

Estudio comparativo in vitro de resistencia a la microtracción y a las fuerzas de cizallamiento con el uso de clorhexidina al 2% durante el protocolo de adhesión de adhesivos de grabado y lavado y adhesivos autograbantes de uno y dos pasos.

Doctorando: Dr. Cristián Bravo Palma.

Directores:

Dr. Juan R. Mayoral Molina.

Dr. Lluís Giner Tarrida

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Estudio comparativo in vitro de resistencia a la microtracción y a las fuerzas de cizallamiento con el uso de clorhexidina al 2% durante el protocolo de adhesión de adhesivos de grabado y lavado y adhesivos autograbantes de uno y dos pasos.

Doctorando: Dr. Cristián Bravo Palma.

Directores: Dr. Juan R. Mayoral Molina.

Dr. Lluís Giner Tarrida.

Universitat Internacional de Catalunya

Año 2017.

Agradecimientos.

Al Dr. Lluís Giner, por su constante preocupación y apoyo en el desarrollo de esta investigación. La distancia y sus actividades profesionales nunca fueron un impedimento para su aliento y cariño, todo lo contrario, su dedicación personal ha sido para mí un ejemplo de entrega a los demás.

Al Dr. Juan Ricardo Mayoral, por su contribución durante la investigación y al tiempo que tuvo que dedicar a la revisión del trabajo final.

A las autoridades de la Universidad de los Andes, las que me alentaron en todo momento durante este período de estudios.

A la Fundación Familiar Catalana por la beca de Magíster que me concedió y me permitió comenzar mis estudios.

A mis padres quienes me enseñaron con su ejemplo el valor del trabajo y de la perseverancia.

A mi esposa Astrid y a mis hijas Florencia, Belén y Trinidad, a quienes les quité de mi tiempo con ellas para estudiar.

Finalmente quisiera agradecer a Dios por darme esta oportunidad y acompañarme durante mi camino.

1 Índice.

Agradecimientos.....	2
2 Introducción.....	5
3 Marco teórico.....	7
3.1 Adhesión.....	7
3.2 Capa Híbrida.....	7
3.3 Evolución de los sistemas adhesivos.....	8
3.4 Problemas actuales, degradación capa híbrida.....	9
3.5 Metaloproteinasas.....	11
3.6 Métodos de análisis de metaloproteinasas en dentina.....	13
3.6.1 Presencia y cantidad de metaloproteinasas en dentina.....	14
3.6.2 Actividad metaloproteinasas en dentina.....	16
3.7 Inhibidores de metaloproteinasas.....	17
3.7.1 EDTA.....	18
3.7.2 Cloruro de benzalconio.....	19
3.7.3 Clorhexidina.....	20
4 Hipótesis.....	22
4.1 Hipótesis nula.....	22
4.2 Hipótesis alternativa.....	22
5 Objetivos.....	23
5.1 General.....	23
5.2 Específicos.....	23
6 Material y método.....	24
6.1 Resistencia a la fuerza de cizallamiento.....	25
6.2 Resistencia adhesiva a la microtracción.....	27
7 Análisis estadístico.....	29
8 Resultados.....	29
8.1 Resistencia a las fuerzas de cizallamiento.....	29
8.2 Resistencia a las fuerzas de micro tracción.....	33
9 Discusión.....	36
10 Conclusiones.....	41
11 Significancia Clínica.....	43

12	Perspectivas futuras.....	43
13	Bibliografía.....	44
14	Articulos submitted.....	50
14.1	International Journal of Morphology. Tracking number: IJM 211-17.....	50
14.2	Brazilian Oral Research. Manuscript ID: BOR-2017-0032.....	59
15	Carta aprobación Comisión Académica Doctoral.....	72
16	Carta aprobación Comité de ética.....	73

2 Introducción.

La odontología restauradora actual se basa fundamentalmente en los procesos adhesivos entre la restauración y el diente. El proceso de grabado ácido primero en esmalte descrito por Buonocore y luego el advenimiento del proceso de adhesión en dentina han permitido a la odontología avanzar en el diseño de cavidades más conservadoras, menos dependientes del diseño cavitario el que ha sido reemplazado por una aplicación de técnicas de adhesión con valores de adhesión cada vez mayores.

