 proteasas humanas que, como las metaloproteinasas, se presentan como zimógenos inactivos. La activación de estas enzimas se produce en condiciones ligeramente ácidas y son inactivos con un pH neutro.<sup>138</sup>

Tersariol y cols.,<sup>138</sup> identificaron, en estudios de ADN, la presencia de cisteína catepsina B en los túbulos dentinarios humanos y sugieren la necesidad de realizar más estudios siguiendo esta línea. Se ha demostrado que las catepsinas de cisteína presentan actividad proteolítica similar a la de las metaloproteinasas y, de la misma manera, pueden ser activadas después del uso de un adhesivo de bajo pH.<sup>139</sup>

Con los resultados de estudios anteriores, es por lo tanto razonable sugerir que la activación de las catepsinas de cisteína pueden intervenir en la degradación de la capa híbrida de resina-dentina con el tiempo. El consenso actual es que la degradación del colágeno está más asociada con los sistemas adhesivos de grabar y lavar, esto es debido a que el ataque de ácido fosfórico desmineraliza la dentina en exceso, dejando las fibras de colágeno expuestas y haciéndolas más susceptibles a la degradación proteolítica por las enzimas dentinarias endógenas. Con el uso de adhesivos autoacondicionantes la degradación se sigue produciendo, pero en menor grado que con los adhesivos de grabado total. Esto se debe a que la imprimación ácida no expone tanto las fibras de colágeno y aunque la resina penetra a menor profundidad en la matriz de colágeno hay menor cantidad de dentina desmineralizada no infiltrada.

#### **2.4.2. Degradación hidrolítica de la matriz de colágeno**

El problema actual de los sistemas adhesivos actuales es su poca durabilidad a largo plazo. Una penetración adecuada del adhesivo en la matriz de la dentina desmineralizada y la formación de una capa híbrida segura y duradera son requisitos obligatorios para garantizar esta durabilidad.<sup>140</sup>

La técnica de unión húmeda es la más utilizada cuando se emplean adhesivos autoacondicionantes. La idea de este método es permitir que la superficie dentinaria permanezca húmeda para impedir el colapso de la matriz de colágeno que se produce después de un extenso secado con aire.<sup>140</sup>

El problema con esta técnica es que el volumen de agua restante es difícil de controlar, una pequeña cantidad de agua es necesaria pero un excedente causará la separación de fases y "ampollas de agua".<sup>92</sup> Se ha sugerido que el exceso de agua competiría con los monómeros de resina hidrófilos en la penetración en la matriz dentinaria, generando así una infiltración incompleta de la resina. De estos estudios se desprende que tanto el excedente de agua como el exceso de secado sería perjudicial.

La hidrólisis de la matriz de resina, contrariamente a la degradación proteolítica de la capa híbrida, se produce de manera similar con el uso de ambos adhesivos grabado total y autoacondicionantes. Ésta se relaciona con la absorción de agua dentro de la capa híbrida.<sup>141,142</sup>

El factor importante con este tipo de degradación no es la diferencia entre la técnica empleada, pero sí de los componentes químicos de los diferentes adhesivos.<sup>142</sup> Los problemas de fracasos de las resinas compuestas se han asociado a procesos de degradación por descomposición química del material frente a la acción de ciertas enzimas presentes en la cavidad oral. Los estudios realizados por Liu y cols.,<sup>14</sup> demostraron, mediante cromatografía de alta resolución, que las esterasas salivales son capaces de degradar distintos componentes de las resinas compuestas, tales como BisGMA (bisfenol-A-glicidilmetacrilato) (estructura aromática) y TEGDMA (triethylenglicol-dimetacrilato) (estructura hidrófila). Con este estudio quedó demostrado que la pseudocolinesterasa degrada preferentemente el TEGDMA y sus derivados, mientras que la colinesterasa tiene un mayor efecto catalítico sobre el BisGMA presente en las resinas compuestas.<sup>14</sup>

## **2.5. Formulaciones de adhesivos basados en aditivos de nanogeles**

El reto actual en Odontología Adhesiva es encontrar formulaciones hidrofílicas que penetren a través de la capa híbrida y mejoren la unión de las restauraciones estéticas directas en la superficie dentaria, rica en agua. La formación de una capa híbrida estable a lo largo del tiempo.

Aun siendo los nuevos adhesivos relativamente hidrófilos, estas formulaciones son todavía parcialmente miscibles con agua, y es común la separación de las fases que se produce, tanto antes, como después de la polimerización.<sup>93,123</sup>

Se ha establecido una fuerte correlación entre la heterogeneidad de la capa adhesiva y la disminución de las propiedades mecánicas y estructurales que comprometen la unión de la interfase.<sup>143,144,145</sup>

La nanotecnología en forma de partículas de prepolímero a escala nanométrica atrae un considerable interés debido a las múltiples aplicaciones en materiales compuestos (liberación de fármacos, ingeniería de tejidos y polímeros).

Estudios recientes de la incorporación de nanogeles a los sistemas adhesivos y composites dentales han mostrado que su presencia reduce la contracción de polimerización, mejora las propiedades mecánicas, como el módulo de flexión, tanto empleando la técnica seca como en mojado, debido al fortalecimiento de la red polimérica por la presencia de estas partículas reticuladas.<sup>146</sup>

Los nanogeles son partículas poliméricas reticuladas globulares de 10 a 100 nm sintetizadas de una forma versátil, que pueden ser incorporados y dispersados en monómeros como BisGMA y HEMA.

Estas nanopartículas penetrarían dentro de la dentina desmineralizada reforzando esa red de resina adhesiva y de la capa híbrida. Tras la eliminación del disolvente y la contracción de polimerización de la resina de la matriz, las partículas se unirían para potenciar a reforzar el entramado de resina. Con ello producirían una interfase más estable a lo largo del tiempo. Estudios recientes realizados por Moraes y cols.,<sup>113</sup> sobre la incorporación de partículas de nanogeles en sistemas adhesivos dentales y composite han obtenido resultados satisfactorios.<sup>146,147</sup>

Estos estudios, junto con los realizados por Liu et al.,<sup>148</sup> comprobaron que la incorporación de estas partículas de nanogeles al adhesivo, no afectaría el grado de conversión o polimerización del mismo, obteniendo mejores propiedades mecánicas en condiciones de humedad, así como mejores resultados en las pruebas de microtensión.

El tamaño y la estructura globular de las partículas de nanogel son tales que se dispersan de forma efectiva en los espacios interfibrilares de colágeno y en los túbulos de la dentina desmineralizada.<sup>113,114</sup>

El estudio sobre los adhesivos concluyó que la incorporación de partículas de nanogel en su composición, no alteraba la evaporación del disolvente. Los nanogeles, además, podían reducir la inhibición de oxígeno durante la polimerización del adhesivo.<sup>146</sup>

Respecto al aumento de viscosidad del adhesivo se comprobó que era aceptable hasta niveles de carga del 20 al 30% en peso, por encima del cual las interacciones entre las partículas dominaban. Respecto a la concentración eficaz de nanogeles en los materiales que contienen etanol como disolvente, se estimó

que debía ser del 22% o 18% en peso, para los 12% y 40% en peso de concentración de disolvente. Con estas concentraciones se conseguía un equilibrio entre el potencial de refuerzo en red de las partículas y la viscosidad que permitía controlar el espesor de la capa de adhesivo. Los estudios de la cinética de polimerización demostraron pocos o ningún efecto en la conversión final de los nanogeles.<sup>146</sup>

Estas partículas también han sido introducidas en materiales para restauración como composites.<sup>147</sup> Se ha estudiado las propiedades de estos nuevos materiales encontrando que su incorporación en monómeros de dimetacrilato no afecta la cinética de la reacción de conversión final durante la polimerización del material. Producen un ligero aumento en la viscosidad a concentraciones moderadas y reducen la contracción y estrés de polimerización.<sup>147</sup>

Un nuevo estudio, realizado por Gotti y cols.,<sup>149</sup> en 2016, corroboró los resultados anteriores. Se estudió la influencia de la hidrofiliidad, el comportamiento mecánico, la resistencia de unión, el grado de conversión y el módulo de elasticidad de adhesivos dentales formulados con partículas de nanogeles. Su comportamiento fue analizado a las 24 horas y a los 3 meses de almacenamiento en agua. Los adhesivos con nanogeles obtuvieron mejor resultado en las pruebas de microtensión a los 3 meses, mientras que no se obtuvieron diferencias significativas en el grupo control, sin estas partículas. La solubilidad en agua se redujo y la fuerza de adhesión a corto plazo mejoró considerablemente sin necesidad de modificar la técnica de aplicación.

## 2.6. El ácido anacárdico

Las investigaciones actuales van encaminadas a descubrir distintas estrategias en el tratamiento previo de la dentina así como nuevas formulaciones de adhesivos que se simplifiquen el procedimiento clínico, al mismo tiempo que tengan una menor degradación con el tiempo. Con ello se pretende reducir la aparición de caries secundarias, lo que prolongaría la durabilidad de las restauraciones y con ello se retrasaría la necesidad de realizar retratamientos, siguiendo así la tendencia actual de la Odontología Restauradora de Mínima Intervención.

El Anacardo líquido, un subproducto obtenido a partir de procesamiento de la cáscara de nuez de marañón (CNSL), "*Anacardium occidentale*", es una fuente rica en compuestos fenólicos de cadena larga (alquilfenoles). Se ha utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de una amplia variedad de condiciones fisiopatológicas.<sup>150</sup>

Para definir su mecanismo de acción se investigó el efecto del extracto de cáscara de nuez de marañón, el ácido anacárdico, en dos metaloproteinasas de la matriz, (MMP-2 y MMP-9), puesto que se conoce que presentan un papel crítico en la degradación enzimática de la capa híbrida. Estos estudios, realizados por Omanakuttan y cols.,<sup>150</sup> demostraron, mediante zimografía, que el ácido anacárdico era capaz de inhibir las actividades catalíticas sobre esas dos gelatinasas MMP-2 y MMP9, en un medio acondicionado a partir de células 3T3-L1. De acuerdo con los resultados obtenidos en estudios basados en fluorescencia los estudios de acoplamiento sugirieron que el grupo carboxílico del ácido anacárdico se une mediante quelación al ion zinc catalítico y forma un

enlace de hidrógeno que inhibe la acción de estas gelatinasas. Los resultados proporcionan la primera evidencia de la inhibición de la actividad catalítica por la gelatinasa del ácido anacárdico, proporcionando una plantilla nueva para el pretratamiento dentinario de modo que su acción proporcione, mediante su mecanismo molecular, una posible acción terapéutica.

La inhibición de la actividad enzimática de la matriz dentinaria mediante la utilización de ácido anacárdico en Odontología no ha sido estudiada, por lo que este trabajo resulta un estudio pionero para valorar su potencial utilizándolo para tratamiento conservador en Odontología.<sup>151</sup>

## **2.7. Pruebas de evaluación de la adhesión a la dentina**

La interfase entre la restauración y el diente, en la cavidad oral se expone a distintas fuerzas que actúan al mismo tiempo. Cuando el diente restaurado entra en función, la restauración estará sometida a fuerzas de masticación, cambios de temperatura y cambios químicos, así como de pH. También en el proceso de polimerización del material restaurador, la contracción del mismo genera un estrés para el adhesivo y genera unas fuerzas que lo intentan separar de la cavidad.

A nivel mundial, las pruebas de resistencia se utilizan para medir la adhesión de los sistemas adhesivos al diente de un modo fiable.<sup>152</sup>

Estos tipos de ensayos son utilizados para la selección inicial de nuevas formulaciones de adhesivos, para comprobar diversas hipótesis de investigación, incluso para el control de calidad de los fabricantes.<sup>153</sup>

A lo largo del tiempo se han establecido distintos tipos de ensayo, la variabilidad de metodologías hoy en día es mucho más amplia y no existe consenso entre los investigadores.<sup>154</sup>

La solución propuesta fue estandarizar el protocolo, con la esperanza de interpretar los datos de forma más eficaz, así como facilitar la comparación de los estudios. El estudio de meta-análisis realizado por De Munck y cols.,<sup>152</sup> en 2012, ofrece una revisión sistemática de las distintas metodologías realizadas. El estudio de las variables y el análisis de los resultados han logrado establecer interesantes y significativas conclusiones. Entre las dos pruebas más utilizadas por los investigadores la prueba de microtracción ha mostrado tener un poder discriminativo mayor que la de macrocizallamiento. En estudios de durabilidad el almacenamiento en agua (3-6 meses) mostró un claro efecto degradante de la unión que imita a la degradación observada clínicamente en las interfases.<sup>155</sup>

En el año 1994, Sano y cols.,<sup>156</sup> describieron, por primera vez, el test de resistencia adhesiva a la microtensión. En este método se realizaba la unión de una resina compuesta a la superficie oclusal desgastada de un diente. El espécimen era cortado en barritas de aproximadamente 1 mm<sup>2</sup> de área y se medía la rotura en una máquina de ensayo de microtracción universal. El tipo de fallo podía ser examinado posteriormente mediante microscopio para realizar el análisis fractográfico.

En esencia, y según recoge el artículo publicado en 1999 por Pashley y cols.,<sup>157</sup> las pruebas de microtensión pueden realizarse con diversas modificaciones, de modo que el investigador pueda seleccionar aquella que mejor se adapte a sus necesidades. Esta prueba se basa en la división de dientes de entre 0,5 y 1 mm

de espesor recortados y testados, de forma que la fuerza de tensión se concentrará en la interfase de unión del diente con el material a estudiar.

Entre sus ventajas ofrece que de cada diente pueden obtenerse múltiples especímenes. Pueden emplearse distintas modificaciones en las preparaciones iniciales; se puede añadir el material restaurador sobre dentina oclusal (modelo plano); por debajo de la superficie de la corona (modelo de cavidad); o por la superficie interna de los conductos radiculares, entre otros.

El test de microtensión permite la comparación cuando la preparación se realiza en diferentes sustratos; dentina sana, careada o esclerótica. La técnica es ideal para evaluar la durabilidad a largo plazo. Este método ofrece gran versatilidad que no puede conseguirse con métodos tradicionales. Requiere más tiempo de trabajo, pero tiene gran potencial para proporcionar una idea de la fuerza de adhesión de los materiales de restauración en sustratos clínicamente relevantes.<sup>156</sup>

## **2.8. Análisis con Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)**

Durante la década de 1950 y principios de 1960, el microscopio electrónico de barrido (MEB) se utilizó en Odontología principalmente para estudiar la dentina y el esmalte. Después de la introducción de la técnica de grabado ácido, MEB también fue utilizado ampliamente para estudiar los mecanismos de unión al esmalte y, más recientemente, la unión a dentina.<sup>158</sup>

El MEB se ha convertido en una herramienta muy versátil en cuanto al tamaño de los especímenes que pueden ser analizados; admite objetos que miden entre

fracciones de micrómetro y varios centímetros. La platina adopta movimientos según los ejes X e Y de giro y de inclinación del espécimen, permitiendo su observación casi desde cualquier ángulo. Sólo oculta la superficie de apoyo que descansa sobre el porta especímenes. Su gran potencial deriva en la gran profundidad de campo que permite enfocar objetos de gran espesor. Todo esto facilita la percepción por parte del ojo humano y mejora la comprensión de las relaciones espaciales entre las estructuras de estudio y, por lo tanto, facilita su correcta interpretación. Su riqueza en información suele superar ampliamente la descripción escrita. En Odontología es una herramienta eficaz para estudiar la capa híbrida, la localización y morfología de las porosidades de tamaño nanométrico que pueden permitir la hidrólisis de las fibras de colágeno y la degradación de los monómeros adhesivos.<sup>159</sup>

## **2.9. Análisis con microscopía confocal**

En Odontología, la microscopía láser confocal ha sido una herramienta importante y útil para analizar el área de unión entre el material restaurador y el esmalte o dentina; así como, para evaluar todos los tratamientos de las estructuras dentales con nuevos materiales.<sup>160</sup>

A diferencia con las técnicas de microscopía electrónica de barrido, el análisis con láser confocal permite ver los componentes adhesivos, materiales compuestos y cementos de resina en la interfase de unión, ya que se emplean diferentes marcadores fluorescentes para cada componente utilizado en el proceso de adhesión. Además esta técnica permite analizar la micropermeabilidad de la capa híbrida formada por los distintos sistemas

adhesivos a través de marcadores fluorescentes mediante inducción de presión en la cámara pulpar.<sup>160-162</sup>

La investigación de la unión del área entre dentina y restauración ha sido un objetivo fundamental de los estudios de microscopía confocal, ya que cierta información solamente se obtiene con la utilización de esta técnica. Se puede identificar la pérdida de sellado de la interfase resina-dentina tras almacenamiento en agua como sugieren Sauro y cols., método eficaz para evaluar la degradación que sufren las interfases resina-dentina a lo largo del tiempo.<sup>162-164</sup>



## *OBJETIVOS E HIPÓTESIS*



### **3. OBJETIVOS Y HIPÓTESIS.**

#### **3.1. Objetivos**

Este proyecto se centró en la utilización de “*primers*” hidrofílicos experimentales formulados con monómeros funcionales 10-MDP, con y sin aditivos de nanogeles. Además se utilizó un adhesivo hidrofóbico. Los adhesivos experimentales de dos pasos se aplicaron de forma universal con técnicas de grabado total o autoacondicionante. Además se estudió un pretratamiento dentinario experimental basado en una solución de etanol/agua con ácido anacárdico a diferentes concentraciones (50%, 25%, 5%, 1%).

Por lo que los objetivos planteados fueron los siguientes:

1. Determinar, mediante análisis de microtensión ( $\mu$ TBS), la durabilidad, transcurrido un periodo de tiempo de 6 meses de inmersión en agua destilada, de dos grupos de adhesivos experimentales, uno de ellos con partículas de nanogeles en su composición, aplicados en dentina con técnica autoacondicionante o técnica de grabado total.
2. Valorar, mediante análisis de microtensión ( $\mu$ TBS), la durabilidad, transcurrido un periodo de tiempo de 6 meses de inmersión en agua destilada, de los adhesivos experimentales con y sin nanogeles, aplicados con técnica autoacondicionante o de grabado total, en dentina pre-tratada con soluciones de ácido anacárdico a diferentes concentraciones.
3. Averiguar el modo de fallo que se produjo en todos los grupos experimentales a las 24 horas y después de 6 meses de inmersión en

agua destilada, mediante la utilización de un estereomicroscopio y sucesivamente con MEB.

4. Describir la ultra-morfología a las 24 horas y después de 6 meses de inmersión en agua destilada, de las interfases resina-dentina que se crearon en todos los grupos experimentales descritos en los objetivos 1 y 2.

### **3.2. Hipótesis**

Las hipótesis formuladas fueron las siguientes:

1. Los adhesivos con nanogeles son capaces de crear una interfase resina-dentina más resistente a la degradación tras 6 meses de almacenamiento en agua cuando se aplican con técnica de grabado total o autoacondicionante.
2. El empleo de una solución de ácido anacárdico a concentración adecuada puede favorecer la formación de una interfase resina-dentina resistente a la degradación, después 6 meses de inmersión en agua, cuando los adhesivos experimentales, con y sin nanogeles, se aplican en dentina con técnica de grabado total o autoacondicionante.

## *MATERIAL Y METODO*



## **4. MATERIAL Y MÉTODO**

### **4.1. Material**

Los materiales empleados para realizar el siguiente estudio se detallan a continuación:

- **Muestra :**
  - Dientes humanos: terceros molares maxilares y mandibulares
- **Conservación de la muestra:**
  - Curetas Gracey 11/12 (Hu-Friedy, Chicago, EEUU)
  - Suero Fisiológico NaCl 0,9 (BRAUN, Braun Melsungen AG, Alemania)
  - Timol 0,1% (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
- **Sistemas adhesivos y otro material experimental:**
  - Adhesivo experimental Nanogeles: Primer 115IMP1NA + Bond 25
  - Adhesivo experimental control: Primer 115-IMP1/o325 + Bond 25
  - Solución de etanol absoluto con ácido anacárdico al 50%
  - Solución de etanol absoluto con ácido anacárdico al 25 %
  - Solución de etanol absoluto con ácido anacárdico al 5 %
  - Solución de etanol absoluto con ácido anacárdico al 1 %
- **Material restaurador:**
  - Composite Filteck™ Z500 (3M ESPE. Dental Products, St. Paul, MI, EEUU)

- Ácido ortofosfórico al 37%. Total Etch (Ivoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein)
- Lámpara de polimerizar Elipar™FreeLigth™2 (3M ESPE EEUU)
- **Preparación de muestras**
  - Turbina KaVo MASTERtorque (KaVo Dental, GmbH, Biberach, Alemania)
  - Fresa diamantada de turbina Komet H5SE (KOMET GROUP GmbH, Besigheim, Alemania)
  - Sonda calibrada CP12 Carl Martin (Carl Martin GmbH Neuenkamper, Solingen Alemania)
  - Lupas de aumento Akura (Akura-medical, Madrid, Spain).
  - Discos de corte de 102 mm x0,3 mm x12,7 mm Isomet™ (BUELHER, Lake Bluff, Illinois, USA).
  - Cortadora de especímenes BUELHER® Isomet™ Low Speed Saw (BUELHER, Lake Bluff, IL, EEUU)
  - Cubeta de ultrasonidos Floureon (ShenZhen Global E-Commerce Co, Shenzhen, China)
- **Prueba de microtensión:**
  - Microtensile Tester, (Bisco Inc, Schaumburg, IL EEUU)
  - Cyanocrylate: Zapit (Dental Ventures of America Inc Corona, CA, EEUU)
  - Accelerator Zapit (Dental Ventures, Corona, EEUU)

- Calibrador digital. Sylvae Ultra-Call. (Li Fower Inc, Newton, MA, EEUU)
- **Medios de contraste fluorescente y material para preparación de muestras**
  - Rodamina al 0,1%. (Sigma-Aldrich, Madrid, España)
  - Papel abrasivo de carburo de silicio de grano ascendente Versocit Struers (# 1200 a #4000) (Ballerup, Dinamarca)
  - Máquina esmeriladora-pulidora MetaServ™ 250 (BUELHER, Lake Bluff, IL, EEUU)
- **Análisis microscópico:**
  - Microscopio Electrónico de Barrido Hitachi FE S4800. (Hitachi Ltd. Tokio, Japón)
  - Microscopio Confocal Olympus FV1000. (Olympus Corporation, Tokio, Japón)
  - Máquina de secado a punto crítico (Leica Microsystem GmbH, Wetzlar, Alemania)
  - Revestidor de bombardeo iónico Sputter coater Quorum SC7640 (Quorum Technologies, Ashford Kent, GB)
- **Software de reconocimiento de imágenes y estadístico:**
  - Leica Application Suite (LAS) (Leica Alemania)
  - Esprite 1.8 Bruker (Bruker, Massachusetts, EEUU)
  - FV Viewer Olympus. (Olympus Japón)
  - Programa estadístico SPSS versión 13.0, (Chicago, IL, EEUU)

## **4.2. Método**

### **4.2.1. Selección de las muestras dentales**

Para el presente estudio se utilizaron molares humanos, (maxilares y mandibulares), obtenidos de pacientes (rango de edad 20-50 años) a los que se les realizó la extracción de los mismos por motivos quirúrgicos. (figura 4-A). Todos procedieron del servicio de Cirugía de la Clínica Odontológica Universitaria de la Universidad CEU Cardenal Herrera en Alfara del Patriarca, España. Se solicitó previamente autorización del comité ético para comenzar el estudio, (Autorización nº CEI16/020).

Para el manejo del material biológico se emplearon todos los métodos barrera necesarios para evitar posible contaminación, uso de guantes, mascarilla y gafas protectoras, durante todo el proceso de manipulación y durante las pruebas de laboratorio.

Los molares seleccionados debían estar libres de caries, sin afectación pulpar, lesiones morfológicas, como hipoplasia, dentinogénesis imperfecta o fracturas. Los pacientes donantes fueron hombres y mujeres y las extracciones de los dientes se llevaron a cabo mediante consentimiento informado (ver anexo I y II del presente documento).

El primer anexo se solicitaba para la extracción quirúrgica de los dientes. Y el segundo anexo se solicitó para que el paciente consintiera su donación para emplearlos en investigación biomédica, si cumplían las condiciones exigidas. Además se les ofrecía garantías al respecto sobre la no utilización del material

para fines genéticos. En caso de que el paciente no aceptara las condiciones, se rechazaba la muestra y se garantizaba al paciente que su tratamiento se realizaría en idénticas condiciones y no supondría ningún trato desigual a efectos médicos ni administrativos.

Todo el material orgánico (encía y ligamento periodontal) fue removido con curetas Gracey 11/12 (Hu-Friedy) para eliminar cualquier tipo de tejido blando. Los dientes fueron finalmente almacenados en botes para recogida de muestras estériles en suero fisiológico (NaCl 0,9% + timol 0,1%) y almacenados en frigorífico a una temperatura  $< 4^{\circ}$  C por un periodo de tiempo inferior a los 3 meses antes de ser utilizados.

#### **4.2.2. Formulación de los grupos de estudio**

Los nanogeles utilizados en nuestro estudio fueron formulados y cedidos por el Catedrático de Ingeniería Química y Biológica, Jeffrey W. Stansbury, en una colaboración Internacional de la “School of Dental Medicine” de la Universidad de Colorado (Denver, EEUU), con La Universidad CEU Cardenal Herrera de Valencia (España).

Los copolímeros de Nanogeles fueron sintetizados a una proporción 70:30 molar de Isobutil-metacrilato (IBMA; Sigma–Aldrich, Madrid, España) y dimetacrilato de uretano (UDMA; Sigma–Aldrich, Madrid, España). Esta síntesis es similar a la que describieron Gotti y cols.,<sup>149</sup> para los nanogeles del grupo NG1 en su estudio.