La adhesión, por tanto, es una importante herramienta ampliamente utilizada y que se define como la unión de un polímero a una superficie dentaria, con propósitos funcionales, biológicos y estéticos (1,2). Para lograr esta unión es necesario seguir un sensible protocolo adhesivo que al efectuarse sin seguir estrictos protocolos significa el fracaso de la rehabilitación en proceso (3). Spencer y col. sostienen que la estrategia de los sistemas de adhesión a dentina vigentes, se centran en la formación de una capa híbrida sobre la superficie dentinaria, la cual consta de monómeros polimerizados dentro de un enmallado colágeno de la dentina formando una traba micromecánica (4). Con los sistemas adhesivos tradicionales de grabado y lavado, esta técnica de infiltración requiere humedad en la superficie de dentina para apoyar las fibras de colágeno, permitiendo por lo tanto una penetración adecuada de la resina para generar una interfaz mineral/colágeno/resina.

La ventaja de este tipo de procedimientos adhesivos es que permite una conservación mayor del tejido dentinario y por ende una menor destrucción de estructura dentaria.

Una de las etapas de este sensible protocolo adhesivo es el grabado ácido el que logra desmineralizar el tejido dentinario. Luego del lavado post-grabado se elimina el barro dentinario producido por la preparación de la cavidad al eliminar la caries. Con esto se expone la malla colágena a expensas de eliminar la materia inorgánica de la dentina (3,5,6).

Existe consenso en la literatura acerca del hecho que la capa híbrida que se forma a través de los procesos adhesivos actuales sufre un deterioro en el tiempo debido a distintos factores (7).

Los ácidos y los monómeros acídicos, por su estructura química, tienen naturaleza polar, es decir, atraen agua. Si hay una incorrecta técnica durante el protocolo adhesivo como, por ejemplo, no respetar los tiempos operatorios, se forma una zona desmineralizada no infiltrada (DNI). Esto causa que exista colágeno expuesto no impregnado que queda rodeado de agua, hidrolizándose y haciendo que componentes dentinarios proteolíticos penetren en esta zona desmineralizada no infiltrada. Los componentes dentinarios responsables de la proteólisis son enzimas colagenolíticas, conocidas como metaloproteinasas. Éstas se activan cuando existe un ácido que elimina la composición

inorgánica de la matriz dentinaria en la que están inmersas, provocando este proceso de proteólisis (5,7,8).

Las metaloproteinasas activadas actúan contra el tejido orgánico desnaturalizándolo. Esta desnaturalización en el tiempo produce problemas como infiltración, desalajo o fractura de la restauración, caries secundaria, etc.(9).

Diversos estudios *in vitro* sugieren que la aplicación de distintos agentes químicos, como EDTA y la clorhexidina a la dentina luego del proceso de grabado ácido ayudarían a disminuir la acción de las metaloproteinasas ayudando de esta manera a mantener más estable la capa híbrida (3,10).

Otros estudios han demostrado que los métodos adhesivos de auto grabado producen menores valores de adhesión inicial, pero al mismo tiempo la degradación de la capa híbrida es menor, debido probablemente a una menor penetración del ácido en la dentina y al uso de ácidos menos agresivos y de mayor pH que provocan una respuesta inflamatoria menor, lo que se traduciría en una mayor longevidad de la restauración.

En este estudio se tratará de verificar el efecto del uso de clorhexidina en un adhesivo autograbante de un tiempo operatorio de pH medio.

3 Marco teórico.

3.1 Adhesión.

La adhesión a sustratos dentarios es una importante herramienta en la odontología, y es ampliamente utilizada. Es la unión de un polímero a una superficie dentaria, con propósitos funcionales, biológicos y estéticos. Para lograr esta adhesión es necesario llevar a cabo un sensible protocolo adhesivo el cual, de no ser desarrollado como corresponde, conlleva al fracaso de la rehabilitación en proceso (1,11).