Dos sistemas adhesivos experimentales universales de dos pasos (“*primer*” y “*bond*”) fueron creados en nuestro laboratorio (tabla 1). Cada “*primer*” tenía una composición distinta y ambos sistemas utilizan el mismo adhesivo “*bond*”. El primer 115 NG difiere del primer 115 CTR en que en su composición, el primero contiene un 15% de partículas de nanogeles.

| <b>PRIM115NG</b>                       | <b>PRIM15 CTR</b>                       | <b>BOND 25 (CONTROL)</b>              |
|--|---|---------------------------------------|
| 15% NG                                 | 0% NG                                   | 0% NG                                 |
| <b>BisGMA/HEMA/MDP</b><br>25/20/25 wt% | <b>Bis-GMA/HEMA/MDP</b><br>25/20/25 wt% | <b>UDMA/HEMA/MDP</b><br>65/33/0.1 wt% |
| <b>CQ/DMAB</b><br>0.65/0.65 wt%        | <b>CQ/DMAB</b><br>0.65/0.65 wt%         | <b>CQ/DMAB</b><br>0.30/0.60 wt%       |
| <b>Ethanol/Water</b><br>20/8.30        | <b>Ethanol/Water</b><br>20/8.30         | <b>Ethanol/Water</b><br>10/4.30       |
| <b>pH 1,9</b>                          | <b>pH 1,9</b>                           | <b>pH 6,4</b>                         |
|  |   |                                       |

**Tabla1** - Composición de los Sistemas Adhesivos experimentales empleados en el presente estudio. Todos los componentes se adquirieron por Sigma–Aldrich (Madrid, España), mientras el 10-MDP fue comprado en ESSTECH (Esstech, Essington, PA, USA).

Se prepararon, por tanto, cuatro grupos principales de estudio, que fueron distribuidos del siguiente modo según el método de aplicación en dentina:

- **Grupo 1 (115NG SELF ETCH):** Adhesivo con nanogeles y técnica autoacondicionante.



- **Grupo 2 (115CTR SELF ETCH):** Adhesivo sin nanogeles y técnica autoacondicionante.
- **Grupo 3 (115NG TOTAL ETCH):** Adhesivo con nanogeles y técnica de grabado total.
- **Grupo 4 (115CTR TOTAL ETCH):** Adhesivo sin nanogeles y técnica de grabado total.

También se confeccionaron, 16 grupos extra-experimentales de estudio, que fueron distribuidos según el método de pre-tratamiento dentinario con distintas soluciones de ácido anacárdico:

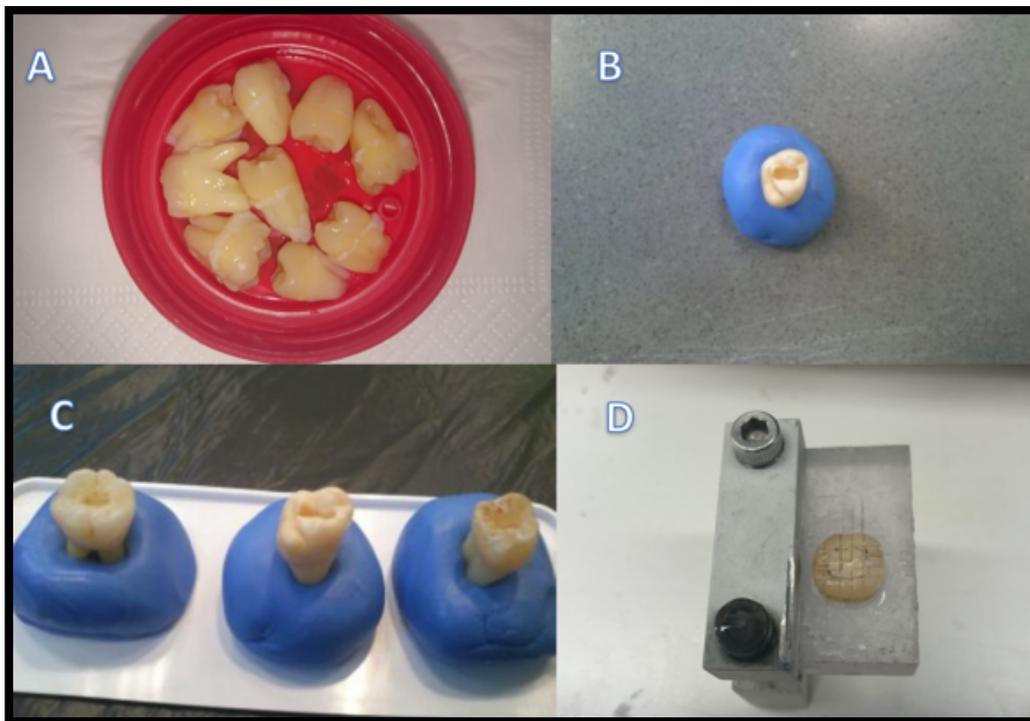
- **Grupo 5 (115NG SELF ETCH):** Adhesivo con nanogeles y técnica autoacondicionante aplicado en dentina pre-tratada con anacárdico [50% (grupo 5-50); 25% (grupo 5-25); 5% (grupo 5-5); 1%(grupo 5-1)].
- **Grupo 6 (115CTR SELF ETCH):** Adhesivo sin nanogeles y técnica autoacondicionante aplicado en dentina pre-tratada con anacárdico [50% (grupo 6-50); 25% (grupo 6-25); 5% (grupo 6-5); 1%(grupo 6-1)].
- **Grupo 7 (115NG TOTAL ETCH):** Adhesivo con nanogeles y técnica de grabado total aplicado en dentina pre-tratada con anacardico [50% (grupo 7-50); 25% (grupo 7-25); 5% (grupo 7-5); 1%(grupo 7-1)].
- **Grupo 8 (115CTR TOTAL ETCH):** Adhesivo sin nanogeles y técnica de grabado total aplicado en dentina pre-tratada con anacárdico [50% (grupo 8-50); 25% (grupo 8-25); 5% (grupo 8-5); 1%(grupo 8-1)].

### 4.2.3. Preparación cavitaria en los dientes seleccionados

Para preparar los especímenes se realizó un modelo de cavidad de clase 1 en la cara oclusal de los molares seleccionados para este estudio (Figura 4B, 4C y 4D).

Todas las cavidades se realizaron por el mismo operador, mediante turbina y fresa diamantada, siempre con refrigeración de agua-aire. Se empleó una fresa nueva para realizar cada una de las cavidades.

Las dimensiones de las cajas oclusales fueron similares 3 mm x 2 mm x 3mm en todos los molares. Se comprobaron las dimensiones con sonda calibrada periodontal.



**Figura 4** – (A) Imagen de algunos molares seleccionados que cumplían los criterios de inclusión. (B y C) Imágenes de cavidades clase I que van a ser obturadas con los sistemas adhesivos experimentales. (D) Detalle de molar con cavidad obturada y tras ser seccionado para la obtención de especímenes.

#### 4.2.4. Protocolo de adhesión y pre-tratamiento con anacárdico

Veinte (20) molares fueron utilizados para cada uno de los cuatro grupos experimentales principales. El protocolo de aplicación del sistema adhesivo con aditivo de nanogeles y sin tratamiento previo con ácido anacárdico (Grupo 1: 115NG SELF ETCH) fue el siguiente para la técnica autoacondicionante: Tras realizar la preparación cavitaria se colocó, con pincel aplicador de adhesivo, una primera capa de “*primer*” 115NG. Transcurridos 10 segundos se aplicó una segunda capa y esperamos 10 segundos más antes de airear de forma suave, durante 5 segundos, con la jeringa del equipo, a una distancia de 20 cm. A continuación se aplicó con otro pincel una capa de adhesivo “*bond*”, frotando la preparación durante 5 segundos. Se aireó de nuevo durante 2 segundos para quitar los excesos. Se polimerizó mediante lámpara de luz LED (1100 mW7cm<sup>2</sup>) durante 30 segundos. A continuación se colocó el material de restauración. Para ello se empleó el composite, Filtek Z500 en 3 incrementos, polimerizando cada uno de ellos durante 40 segundos.

El mismo protocolo se siguió con el sistema adhesivo control (Grupo 2: 115CTR SELF ETCH). En este caso se sustituyó el acondicionador 115NG por el acondicionador 115CTR, pero manteniendo el mismo modo de trabajo y tiempos. Con la técnica de grabado total, y sin tratamiento previo con ácido anacárdico, se empleó ácido ortofosfórico al 37%. Este ácido se colocó en esmalte y dentina durante 15 segundos tras la preparación de la cavidad. A continuación se lavó minuciosamente y se procedió a aplicar el “*primer*” y el “*bond*” correspondientes, como se ha descrito anteriormente. Este protocolo se realizó en el grupo 3 (115NG TOTAL ETCH) y grupo 4 (115CTR TOTAL ETCH). A continuación se

colocó el material de restauración de manera similar a la descrita con anterioridad. Tras las obturaciones, envolvimos los especímenes en papel mojado con agua y los conservamos en botes estériles cerrados hasta ser cortados para la preparación de las muestras a las 24 horas.

En los grupos extra-experimentales se utilizó pretratamiento previo con soluciones de ácido anacárdico tras la preparación de la cavidad. Se utilizaron inicialmente 5 molares para cada grupo. Las soluciones (0,1 ml) se frotaron en las cavidades con un pincel impregnado con la solución durante 30 segundos. A continuación se lavó profusamente con agua destilada durante 10 segundos. Una vez identificada la concentración de anacárdico adecuada (tras el corte de barritas por ensayo de microtensión) se incorporaron 15 molares más en el estudio (Se anticipa que la concentración de anacárdico fue 1%).

Los siguientes pasos fueron similares a los descritos con anterioridad, utilizando adhesivos con y sin nanogeles y empleando ambas técnicas, grabado total o autoacondicionante.

#### **4.2.5. Evaluación de la eficacia adhesiva (test de microtensión)**

Tras la preparación cavitaria y obturación de los molares, los especímenes se almacenaron en condiciones de humedad, Con agua destilada, a temperatura de 37° durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se seccionaron para obtener las muestras. Se obtuvieron, de este modo, barritas, “sticks”, de 1 mm mediante la cortadora de precisión a baja velocidad Low Speed saw ISOMET (Figura 5).

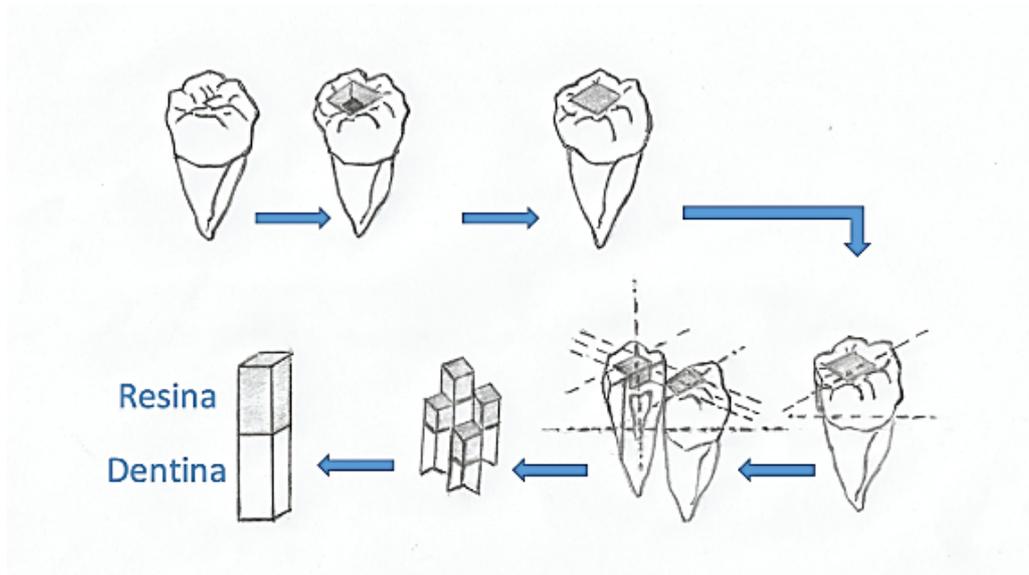
Estas barras se sometieron a los test de microtensión y análisis del tipo de fallo.

La cortadora se empleó a velocidad de 250 rpm, junto con la aplicación de discos de corte de 102 mm x 0,3 mm x 12,7 mm (Isomet Buelher,). Se aplicó en el brazo de carga 25 gr de peso, para permitir un parámetro de corte reproducible en cada muestra. El ajuste micrométrico incorporado al brazo de sujeción permitió una alineación precisa para obtener las barras longitudinales.



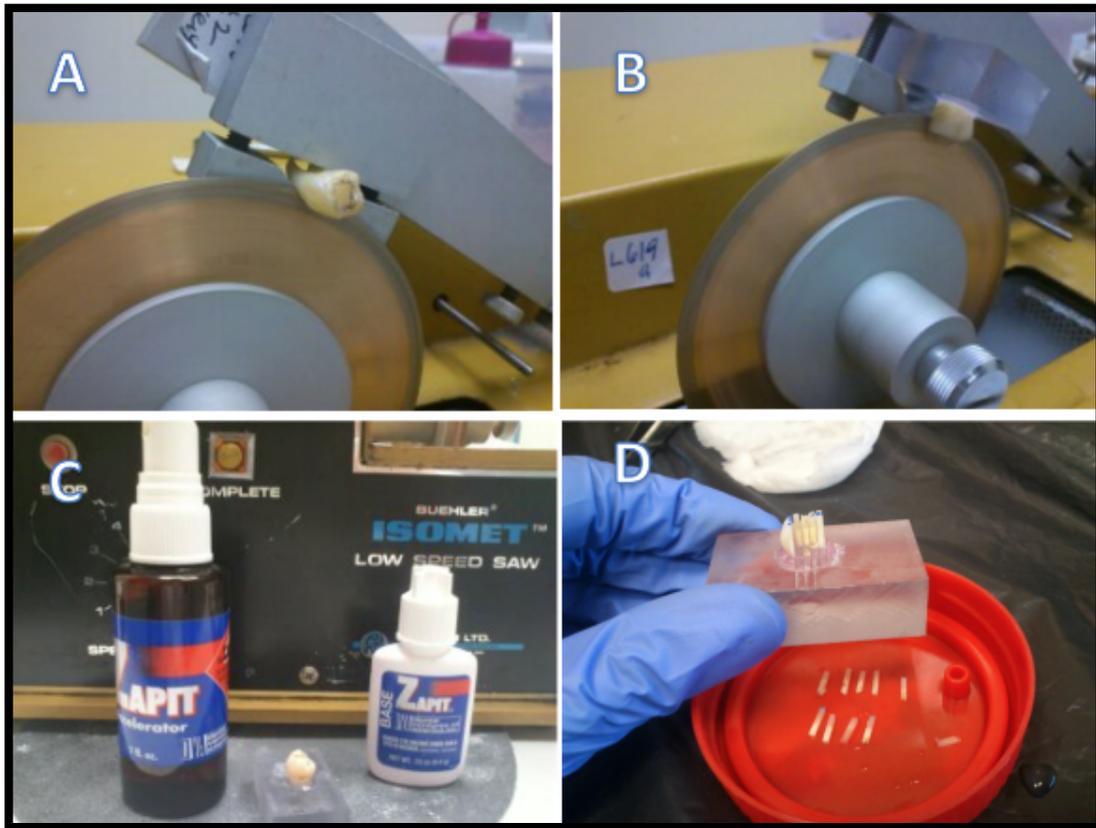
**Figura 5** - Cortadora de precisión a baja velocidad Low Speed saw ISOMET® empleada en el presente trabajo. Isomet™ Low Speed Saw (BUELHER, USA).

En la siguiente figura (Figura 6) se ilustra el protocolo seguido para la obtención de los especímenes:



**Figura 6** - Se representa el esquema de trabajo seguido para la obtención de muestras. Se realiza una cavidad clase I, posteriormente se obtura siguiendo el protocolo descrito para los distintos grupos de estudio. Se obtienen barras longitudinales para someterlas a análisis de microtensión.

Los molares se seccionaron a la altura del fulcro, dejando una superficie inferior plana que se debía adherir con pegamento de base cianocrilato a una estructura rectangular de metacrilato preformada. Esta base sirvió de soporte y sujeción para estabilizar el espécimen en la cortadora y obtener las barras de muestra. De cada uno de los molares se obtuvieron aproximadamente de 8 a 10 barras (Figura 7).

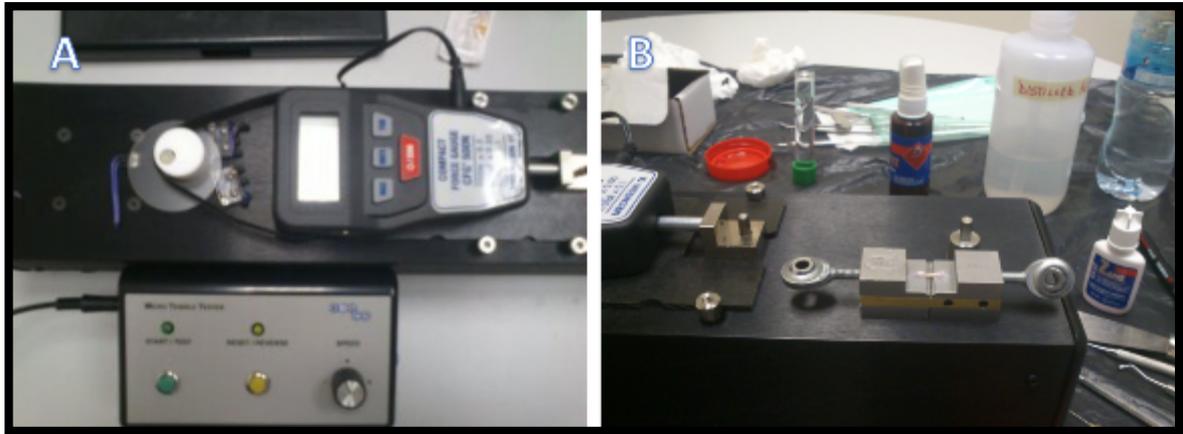


**Figura 7** - Proceso de trabajo con la cortadora de precisión. **(A)** Imagen Se observa el molar es seccionado a la altura del fulcro. **(B)** Se fija en una placa de metacrilato para obtener las muestras. **(C)** Adhesivo de base cianocrilato y acelerador empleado para fijar los molares previamente a la sección. **(D)** Detalle de un molar seccionado, la interfase oclusal aparece marcada con rotulador indeleble. De cada molar pueden obtenerse 8 muestras para su posterior análisis de microtracción.

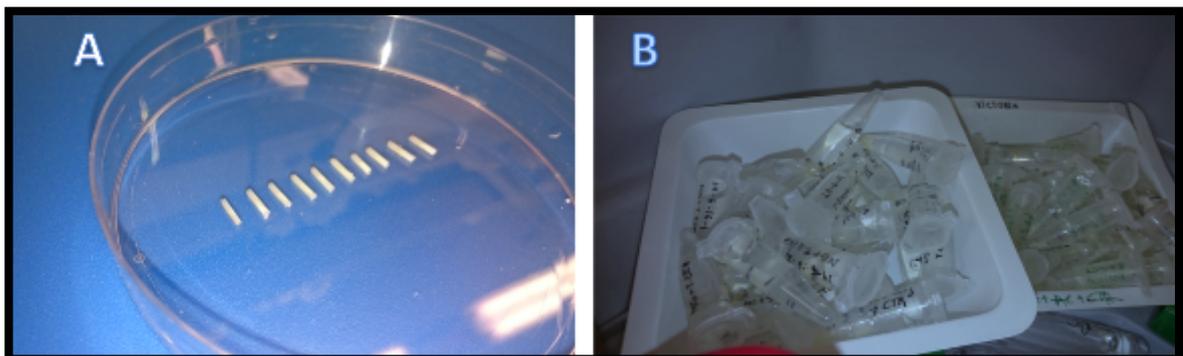
La mitad de las barritas de todos los grupos se sometieron a pruebas de microtensión (Figura 8).

Se realizó, por tanto, un primer test de microtensión a las 24h tras preparación de los modelos cavitarios. La otra mitad de las barritas, correspondientes a cada uno de los grupos de estudio, se almacenaron en tubos estériles, con agua

destilada, en incubadora a 37°C durante 6 meses para la segunda prueba de microtensión (Figura 9).

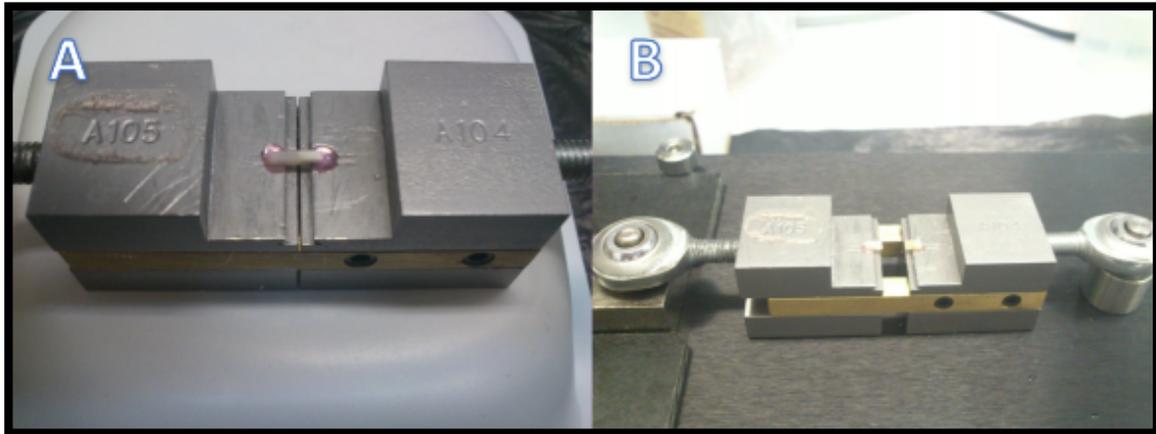


**Figura 8** - (A) Imagen del aparato de microtensión empleado para realizar análisis de microtensión. (B) Vista en detalle del soporte “jig” donde se adherían las muestras para su análisis.



**Figura 9** - (A) Detalle de algunas muestras que van se almacenaron en condiciones húmedas. (B) Muestras debidamente identificadas y almacenadas en medio húmedo e incubadora durante 6 meses (37°C).

Una vez preparados los especímenes, se fijaron a continuación las barritas al soporte “jig” de la máquina de microtensión. Se unieron cada una de ellas por ambos extremos con un adhesivo de cianocrilato Zapit (Dental Ventures of America) y se testaron bajo tensión hasta su rotura con una velocidad de 1mm/min. La interfase a valorar quedó siempre perpendicular a las fuerzas de tracción a las que eran sometidas (Figura 10).

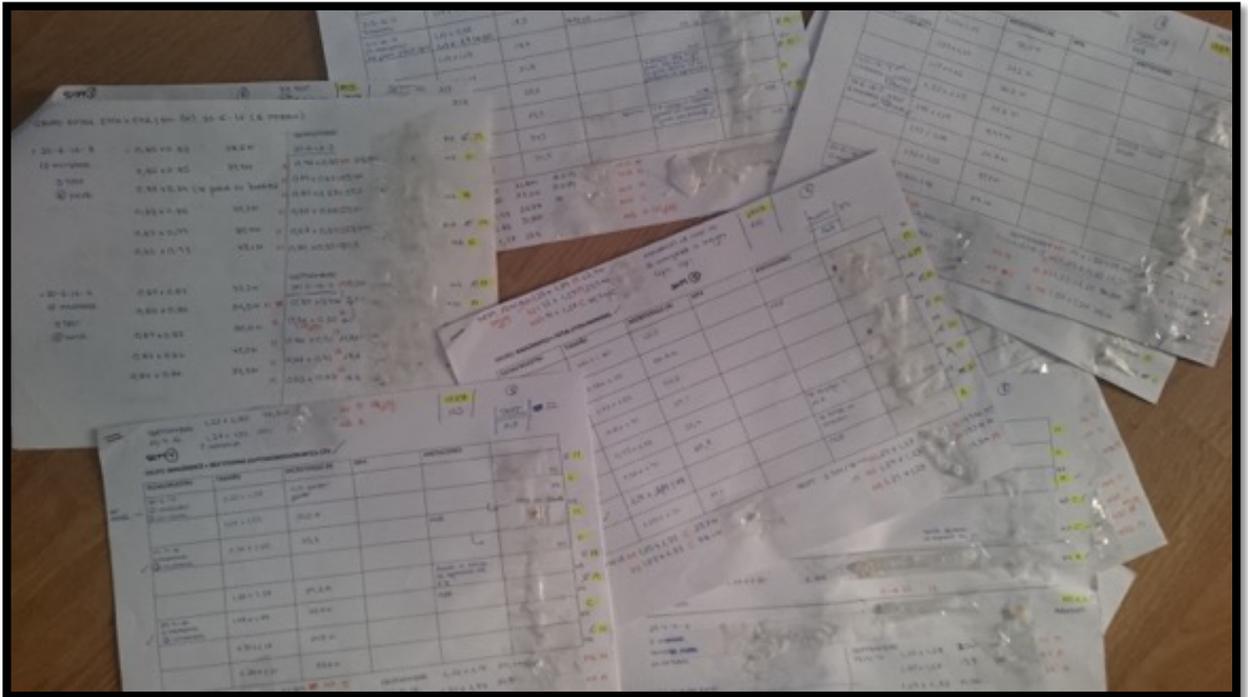


**Figura 10 - (A)** Imagen de una de las barras fijadas con pegamento a base de cianocrilato (color rosa) al “jig” del microtensile. **(B)** Se puede apreciar el momento de rotura de una de las muestras.

Las barras fracturadas se retiraron cuidadosamente del soporte con ayuda de una hoja de bisturí nº 15. A continuación se efectuó la medición de su área (Figura 11) en el punto de fractura con un calibrador digital. Los resultados obtenidos en la prueba de microtensión fueron convertidos de Netwons (Nw) a megapascales (MPa) mediante un cálculo específico (fuerza de fractura dividida

por el área de la sección):  $\left[ \frac{Nw}{mm^2} \right] = MPa$ .

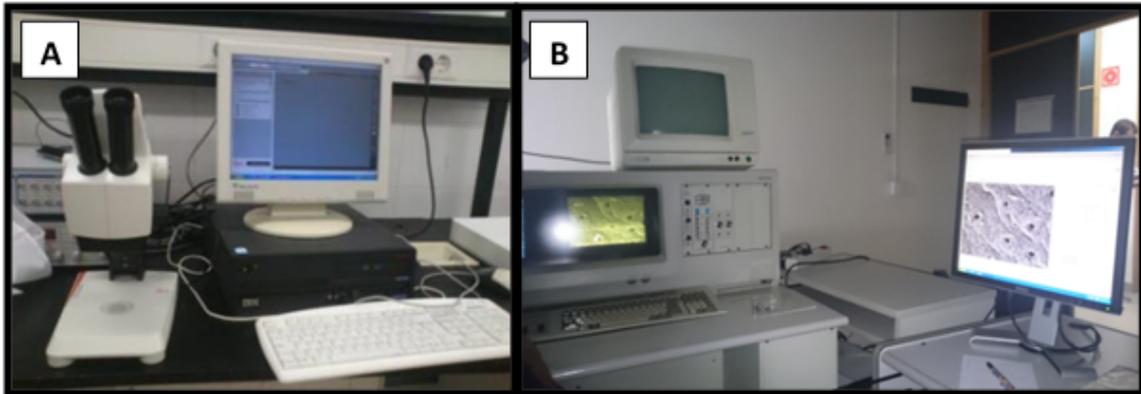
Los resultados se analizaron estadísticamente análisis de la varianza (ANOVA) de tres vías Variable dependiente: resistencia en MPa a la microtensión. Variable independiente: i) presencia de nanogeles; ii) tiempo de almacenamiento en agua; iii) pre-tratamiento con anacárdico). Las interacciones de los factores fueron también analizadas. Todos los procedimientos de comparación múltiple se realizaron por el método de Student-Newman-Keuls ( $\alpha = 0,05$ ).



**Figura 11** - Detalle de las anotaciones de laboratorio obtenidas de los test de microtensión a las 24 horas y 6 meses, en todos los grupos experimentales. Se aprecia las barritas cortadas y ordenadas para facilitar su identificación y análisis.

#### **4.2.6. Análisis fractográfico con estereomicroscopio y microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Los fracasos en la adhesión se tradujeron en fallos a distintos niveles de la interfase: A]: fallos adhesivos, aquellos que ocurren en la interfase dentina y material adhesivo; C]: fallos cohesivos, aquellos que ocurren en el interior de la estructura del dentina, resina compuesta o material adhesivo; M]: fallos mixtos, sucedidos por combinación de ambos. Todos los especímenes fracturados se examinaron con un estereomicroscopio (LEICA EZ4 H0), con magnificación de 35X para determinar el tipo de fallo o fractura (Figura 12A).



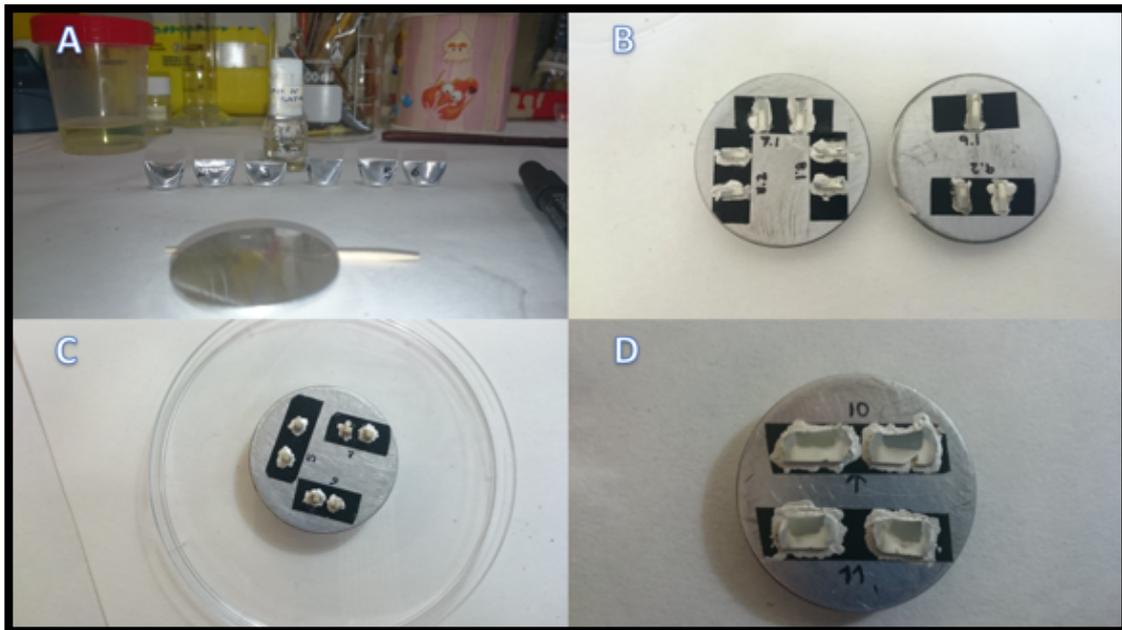
**Figura 12** – (A) Microscopio Leyca EZ4 H0 con el que se realizó el análisis de modo de fallo. (B) Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo marca Hitachi modelo FE S4800, empleado en este estudio.

Seis barras fueron elegidas [con fallo mixto (n3) y adhesivo (n3)] como muestras representativas para la evaluación de la ultra-morfología de fractura al MEB (Figura 12B). Todos los especímenes se desecaron en sílice durante 24h y se montaron en portamuestras de aluminio con cinta conductora de doble cara de carbono. Se metalizaron mediante revestidor de bombardeo iónico con una capa de Oro Paladio (Au-Pd) de 30 nm durante 120 segundos. Tras la pulverización catódica de oro, se realizaron las observaciones en microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (Figura 13). Se trabajó con un voltaje de 15 Kv a diferentes aumentos. Durante el análisis se obtuvieron tres imágenes de cada uno de los especímenes.

#### **4.2.7 Análisis de la interfase resina-dentina con microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Tras la preparación cavitaria y obturación de 3 molares más para cada uno de los grupos experimentales principales y extra-experimentales con soluciones de anacárdico, los especímenes se almacenaron en condiciones de humedad, con agua destilada, a temperatura de 37 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se seccionaron en láminas de resina-dentina de un diámetro de 4 mm. A continuación se pulieron con papel abrasivo de carburo de silicio de grano ascendente (# 1200 a #4000) (Figura 14C), mediante máquina pulidora rotatoria. Se introdujeron para un baño final en cubeta de ultrasonidos en agua durante 5 minutos y se completó la preparación de la muestra (Figura14D).

Los especímenes se grabaron con una solución de ácido ortofosfórico al 35% durante 15 segundos, se enjuagaron en agua destilada otros 15 segundos y, tras secarse al aire, fueron sumergidos en solución de hipoclorito sódico al 5,25% durante 10 minutos. Posteriormente se lavaron a fondo con agua destilada durante 5 minutos en agitación continua (100 rpm). Todas las muestras se prepararon para el estudio con MEB del mismo modo que se ha descrito anteriormente. El análisis al MEB se desarrolló con un voltaje de 15 Kv a diferentes aumentos.



**Figura 13** – (A) Preparación de las muestras para su visualización en microscopio electrónico de barrido. (B, C y D) Imagen donde se observan las muestras sobre cinta de doble cara con carbono, sobre portamuestras de aluminio y recubiertas con película de Au-Pd conductora en distintos momentos del estudio.

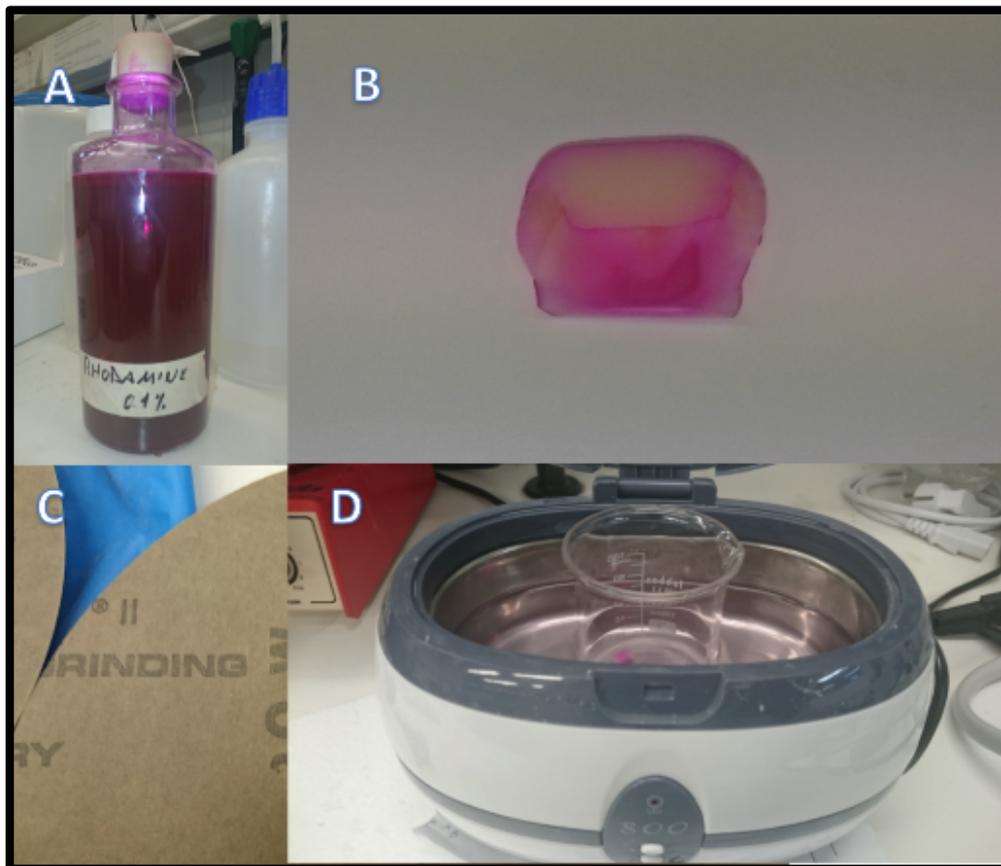
#### **4.2.8 Análisis de la interfase resina-dentina con microscopía confocal.**

Otros cuatro especímenes de cada grupo, con los distintos protocolos de adhesión descritos previamente, fueron empleados para el estudio con microscopía confocal (Figura 14A).

Los especímenes se seccionaron cuidadosamente a través de la interfase adhesiva para obtener láminas de resina-dentina de 1 mm de espesor en cada molar. Estas láminas de resina-dentina (n=10 por grupo) se dividieron en dos subgrupos (6 láminas cada uno), basados en el tiempo de almacenamiento en agua (24 horas y 6 meses).

Antes del periodo de almacenamiento las muestras se recubrieron con dos capas de barniz de fraguado rápido, aplicado a 1mm de la interfase resina-dentina.

Se colocaron en inmersión de solución de rodamina 0,1% durante 24 horas (Figura 14B). Transcurrido ese tiempo se trataron en baño ultrasónico durante 2 minutos.



**Figura 14** - (A) solución de Rodamina al 0.1%. (B) Detalle de uno de las muestras preparada para su estudio con microscopía confocal tras su tinción con rodamina al 1%, corte, pulido y limpieza con cubeta de ultrasonidos. (C) Papel de carburo de silicio con el que se pulieron los especímenes. (D) Vibración de un espécimen en cubeta de ultrasonido.

A continuación las muestras se pulieron con papel abrasivo de carburo de silicio de grano ascendente (# 1200 a #4000) (Figura 14C), mediante máquina pulidora rotatoria (Buehler Meta-Serv 3000 GRinder-Polisher; Bluehler). Se introdujeron

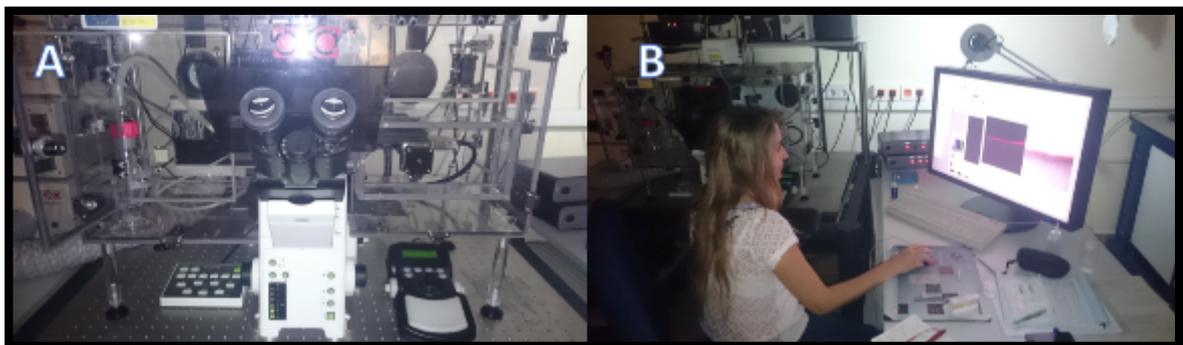
para un baño final en cubeta de ultrasonidos en agua durante 5 minutos y se completó la preparación de la muestra (Figura 14D).

Cada una de las interfases de los distintos grupos se estudiaron con microscopía confocal (Figura 15), montado sobre un IX81 invertido motorizado, con 63 9/1.4 de inmersión en aceite. La línea de excitación empleada fueron: 559 nm, (excitación rodamina).

Las imágenes de microscopía de barrido de reflexión y fluorescencia se obtuvieron a una profundidad de hasta 20  $\mu\text{m}$  bajo la superficie.<sup>162, 163</sup>

Las exploraciones del eje “Z” de la superficie fueron pseudo-coloreadas arbitrariamente por los operadores y compiladas en proyecciones únicas utilizando el software FV Viewer Olympus.

La configuración del sistema fue estandarizada y se empleó la misma para toda la investigación. De cada interfase resina-dentina se capturaron cinco imágenes ópticas aleatoriamente. Fueron capturadas y grabadas las imágenes que representaban las características más comunes de nanofiltración a lo largo de la unión de la interfase.



**Figura 15A y 15B** - Microscopio confocal Olympus FV1000.



## *RESULTADOS*



### 5.1. Resultados de la eficacia adhesiva (test de microtensión)

Los resultados obtenidos mediante análisis de microtensión a las 24 horas y 6 meses de dos grupos de adhesivos experimentales, uno de ellos con partículas de nanogel en su composición, aplicados en dentina, con técnica autoacondicionante o técnica de grabado total, así como, aplicados con ambas técnicas, en dentina pre-tratada con solución de ácido anacárdico al 1%, se detallan en las tablas 2 y 3.

Todos los resultados del análisis estadístico y las interacciones entre factores se puede encontrar en los anexos III y IV.

| Autoacondicionante               | Control          |                  | Ácido Anacárdico |                  |
|----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                  | Sin nanogeles    | Con nanogeles    | Sin nanogeles    | Con nanogeles    |
| <b><math>\mu</math>TBS (MPa)</b> |                  |                  |                  |                  |
| <b>24h</b>                       | 23.8 (3.4) A,a,1 | 24.2 (4.8) A,a,1 | 24.3 (9.6) A,a,1 | 19.8 (3.4) A,a,1 |
| <b>[A/M/C]</b>                   | [0/10/90]        | [0/15/85]        | [2/20/78]        | [3/22/75]        |
| <b>6 meses</b>                   | 13.4 (2.2) B,a,1 | 18.9 (3.5) A,b,1 | 15.9 (4.7) B,a,1 | 15.2 (2.5) A,a,1 |
| <b>[A/M/C]</b>                   | [25/35/40]       | [10/35/55]       | [20/35/45]       | [10/30/60]       |

**Tabla 2** - Resultados de los grupos de estudio con técnica autoacondicionante. Las letras mayúscula indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en columnas Las letras minúscula indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en filas. El mismo número indica que no existe diferencia estadística (a las 24h o a 6 meses) entre un adhesivo (con o sin nanogeles) aplicado, con o sin pre-tratamiento con ácido anacárdico (1%). Los números en paréntesis indican el porcentaje de fallos adhesivo (A), mixto (M) y cohesivo (C) obtenido en cada grupo.

| Grabar y Lavar | Control          |                  | Ácido Anacárdico |                  |
|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
|                | Sin nanogeles    | Con nanogeles    | Sin nanogeles    | Con nanogeles    |
| <b>24h</b>     | 30.1 (6.7) A,a,1 | 27.2 (6.6) A,a,1 | 26.6 (8.1) A,a,1 | 27.1 (8.6) A,a,1 |
| <b>[A/M/C]</b> | [0/15/90]        | [0/10/90]        | [5/20/75]        | [5/15/80]        |
| <b>6 meses</b> | 16.7 (2.7) B,b,1 | 22.1 (5.9) A,a,1 | 14.5 (4.0) B,b,1 | 25.5 (7.5) A,a,1 |
| <b>[A/M/C]</b> | [20/35/45]       | [15/25/60]       | [20/40/40]       | [10/35/55]       |

**Tabla 3** - Resultados de los grupos de estudio con técnica de grabar y lavar. Las letras mayúscula indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en columnas Las letras minúscula indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en filas. El mismo número indica que no existe diferencia estadística (a las 24h o a 6 meses) entre un adhesivo (con o sin nanogeles) aplicado, con o sin pre-tratamiento con ácido anacárdico (1%). Los números en paréntesis indican el porcentaje de fallos adhesivo (A), mixto (M) y cohesivo (C) obtenido en cada grupo.

Con la técnica autoacondicionante, en el grupo control, sin nanogeles consiguió un valor medio de 23,8 MPa tras 24 horas de almacenamiento en agua.

Transcurridos 6 meses se observó una reducción estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) del valor de adhesión (13,4 MPa).

Con esta misma técnica (autoacondicionante), el adhesivo con nanogeles alcanzó un valor medio de adhesión de 24,2 MPa a las 24 horas y de 18,9 MPa tras 6 meses de inmersión en agua. No se encontró diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) entre estos dos grupos.

Con técnica, autoacondicionante, los adhesivos con y sin nanogeles en su composición, no obtuvieron diferencias estadísticamente significativas tras 24 horas ( $p > 0.05$ ), mientras que se encontraron diferencias estadísticamente

significativas transcurridos 6 meses de inmersión en agua destilada ( $p < 0.05$ ).

Las interacciones entre factores se pueden encontrar en los anexos III y IV.

Cuando se empleó la técnica de grabar y lavar, en el grupo control, obtuvo un valor a la prueba de microtensión de 30,1 MPa a las 24 horas de almacenamiento en agua.

A los 6 meses de inmersión en agua se encontró una reducción de adhesión (16,7 MPa) estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

El adhesivo con nanogeles empleando la técnica de grabar y lavar logró un valor de 27,2 MPa a las 24 horas y después de 6 meses de almacenamiento, el valor obtenido fue de 22,1 MPa. No presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

Con esta técnica de grabar y lavar, los adhesivos con y sin partículas de nanogeles en su composición no presentaron diferencias estadísticamente significativas en las pruebas de microtensión ( $\mu$ TBS) a las 24 horas ( $p > 0.05$ ), mientras que sí que las encontramos tras 6 meses de almacenamiento en agua destilada ( $p < 0.05$ ). Ver resultados en tabla 5. Las interacciones entre factores se pueden encontrar en los anexos III y IV.

La solución de ácido anacárdico se empleó a diferentes concentraciones (50%, 25%, 5%, 1%).

Las muestras preparadas con concentraciones al 50%, 25% y 5% fallaron durante el corte a las 24 horas (ver tablas 3, 4 y 5), por lo que estas concentraciones fueron excluidas del estudio.

La solución de ácido anacárdico al 1% se determinó como solución adecuada para continuar con los experimentos porque se tuvo un pre-fallo en todas las muestras y los grupos con concentración superior al 1%.

A continuación se exponen las tablas con los resultados obtenidos con pre-tratamiento de ácido anacárdico a distintas concentraciones (50%, 25%, 5% )

| <b>Anacardico 50%</b> |            |            |                       |            |            |
|-----------------------|------------|------------|-----------------------|------------|------------|
| <b>Con Nanogeles</b>  |            |            | <b>Sin Nanogeles</b>  |            |            |
| <b>5 dientes</b>      | <b>24h</b> | <b>24h</b> | <b>5 dientes</b>      | <b>24h</b> | <b>24h</b> |
| <b>Autoacond</b>      | Nano       | no Nano    | <b>Grabar y lavar</b> | Nano       | no Nano    |
| <b>Mpa</b>            | 0          | 0          | <b>Mpa</b>            | 0          | 0          |
| <b>Fallo A/M/C</b>    | 100/0/0    | 100/0/0    | <b>Fallo A/M/C</b>    | 100/0/0    | 100/0/0    |

**Tabla 4** - Resultado de los grupos creados mediante aplicación de los sistemas adhesivos experimentales, con técnica autoacondicionante o técnica de grabar y lavar, en dentina pre-tratada con solución de ácido anacárdico al 50%.

| <b>Anacardico 25%</b> |            |            |                       |            |            |
|-----------------------|------------|------------|-----------------------|------------|------------|
| <b>Con Nanogeles</b>  |            |            | <b>Sin Nanogeles</b>  |            |            |
| <b>5 dientes</b>      | <b>24h</b> | <b>24h</b> | <b>5 dientes</b>      | <b>24h</b> | <b>24h</b> |
| <b>Autoacond</b>      | Nano       | no Nano    | <b>Grabar y lavar</b> | Nano       | no Nano    |
| <b>Mpa</b>            | 0          | 0          | <b>Mpa</b>            | 0          | 0          |
| <b>Fallo A/M/C</b>    | 100/0/0    | 100/0/0    | <b>Fallo A/M/C</b>    | 100/0/0    | 100/0/0    |

**Tabla 5** - Resultado de los grupos creados mediante aplicación de los sistemas adhesivos experimentales, con técnica autoacondicionante o técnica de grabar y lavar, en dentina pre-tratada con solución de ácido anacárdico al 25%.

| <b>Anacardico 5%</b> |            |            |                       |            |            |
|----------------------|------------|------------|-----------------------|------------|------------|
| <b>Con Nanogeles</b> |            |            | <b>Sin Nanogeles</b>  |            |            |
| <b>5 dientes</b>     | <b>24h</b> | <b>24h</b> | <b>5 dientes</b>      | <b>24h</b> | <b>24h</b> |
| <b>Autoacond</b>     | Nano       | no Nano    | <b>Grabar y lavar</b> | Nano       | no Nano    |
| <b>Mpa</b>           | 0          | 0          | <b>Mpa</b>            | 0          | 0          |
| <b>Fallo A/M/C</b>   | 100/0/0    | 100/0/0    | <b>Fallo A/M/C</b>    | 100/0/0    | 100/0/0    |

**Tabla 6** - Resultado de los grupos creados mediante aplicación de los sistemas adhesivos experimentales, con técnica autoacondicionante o técnica de grabar y lavar, en dentina pre-tratada con solución de ácido anacárdico al 5%.

En los grupos tratados con solución de ácido anacárdico al 1%, como pre-tratamiento dentinario, se obtuvieron los siguientes resultados:

Cuando se empleó la técnica autoacondicionante, el adhesivo sin nanogeles logró un valor de adhesión de 24,3 MPa tras 24 horas de almacenamiento. A los 6 meses el valor obtenido fue de 15,9 Mpa. La diferencia fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

El adhesivo con nanogeles en su composición obtuvo un valor de adhesión de 19,8 MPa tras 24 horas y de 15,2 MPa a los 6 meses de almacenamiento en agua. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

En ambos grupos, (con y sin nanogeles), cuando se pre-trataba la dentina con ácido anacárdico al 1%, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas tras 24 horas y 6 meses de almacenamiento en agua ( $p > 0.05$ ).

Cuando se empleó la técnica de grabar y lavar, el adhesivo sin nanogeles consiguió un valor de adhesión de 26,6 MPa a las 24 horas. El valor obtenido tras 6 meses 14,5 MPa fue estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ).

El adhesivo con nanogeles y técnica de grabar y lavar consiguió un valor a las pruebas de microtensión de 27,1 Mpa a las 24 horas y de 25,5 MPa a los 6 meses de almacenamiento en agua. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).

Con pre-tratamiento con solución de ácido anacárdico al 1% y empleando técnica de grabar y lavar, en ambos grupos, adhesivos con y sin nanogeles, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas tras 24 horas de almacenamiento ( $p > 0.05$ ). Mientras sí que se encontraron diferencias estadísticamente significativas tras 6 meses de almacenamiento en agua destilada ( $p < 0.05$ ).

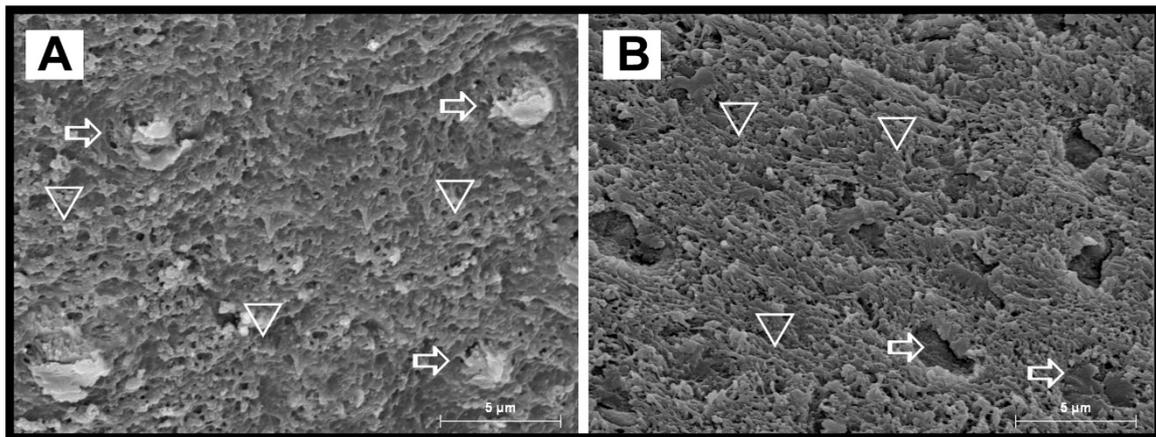
No se encontró ninguna diferencia estadística cuando se evaluó si el tratamiento con anacárdico podría interferir con la adhesión de los grupos adhesivos utilizados, (con o sin nanogeles), a las 24 horas o a los 6 meses. Las interacciones entre factores se pueden encontrar en los anexos III y IV.