Existen varias estrategias de adhesión, grabado total, autograbado, grabado dual, etc. El objetivo es lograr una capa híbrida en dentina y microtags en esmalte (12).

La adhesión a esmalte se logra producto de la infiltración del primer a los microporos generados por el grabado ácido, formándose verdaderos microtags de resina que sobresalen de la interfase unión-restauración (2,13). En dentina la adhesión se logra de una manera diferente. Tras el grabado ácido se elimina el componente inorgánico de la dentina y, después del lavado, se deja expuesta una trama de fibras colágenas, la cual es luego impregnada por el monómero ácido primer, molécula bipolar que tiene dos funcionalidades, hidrofílica e hidrofóbica, lo que le da la capacidad de unirse al colágeno húmedo expuesto de la dentina grabada, y por otro lado unirse al bonding, una resina que actúa como agente de enlace, a la cual se va a adherir de mejor manera la resina restauradora propiamente tal.

3.2 Capa Híbrida.

A diferencia de lo logrado en esmalte, lo que se busca lograr en la dentina es la formación de una capa híbrida, constituida por las fibras colágenas, proteínas, proteoglicanos, y la molécula bipolar que imprimó toda esta zona intertubular, más conocida como primer o agente imprimante. Si bien se obtienen también tags de resina en dentina, estos no forman parte de la capa híbrida. Los tags corresponden a resina que penetró en los túbulos dentinarios (2).

Se establece que el tipo de unión que se logra en la capa híbrida es una adhesión micro mecánica, por trabazón con la malla colágena, pero se ha postulado también que la penetración del monómero atrae los átomos del primer a un íntimo contacto con los átomos del sustrato, lo que conduce a interacciones adhesivas a través de fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno e interacciones electrostáticas, es decir, logrando uniones químicas (2).

3.3 Evolución de los sistemas adhesivos.

Basado en los avances logrados en la comprensión de la adhesión a la dentina como resultado de estos estudios, se fueron desarrollando métodos de unión a la dentina que actualmente constan de tres etapas principales; (a) el grabado ácido y lavado (b) imprimación con un monómero bifuncional; hidrofóbico e hidrofílico, y (c) la unión total combinada donde un comonomero de adhesivo se une tanto al monómero del primer como al monómero de la resina restauradora (2). Basado en la estrategia de acondicionamiento dentinario, se pueden clasificar los adhesivos dentinarios actuales en:

- Adhesivos de grabado y lavado en los cuales inicialmente se utiliza ácido ortofosfórico entre el 30 y 40%, posteriormente se condiciona el tejido dentinario y finalmente se imprima la dentina. Simplificaciones de estos adhesivos unen en un paso clínico el acondicionador y el imprimante permitiendo que se disminuye de tres a dos los pasos clínicos del proceso adhesivo.
- Adhesivos autograbantes los cuales contiene monómeros acídicos, por lo que no se requiere enjuagar luego de aplicado el producto y que simultáneamente acondicionan e impriman la dentina. Al disminuir los tiempos operatorios y, por tanto, las variables que dependen del operador, estos adhesivos disminuyen el riesgo de falla por errores durante su aplicación. A su vez estos adhesivos autograbantes pueden ser divididos en dos tipos: medianos y fuertes. Los adhesivos autograbantes medianos tienen un pH cercano a dos disolviendo por tanto la superficie de la dentina parcialmente, por tanto, queda mayor cantidad de hidroxiapatita en la capa híbrida, a diferencia de los adhesivos fuertes cuyo pH es menos a 1 y que alcanzan una estructura de capa híbrida similar a los adhesivos de grabado y lavado (14,15).