## **5.2 Cuantificación del modo de fallo mediante estereomicroscopía y análisis de fractografía al MEB**

Los valores porcentuales del modo de fallo obtenido mediante estereomicroscopía se pueden encontrar en las tablas 4 (anacárdico 50%), tabla

5 (anacárdico 25%) y tabla 6 (anacárdico 5%); todos fracasaron en modo adhesivo.

Cuando estas muestras se analizaron al MEB se pudo observar una ultramorfología parecida en todos los grupos. La sensación fue que la aplicación de ácido anacárdico en dentina no grabada interfería con la acción ácida de los adhesivos de grabado total, causaba porosidad en la interfase y separación de fases entre adhesivo y anacárdico residual pegado a la dentina (Figura 16A). Cuando se aplicó una concentración mayor del 1% en dentina grabada con ácido fosfórico, causaba interferencia con la penetración de los “*primers*” adhesivos en la red de colágeno desmineralizado (Figura 16B).

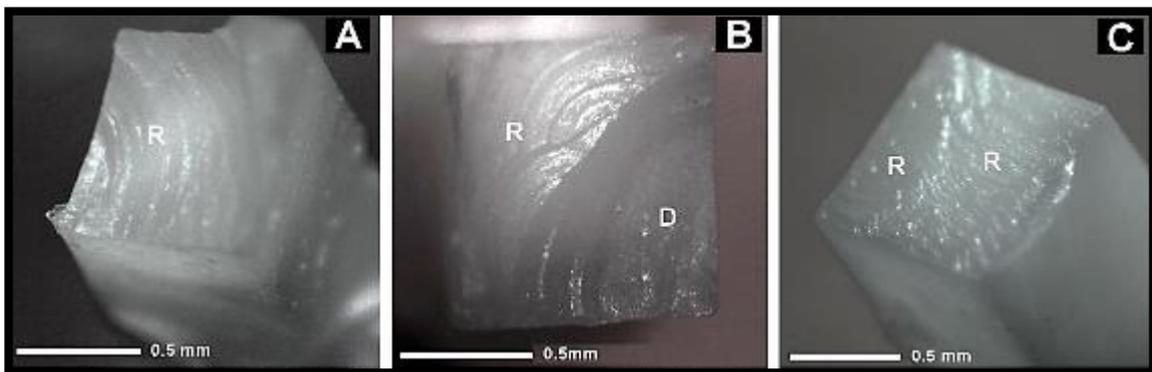


**Figura 16** - Imagen representativa de microscopia MEB a las 24 horas de inmersión en agua. (A) Se puede observar un tipo de fallo adhesivo en una muestra que se preparó con adhesivo experimental sin nanogeles, aplicado en dentina autoacondicionada, pre-tratada con solución de anacárdico (25%). Se puede observar los túbulos obturados con “*tags*” de resina (flechas) y una red de fibrillas colágenas no infiltradas en su totalidad con monómeros adhesivos (Triángulo vacío). (B) Se puede observar un tipo de fallo adhesivo en una muestra que se preparó con adhesivo experimental sin nanogeles, aplicado en dentina grabada con ácido fosfórico, pre-tratada con solución de anacárdico (5%).

Los valores porcentuales del modo de fallo obtenido mediante estereomicroscopía en muestras creadas con los adhesivos, con y sin nanogeles, aplicados con técnica de grabado total o autoacondicionante, en dentina pre-tratada con o sin anacárdico, se pueden encontrar en las tablas 2 y 3. También se exponen algunas fotos representativas de estos fallos (Figuras 17 y 20).

Los resultados mostraron que todos los grupos de adhesivo, aplicados con técnica autoacondicionante y con técnica de grabado total con ácido fosfórico en dentina, con o sin pre-tratamiento con ácido anacárdico al 1%, mostraron principalmente un fallo cohesivo >80% y mixto (15-25%) a las 24 horas (figura 19A-C).

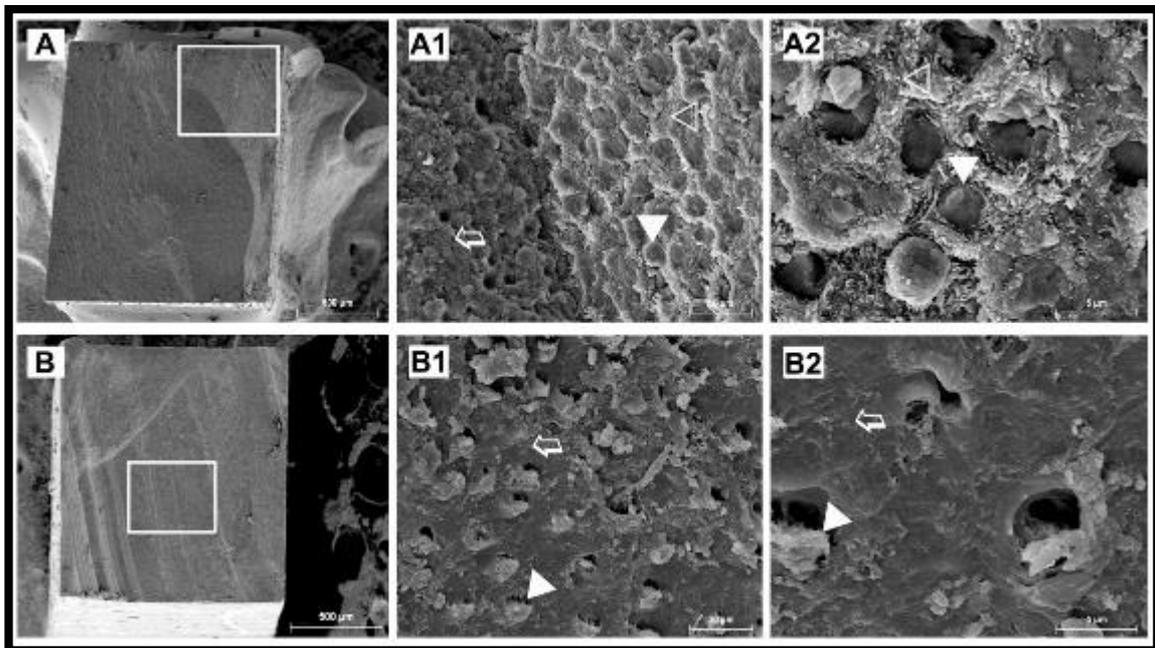
Sólo los grupos experimentales con ácido anacárdico al 1% presentaron un fallo adhesivo <5% cuando se emplearon los adhesivos, con y sin nanogeles, con técnica autoacondicionante.



**Figura 17** - (A) Fractura cohesiva en una muestra representativa creada con adhesivo sin nanogeles aplicado en dentina sin pre-tratamiento de anacárdico a las 24 horas. Se puede observar resina (R) sobre la dentina del espécimen. (B) Fractura mixta a las 24h en una muestra creada con adhesivo sin nanogeles aplicado en dentina autograbada pre-tratada con ácido anacárdico al 1%. (C) Fractura cohesiva creada con adhesivo, con nanogeles en su composición, aplicado en dentina grabada con ácido fosfórico y pre-tratada con ácido anacárdico al 1%, donde se puede observar resina (R) y dentina expuesta (D) en la misma muestra.

Cuando las muestras se analizaron al MEB se pudo observar la ultramorfología de fallo, éstas fallaron en modo adhesivo y mixto. En todos los grupos creados con adhesivos, con o sin nanogeles, aplicados con técnica de grabado total, en dentina pre-tratada con o sin ácido anacárdico al 1%, se observaron muchos túbulos obturados con “*resin tags*” y presencia de fibrillas colágenas no infiltradas perfectamente por la resina (Figuras 18A, 18-A1 y 18-A2).

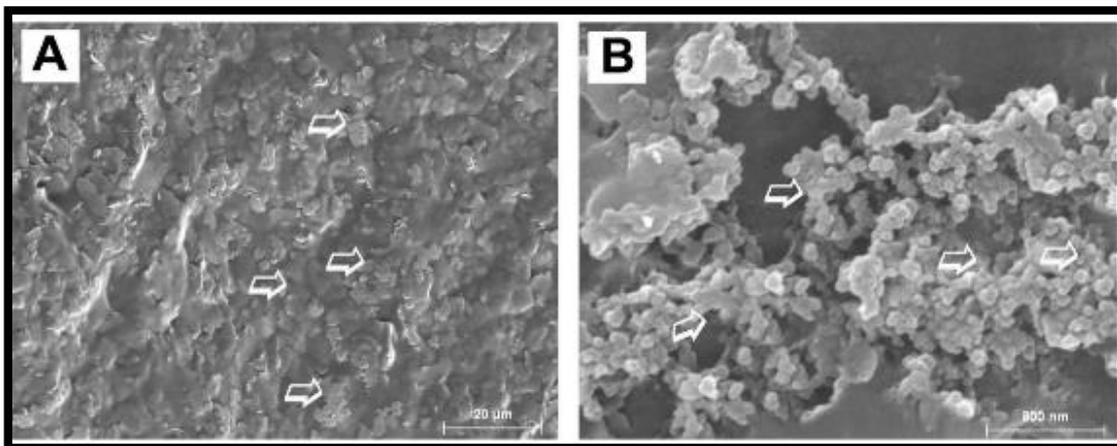
En todos los grupos creados con adhesivo, con o sin nanogeles, aplicados con técnica autoacondicionante, en dentina pre-tratada con o sin ácido anacárdico al 1%, se observaron gran cantidad de túbulos obturados con presencia de “*resin tags*” y total ausencia de fibrillas colágenas debido a que las muestras aparecían perfectamente infiltradas por la resina de los adhesivos (Figuras 18B, 18-B1 y 18-B2).



**Figura 18** – (A): Imagen representativa de microscopia MEB a las 24 horas de inmersión en agua. Se puede observar un tipo de fallo mixto en una muestra que se preparó con adhesivo experimental sin nanogeles, aplicado en dentina grabada con ácido fosfórico, pre-tratada con solución de anacárdico (1%). El área marcada con el cuadrado blanco es la parte donde se obtenía un fallo adhesivo y se analizó a mayor aumento (Imágenes A1 y A2). En la imagen B1 se pueden observar muchos túbulos obturados con “*resin tags*” (triángulo blanco) y la presencia

de fibrillas colágenas (triángulo vacío). En la imagen A2 se observa la presencia de fibrillas colágenas (triángulo vacío) no infiltradas totalmente por la resina; esa es la zona donde puede producirse la degradación de la capa híbrida después de inmersión en agua durante largo periodo de tiempo. **(B)** Imagen representativa de microscopia MEB a las 24 horas de inmersión en agua de una muestra que se preparó con adhesivo experimental con nanogeles, aplicando técnica de autograbado en dentina, sin pre-tratamiento con solución de anacárdico (1%). El área marcada con el cuadrado blanco indica la zona donde se obtenía un fallo adhesivo y se analizó a mayores aumentos (imágenes B1 y B2). En la imagen **(B1)** se pueden observar muchos túbulos obturados con “resin tags” (triángulo blanco) sin presencia de fibrillas colágenas expuestas (flechas). En la imagen **(B2)** se observa la ausencia total de fibrillas colágenas porque están totalmente cubiertas e infiltradas por la resina de los adhesivos (flecha).

Durante el análisis de ultra-morfología con MEB de los fallos, en las muestras creadas con el adhesivo con nanogeles, se observó frecuentemente una clara presencia de partículas de nanogeles uniformemente distribuidas en la capa adhesiva (Figura 19A). También se observaron aglomerados de nanogeles depositados en la superficie dentinaria (Figuras 19B).

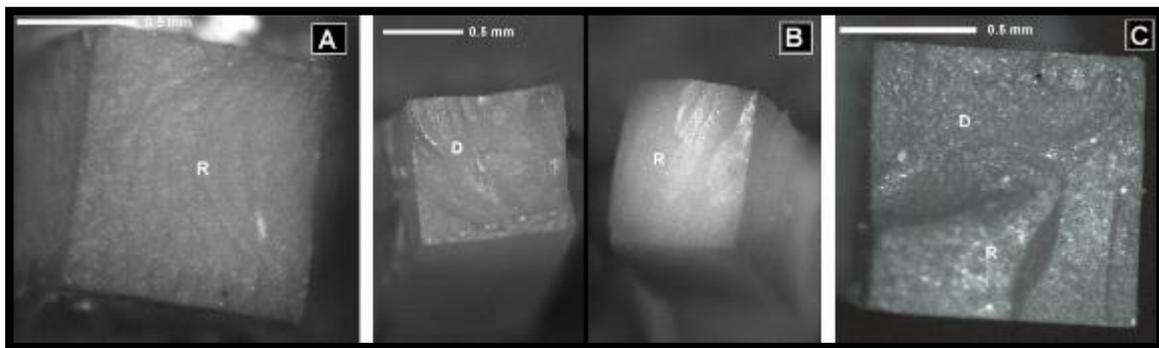


**Figura 19** – **(A)**: Imagen de microscopia MEB donde se puede observar la clara presencia de partículas de nanogeles uniformemente distribuidas en la capa adhesiva del sistema de unión esmalte-dentinario (flechas) utilizado en este estudio. A mayor magnificación **(B)** se pueden observar un aglomerado de nanogeles donde se identifican las dimensiones de cada partícula (flechas).

Los resultados mostraron que todos los grupos, aplicados con técnica autoacondicionante o con técnica de grabado total con ácido fosfórico, en dentina con o sin pre-tratamiento con ácido anacárdico al 1%, tuvieron a los 6

meses de almacenamiento en agua fallos principalmente cohesivos en un porcentaje comprendido entre el 40% y 60%; y mixto entre el 25 y 40% (Figura 20-A y 20-C).

Los adhesivos, con o sin nanogeles, aplicados en dentina pre-tratada sin anacárdico (1%) presentaron fallos adhesivos con un porcentaje comprendido entre el 20-25%, mientras que cuando se aplicaron en dentina pre-tratada con anacárdico (1%) en valor de fallo adhesivo presentaba un rango del 10-15%.



**Figura 20** - (A) Fractura cohesiva en una muestra representativa creada con adhesivo sin nanogeles, aplicado en dentina sin pre-tratamiento de anacárdico, a los 6 meses de almacenamiento en agua. Se puede observar resina (R) sobre la dentina del espécimen. (B) Fractura adhesiva a los 6 meses de almacenamiento en agua, en una muestra creada con adhesivo sin nanogeles, aplicado en dentina grabada con fosfórico y pre-tratada sin anacárdico al 1%, donde se puede observar dentina expuesta (D) a un lado de la muestra y resina (R) en el otro lado que corresponde a la parte de composite de la muestra. (C) Fractura mixta en una muestra creada con adhesivo con nanogeles, aplicado en dentina autograbada, sin pre-tratamiento de anacárdico, a los 6 meses de almacenamiento en agua. Se puede observar resina (R) y dentina expuesta (D) en la misma muestra.

Cuando las muestras se analizaron al MEB se pudo observar la ultra-morfología de fallo de las muestras, que fallaron en modo adhesivo y mixto (Figuras 21A y 21B).

Las muestras creadas con adhesivos experimentales, con y sin nanogeles, aplicados en dentina grabada con ácido fosfórico y pre-tratada con solución de

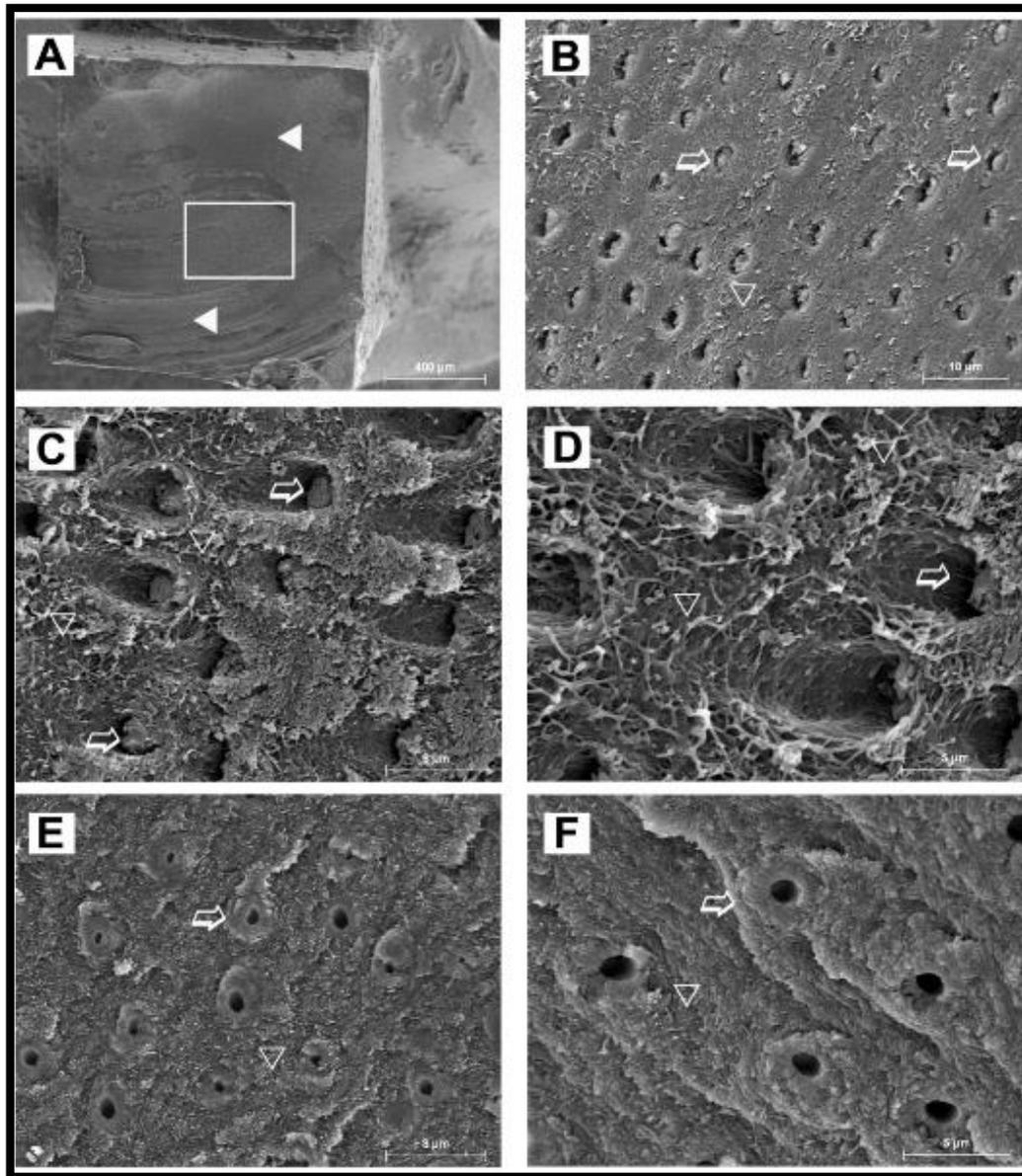
anacárdico (1%), mostraron muchos túbulos obturados con “*resin tags*” y la presencia de fibrillas colágenas intactas y preservadas, probablemente por acción del anacárdico (Figuras 21C y 21D).

En las muestras preparadas con adhesivos experimentales, sin o con nanogeles, aplicados en dentina grabada con ácido fosfórico y sin pre-tratamiento con solución de anacárdico, se encontraron fallos debajo de una capa híbrida más degradada que el grupo anterior y con presencia de abundantes túbulos expuestos, así como, ausencia de fibrillas de colágeno desmineralizado (Figuras 21E y 21F).

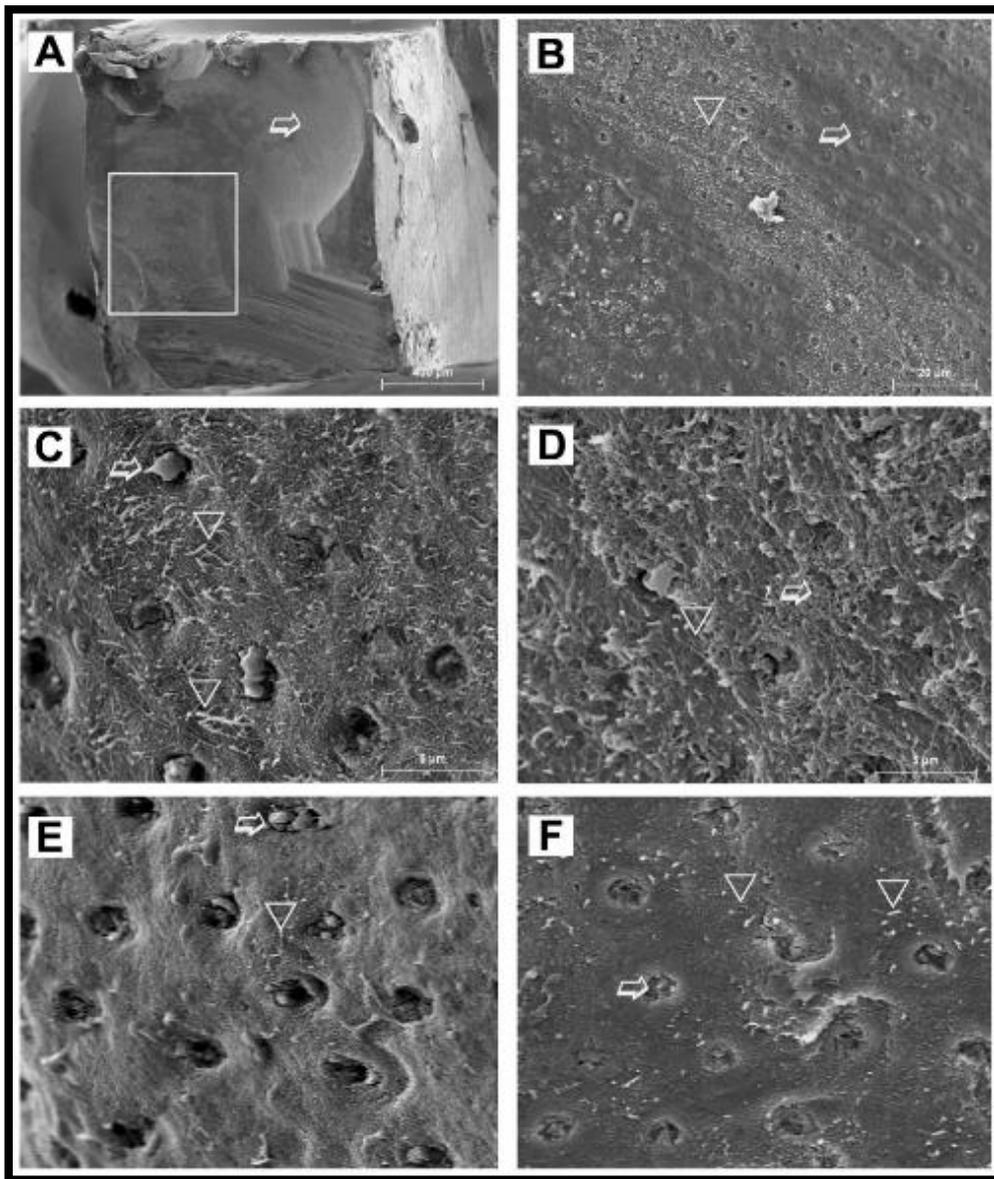
Cuando las muestras se analizaron al MEB después de 6 meses en agua se pudo observar la ultra-morfología de fallo de las muestras, que fallaron en modo adhesivo y mixto (Figuras 22A y 22B).

En las muestras creadas con adhesivos experimentales, con y sin nanogeles, aplicados en dentina pre-tratada con solución de anacárdico (1%), con técnica autoacondicionante, se observaron muchos túbulos obturados por la resina y fibrillas de colágeno intactas y preservadas, probablemente por acción del anacárdico (Figuras 22C y 22D).

En las muestras creadas con adhesivo experimental, con y sin nanogeles, aplicado en dentina sin pre-tratamiento con solución de anacárdico y con técnica autograbante, se observa menos fibrillas y residuos de resina porosa (degradada), causada probablemente por degradación hidrolítica (Figuras 22E y 22F).



**Figura 21** – (A): Imagen de microscopía MEB después de inmersión en agua durante 6 meses. Se puede observar un tipo de fallo mixto (el triángulo blanco indica la resina) en una muestra que se preparó con adhesivo experimental sin nanogeles, aplicado en dentina grabada con ácido fosfórico y pre-tratada con solución de anacárdico (1%). El área marcada con el cuadrado blanco es la parte donde se obtenía un fallo adhesivo y se analizó a mayor aumento (figura B). En esta imagen (B) se observan muchos túbulos obturados con “resin tags” (flechas) y la presencia de fibrillas colágenas (triángulo vacío). En la figuras (C y D), estas fibrillas colágenas aparecen intactas y preservadas, probablemente por acción del anacárdico. La situación es completamente diferente en las muestras preparadas con adhesivo experimental con nanogeles, aplicado en dentina grabada con ácido fosfórico, donde se obtuvieron más fallos adhesivos. En las figuras (E y F) se aprecia ausencia de colágeno desmineralizado y la presencia de dentina mineralizada (Flechas), porque el fallo ocurrió debajo de una capa híbrida totalmente degradada.



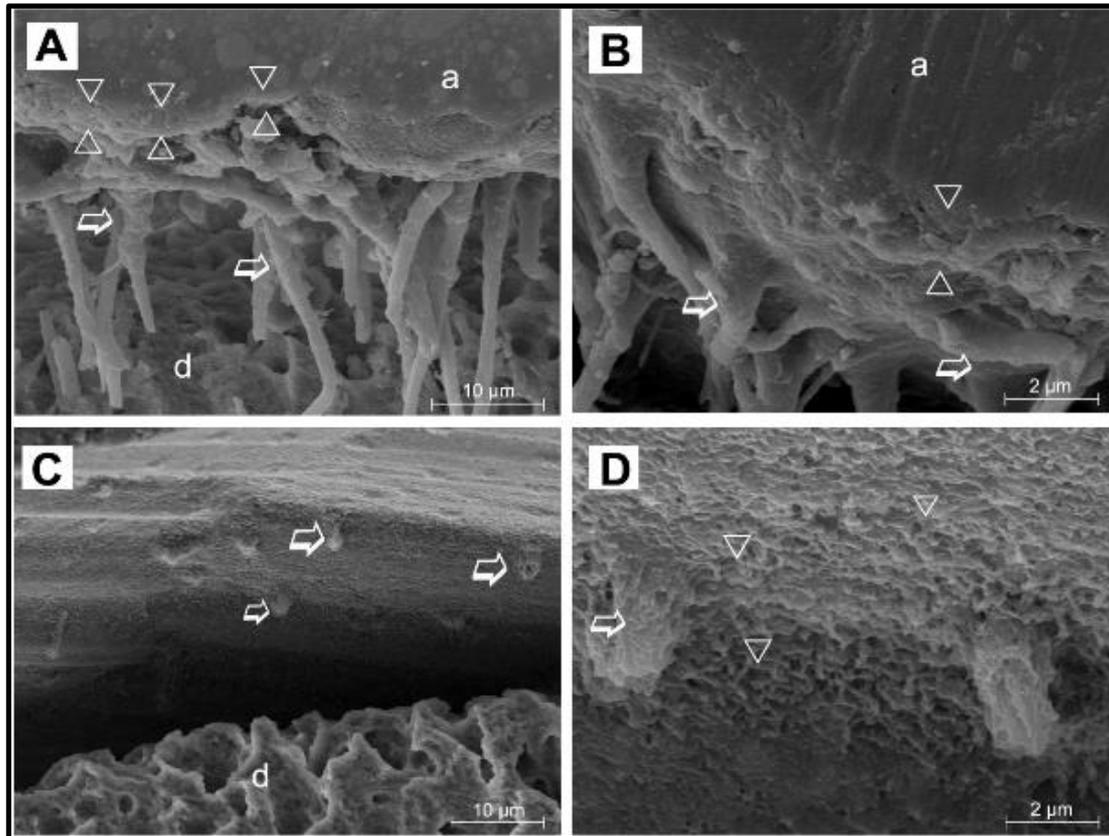
**Figura 22 – (A):** Imagen de microscopía MEB después de inmersión en agua durante 6 meses. Se puede observar un tipo de fallo mixto (el triángulo blanco indica la resina), en una muestra que se preparó con adhesivo experimental con nanogeles, aplicado en dentina autoacondicionada y pre-tratada con solución de anacárdico (1%). El área marcada con el cuadrado blanco es la parte donde se obtenía un fallo adhesivo y se analizó a mayor aumento (figura B). En esta imagen (B) se observa una parte de dentina con fallo adhesivo y presencia de muchos túbulos y fibrillas de colágeno (triángulo). También se observa una gran parte de dentina que aún queda protegida por la resina (flechas) y con los túbulos cerrados. Estas fibrillas se pueden apreciar mejor a mayor aumento en la figura (C), donde se observa como las fibrillas de colágeno aparecen intactas y preservadas, probablemente por acción del anacárdico. En la figura (D) se representa un fallo en una muestra que se preparó con adhesivo experimental sin nanogeles, aplicado en dentina autoacondicionada y con pre-tratamiento con solución de anacárdico. En esta imagen se observan menos fibrillas (triángulo) y también residuos de resina porosa que se crearon, probablemente, por degradación hidrolítica. En las figuras (E y F) están

representadas respectivamente las superficies de fallos de una muestra creada con adhesivo experimental sin nanogeles, aplicado en dentina autoacondicionada y sin pre-tratamiento con solución de anacárdico, y una muestra creada con adhesivo experimental con nanogeles, aplicado en dentina autoacondicionada y sin pre-tratamiento con solución de anacárdico. En ambos los casos se pueden observar túbulos parcialmente abiertos y muy pocas fibrillas residuales de colágeno.

### **5.3 Análisis de la interfase resina-dentina con microscopía electrónica de barrido**

Todos los adhesivos analizados en este estudio, aplicados con técnica autoacondicionante o de grabado total, en dentina pre-tratada con ácido anacárdico al 50%, 25% y 5% mostraron una alteración estructural evidente de la capa híbrida. Las interfases dentina-resina, creadas en dentina grabada con ácido fosfórico y posteriormente tratadas con estas soluciones de anacárdico, presentaban una capa híbrida muy irregular así como “tags” de resina que muchas veces no aparecían o presentaban una morfología anómala y de reducido tamaño (Figura 23A y 23B).

La misma situación se observó en las interfases dentina-resina creadas con técnica autoacondicionante. Todos los grupos presentaban ausencia o presencia irregular de capa híbrida, que aparecía muy porosa y caracterizada por una separación de fase que ocurría probablemente entre el adhesivo y la dentina-anacárdico. También se observó la ausencia total de “tags” de resina, o sólo en algunos casos, se apreciaban “tags” de tamaño muy reducido (Figura 23C y 23D).

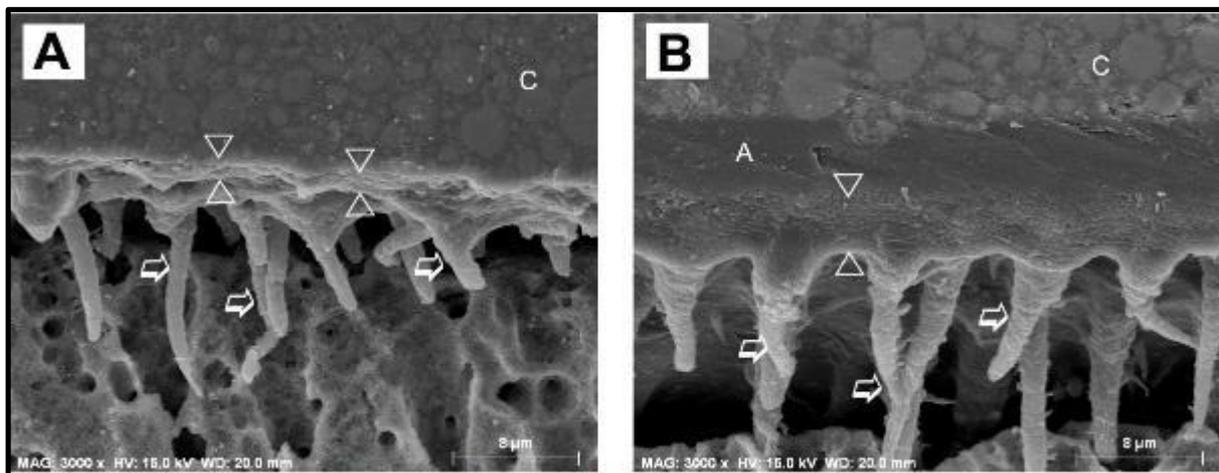


**Figura 23** - (A-B) Imágenes de microscopía MEB donde se puede observar, a diferentes magnificaciones, las interfases dentina-resina creadas en dentina grabada con ácido fosfórico y sucesivamente tratada con solución de anacárdico (5%). Se observa una capa híbrida muy alterada (triángulos) así como como los “tags” de resina (flechas). (C-D) Imágenes de microscopía MEB donde se puede observar, a diferentes magnificaciones, la interfase dentina-resina creada con adhesivo autoacondicionante en dentina tratada con solución de anacárdico (5%). Se observa la ausencia de capa híbrida (triángulos); esta área aparece muy porosa y caracterizada por una separación de fase entre el adhesivo y la dentina-anacárdico. También se puede observar la ausencia prácticamente de “tags” de resina (flechas); los que se ven son muy cortos y con una morfología alterada.

Los adhesivos aplicados con técnica autoacondicionante o grabado total, en dentina sin pre-tratamiento con ácido anacárdico, mostraron una interfase dentina-resina regular. Los adhesivos aplicados, con y sin nanogeles, en dentina

con técnica autoacondionate presentaron una capa híbrida con un tamaño de 1-2  $\mu\text{m}$  y “tags” de resina con tamaño de 5-10  $\mu\text{m}$ . (Figura 24A).

Los adhesivos aplicados en dentina con técnica de grabado total presentaron una capa híbrida con un tamaño de 5-7  $\mu\text{m}$  y “tags” de resina con longitud superior a 20-30  $\mu\text{m}$  (Figura 24B).

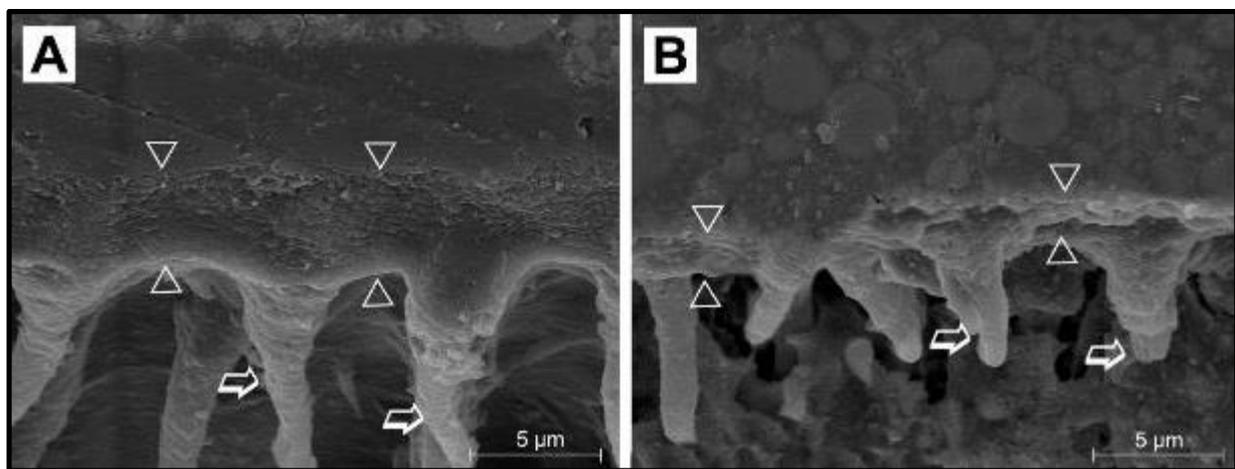


**Figura 24** - (A) Imagen de microscopia MEB donde se puede observar la capa de composite (c) y una capa híbrida (triángulos) muy pequeña ( $>1\mu\text{m}$ ), así como indentaciones de resina “resin tags” muy cortas (flechas) creadas por el uso de adhesivo experimental autoacondicionante, con y sin nanogeles, aplicado en dentina en una cavidad de clase 1. (B) Imagen de microscopia MEB donde se puede observar la capa de composite (c) y una capa híbrida (triángulos) más larga ( $>3\mu\text{m}$ ) así como “resin tags” más largos (flechas) creados por el uso de adhesivo experimental con técnica de grabado total, con y sin nanogeles, aplicado en dentina en una cavidad de clase 1.

Al contrario que en los grupos creados en dentina pre-tratada con anacárdico a concentraciones superiores al 1%, todos los adhesivos, con y sin nanogeles, aplicados con técnica autoacondicionante o grabado total, en dentina pre-tratada, con o sin ácido anacárdico al 1% mostraron interfases dentina-resina similares a las que se observaron en las muestras creadas sin anacárdico (Figuras 26A-B).

Los adhesivos aplicados en dentina con técnica de grabado total presentaron una capa híbrida regular con un tamaño de 5-7  $\mu\text{m}$  y “tags” de resina de longitud superior a 20-30  $\mu\text{m}$  (Figura 25A).

Los adhesivos aplicados en dentina con técnica autoacondicionante presentaron una capa híbrida regular con un tamaño de 1-2  $\mu\text{m}$  y “tags” de resina con tamaño de 5-10  $\mu\text{m}$  (Figura 25B).



**Figura 25 - (A)** Imagen de microscopía MEB donde se puede observar la interfase dentina-resina creada en dentina grabada con ácido fosfórico y sucesivamente tratada con anacárdico (1%). Se observa una capa híbrida y “tags” de resina (flechas) de aspecto regular (triángulos).

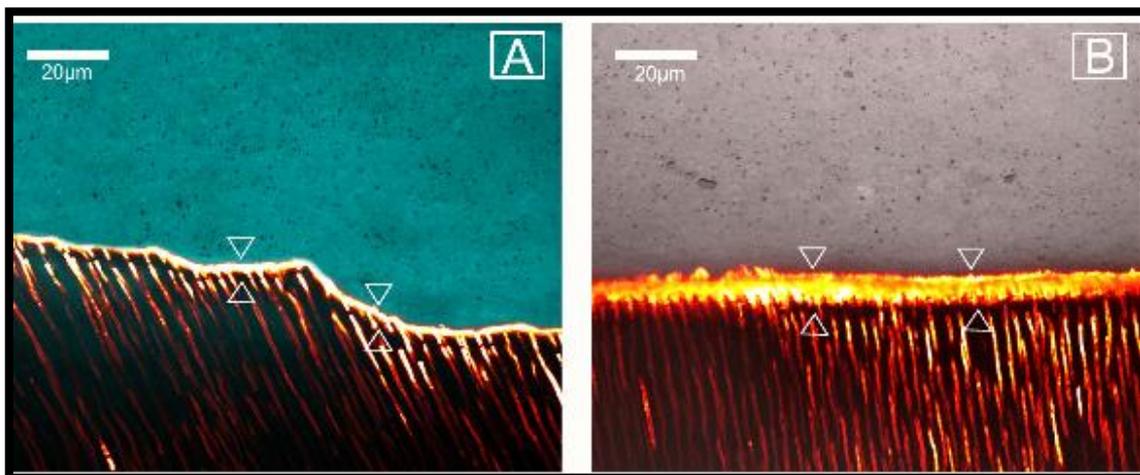
**(B)** Imagen donde se puede observar la interfase dentina-resina creada con adhesivo autoacondicionante en dentina tratada con solución de anacárdico (1%). Se observa la presencia de una capa híbrida (triángulos) y de “tags” de resina (flechas) clásica como se observó en el grupo control cuando no se utilizó ácido anacárdico.

#### 5.4. Análisis de la interfase resina-dentina con microscopía confocal.

El análisis de la interfase resina-dentina con microscopía confocal mostraron que las muestras preparadas con los adhesivos, con y sin nanogeles, aplicados con técnica autoacondicionante o técnica de grabado total, en dentina, sin o con

pre-tratamiento con ácido anacárdico (1%) a las 24h, presentaban una interfase dentina-resina regular.

Como ya se ha observado anteriormente con MEB, también con el confocal, los adhesivos aplicados en dentina con técnica autograbante presentaron una capa híbrida regular, con un tamaño de 1-2  $\mu\text{m}$  totalmente infiltrada por la rodamina, pero sin ningún signo de alteración morfológica (como puede ser la presencia de “gaps” o fracturas). También se observaron menor número de túbulos permeables a la rodamina (Figura 26A) en comparación con las muestras creadas con técnica de grabado total (Figura 26B).



**Figura 26** – (A) Imagen de microscopia confocal donde se observa una interfase dentina-resina íntegra, sin presencia de “gaps”, después de almacenamiento en agua durante 6 meses. Se aprecia como la capa híbrida creada por el uso de adhesivo autoacondicionante experimental, con y sin nanogeles, aplicado en dentina pre-tratada con ácido anacárdico (1%) resulta porosa e impregnada con rodamina. (B) Imagen de microscopía confocal donde se observa una interfase dentina-resina creada mediante la utilización de adhesivo experimental, con técnica de grabado total, con y sin nanogeles, aplicado en dentina sin pre-tratamiento con ácido anacárdico (1%). Se observa una capa híbrida más ancha (5-7  $\mu\text{m}$ ) y totalmente impregnada con rodamina.

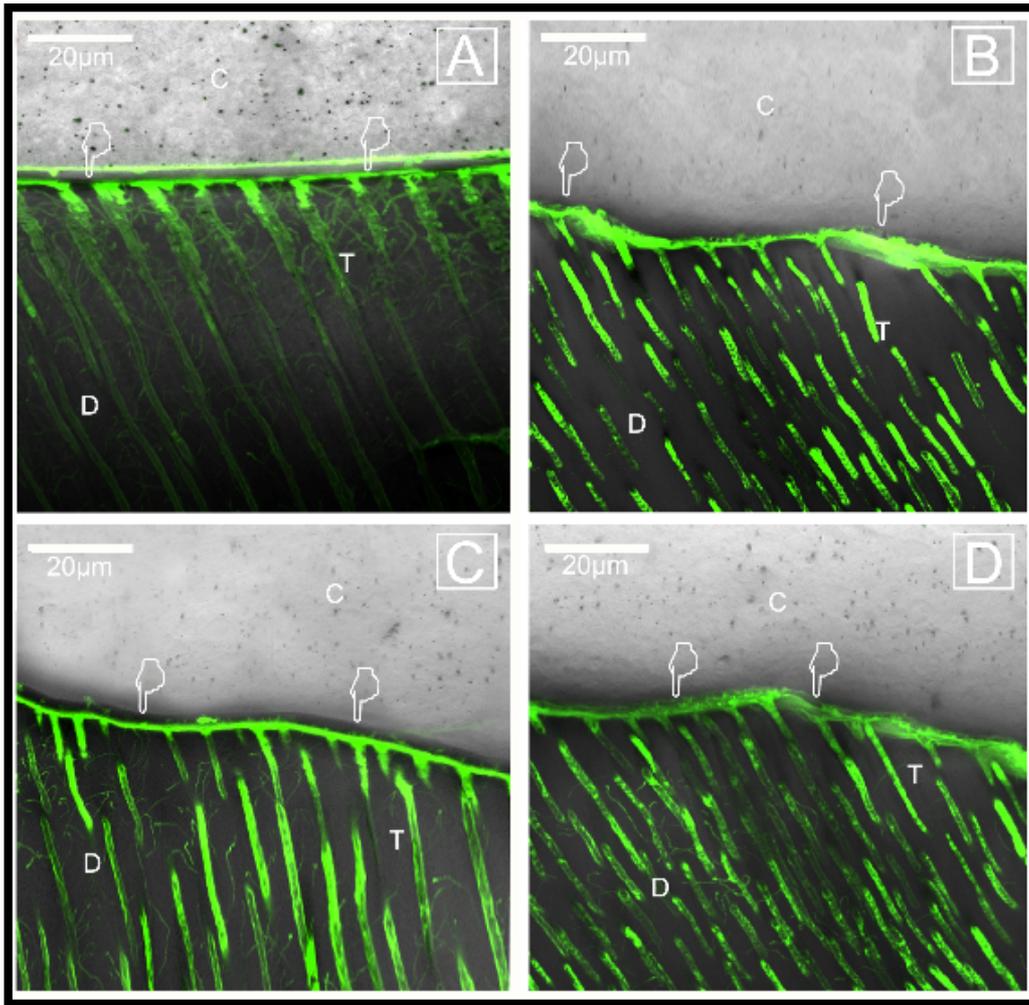
Las muestras obtenidas de los adhesivos aplicados en dentina mediante técnica de grabado total presentaron una capa híbrida regular, con un tamaño de 8-10  $\mu\text{m}$  totalmente infiltrada por la rodamina, pero también en este caso no se observaron signos de alteración morfológica (“gaps” o fracturas). En este caso, los túbulos presentes en las muestras pre-grabadas con ácido fosfórico, se presentaron más permeables a la rodamina (Figura 28B).

El resultado del análisis a los 6 meses de la interfase resina-dentina creada con los adhesivos, con y sin nanogeles, aplicados con técnica autograbante, en dentina, sin o con pre-tratamiento con ácido anacárdico (1%) está representada en la figura 29.

Los resultados de las muestras preparadas con adhesivo sin nanogeles, aplicado en dentina sin pre-tratamiento con anacárdico, mostraron una clara degradación de la interfase dentina-resina (Figura 27A).

Esta degradación evidenció en menor medida cuando se utilizó el adhesivo sin nanogeles, aplicado en dentina pre-tratada con anacárdico (Figura 27B). También se encontraron signos de degradación de la interfase dentina-resina cuando se empleó el adhesivo con nanogeles que se aplicó en dentina pre-tratada con anacárdico (Figura 27C).

La degradación menos indiscutible se encontró cuando se utilizó el adhesivo con nanogeles aplicado en dentina sin pretratamiento con anacárdico (Figura 27D).



**Figura 27 - (A)** Imagen de microscopía confocal donde se observa una interfase dentina-resina después de almacenamiento en agua durante un periodo de 6 meses. Se aprecia como la capa híbrida creada por el uso de adhesivo autoacondicionante experimental, sin nanogeles, aplicado en dentina sin pre-tratamiento con ácido anacárdico (1%), resulta degradada con presencia de “gaps” (dedo) entre dentina (d) y composite (c). **(B)** Imagen de microscopía confocal donde se observa una interfase dentina-resina creada por el uso de adhesivo autoacondicionante experimental, sin nanogeles, aplicado en dentina pre-tratada con ácido anacárdico (1%). Se aprecia una degradación más suave con presencia de “gap” (dedo) entre dentina (d) y composite (c). **(C)** Imagen de microscopía confocal donde se observa una interfase dentina-resina creada mediante el empleo de adhesivo autoacondicionante experimental, con nanogeles, aplicado en dentina sin pre-tratamiento con ácido anacárdico (1%) la interfase aparece degradada con presencia de “gap” (dedo) entre dentina (d) y composite (c). **(D)** Imagen de microscopía confocal donde se observa una interfase dentina-resina creada por el uso de adhesivo autoacondicionante experimental, con nanogeles, aplicado en dentina pre-tratada con ácido anacárdico (1%). Se observa una degradación más suave y sin una clara presencia de “gap” (dedo) entre dentina (d) y composite (c).

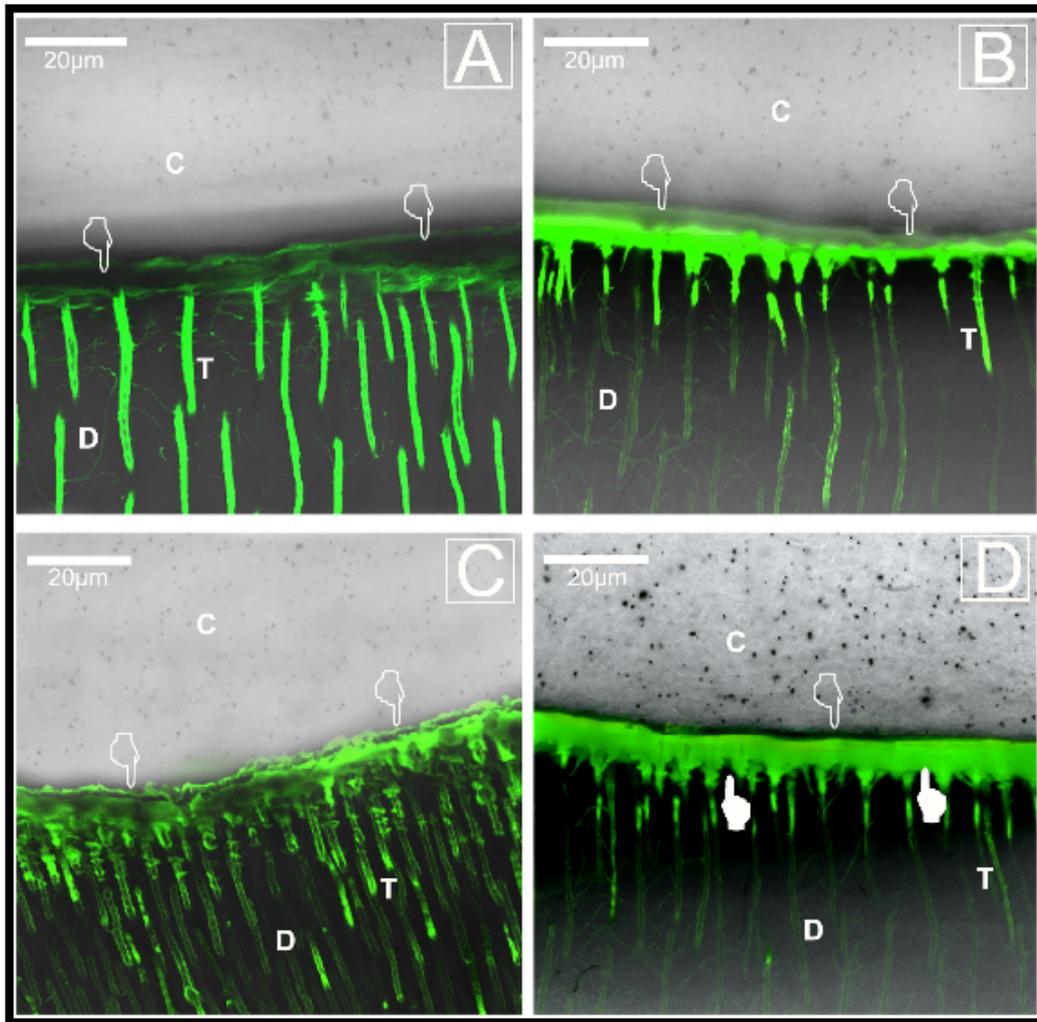
El análisis a los 6 meses de la interfase resina-dentina creada con los adhesivos, con y sin nanogeles, aplicados con técnica de grabado total en dentina, sin o con pre-tratamiento con ácido anacárdico (1%) está representado en la figura 28.

Los resultados de las muestras preparadas con el adhesivo sin nanogeles, aplicado en dentina sin pretratamiento con anacárdico, mostraron una clara degradación de la interfase dentina-resina (Figura 28A).

Esta degradación apareció menos evidente cuando se utilizó el adhesivo sin nanogeles aplicado en dentina pre-tratada con anacárdico (Figura 28B).

Cuando se aplicó el adhesivo con nanogeles en dentina pre-tratada con anacárdico también se encontraron signos de degradación de la interfase dentina-resina (Figura 28C), pero eran menos drásticos comparados con los observados en la figura 27A.

La interfase con degradación de la capa híbrida menos evidente se encontró cuando se utilizó el adhesivo con nanogeles aplicado en dentina sin pre-tratamiento con anacárdico (Figura 28D); pero se observó presencia de “gaps”.