Estos adhesivos autograbantes, permiten la interacción química entre ciertos grupos carboxilos o fosfatos de los monómeros del adhesivo y esta hidroxiapatita residual (15). Esta doble unión química y mecánica entregaría ventajas a la restauración en términos de durabilidad y sellado marginal en el tiempo.

3.4 Problemas actuales, degradación capa híbrida.

Es un consenso que esta unión entre la resina y la dentina es la debilidad de los sistemas adhesivos, ya que se ha demostrado que se deteriora con el tiempo (16). La pérdida prematura de la fuerza de unión es uno de los problemas que afecta a las restauraciones adhesivas directas o la cementación de restauraciones indirectas con cementos de resina, y reduce marcadamente su durabilidad. La pérdida de fuerza de esta unión resina-dentina ha sido atribuida a la degradación de la matriz dentinaria, al deterioro del colágeno y, por ende, a la degradación de la capa híbrida en la interfase, por efectos de hidrólisis y proteólisis (17,18).

El colágeno fibrilar tipo I es el componente predominante de la matriz dentinaria. Éste provee un andamiaje estructural a la dentina acomodando los cristales de hidroxiapatita dentro y alrededor de las fibras. La asociación específica y la organización de estas dos fases son críticas en la estructura y mantención de las propiedades mecánicas de este tejido dentinario y, por ende, su estabilidad al estar unido a otro elemento también lo es. Múltiples estudios han demostrado que esta pérdida de integridad de la capa híbrida por la degradación colágena es producida por la acción de las metaloproteinasas de la matriz, lo que conlleva a un fracaso en las técnicas adhesivas a lo largo del tiempo.

Se han reportado varias metaloproteinasas de la matriz presentes en dentina, regulando la organización y mineralización de las fibras colágenas (19).

Se ha descrito en variados estudios que metaloproteinasas endógenas como colagenasas (MMP-8) y gelatinasas (MMP-2 y -9) tienen un rol en la progresión de caries y disrupción de la capa híbrida formada durante el proceso de adhesión (7,19).

El mecanismo de degradación de la unión se explica por la inestabilidad de la matriz colágena de la dentina desmineralizada. Ésta se ha manifestado como desaparición de colágeno en la dentina de piezas dentarias adultas unidas a resina, o incluso en dentina joven sin unión alguna (20,21).

Este proceso de degradación se origina por diversos factores. Por un lado, están los ácidos, ya sean grabantes o productos de metabolismo bacteriano (en presencia de caries), los que por su estructura química tienen naturaleza polar, es decir, incluso bajo adecuadas condiciones de adhesión, estos ácidos al desmineralizar atraen agua, por lo que dentro de la cavidad llega agua de todas las cercanías transformándose en una membrana semipermeable; esto forma manifestaciones tales como árboles de agua (blisters) y cavidades llenas de agua por la perfusión (7,19,21).

El ácido grabante también desintegra la capa híbrida al ser aplicado de manera incorrecta. Un ejemplo es el caso del sistema adhesivo de tres pasos, o de 2 pasos “etch- and- rinse”, en los cuales hay un grabado ácido previo a la aplicación del primer. Es común que, por

error, se grabe más profundamente de lo que el primer puede llegar a imprimir, o bien, grabar correctamente pero no darle el tiempo adecuado al monómero del primer para llegar a las profundidades ya desmineralizadas y cubrir el colágeno, dejando una zona desmineralizada no imprimada (18). Esto permite que exista colágeno expuesto por el ácido, pero no impregnado por el primer, que queda también rodeado de agua, hidrolizándose y quedando componentes de la matriz dentinaria con acción proteolítica que penetran en esa zona, dejando actuar a las metaloproteinasas. Éstas se activan cuando existe un ácido que elimina la composición inorgánica que las rodea. Las metaloproteinasas expuestas actúan contra el tejido orgánico desnaturalizándolo, así ocurre la degradación hidrolítica y proteólisis de estas fibras colágenas, y por lo tanto de la capa híbrida (22-24).