**Figura 28-** (A) Imagen de microscopía confocal donde se observa una interfase dentina-resina después de almacenamiento en agua durante 6 meses. Se aprecia como la capa híbrida, creada por el uso de adhesivo con técnica de grabado total sin nanogeles, aplicado en dentina sin pre-tratamiento con ácido anacárdico (1%) resulta degradada con presencia “gaps” (dedo) entre dentina (d) y composite (c). (B) Imagen de microscopía confocal donde se observa una interfase dentina-resina creada por el uso de adhesivo, con técnica de grabado total sin nanogeles, aplicado en dentina pre-tratada con ácido anacárdico (1%). Se aprecia una degradación más suave de la capa híbrida. (C) Imagen de microscopía confocal donde se observa una interfase dentina-resina creada mediante el empleo de adhesivo experimental con nanogeles, aplicado en dentina sin pre-tratamiento con ácido anacárdico (1%) se observa degradación con presencia de “gap” (dedo) entre dentina (d) y composite (c). (D) Imagen de microscopía confocal que muestra una interfase dentina-resina creada por el uso de adhesivo experimental con nanogeles, aplicado en dentina pre-tratada con ácido anacárdico (1%). La capa híbrida aparece permeable a la rodamina pero aun intacta (Dedos blancos). También se pueden observar unos signos de degradación como la clara presencia de “gap” (dedo) entre la dentina (d) y el composite (c).



## *DISCUSIÓN*



La longevidad de las restauraciones está considerablemente relacionada con la degradación de la interfase resina-dentina. El rendimiento a lo largo del tiempo de los sistemas adhesivos se ha visto afectado por la degradación, de modo que con el tiempo, esto deriva en decoloración, microfiltración y aparición de caries secundarias.<sup>45</sup>

El objetivo principal de muchos de los estudios experimentales en Odontología Adhesiva persigue comprender qué parámetros influyen en la formación de una unión estable y duradera entre los sistemas adhesivos y el diente.<sup>15</sup>

Se han identificado dos mecanismos principales que explican la degradación de la capa híbrida; i) la degradación intrínseca o proteolítica de la matriz orgánica de la dentina; ii) la degradación hidrolítica, o extrínseca, de la matriz de resina. Aunque ambos mecanismos están relacionados entre sí, la acción de estos procesos individuales deriva en la disminución de la durabilidad de las uniones de resina-dentina y reducen el pronóstico favorable del diente.<sup>130</sup>

Las metaloproteinasas, como las catepsinas, se han relacionado con procesos de degradación de la matriz extracelular de la dentina, en procesos fisiológicos y patológicos.<sup>37-39</sup> Además, la degradación hidrolítica de los polímeros sintéticos es también un evento previsible.<sup>93</sup>

Los nuevos sistemas adhesivos y también las técnicas de adhesión tienen que ser mejoradas considerando estos dos aspectos. Por esta razón, nuestra investigación se enfocó en evaluar la durabilidad de adhesivos experimentales con partículas de nanogeles en su composición, aplicados en dentina con técnica autoacondicionante o técnica de grabado total. Además, se evaluó la durabilidad

de estos adhesivos experimentales aplicados en dentina pre-tratada con soluciones de ácido anacárdico a diferentes concentraciones.

Los resultados de esta investigación ha demostrado que la incorporación de nanogeles en la composición de adhesivos universales experimentales no afecta la capacidad adhesivas tras 24h de almacenamiento en agua, ya sea cuando se aplican empleando una técnica autoacondicionante o mediante grabado total; no se encontraron diferencias estadísticamente significativa en estos grupos. Además los adhesivos con nanogeles, así como los adhesivos sin nanogeles, aplicados con técnica autograbante y con grabado total (ácido fosfórico 37%), tuvieron principalmente un fallo cohesivo y mixto. Los adhesivos con y sin nanogeles, aplicados con técnica autoacondicionante o de grabado total mostraron en el análisis con microscopía confocal y al MEB una interfase dentina-resina regular sin presencia de “gaps”. Los adhesivos aplicados en dentina con técnica autoacondicionante presentaron una capa híbrida con un tamaño de 1-2  $\mu\text{m}$  y “tags” de resina de un tamaño de 5-10  $\mu\text{m}$  (Figura 24A). Los adhesivos aplicados en dentina mediante técnica de grabado total presentaron una capa híbrida con un tamaño de 5-7  $\mu\text{m}$  y “tags” de resina con una longitud superior a 20-30  $\mu\text{m}$  (Figura 24B).

El resultado más prometedor fue que los adhesivos con nanogeles no presentaron una reducción de fuerza de adhesión estadísticamente significativa tras 6 meses de almacenamiento en agua, por el contrario, todos los grupos de adhesivos sin nanogeles mostraron una reducción de la fuerza de adhesión estadísticamente significativa después 6 meses de almacenamiento en agua (Tablas 5 y 6). Además los adhesivos con nanogeles, aplicados con técnica de grabado total o autoacondicionante, presentaron un mayor número de fallos

cohesivos comparado con los adhesivos sin nanogeles en su composición. Los adhesivos con y sin nanogeles, aplicados con técnica autograbante o de grabado total, mostraron en el análisis de microscopía confocal una interfase dentina-resina regular caracterizada por presencia de degradación y “gaps”. Esta degradación apareció de forma menos evidente cuando se utilizó el adhesivo con nanogeles con técnica autoacondicionante (Figura 27C) y técnica de grabado total (Figura 27C).

En base a estos resultados obtenidos la hipótesis planteada sobre la capacidad de los adhesivos con nanogeles para crear una interfase resina-dentina resistente a la degradación tras 6 meses de almacenamiento en agua, cuando se aplican con técnica de grabado total o técnica autoacondicionante, tiene que ser aceptada. Nuestros resultados avalan los resultados obtenidos por las recientes investigaciones, realizadas en 2016, por Gotti y cols.,<sup>149</sup> en las que evaluaron la influencia de la hidrofiliidad de los nanogeles reactivos sobre el comportamiento mecánico de los adhesivos dentales y la resistencia de la unión a dentina, mediante estudios de microtensión, tras 24 horas y 3 meses de almacenamiento en agua. Para ello sintetizaron tres nanogeles: NG1: IBMA/UDMA (similar a los nanogeles utilizado en nuestro estudio); NG2: HEMA/BISGMA y NG3: HEMA/ TEGDMA. Este estudio demostró que tres tipos de partículas de nanogeles, con un tamaño de aproximadamente 10 nm y una estructura globular, podían ser dispersados dentro de los túbulos dentinarios y en los espacios interfibrilares del colágeno.<sup>146,147,165</sup>

Los autores también demostraron que al escáner térmico el nanogel NG-1 mostró el valor más alto de temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>) de 96°C. Además, la presencia de nanogeles en la estructura polimérica favoreció la

formación de redes poliméricas secundarias.<sup>146,165,166</sup>

Los resultados pueden ser explicados por el nivel de polimerización de los adhesivos que contienen nanogeles porque las partículas retenidas en los polímeros finales, tanto de forma física como covalente, presentan un grado de conversión muy elevado que no permite absorber agua en exceso comprado con los polímeros polimerizados mediante luz.<sup>167</sup>

Los resultados demuestran que, sin embargo, los adhesivos libres de nanogeles pueden absorber más agua en el interior de la red polimérica durante el periodo de almacenamiento y presentar mayor degradación hidrolítica. Eso se explica porque el flujo de agua en el interior de la estructura del polímero puede ser capaz de debilitar la fuerza de interacciones entre las cadenas. Además, los nanogeles pueden reaccionar e inducir una polimerización retardada ya que con ellos persisten radicales libres residuales que pueden inducirlos.<sup>149,167</sup>

En la segunda parte experimental de este trabajo se emplearon soluciones alcohólicas de ácido anacárdico a diferentes concentraciones (50%, 25%, 5%,1%). Los resultados mostraron que las muestras preparadas con concentraciones al 50%, 25% y 5% fallaron todas durante el corte a las 24 horas (Tablas 2, 3 y 4), por lo que estas concentraciones fueron excluidas del estudio. La principal razón de este resultado fue probablemente el exceso de ácido anacárdico que se pegaba en la superficie dentinaria y que interfería con la acción autograbante (Figura 16A), y con la difusión de los adhesivos en dentina grabada con ácido fosfórico (Figura 16B). Esto producía la formación de una capa híbrida totalmente alterada, como pudimos observar en todas las muestras pre-tratadas con concentraciones de solución de anacárdico superiores al 1% (Figures 23A a 23D).

Por el contrario, la solución de ácido anacárdico al 1% se determinó como solución adecuada para continuar con la fase de experimentación, ya que su empleo no afecta la capacidad adhesiva tras 24 horas de almacenamiento en agua; no encontrando diferencias estadísticamente significativas en estos grupos, empleando la técnica autoacondicionante o mediante grabado total. Los adhesivos con nanogeles, así como los adhesivos sin nanogeles en su composición, aplicados con técnica autoacondicionante y técnica de grabado total, mostraron principalmente un fallo cohesivo y mixto a las 24 horas. También en este caso, el análisis con microscopía confocal y al MEB mostró una interfase dentina-resina regular, sin presencia de “gaps”. Los adhesivos aplicados en dentina, con técnica autoacondicionante y grabado total, presentaron una capa híbrida con un tamaño regular (Figura 25A y 25B) y sin presencia de gaps (Figura 26A y 26B).

A los 6 meses de almacenamiento en agua, los resultados mostraron que cuando se empleó la técnica autoacondicionante o de grabado total, los adhesivos sin nanogeles obtuvieron una reducción estadísticamente significativa de la fuerza de adhesión. Sin embargo, cuando se empleó la técnica autoacondicionante o de grabado total, en los sistemas adhesivos con nanogeles, éstos mostraron una reducción que no fue estadísticamente significativa tras 6 meses de almacenamiento en agua. Los adhesivos con nanogeles, aplicados con técnica de grabado total o autoacondicionante, en dentina pre-tratada con la solución de anacardico al 1%, presentaron un mayor número de fallos cohesivos comparado con los adhesivos sin nanogeles en su composición. Aunque el análisis al microscopio confocal evidenció menor degradación en la interfase dentina-adhesivo de todos los grupos obtenidos de

la dentina pre-tratada con anacárdico, es necesario afirmar que el uso de ácido anacárdico como pre-tratamiento dentinario previamente a la aplicación de adhesivos autoacondicionantes o de grabado total no ofrece ningún beneficio estadísticamente significativo en el mantenimiento de la fuerza de adhesión tras un almacenamiento prolongado de 6 meses. Por lo que la segunda hipótesis planteada de este estudio tiene que ser rechazada en vista a los resultados obtenidos. El empleo de solución de ácido anacárdico, al 1%, no favorece la formación de una interfase resina-dentina resistente a la degradación tras 6 meses de inmersión en agua, cuando los adhesivos experimentales, con y sin nanogel, se aplican en dentina mediante técnica de grabado total o autoacondicionante.

No obstante, han de desarrollarse nuevos estudios en el futuro para valorar el efecto del anacárdico en las interfases creadas con diferentes tipos de adhesivos comerciales. La razón para continuar con el estudio del anacárdico radica en que estudios realizados por Kim y cols.,<sup>166</sup> demuestran que el ácido anacárdico puede inhibir la expresión de la MMP-1 y puede reducir, según estudios realizados por Sung y cols.,<sup>167</sup> la expresión de MMP-9 aunque estas son acciones de interacciones a nivel celular y no están directamente correlacionadas con la inhibición directa de las MMPs.

Omanakuttan y cols.,<sup>150</sup> en 2012, analizaron si el ácido anacárdico podría tener efectos directos sobre dos gelatinasas secretadas, MMP-2 y MMP-9, que se sabe juegan un papel clave en varias condiciones patológicas. De hecho, quedó comprobado en este estudio que el ácido anacárdico inhibe la actividad de la gelatinasa de las células 3T3-L1. La regulación de la actividad MMP puede ocurrir a diferentes niveles, incluyendo control de la transcripción, el

procesamiento alterado de la forma zimógeno inactivo o inhibición catalítica por un grupo de inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de la matriz (TIMP), que interactúan con el sitio activo de las MMP. Los resultados del análisis de acoplamiento computacional realizado por Omanakuttan y cols.,<sup>150</sup> sugirieron que la inhibición de MMP-2 se produce mediante unión directa del ácido anacárdico al sitio activo MMP-2, que implica interacciones similares a las observadas durante los estudios de diseño de inhibidores basados en la estructura de las MMPs. En la actualidad, los grupos carboxilato son el segundo sitio de unión al zinc más común en los inhibidores de MMP desarrollados hasta el momento.<sup>168</sup>

Es de destacar que la interacción del ácido anacárdico con MMP-2 también implica su grupo carboxilato restante de unión al zinc; donde el cardanol, que carece de grupo carboxilato produce una inhibición mínima si se compara con el ácido anacárdico. Los diferentes miembros de la familia de las MMP contienen un dominio enzimático de plegado similar al que emplea el zinc para la catálisis. Por lo tanto, en el caso de ambos sustratos naturales y los inhibidores de MMP de nuevo desarrollo, son los sitios cercanos, y en particular el bolsillo S1, que se observa responsable de formar su base para la selectividad de sustrato.<sup>169</sup>

Además, los estudios de acoplamiento realizados por Omanakuttan y cols.,<sup>150</sup> sugieren que la gran cadena alifática C 15 del ácido anacárdico se une fácilmente en el bolsillo de MMP-2 y MMP-9, que presentan un bolsillo profundo, en comparación con las MMP con bolsillo poco profundo. Por lo tanto, el uso potencial del ácido anacárdico como un “bio-fármaco” natural, puede ser considerado y unirse ahora a una pequeña lista de precedentes y definidos compuestos naturales con capacidad para inhibir las MMP.<sup>168,170</sup>

Varios estudios se han centrado en análogos del ácido anacárdico empleados como agentes antibacterianos contra MRSA,<sup>171</sup> contra “*Mycobacterium smegmatis*”<sup>172</sup> y “*Micobacterium tuberculosis*” y “*Streptococcus mutans*”.<sup>173</sup> Estos estudios proporcionan la base molecular para la exploración de nuevas aplicaciones terapéuticas para el ácido anacárdico.

La degradación de la capa híbrida de resina-dentina es un problema clínico frecuente que disminuye la durabilidad de las restauraciones dentales a base de resina. Las enzimas colagenolíticas endógenas conducen a la degradación proteolítica y la hidrofiliidad de los adhesivos dentales causa la degradación hidrolítica. Actualmente se acepta ampliamente que las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) unidas a la dentina contribuyen a la degradación progresiva de las fibrillas de colágeno en las capas híbridas formadas durante la unión dentinaria.<sup>174</sup> Durante la fase de ataque químico de la unión, las MMP que están normalmente unidas a fibrillas de colágeno mineralizadas se exponen y se activan.<sup>175,176</sup> La inhibición de las MMP derivadas del huésped podría retardar la degradación de los enlaces resina- dentina a lo largo del tiempo.<sup>131,177</sup> Como ya se ha expuesto con anterioridad, se han identificado dos mecanismos principales que explican la degradación de la capa híbrida: la degradación intrínseca o proteolítica de la matriz orgánica y extrínseca o la degradación hidrolítica de la matriz de resina. Aunque ambos mecanismos están relacionados entre sí la acción de estos procesos individuales deriva en la disminución de la durabilidad de las uniones de resina-dentina y reducen el pronóstico del diente.

Últimamente, las enzimas dentinarias endógenas, especialmente metaloproteinasas (MMP) y catepsinas cisteína, han recibido una gran atención por su potencial papel en la degradación de la capa híbrida. Parecen estar

implicadas en la degradación proteolítica patológica del colágeno, así como, en la enfermedad periodontal, caries de la dentina y la degradación de la capa híbrida. Mazzonei y cols.,<sup>178</sup> realizaron el análisis inmunohistoquímico y confirmaron que las metaloproteinasas (MMP-2) y (MMP-9) son residentes intrínsecas de la red de colágeno orgánico en la dentina y, por lo tanto, potencialmente pueden desempeñar un papel en la destrucción de la materia orgánica dentinaria.

En vista de nuestros resultados y comparando con otros estudios sobre la potente acción anti-MMP, pensamos que el ácido anacárdico, utilizado en nuestro estudio, puede haber interferido con la polimerización de los adhesivos sin nanogeles y con su degradación polimérica, aunque manteniendo un buen potencial antibacteriano y anti-MMP.

Por el contrario, en los adhesivos con nanogeles que presentan una cantidad de partículas pre-polimerizadas depositadas en la interfase dentina-resina, no se afectan por la presencia de anacárdico. Esto puede determinar que se encuentren menos fenómenos de degradación polimérica en las interfases de estos grupos ya que como se ha mencionado con anterioridad, la hidrólisis de la matriz de resina, contrariamente a la degradación proteolítica de la capa híbrida, se produce de manera similar con el uso de ambos adhesivos, grabado total o autoacondicionantes y esta degradación se relaciona con la absorción de agua dentro de la capa híbrida.<sup>62</sup>

Por su estructura molecular, en estudios futuros también se debería evaluar el potencial del ácido anacárdico como posible agente de reticulación de colágeno. En busca de estrategias a largo plazo para proteger la capa híbrida, los agentes

de reticulación de colágeno se han defendido como una alternativa muy valorada. Muchos agentes de reticulación de colágeno requieren más de 1 hora para surtir efecto, por lo que muchos estudios se están centrando en los tiempos de aplicación clínicos aceptables combinados con una mejora en la resistencia de la unión y estabilidad.<sup>128</sup>

La utilización de estos agentes pretende mejorar la inter e intra-reticulación molecular. Con ello se mejorarían las propiedades mecánicas y la estabilidad estructural del colágeno con la esperanza de crear una capa híbrida estable y resistente a la degradación con el tiempo. Esta estabilidad se conseguiría inactivando potencialmente y permanentemente las metaloproteinasas MMPs que están enlazadas a la matriz de colágeno y aumentaría la resistencia contra la degradación proteolítica producida por las enzimas endógenas dentinarias. La aplicación de glutaraldehído sobre la dentina desmineralizada para fomentar la reticulación de colágeno tuvo éxito en un estudio "*in vitro*". Sin embargo, esta sustancia tiene poder citotóxico y, por lo tanto, ha sido descartada.<sup>180</sup>

También han sido probados agentes de reticulación naturales, como el extracto de semilla de uva, principalmente proantocianidina, que se ha demostrado que aumenta el módulo de elasticidad de la dentina, mediante la inducción de colágeno de reticulación. Los resultados de este estudio también demostraron que el extracto de semilla de uva fortaleció la dentina mucho más que el glutaraldehído. De Fang y cols.,<sup>181</sup> usando un pre acondicionador a base de proantocianidina encontraron un aumento en la resistencia de la unión inmediata en comparación con los grupos controles. Además la microscopía electrónica de barrido de este estudio ilustró una red de colágeno homogénea y regular en la dentina desmineralizada después de la aplicación de proantocianidina durante

120 segundos. Estos agentes de reticulación naturales han mostrado resultados iniciales prometedores y son económicos y fácilmente disponibles. Sin embargo el extracto de semilla de uva tiñe la dentina de color marrón y el comportamiento a largo plazo y la estabilidad de este producto deben ser estudiados.<sup>182</sup>

La riboflavina combinada con irradiación ultravioleta-A (UVA) también ha sido probada para mejorar entrecruzamiento del colágeno, la teoría detrás de esto es que la radiación ultravioleta estimularía la formación de enlaces estables entre colágeno y riboflavina.<sup>183</sup> Los resultados mostraron un aumento en la resistencia de la unión después de la aplicación de 0,1% de riboflavina con 2 minutos de radiación ultravioleta-A40. El uso de radiación ultravioleta en la clínica es una preocupación ya que su seguridad es cuestionable y también el uso de una luz adicional no es ideal en la práctica clínica. También se ha evaluado el uso de una luz de tungsteno-halógeno dental para activar riboflavina y aunque el uso de los rayos UVA produce mejores resultados, la luz azul todavía lograba mejor fuerza de adhesión en comparación con los grupos control.<sup>184</sup>



## *CONCLUSIONES*



## 7. CONCLUSIONES

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

1. Los adhesivos con partículas de nanogel en su composición pudieron aumentar la durabilidad adhesiva tras 6 meses de almacenamiento en agua comparado con los adhesivos sin partículas de nanogel.

La formulación de nuevos sistemas adhesivos con nanogeles puede ofrecer un beneficio clínico ya que aumenta la durabilidad de las interfases con el tiempo, según muestran los resultados obtenidos en este trabajo.

2. El uso de ácido anacárdico al 1% como pre-tratamiento dentinario no ofrece ningún beneficio en el mantenimiento de la adhesión en lo largo del tiempo. Mientras que el empleo de solución alcohólica de ácido anacárdico a concentraciones superiores al 1% afecta a la capacidad adhesiva a las 24 horas y produce fallos de adhesión. El patrón morfológico (MEB) de las interfases obtenidas corroboró estos resultados.

3. El estudio de las interfases con microscopía confocal mostró una degradación más suave cuando se empleó técnica autoacondicionante y pre-tratamiento con ácido anacárdico al 1%, pero esto no puede ser explicado por la utilización de esta solución, probablemente pueda ser debido a que la presencia de nanogeles mejora la resistencia a la

degradación hidrolítica de los adhesivos, pues no se observó el mismo patrón cuando se utilizaron adhesivos sin nanogeles.

En base a estos resultados queda probada la hipótesis que los adhesivos con nanogeles son capaces de crear una interfase resina-dentina resistente a la degradación tras 6 meses de almacenamiento. Por lo que puede resultar una herramienta eficaz para la formulación de nuevos sistemas adhesivos reforzados con este tipo de partículas.

La segunda hipótesis planteada hemos de rechazarla puesto que las concentraciones de anacárdico por encima del 1% interfieren de forma inmediata en la adhesión, probablemente por la interferencia con los mismos componentes químicos del sistema adhesivo. A concentración del 1% pudo ser utilizado sin interferir en la adhesión inmediata, pero no se obtuvo ningún resultado beneficioso derivado de su utilización tras un periodo de 6 meses. Existe suficiente literatura científica y estudios que demuestran su acción molecular para inhibir las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9, responsables de la degradación de la matriz dentinaria. Por lo que sería interesante continuar en esta línea de investigación, realizando primero estudios histoquímicos para verificar si puede ser empleado como potencial agente de reticulación del colágeno y, posteriormente, encontrar una forma de aplicación eficiente, modificando probablemente su forma de aplicación, para encontrar una vía que le permita interactuar de forma eficaz sin alterar la acción de los sistemas adhesivos.

## *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*



## **9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.**

1. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century – the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003;31(1):3–24.
2. Bjørndal, L. Buonocore Memorial Lecture. Dentin caries: progression and clinical management. *Oper Dent.* 2001;27(3):211-217.
3. Gudiño S, Lanata E. From Black to Contemporary Cariology: Learning to look at the same lesions with a different perspective. *Od Int J Dent Sc.* 2015;17(3):8-12.
4. Slavkin H. Bioluminescence, microbial ecology and Antoni van Leeuwenhoek. *J Am Dent Assoc.* 1997;128(4):492-495.
5. Wade W. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 2013;69(1):137–143.
6. Miller W. *The Microorganisms of the Human Mouth.* The SS White Manufacturing Co. Philadelphia, 1890 .
7. Loesche W. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev.* 1986;50(4):353-380.
8. Keyes P. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries: findings and implications. *Arch Oral Biol.* 1960;1(4):304-320.



9. Camps Alemany I. La evolución de la adhesión a dentina. Av Odontoestomatol. 2004;20(1):11-17.
10. Black G. A work on operative dentistry: the technical procedures in filling teeth. Vol 3. Chicago. Ed;Medico-Dental Publishing Company.1917.
11. Van Meerbeek B, Vargas S, Inoue S, Yoshida Y, Peumans M, Lambrecht P, Vanherle G. Adhesives and cements to promote preservation dentistry. Oper Dent. 2001;26:119-144.
12. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazami M, Shintani H, et al. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. J Dent Res. 2004;83(6):454-458.
13. Takana J, Ishikawa K, Yatani H, Yamashita A, Suzuki K. Correlation of dentin bond durability with water absorption of bonding layer. J Dent Mater. 1999;18(1):11-18.
14. Lin B, Jaffer F, Duff M, Tang Y, Santerre J. Identifying enzyme activities within human saliva which are relevant to dental resin composite biodegradation. Biomat. 2005;26(20):4259-4264.
15. De Munck, J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts, P, Braem, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. J Dent Res. 2005;84(2):118-132.
16. Nanci A. Dentin-pulp complex. In: Nanci A, editor. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function: 6 a ed. St Louis, MO: Mosby.; 2003. p 145-191.



17. Nanci A. Dentin-Pulp complex. In: Nanci A editor. Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function, 6a ed. St Louis. MO: Mosby; 2003: p 192-239.
18. Fincham A, Moradian-Oldak J, Simmer J. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol.* 1999;126:270–299.
19. Robinson C, Brookes S, Roger C, Kirkham J. The developing enamel matrix: nature and function. *Eur J Oral Sci.* 1998;1:282–291.
20. Tjäderhane L, Nascimento F, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol I, Geraldini S, et al. Optimizing dentin bond durability: control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. *Dent Mater.* 2013;(29):116–135.
21. Fejerskov O, Thylstrup A. Dental Enamel. In: Mjör IA, Fejerskov O editors. *Human Oral Embriology and Histology.* Copenhagen Munkaaard. 1986. p 5-89.
22. Agee K, Prakki A, Abu-Haimed T, Naguib G, Nawareg M, Tezvergill-Mutluay A, et al. Water distribution in dentin matrices: bound vs. unbound water. *Dent Mater.* 2015;3(3):205–16.
23. Mazzoni A, Mannello F, Tay F, Tonti G, Papa S, Mazzotti G, et al. Zymographic analysis and characterization of MMP-2 and-9 forms in human sound dentin. *J Dent Res.* 2007;86(5):436-440.
24. Goracci G, Mori G, Baldi M. Terminal end of the human odontoblast process: a study using SEM and confocal microscopy. *Clin Oral Invest.* 1999;3(3):126-132.

25. Pashley D, Ciucchi B, Sano H, Horner J. Permeability of dentin adhesive agents. *Quintessence Int.* 1993;24(9):618–631.
26. Davari A, Ataei E, Assarzadeh H. Dentin Hypersensitivity: Etiology, Diagnosis and Treatment; A Literature Re-view. *J Dent.* 2013;14(3):136-145.
27. Kinney J, Pople J, Marshall G, Marshall S. Collagen orientation and crystallite size in human dentin: a small angle X-ray scattering study. *Calcif Tissue Int.* 2001;69(1):31–37.
28. Perdigao J, Swift Jr E, Roberson T, Heymann H, Swift Jr E. Fundamental concepts of enamel and dentin adhesión. In: Harald O, Heymann E, Swift Jr J, Andre V, Ritter V. *editors.* *Sturdevant's Art & Science of Operative Dentistry.* St. Louise, Missouri: Elsevier Health Sciences;2002. P 114-135.
29. Bertassoni L, Habelitz S, Marshall S, Marshall G. Mechanical recovery of dentin following remineralization in vitro—an indentation study. *J Biomech.* 2011;4(44):176–181.
30. Ryou H, Niu L, Dai L, Pucci C, Arola D, Pashley D, et al. Effect of biomimetic remineralization on the dynamic nanomechanical properties of dentin hybrid layers. *J Dent Res.* 2011;90(9):1122–1128.
31. Toledano M, Osorio R, Perdigao J, Rosles J, Thompson J, Cabrerizo-Vilchez M. Effect of acid etching and collagen removal on dentin wettability and roughness. *J Biomed Res.* 1999;47(2):198-203.
32. Pashley D. Clinical correlations of dentin structure and function. *J prosthet Dent.* 1991;66(6):777-781.



33. Pahsley D, Horner J, Brewer P. Interactions of conditioners on the dentin surface. *Oper Dent.*1992;5:137-150.
34. Van Meerbeek B, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Morphological characteritaton of the interface between resin and sclerotic dentin. *J Dent.* 1994;22(3):141-146.
35. Pahsley D. Smear Layer: Physiological considerations. *Oper Dent.*1984;13:13-29.
36. Mjör I, Sveen, O, Heyeraas K. Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. *Quintessence Int* .2001;32(6):427-446.
37. Sano H., Yoshikawa T, Pereira P, Kanemura, N, Morigamui, M, Tagami, et al. Long-term durability of dentin bonds made with a self-etching primer, in vivo. *J Dent Res.* 1999;78(4):906-911.
38. Marshall G, Marshall, S, Kinney J, Balooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.*1997;25(6):441-458.
39. Reis A, Giannini M, Pereira P. Long-term TEM analysis of the nanoleakage patterns in resin–dentin interfaces produced by different bonding strategies. *Dent Mat.* 2007;23(9):1164-1172.
40. Van Meerbeek B, Yoshida Y, Lambrechts P, Vanherle G, Duke E, S, Eick J. Et al. A TEM study of two water-based adhesive systems bonded to dry and wet dentin. *J Dent Res.*1998;77(1):50-59.



41. Tay F, Gwinnett A, Pang K, Wei S. Resin permeation into acid-conditioned, moist, and dry dentin: a paradigm using water-free adhesive primers. *J Dent Res.* 1996;75(4):1034-1044.
42. Packham D. The mechanical theory of adhesion – A seventy year perspective and its current status. In W.J. van Ooij W, Anderson Jr H. *Editors First International Congress on Adhesion Science and Technology The Netherlands Tokio, Japan:1998.p 81-109.*
43. Buonocore M. A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *J Dent Res.* 1955;34(6):849-853.
44. Perdigão J, Reis A, Loguercio A. Dentin adhesion and MMPs: a Comprehensive review. *J Esthet Restor Dent.* 2013;25(4):219–241.
45. Söderholm K. Dental adhesives how it all started and later evolved. *J Adhes Dent.* 2007;(92):227–230.
46. McLean J. The pioneers of enamel and dentin bonding. *J Adhes Dent.* 1999;1(3):185–187.
47. Sauro S, Pashley D. Strategies to stabilise dentine-bonded interfaces through remineralising operative approaches – State of The Art. *Int J Adhes Adhes* (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2016.03.014i>.
48. Kramer I, Mclean J. Alterations in the staining reaction of dentine resulting from a constituent of a new self-polymerizing resin. *Br Dent J.* 1952;93:150–153.
49. Nakabayashi N, Nakamura M, Yasuda N. Hybrid Layer as a Dentin-Bonding Mechanism. *J Esthet Rest Dent.* 1991;3(4):133-138.



50. Eick J, Robinson S, Cobb C. The dentinal surface. Its influence on dentinal adhesion. Part III. Quintessence Int. 1993;24(8):571–582.
51. Pashley D. Dentin bonding: overview of the substrate with respect to adhesive material. J Esthet Rest Dent. 1991;3(2):46–50.
52. Davidson C, De Gee A, Feilzer A. The competition between the composite- dentin bond strength and the polymerization contraction stress. J Dent Res. 1984;63(12):1396–1399.53.
53. Jacobsen T, Soderholm K-J. Some effects of water on dentin bonding. Dent Mater. 1995;11(7):132–136.
54. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. J Biomed Mat Res. 2002;62(3):447-456.
55. Kanca 3rd J. Wet bonding: effect of drying time and distance. Am J Dent. 1996;9(6):273–276.
56. Pashley D, Tay F, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho R, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. Dent Mater. 2011;27(1)1–16.
57. Van Meerbeek B, De Munck J, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Vijay P, et al. Buonocore memorial lecture, Adhesion to enamel and dentin: current status and future challenges. Oper Dent 2003;28(3):215–235.
58. Allen K W. Theories of adhesion. In: D. E. Packman, editor. Handbook of adhesion. Essex. England. Jhon Willey & Sons. 2006.p38-42.
59. Padday J. Contact angle measurement. In: D.E. Packman editor. Handbook of adhesion. Essex, England: Jhon Willey & Sons. 2006.p82-83.



60. Marshall S, Bayne S, Baier R, Tomsia A, Marshall G. A review of adhesion science. *Dent Mat.*2010;26(2):11-16.
61. Moszner, N, Salz U, Zimmermann J. Chemical aspects of self-etching enamel–dentin adhesives: a systematic review. *Dent Mater.* 2005;21(10):895-910.
62. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mat.* 2008;24(1):90-101.
63. Degrange M. Roulet J. Minimally Invasive Restorations with Bonding. Chicago: Quintessence;1997.
64. Fortin D, Swift E, Denehy G, Reinhardt J. Bond strength and microleakage of current dentin adhesives. *Dent Mater.*1994;10(4):253-258.
65. Van Meerbeek B, Peumans M, Gladys S, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Three-year clinical effectiveness of four total-etch dental adhesive systems in cervical lesions. *Quintessence Int.*1996;27(11):775-784.
66. Pashley D, Tao L, King G, Horner J. Scanning electron microscopy of the substructure of smear layers in human dentin. *Arch Oral Biol.*1988;33(4):265-270.
67. Oliveira S, Pugach, Hilton J, Watanabe L, Marshall, Marshall G. The influence of the dentin smear layer on adhesion: a self-etching primer vs. a total-etch system. *Dent Mater.* 2003;19(8):758-767.



68. Swift Jr E, Perdigao J, Heymann H. Bonding to enamel and dentin: a brief history and state of the art. *Quintessence Int.* 1995;26(2):95-110.
69. Pashley D. The evolution of dentin bonding from no-etch to total-etch to self-etch. *Adhes Techol Sol.* 2003;5:1-5.
70. Watanabe I, Nakabayashi N, Pashley D. Bonding to ground dentin by a phenyl-P self-etching primer. *J Dent Res.* 1994;73(3):1212-1220.
71. Tay F, Pashley D. Agresiveness of contemporary self-etching systems. Part I: Depth of penetration beyond dentin smear layers. *Dent Mater.* 2001;17(4):296-308.
72. Toledano M, Osorio R, de leonardi G, rosales-Leal J, Cabrerizo Vilchez M. Influence of self-etching primer on the resin adhesion to enamel and dentin. *Am J Dent.* 2001;14(4):205-210.
73. Nakabayashi N, Kojima K, Masuhara E. The promotion of adhesion by the infiltration of monomers into tooth substrates. *J Biomed Mater Res.* 1982;16(3):265-273.
74. Kugel G, Ferrari M. The science of bonding: from first to sixth generation. *J Am Dent Assoc.* 2000;131:20-25.
75. Fusayama T, Nakamura M, Kurosaki N, Iwaku M. Non-pressure adhesion of a new restorative resin. *J Dent Res.* 1979;58(4):1364-1370.
76. Kinney J, Balooch M, Haupt D, Marshall S, Marshall G. Mineral distribution and dimensional changes in human dentin during demineralization. *J Dent Res.* 1995;74(5):1179-1184.



77. Santini A, Milia E, Miletic V. A review of SEM and TEM studies on the hybridisation of dentine. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. 2010;1:256-268.
78. Proença J, Polido M, Osorio E, Erhardt M, Aguilera F, García-Godoy F, et al. Dentin regional bond strength of self-etch and total-etch adhesive systems. *Dent Mat*. 2007;23(12):1542-1548.
79. Inoue G, Nikaido T, Sadr A, Tagami J. Morphological categorization of acid–base resistant zones with self-etching primer adhesive systems. *Dent Mater J*. 2012;31:232–8.
80. Deng D, Yang H, Guo J, Chen X, Zhang W, Huang C. Effects of different artificial ageing methods on the degradation of adhesive–dentine interfaces. *J Dent*. 2014;42:1577–85.
81. Epasinghe D, Yiu C, Burrow M, Tsoi J, Tay F. Effect of flavonoids on the mechanical properties of demineralised dentine. *J Dent*. 2014;42:1178–84.
82. Van Landuyt K, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials*. 2007;28:3757–85.
83. Kato G, Nakabayashi N. Effect of phosphoric acid concentration on wet-bonding to etched dentin. *Den Mater*. 1996;12(4):250-255.



84. Toledano M, Osorio R, Ceballos L, Fuentes M, Fernández C, Tay F, et al. Microtensile bond strength of several adhesive systems to different dentin depths. *Am J Dent.* 2003;16(5):292-298.
85. Bowen R. Bonding of restorative materials to dentine: the present status in the United States. *Int Dent J.* 1985;35(2):155-159.
86. Newman S, Porter H. Dentin treatment effects on dentinal bonding. *J Dent Res.* 1986;65(38):174.
87. Toledano M, Osorio R, Perdigao J, Rosales J, Thompson J, Cabrerizo-Vilchez M. Effect of acid etching and collagen removal on dentin wettability and roughness. *J Biomed Mater Res.* 1999;47(2):198-203.
88. Okamoto Y, Heelev J, Dogon I, Shintani H. Effects of phosphoric acid and tannic on dentine collagen. *J Oral rehabil.* 1991;18(6):507-512.
89. Gerzina T, Hume W. Effect of dentine on release of TEGDMA from resin composite in vitro. *J Oral Rehabil.* 1994;21(4):463-468.
90. Hashimoto M, Tay F, Svizero N, de Gee A, Feilzer A, Sano H, et al. The effects of common errors on sealing ability of total-etch adhesives. *Dent Mater.* 2006;22(6):560-568.
91. Hashimoto M, Fujita S, Endo K, Ohno H. Effect of dentinal water on bonding of self-etching adhesives. *Dent Mater J.* 2009;28(5):634-641.
92. Sauro S, Watson T, Mannocci F, Miyake K, Huffman B, Tay F, et al. Two-photon laser confocal microscopy of micropermeability of resin-dentin bonds made with water or ethanol wet bonding. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;90(1):327-337.



93. Hashimoto M, Ohno H, Kaga M, Endo K, Sano H, Oguchi H. In vivo degradation of resin-dentin bonds in humans over 1 to 3 years. *J Dent Res.* 2000;79:1385-91.
94. Van Landuyt K, Peumans M, De Munck J, Lambrechts, Van Meerbeek B. Extension of a one-step self-etch adhesive into a multi-step adhesive. *Dent Mat.* 2006;22(6):533-544.
95. Carvalho R, Yoshiyama M, Pashley E, Pashley D. In vitro study on the dimensional changes of human dentine after demineralization. *Arch Oral Biol.* 1996;41(4):369-377.
96. Tay F, Gwinnett J, Wei H. Micromorphological spectrum from overdrying to overwetting acid-conditioned dentin in water-free acetone-based, single-bottle primer/adhesives. *Dent Mater.* 1996;12(4):236-244.
97. Gwinnett J. Dentin bond strength after air drying and rewetting. *Am J Dent.* 1994;7(3):144-148.
98. Jacobsen T, Söderholm J. Effect of primer solvent, primer agitation, and dentin dryness on shear bond strength to dentin. *Am J Dent.* 1998;(5)11:225-228.
99. Van Meerbeek B, Dhem A, Goret-Nicaise M, Braem M, Lambrechts P, Vanherle G. Comparative SEM and TEM examination of the ultrastructure of the resin-dentin interdiffusion zone. *J Dent Res.* 1993;72(2):495-501.
100. Reis A, Loguercio D, Azevedo N, Carvalho R, Singer J, Grande R. Moisture spectrum of demineralized dentin for adhesive systems with different solvent based. *J Adhes Dent.* 2003;5(3):183-192.



101. Perdigao J, Lambrechts P, Van Meerbeek B, et al. The interaction of adhesives systems with human dentin. *Am J Dent.* 1996;9:167-73.
102. Tay F, Gwinnett A, Pang K, Wei S. Resin permeation into acid-conditioned, moist, and dry dentin: a paradigm using water-free adhesive primers. *J Dent Res.* 1996;75(4):1034-1044.
103. Dal-Bianco K, Pellizzaro A, Patzlaft R, Bauer J, Loguercio A, Reis A. Effects of moisture degree and rubbing action on the immediate resin-dentin bond strength. *Dent Mater.* 2006;22(12):1150-1156.
104. Cardoso P, Loguercio A, Vieira L, Baratieri L, Reis A. Effect of prolonged application times on resin-dentin bond strengths. *J Adhes Dent.* 2004;7(2):143-149.
105. Van Landuyt K, De Munck J, Snauwaert J, Coutinho E, Poitevin A, Yoshida Y, et al. Monomer-solvent phase separation in one-step self-etch adhesives. *J Dent Res.* 2005;84(2):183-188.
106. Rueggeberg F, Margeson D. The effect of oxygen inhibition on an unfilled/filled composite system. *J Dent Res.* 1990;69(10):1652-1658.
107. Plasmans P, Creugers N, Hermsen R, Vrijhoef M. Intraoral humidity during operative procedures. *J Dent.* 1994;22(2):89-91.
108. Sadek F, Castellans C, Braga R, Mai S, Tjäderhane L, Pashley D, et al. One year stability of resin-dentin bonds created with a hydrophobic ethanol-wet bonding technique. *Dent Mater.* 2010;26(4):380-386.
109. Tay F, Pashley D, Suh B, Carvalho R, Itthagarun A. Single-step, self-etch adhesives are permeable membranes after polymerization.



- Partl. Bond strength and morphologic evidence. *J Dent.* 2004;17(4):271-278.
110. Van Meerbeek B, Conn L, Duke E, Robinson S, Eick J, Guerrero D. Correlative transmission electron microscopy examination of nondemineralized and demineralized resin-dentin interfaces formed by two dentin adhesive systems. *J Dent Res.* 1996;75(3):879-888.
111. Tay F, Pashley D, Yoshiyama M. Two modes of nanoleakage expression in single-step adhesives. *J Dent Res.* 2002;81(7):472-476.
112. Inoue S, Van Meerbeek B, Vargas M, Lambrechts P, Vanherle G. Adhesion mechanism of self-etching adhesives. Conference. Document pages 131-148. International Kuraray Symposium. Granada 3-4 december 1999.
113. Inoue S, Vargas M, Abe Y, Yoshida Y, Lambrechts P, Vanherle G, et al. Microtensile bond strength of eleven contemporary modern adhesives to dentin. *J Ad Dent.* 2001;3(3):237-245.
114. De Munck J, Van Meerbeek B, Inoue S, Vargas M, Yoshida Y, Armstrong S, et al. Microtensile bond strength of one- and two-step self-etch adhesives to bur-cut enamel and dentin. *A J Dent.* 2003;16(6):414-420.
115. Van Meerbeek B, Yoshida Y, Inoue S, Vargas M, Abe Y, Fukuda R, et al. Bonding mechanism and micro-tensile bond strength of 4-MET-based self-etching adhesive. *J Dent Res.* 2000;79:249.



116. Yoshida Y, Van Meerbeek B, Okazaki M, Shintani H, Suzuki K. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res.* 2004;83(6):454-458.
117. Feitosa V, Ogluari F, Van Meerbeeck B, Watson T, Yoshihara K, Ogluari A, et al. Can the hidrophilicity of functional monomers affect chemical interaction? *J Dent Res.* 2014;93(2):201-206.
118. Perdigao J, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Braem M, Yildiz, Yücel, T, et al. The interaction of adhesive systems with human dentin. *Am J Dent.* 1996;9(4):167-173.
119. Bouillaguet S, Gysi P, Wataha J, Ciucchi B, Cattani M, Godin C, et al. Bond strength of composite to dentin using conventional one-step and selfing-etched adhesive systems. *J Dent.* 2001;29(1):55-61.
120. Reis A, Albuquerque M, Pergorao M, Mattei G, de Oliveira Baver J et al. Can the durability of one step self etching adhesives be improved by doublé application or by an extra layer of hidrophobic resin? *J Dent Res.* 2008;36(5):309-315..
121. Inoue S, Van Meerbeek B, Abe Y, Yoshida Y, Lambrechts P, Vanherle G, et al. Effect of remaining dentin thickness and the use of conditioner on micro-tensile bond strength of a glass-ionomer adhesive. *Dent Mat.* 2001;17(5):445-455.
122. Van Meerbeek B, Yoshida Y, Lambrechts P, Vanherle G. Mechanisms of bonding of a resin-modified glass-ionomer adhesive to dentin. *J Dent Res.* 1998;77:911.

123. Spencer P, Wang Y. Adhesive phase separation at the dentin interface under wet bonding conditions. *J Biomed Mater Res.* 2002;62(3):447-456.
124. Profeta A. Preparation and properties of calcium-silicate filled resins for dental restoration. Part I: Chemical-physical characterization and apatite-forming ability. *Act Odontol Scand.* 2014;72(8):597-606.
125. Toledano M, Sauro S, Cabello I, Watson T, Osorio R. A Zn-doped etch-and-rinse adhesive may improve the mechanical properties and the integrity at the bonded-dentin interface. *Dent Mat.* 2013;29(8):142-152.
126. Sunnegårdh-Grönberg K, van Dijken J, Funegård U, Lindberg A, Nilsson M. Selection of dental materials and longevity of replaced restorations in Public Dental Health clinics in northern Sweden. *J Dent.* 2009;37(9):673-678.
127. Zhang S, Kern M. The Role of Host-derived Dentinal Matrix Metalloproteinases in Reducing Dentin Bonding of Resin Adhesives. *Int J Oral Sci.* 2009;1(4):163-176.
128. Tjäderhane L, Nascimento F, Breschi L, Mazzoni, A., Tersariol, I. L., Geraldeli S, et al. Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer-a review. *Dent Mater.* 2013;29(10):999-1011.
129. Sauro S, Osorio R, Watson T, Toledano M. Influence of phosphoproteins' biomimetic analogs on remineralization of mineral-depleted resin-dentin interfaces created with ion-releasing resin-based systems. *Dent Mater.* 2015;31(7):759-777.

130. Sunnegårdh-Grönberg K, Van Dijken J, Funegård U, Lindberg A, Nilsson M. Selection of dental materials and longevity of replaced restorations in Public Dental Health clinics in northern Sweden. *J Dent.* 2009;37(9):673-678.
131. Pashley D, Tay F, Yiu C, Hashimoto M, Breschi L, Carvalho R, et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res.* 2004;83(3):216-221.
132. Hannas A, Pereira J, Granjeiro J, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 2007;65(1):1-13.
133. Mazzoni A, Pashley D, Tay F, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A, et al. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentine: Correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res A.* 2009;88(3):697-703.
134. Niu L, Zhang L, Jiao K, Li F, Ding Y, Wang D et al. Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in human coronal dentine. *J Dent.* 2011;39(8):536-542.
135. Sulkala M, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Teronen O, Salo T, et al. The effects of MMP inhibitors on human salivary MMP activity and caries progression in rats. *J Dent Res.* 2001;80(6):1545-1549.
136. Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, et al. Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(2):160-166.



137. Mazzoni A, Nascimento F, Carrilho M, Tersariol I, Papa V, Tjäderhane L, et al. MMP Activity in the Hybrid Layer Detected with *in situ* Zymography. J Dent Res. 2012;91(5):467-472.
138. Tersariol I, Geraldeli S, Minciotti C, Nascimento F, Pääkkönen V, Martins M, et al. Cysteine cathepsins in human dentin-pulp complex. J Endod. 2010;36(3):475-481.
139. Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay F, et al. Role of dentin MMPs in Caries progression and bond stability. J Dent Res. 2015;94(2):241-251.
140. Schulze K, Oliveira S, Wilson R, Gansky S, Marshall G, Marshall S. Effect of hydration variability on hybrid layer properties of a self-etching versus an acid-etching system. Biomat. 2005;26(9):1011-1018.
141. Anchieta R, Machado L, Martini A, Dos Santos P, Giannini M, Janal M, et al. Effect of long-term storage on nanomechanical and morphological properties of dentin-adhesive interfaces. Dent Mat. 2015;31(2):141-153.
142. Hass V, Luque-Martinez I, Gutierrez M, Moreira C, Gotti V, Feitosa V, et al. Collagen cross-linkers on dentin bonding: Stability of the adhesive interfaces, degree of conversion of the adhesive, cytotoxicity and *in situ* MMP inhibition. Dent Mater. 2016;32(6):732-741.
143. Ye Q, Park J, Topp E, Wang Y, Misra A, Spencer P. *In vitro* performance of nano-heterogeneous dentin adhesive. J Dent Res. 2008;87(9):829-833.

144. Van Landuyt K, Snauwaert J, De Munck J, Coutinho E, Poitevin A, Yoshida Y, et al. Origin of interfacial droplets with one-step adhesives. *J Dent Res.* 2007;86(8):739-744.
145. Tay F, Pashley D. Water treeing--a potential mechanism for degradation of dentin adhesives. *Am J Dent.* 2003;16(1):6-12.
146. Moraes R, Garcia J, Wilson N, Lewis S, Barros M, Yang B, et al. Improved dental adhesive formulations based on reactive nanogel additives. *J Dent Res.* 2012;91(2):179–84.
147. Moraes R, Garcia J, Barros M, Lewis S, Pfeifer C, Liu J, et al. Control of polymerization shrinkage and stress in nanogel-modified monomer and composite materials. *Dent Mater.* 2011;27(6):509-519.
148. Liu J, Howard G, Lewis S, Barros M, Stansbury J. A study of shrinkage stress reduction and mechanical properties of nanogel-modified resin systems. *Eur Polym J.* 2012;48(11):1819-1828.
149. Gotti, V, Correr A, Lewis S, Feitosa V. Correr-Sobrinho L, Stansbury J. Influence of nanogel additive hydrophilicity on dental adhesive mechanical performance and dentin bonding. *Dent Mater.* 2016;32(11):1406-1413.
150. Omanakuttan A, Nambiar J, Harris R, Bose C, Pandurangan N, Varghese R, et al. Anacardic acid inhibits the catalytic activity of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9. *Molec pharmacol.* 2012;82(4):614-622.

151. Pashley D, Sano H, Ciucchi B, Yoshiyama M, Carvalho R. Adhesion testing on dentin bonding agents. A review. *Dent Mater.* 1995;11(2):117-125.
152. De Munck J, Mine A, Poitevin A, Van Ende A, Cardoso M, Van Landuyt K, et al. Meta-analytical review of parameters involved in dentin bonding. *J Dent Res.* 2012;91(4):351-357.
153. Leloup G, D'Hoore W, Bouter D, Degrange M, Vreven J. Concise. Review biomaterials & bioengineering: Meta-analytical review of factors involved in dentin adherence. *J Dent Res.* 2001;80(7):1605-1614.
154. Armstrong S, Geraldeli S, Maia R, Raposo L, Soares C, Yamagawa J. Adhesion to tooth structure: a critical review of "micro" bond strength test methods. *Dent Mater.* 2010;26(2):50-62.
155. Carrilho M, Carvalho R, Tay F, Pashley, D. Effects of storage media on mechanical properties of adhesive systems. *Am J Dent.* 2004;17:104-108.
156. Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, et al. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength—evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater.* 1994;10(4):236-240.
157. Pashley D, Carvalho R, Sano H, Nakajima M, Yoshiyama M, Shono Y, et al. The microtensile bond test: A review. *J Adhes Dent.* 1999;1(4):299-309.



158. Perdigao J, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Vanherle G, Lopes A. Field emission SEM comparison of four postfixation drying techniques for human dentin. *J Biomed Mater Res.* 1995;29(9):1111-1120.
159. Sano H, Yoshiyama M, Ebisu S, Burrow M, Takatsu T, Ciucchi, B, et al. Comparative SEM and TEM observations of nanoleakage within the hybrid layer. *Oper Dent.* 1994;20(4):160-167.
160. Watson T. Applications of high-speed confocal imaging techniques in operative dentistry. *Scanning.* 1994;16(3):168-173.
161. Sauro S, Feitosa V, Galvao A, Berger S, Cantanhede R, Giannini M. Microscopía confocal a láser: fundamentos en odontología restauradora e estética. En: Ribeiro R Rodrigo, Ricardo S Carlos eds. *Biotecnología aplicada À Saúde. Fundamentos e aplicações.* 5ª ed. São Paulo:Blucher;2015.
162. Sauro S, Pashley D, Montanari M, Chersoni S, Carvalho R, Toledano M, et al. Effect of simulated pulpal pressure on dentin permeability and adhesion of self-etch adhesives. *Dent Mater.* 2007;;23(6):705-713.
163. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi, H. In vitro degradation of resin–dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomater.* 2003;24(21):3795-3803.
164. Sauro S, Pashley D, Mannocci F, Tay F, Pilecki P, Sherriff M., et al. Micropermeability of current self-etching and etch-and-rinse adhesives



- bonded to deep dentine: a comparison study using a double-staining/confocal microscopy technique. *European J oral sci.* 2008;116(2):184-193.
165. Gotti V, Feitosa V, Sauro S, Correr-Sobrinho L, Leal F, Stansbury J, et al. Effect of antioxidants on the dentin interface bond stability of adhesives exposed to hydrolytic degradation. *J Adhes Dent* 2015;17:35-44.
166. Kim M, Shin J, Eun H, Chung J. (2009) The role of p300 histone acetyltransferase in UV-induced histone modifications and MMP-1 gene transcription. *PLoS One.* 2009;4(3):4864.
167. Sung B, Pandey M, Ahn K, Chaturvedi M, Liu M, Aggarwal B. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor-kB-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor kB  $\gamma$  kinase, leading to potentiation of apoptosis. *Blood.* 2008;111(19):4880-4891.
168. Lia N, Shib, Z, Tang, Y, Duan J. Selective Matrix Metalloproteinase Inhibitors for Cancer. *Curr Med Chem.* 2009;16:3805-3827
169. Maskos K, Bode W. Structural basis of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Mol Biotechnol.* 2003;25:241-266



170. Lovejoy B, Welch A, Carr S, Luong C, Broka C, Hendricks R, et al. Structural studies of matrix metalloproteinases. *Nat Struct Biol.* 1999;6:217-221.
171. Green I, Tocoli F, Lee S, Nihei K, Kubo I. Molecular design of anti-MRSA agents based on the anacardic acid scaffold. *Bioorg Med Chem.* 2007;15:6236-6241.
172. Swamy B, Suma T, Rao G, Reddy G. Synthesis of isonicotinoylhydrazones from anacardic acid and their in vitro activity against *Mycobacterium smegmatis*. *Eur J Med Chem.* 2007;42:420-424.
173. Green I, Tocoli F, Lee S, Nihei K, Kubo I. Design and evaluation of anacardic acid derivatives as anticavity agents. *Eur J Med Chem.* 2008;43:1315-132.
174. Pashley D, Tay F, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho R, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dent Mater.* 2011;27:1-16
175. Tezvergil-Mutluay A., Agee k, Uchiyama T, Imazato S, Mutluay M, Cadenaro M, Pashley D. The inhibitory effects of quaternary ammonium methacrylates on soluble and matrix-bound MMPs. *J Dent Res.* 2011;90(4), 535-540.
176. Mazzoni A, Pashley D, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, et al. Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomater.* 2006; 27:4470-4476.



177. Carrilho M, Carvalho R, de Goes M, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay F, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond *in vitro*. *J Dent Res*. 2007; 86:90-94.
178. Mazzoni A, Pashley D, Tay F, Gobbi P, Orsini G, Ruggeri A Jr, et al. Immunohistochemical identification of MMP-2 and MMP-9 in human dentine: Correlative FEI-SEM/TEM analysis. *J Biomed Mater Res A*. 2009;1;88(3):697-703.
179. Bedran-Russo A, Pashley D, Agee K, Drummond J, Miescke K. Changes in stiffness of demineralized dentin following application of collagen crosslinkers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;86(2):330-4.
180. Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De Stefano Dorigo E. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater*. 2008;24(1):90-101.
181. Fang M, Liu R, Xiao Y, Li F, Wang D, Hou R et al. Biomodification to dentin by a natural crosslinker improved the resin-dentine bonds. *J Dent*. 2012 ;40(6):458-66.
182. Scheffel D, Hebling J, Scheffel R, Agee K, Turco G, de Souza Costa C et al. Inactivation of matrix-bound matrix metalloproteinases by cross-linking agents in acid-etched dentin. *Oper Dent*. 2014 Mar;39(2):152-8.
183. Chiang Y, Chen Y, Chuang S, Wu C, Wei P, Han C et al. Riboflavin-ultraviolet-A-induced collagen cross-linking treatments in improving dentin bonding. *Dent Mater*. 2013;29(6):682-92.



184. Fawzy A, Nitisusanta L, Iqbal K, Daood U, Neo J. Riboflavin as a dentine crosslinking agent: ultraviolet A versus blue light. *Dent Mater.* 2012;28(12):1284-91.



## *ANEXOS*



## 9. ANEXOS.

### 9.1 ANEXO I- CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EXTRACCIÓN DE CORDALES.



#### **CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA CIRUGÍA DE CORDALES**

##### **(EXTRACCIÓN DE MUELAS DEL JUICIO)**

Este documento sirve para que usted, o quien lo represente, dé su consentimiento para esta intervención. Eso significa que nos autoriza a realizarla. Puede usted retirar este consentimiento cuando lo desee. Firmarlo no le obliga a usted a hacerse la intervención. De su rechazo no se derivará ninguna consecuencia adversa respecto a la calidad del resto de la atención recibida. Antes de firmar, es importante que lea despacio la información siguiente. **Díganos si tiene alguna duda o necesita más información.** Le atenderemos con mucho gusto.

##### **EN QUÉ CONSISTE. PARA QUÉ SIRVE:**

Consiste en la extracción de una muela del juicio (cordales). Sirve para eliminar tanto los problemas que esté ocasionando actualmente como los que pudiera ocasionar por mantenerlas.

##### **CÓMO SE REALIZA:**

Se administra anestesia en la zona por medio de una inyección para eliminar o suprimir la sensación dolorosa (de forma reversible). A continuación se procede a la extracción de la pieza dental afectada y/o de las afectadas.

##### **QUÉ EFECTOS LE PRODUCIRÁ:**

Se suele producir una sensación de acolchamiento del labio y/o de la cara, que normalmente va a desaparecer en 2 o 3 horas.



A consecuencia de las maniobras para la extracción se le producirá inflamación y dolor que disminuirá en unos días. En algunas ocasiones, puede haber presión de un nervio que le ocasionará un adormecimiento que durará un tiempo indeterminado.

También puede producirse una herida o llaga dolorosa en el punto de la inyección que puede limitar el movimiento de la apertura de la boca. Finalmente pueden producirse complicaciones alérgicas, hemorrágicas (sangrado), vasculares y cardiorrespiratorias, llegando a producir excepcionalmente la muerte como consecuencia de la anestesia.

**EN QUÉ LE BENEFICIARÁ:**

Se eliminarán los signos o síntomas relacionados con la muela del juicio que se extraiga, así como los problemas orales que podrían derivarse por mantener dichas piezas dentales; siendo los más frecuentes la inflamación del tejido que rodea el diente (pericoronaritis aguda), así como la caries del segundo molar por malposición e impactación (diente que no logra salir completamente a través de la encía) y retención de alimentos.

**OTRAS ALTERNATIVAS DISPONIBLES EN SU CASO:**

No extraer la pieza dental implica mantener el riesgo de la persistencia e incluso, aumentar los síntomas o problemas bucales.

En su caso: riesgos que pueden aparecer en este proceso o intervención.

**QUÉ RIESGOS TIENE:**

Cualquier actuación médica tiene riesgos. La mayor parte de las veces los riesgos no se materializan, y la intervención no produce daños o efectos secundarios indeseables. Pero a veces no es así. Por eso es importante que usted conozca



✓ **LOS MÁS FRECUENTES:**

- Hematomas (morados) e hinchazón de la zona.
- Hemorragias postoperatorias.
- Daño a los dientes vecinos.
- Infección de los tejidos o del hueso.

✓ **LOS MÁS GRAVES:**

- Luxación (desplazamiento y separación de un hueso de su articulación) o alteraciones articulares.
- Heridas en el interior de la mejilla, lengua o paladar.
- Falta de sensibilidad parcial o total, temporal o permanente de los nervios bucales o faciales.
- Sinusitis.
- Comunicaciones entre la boca y la nariz o los senos maxilares.
- Fracturas óseas.
- Desplazamiento de dientes a estructuras vecinas.
- Tragado o aspiración de dientes o materiales odontológicos.
- Rotura de instrumentos.
- Apertura o infección de los puntos de sutura.

**SITUACIONES ESPECIALES QUE DEBEN SER TENIDAS EN CUENTA:**

No debe realizarse la cirugía de cordales en los siguientes casos:

- Cuando hay posibilidades de salida correcta del molar con funcionalidad adecuada.
- Cuando se ha producido una exodoncia de germen dentario (extracción de un conjunto de células que se unen para formar el futuro diente).



- Cuando por patología sistémica concomitante, la exodoncia supone un riesgo inaceptable y las consecuencias superan los beneficios.
- Cuando no hay historia ni evidencia de enfermedad relacionada con el tercer molar
- Cuando los riesgos quirúrgicos son elevados, incluso de fractura ósea (de huesos).
- Pueden existir circunstancias que aumenten la frecuencia y gravedad de riesgos y complicaciones a causa de enfermedades que usted ya padece. Para ser valoradas debe informar a su médico de sus posibles alergias medicamentosas, alteraciones de la coagulación, enfermedades, medicaciones actuales o cualquier otra circunstancia.

#### **MINORÍA DE EDAD O INCAPACIDAD**

En el caso de INCAPACIDAD DEL/DE LA PACIENTE será necesario el consentimiento del/de la representante legal. En el caso del MENOR DE EDAD, cuando se considere que carece de madurez suficiente, el consentimiento lo darán sus representantes legales, aunque el menor siempre será informado de acuerdo a su grado de entendimiento y, si tiene más de 12 años, se escuchará su opinión. Si el paciente está emancipado o tiene 16 años cumplidos será él quien otorgue el consentimiento. Sin embargo, en caso de actuación de grave riesgo, según el criterio del facultativo, los representantes legales también serán informados y su opinión será tenida en cuenta para la decisión.) Después de leer detenidamente el presente documento y aclarar las dudas o cuestiones que pudiera tener al respecto



Yo, D/Dña.....  
manifiesto que estoy conforme con la intervención que se me ha propuesto. He leído y comprendido la información anterior. He podido preguntar y aclarar todas mis dudas. Por eso he tomado consciente y libremente la decisión de autorizarla. También sé que puedo retirar mi consentimiento cuando lo estime oportuno.

En Alfara del Patriarca,  
a.....de.....de.....

Fdo. El paciente Fdo. El odontólogo/  
Estomatólogo  
(Su representante legal) Núm. Colegiado

## 9.2. ANEXO II. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA CESIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO.

 **CEU** | Universidad  
Cardenal Herrera

**CONSENTIMIENTO INFORMADO/ ESTUDIOS DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA/ SOLICITUD DE MUESTRAS MATERIAL BIOLÓGICO/DIENTES POST EXTRACCIÓN**

Yo,

D. /Dña.....  
(Como paciente), Con DNI núm....., mayor de edad,  
Y con domicilio  
en.....  
.De (ciudad y código postal).....

**DECLARO:**

Que del Dr.....

Me ha solicitado muestras de material biológico, (e este caso el/los dientes extraído/s), para poder utilizarlos en estudios de investigación biomédica.

Me ha informado que las muestras obtenidas serán usadas únicamente para investigaciones que incluyan pruebas físicas y no biológicas, detallando específicamente que no se harían estudios genéticos con ellas. Si en el futuro son usadas para propósitos diferentes a los de esta investigación se me solicitaría un nuevo consentimiento.

Me ha especificado, además, algunas consideraciones de diferentes aspectos del estudio. Entre ellas las relativas a:

**PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN.** Las muestras serán almacenadas en botes estériles inmersas en suero fisiológico, en la propia clínica dental, bajo responsabilidad de la profesora Dña. Victoria Vivó Agulló.

**RIESGOS:** Se me ha informado que, dada la naturaleza de la investigación médica que se llevará a cabo sobre las muestras, no existe ningún riesgo para mí.



**BENEFICIOS:** No obtendré beneficios de ningún tipo por participar en esta investigación médica, sin embargo la información que se obtendrá será de utilidad para conocer más acerca del problema en estudio y eventualmente podrá beneficiar a otras personas.

**VOLUNTARIEDAD:** Mi participación en esta donación de muestras biológicas es completamente voluntaria. Si no acepto no perderé ningún derecho como paciente y no se verá afectada la calidad de la atención médica recibida ni ahora ni en el futuro.

**CONFIDENCIALIDAD:** Tanto el procesamiento de las muestras, como en la publicación de los resultados se mantendrán estrictas medidas para garantizar la confidencialidad de los datos personales incluyendo el presente documento.

Para la realización de los estudios los especímenes se agrupan aleatoriamente siguiendo programas de computadora. Es posible que los resultados obtenidos sean presentados en revistas y conferencias sin vulnerar el derecho a la protección de los datos personales.

Después de leer detenidamente el presente documento y aclarar las dudas o cuestiones que pudiera tener al respecto

**DOY MI CONSENTIMIENTO**, para que el/los **DIENTES EXTRAIDOS** puedan utilizarse en los citados estudios de investigación.

En Alfara del Patriarca,  
a.....de.....de.....

Fdo. El paciente

(Su representante legal)

Fdo. El odontólogo/ Estomatólogo

Núm. Colegiado.

### 9.3. ANEXO III: DATOS ESTADÍSTICOS (ADHESIVOS AUTOGRABANTES)

**Three Way Analysis of Variance**

domingo, setembro 25, 2016, 22:34:40

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

Balanced Design

Dependent Variable: Col 4

**Normality Test:** Passed (P = 0,242)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0,085)

| Source of Variation   | DF | SS       | MS      | F      | P      |
|-----------------------|----|----------|---------|--------|--------|
| Col 1                 | 1  | 9,900    | 9,900   | 0,429  | 0,517  |
| Col 2                 | 1  | 0,506    | 0,506   | 0,0219 | 0,883  |
| Col 3                 | 1  | 468,540  | 468,540 | 20,315 | <0,001 |
| Col 1 x Col 2         | 1  | 105,950  | 105,950 | 4,594  | 0,040  |
| Col 1 x Col 3         | 1  | 9,120    | 9,120   | 0,395  | 0,534  |
| Col 2 x Col 3         | 1  | 109,892  | 109,892 | 4,765  | 0,037  |
| Col 1 x Col 2 x Col 3 | 1  | 0,306    | 0,306   | 0,0133 | 0,909  |
| Residual              | 32 | 738,052  | 23,064  |        |        |
| Total                 | 39 | 1442,268 | 36,981  |        |        |

**Col 1 – Control vs. Anacardic**

**Col 2 – No nanogeles vs Nanogeles**

**Col 3 – 24h vs. 6mos**

The main effects for Col 1 cannot be properly interpreted since the size of the factor's effect depends upon the level of another factor.

The main effects for Col 2 cannot be properly interpreted since the size of the factor's effect depends upon the level of another factor.

The main effects for Col 3 cannot be properly interpreted since the size of the factor's effect depends upon the level of another factor.

The effect of different levels of Col 1 depends on what level of Col 2 is present. There is a statistically significant interaction between Col 1 and Col 2. (P = 0,040)

The effect of different levels of Col 1 does not depend on what level of Col 3 is present. There is not a statistically significant interaction between Col 1 and Col 3. (P = 0,534)

The effect of different levels of Col 2 depends on what level of Col 3 is present. There is a statistically significant interaction between Col 2 and Col 3. (P = 0,037)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Col 2 within Control**

| Comparison             | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|------------------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| Nanogeles vs. No nanoG | 3,480         | 2 | 2,291 | 0,115 | No     |

Comparisons for factor: **Col 2 within Anacard**

| Comparison             | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|------------------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| No nanoG vs. Nanogeles | 3,030         | 2 | 1,995 | 0,168 | No     |

Comparisons for factor: **Col 1 within No nanoG**

| Comparison          | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|---------------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| Anacard vs. Control | 2,260         | 2 | 1,488 | 0,301 | No     |

Comparisons for factor: **Col 1 within Nanogeles**

| Comparison          | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|---------------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| Control vs. Anacard | 4,250         | 2 | 2,798 | 0,057 | No     |

Comparisons for factor: **Col 3 within Control**

| Comparison   | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|--------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| 24h vs. 6mos | 7,800         | 2 | 5,136 | 0,001 | Yes    |

Comparisons for factor: **Col 3 within Anacard**

| Comparison   | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|--------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| 24h vs. 6mos | 5,890         | 2 | 3,878 | 0,010 | Yes    |

Comparisons for factor: **Col 1 within 24h**

| Comparison          | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|---------------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| Control vs. Anacard | 1,950         | 2 | 1,284 | 0,371 | No     |

Comparisons for factor: **Col 1 within 6mos**

| Comparison          | Diff of Means | p | q      | P     | P<0,05 |
|---------------------|---------------|---|--------|-------|--------|
| Control vs. Anacard | 0,0400        | 2 | 0,0263 | 0,985 | No     |

Comparisons for factor: **Col 3 within No nanoG**

| Comparison   | Diff of Means | p | q     | P      | P<0,05 |
|--------------|---------------|---|-------|--------|--------|
| 24h vs. 6mos | 10,160        | 2 | 6,690 | <0,001 | Yes    |

Comparisons for factor: **Col 3 within Nanogeles**

| Comparison   | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|--------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| 24h vs. 6mos | 3,530         | 2 | 2,324 | 0,110 | No     |

Comparisons for factor: **Col 2 within 24h**

| Comparison             | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|------------------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| No nanoG vs. Nanogeles | 3,090         | 2 | 2,035 | 0,160 | No     |

Comparisons for factor: **Col 2 within 6mos**

| Comparison             | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|------------------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| Nanogeles vs. No nanoG | 3,540         | 2 | 2,331 | 0,109 | No     |

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Col 1 : 0,0500

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Col 2 : 0,0500

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Col 3 : 0,995

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Col 1 x Col 2 : 0,440

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Col 1 x Col 3 : 0,0500

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Col 2 x Col 3 : 0,458

Least square means for Col 1 :

**Group Mean**

Control 20,130

Anacard 19,135

Std Err of LS Mean = 1,074

Least square means for Col 2 :

**Group Mean**

No nanoG 19,520

Nanogeles 19,745

Std Err of LS Mean = 1,074

Least square means for Col 3 :

**Group Mean**

24h 23,055

6mos 16,210

Std Err of LS Mean = 1,074

Least square means for Col 1 x Col 2 :

**Group Mean**

Control x No nanoG 18,390

Control x Nanogeles 21,870

Anacard x No nanoG 20,650

Anacard x Nanogeles 17,620

Std Err of LS Mean = 1,519

Least square means for Col 1 x Col 3 :

**Group Mean**

Control x 24h 24,030

Control x 6mos 16,230

Anacard x 24h 22,080

Anacard x 6mos 16,190

Std Err of LS Mean = 1,519

Least square means for Col 2 x Col 3 :

**Group Mean**

No nanoG x 24h 24,600

No nanoG x 6mos 14,440

Nanogeles x 24h 21,510

Nanogeles x 6mos 17,980

Std Err of LS Mean = 1,519

Least square means for Col 1 x Col 2 x Col 3 :

**Group Mean**

Control x No nanoG x 24h 23,860

Control x No nanoG x 6mos 12,920

Control x Nanogeles x 24h 24,200

Control x Nanogeles x 6mos 19,540

Anacard x No nanoG x 24h 25,340

Anacard x No nanoG x 6mos 15,960

Anacard x Nanogeles x 24h 18,820

Anacard x Nanogeles x 6mos 16,420

Std Err of LS Mean = 2,148

## 9.4. ANEXO IV. DATOS ESTADÍSTICOS (ADHESIVOS DE GRABADO TOTAL)

**Three Way Analysis of Variance**

domingo, setembro 25, 2016, 23:31:22

**Data source:** Data 1 in Notebook 1

Balanced Design

**Normality Test:** Passed (P = 0,287)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0,865)

| Source of Variation   | DF | SS      | MS      | F      | P      |
|-----------------------|----|---------|---------|--------|--------|
| Col 1                 | 1  | 0,00353 | 0,00353 | 0,246  | 0,624  |
| Col 2                 | 1  | 0,0578  | 0,0578  | 4,021  | 0,053  |
| Col 3                 | 1  | 0,224   | 0,224   | 15,616 | <0,001 |
| Col 1 x Col 2         | 1  | 0,0154  | 0,0154  | 1,075  | 0,308  |
| Col 1 x Col 3         | 1  | 0,00524 | 0,00524 | 0,365  | 0,550  |
| Col 2 x Col 3         | 1  | 0,0948  | 0,0948  | 6,598  | 0,015  |
| Col 1 x Col 2 x Col 3 | 1  | 0,00303 | 0,00303 | 0,211  | 0,649  |
| Residual              | 32 | 0,460   | 0,0144  |        |        |
| Total                 | 39 | 0,864   | 0,0222  |        |        |

**Col 1 – Control vs. Anacardic**

**Col 2 – No nanogeles vs Nanogeles**

**Col 3 – 24h vs. 6mos**

The difference in the mean values among the different levels of Col 1 are not great enough to exclude the possibility that the difference is just due to random sampling variability after allowing for the effects of differences in Col 2 and Col 3. There is not a statistically significant difference (P = 0,624).

The main effects for Col 2 cannot be properly interpreted since the size of the factor's effect depends upon the level of another factor.

The main effects for Col 3 cannot be properly interpreted since the size of the factor's effect depends upon the level of another factor.

The effect of different levels of Col 1 does not depend on what level of Col 2 is present. There is not a statistically significant interaction between Col 1 and Col 2. (P = 0,308)

The effect of different levels of Col 1 does not depend on what level of Col 3 is present. There is not a statistically significant interaction between Col 1 and Col 3. (P = 0,550)

The effect of different levels of Col 2 depends on what level of Col 3 is present. There is a statistically significant interaction between Col 2 and Col 3. (P = 0,015)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test):

Comparisons for factor: **Col 2 within Control**

| Comparison             | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|------------------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| Nanogeles vs. No nanoG | 0,0367        | 2 | 0,968 | 0,499 | No     |

Comparisons for factor: **Col 2 within Anacard**

| Comparison | Diff of Means | p | q | P | P<0,05 |
|------------|---------------|---|---|---|--------|
|------------|---------------|---|---|---|--------|

Nanogeles vs. No nanoG 0,115 2 3,042 0,039 Yes

Comparisons for factor: **Col 1 within No nanoG**

| Comparison          | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|---------------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| Control vs. Anacard | 0,0581        | 2 | 1,532 | 0,287 | No     |

Comparisons for factor: **Col 1 within Nanogeles**

| Comparison          | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|---------------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| Anacard vs. Control | 0,0205        | 2 | 0,541 | 0,705 | No     |

Comparisons for factor: **Col 3 within Control**

| Comparison   | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|--------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| 24h vs. 6mos | 0,173         | 2 | 4,556 | 0,003 | Yes    |

Comparisons for factor: **Col 3 within Anacard**

| Comparison   | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|--------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| 24h vs. 6mos | 0,127         | 2 | 3,348 | 0,024 | Yes    |

Comparisons for factor: **Col 1 within 24h**

| Comparison          | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|---------------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| Control vs. Anacard | 0,0417        | 2 | 1,099 | 0,443 | No     |

Comparisons for factor: **Col 1 within 6mos**

| Comparison          | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|---------------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| Anacard vs. Control | 0,00411       | 2 | 0,109 | 0,939 | No     |

Comparisons for factor: **Col 3 within No nanoG**

| Comparison   | Diff of Means | p | q     | P      | P<0,05 |
|--------------|---------------|---|-------|--------|--------|
| 24h vs. 6mos | 0,247         | 2 | 6,520 | <0,001 | Yes    |

Comparisons for factor: **Col 3 within Nanogeles**

| Comparison   | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|--------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| 24h vs. 6mos | 0,0524        | 2 | 1,383 | 0,336 | No     |

Comparisons for factor: **Col 2 within 24h**

| Comparison             | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|------------------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| No nanoG vs. Nanogeles | 0,0214        | 2 | 0,563 | 0,693 | No     |

Comparisons for factor: **Col 2 within 6mos**

| Comparison             | Diff of Means | p | q     | P     | P<0,05 |
|------------------------|---------------|---|-------|-------|--------|
| Nanogeles vs. No nanoG | 0,173         | 2 | 4,574 | 0,003 | Yes    |

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Col 1 : 0,0500

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Col 2 : 0,378

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Col 3 : 0,972

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Col 1 x Col 2 : 0,0553

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Col 1 x Col 3 : 0,0500

Power of performed test with alpha = 0,0500: for Col 2 x Col 3 : 0,631



Least square means for Col 1 :

**Group Mean**

Control 1,361

Anacard 1,342

Std Err of LS Mean = 0,0268

Least square means for Col 2 :

**Group Mean**

No nanoG 1,314

Nanogeles 1,390

Std Err of LS Mean = 0,0268

Least square means for Col 3 :

**Group Mean**

24h 1,426

6mos 1,277

Std Err of LS Mean = 0,0268

Least square means for Col 1 x Col 2 :

**Group Mean**

Control x No nanoG 1,343

Control x Nanogeles 1,379

Anacard x No nanoG 1,285

Anacard x Nanogeles 1,400

Std Err of LS Mean = 0,0379

Least square means for Col 1 x Col 3 :

**Group Mean**

Control x 24h 1,447

Control x 6mos 1,275

Anacard x 24h 1,406

Anacard x 6mos 1,279

Std Err of LS Mean = 0,0379

Least square means for Col 2 x Col 3 :

**Group Mean**

No nanoG x 24h 1,437

No nanoG x 6mos 1,190

Nanogeles x 24h 1,416

Nanogeles x 6mos 1,363

Std Err of LS Mean = 0,0379

Least square means for Col 1 x Col 2 x Col 3 :

**Group Mean**

Control x No nanoG x 24h 1,469

Control x No nanoG x 6mos 1,216

Control x Nanogeles x 24h 1,426

Control x Nanogeles x 6mos 1,333

Anacard x No nanoG x 24h 1,405

Anacard x No nanoG x 6mos 1,164

Anacard x Nanogeles x 24h 1,406

Anacard x Nanogeles x 6mos 1,394

Std Err of LS Mean = 0,0536



## 9.5. ANEXO VI: DOCUMENTO DE COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA



*Vicerrectorado de Investigación*

La COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y ÉTICA de la Universidad CEU Cardenal Herrera, con domicilio en el Edificio Seminario, s/n, 46113 – Moncada (Valencia)

### INFORMA

La viabilidad del Proyecto de Investigación cuyo título es "Estudio "in vitro" de la degradación de la interfase adhesiva resina-dentina mediante adhesivos con nanogel aplicados en dentina pre-tratada con ácido anacárdico", (Autorización nº CEI16/020) siendo el Investigador Principal el Dr. D. Salvatore Sauro, del Departamento de Odontología.

Y para que conste donde convenga y proceda, y a petición del interesado, expido la presente, en Moncada a 14 de diciembre de dos mil dieciséis.



Fdo.: Ignacio Pérez Roger  
Presidente de la Comisión de Investigación y Ética CEU-UCH.