Otro problema planteado en la adhesión es el aumento en las concentraciones de monómeros acídicos de resinas hidrofílicas (polares) e iónicas usados para simplificar los sistemas adhesivos de etch-and-rinse y self-etch para mejorar su unión a la dentina, lo que sería la clave en la falta de estabilidad de los materiales(5,10). Esta naturaleza hidrofílica de los monómeros de resinas hace que estos adhesivos simplificados sean extremadamente permeables, lo que aumenta la absorción de agua. El mecanismo de degradación de la capa híbrida involucra la degradación enzimática del colágeno, la hidrólisis de éste y del polímero. Las metaloproteinasas requieren agua para hidrolizar las uniones peptídicas con las moléculas de colágeno (25,26). La absorción de agua causa plastificación de las cadenas de polímeros y una disminución de las propiedades mecánicas de los adhesivos a lo largo del tiempo por la hidrólisis (5,25).

También se ha especulado que una gradiente de concentración decreciente de la difusión del monómero de resina en la dentina grabada y la posterior elución de la resina desde hidrogeles poliméricos hidrolíticamente inestables dentro de las capas híbridas, deje las fibrillas de colágeno desprotegidas y vulnerables a la degradación por las metaloproteinasas endógenas (26).

Por lo tanto, es un hecho que, tanto bajo condiciones adecuadas de adhesión, como ante errores en el protocolo, la capa híbrida se degrada (14). Claramente la degradación ocurre de manera más rápida en casos de procesos adhesivos incorrectos. Sin embargo, en resinas adheridas con protocolos adecuadamente efectuados, este efecto no deseado de degradación se ha presentado en obturaciones incluso después de un año de realizadas (14).

3.5 Metaloproteinasas.

Las metaloproteinasas, una clase de endopeptidasas dependientes de calcio y zinc (7), son un grupo de 23 enzimas capaces de degradar componentes de la matriz extracelular y del tejido conectivo (7,27), y participan en muchos procesos tanto fisiológicos como patológicos, como la progresión de las caries, o la enfermedad periodontal (25,28).

Las metaloproteinasas son secretadas como proenzimas (zimógenos) y pueden ser activadas por proteinasas o agentes químicos, además de bajo pH (en el caso de caries, por ejemplo) y tratamientos de calor. Estos agentes y procesos activadores probablemente actúen a través de la disrupción de los enlaces cisteína-zinc que las constituye (7,29). La dentina humana contiene colagenasas (MMP-8) y gelatinasas (MMP-2 y -9) entre otras. Estas enzimas gelatinolíticas y colagenolíticas pueden ser producidas por los mismos odontoblastos en un ambiente ácido a lo largo del sustrato dentinario (30).

A nivel dentario, los odontoblastos, en estados fisiológicos, sintetizan MMPs-2 y 9, MMP-8 y MMP-20, las que participan en el desarrollo del diente (27,30). En el caso de la dentina sana, la presencia de metaloproteinasas se ha asociado a la formación de dentina peritubular y terciaria y a la liberación de factores de crecimiento dentinario (31).

En estados patológicos MMP-2 y MMP-9 colaboran con la progresión de caries. Además, participan en la degradación de la capa híbrida en restauraciones de adhesión resina-dentina (27,29). Estas metaloproteinasas son capaces de degradar la matriz orgánica de la dentina desmineralizada y pueden llegar a exponer fibras colágenas de la base de la capa híbrida, que fue originada de la correcta o deficiente infiltración del primer en la matriz dentinaria, resultando en degradación hidrolítica y, por consiguiente, en la reducción de las fuerzas de adhesión de ésta (25,27,31).

En el caso de la caries dental en dentina la desmineralización inicial producto de los ácidos bacterianos, continua con la destrucción de la matriz orgánica debido a la acción de proteasas de origen bacteriano, las que actúan de manera indirecta activando metaloproteinasas derivadas del huésped. Estas metaloproteinasas son producidas por el odontoblasto durante el proceso de formación de la dentina, de manera inactiva quedan atrapadas en la matriz orgánica. El proceso de caries potencialmente podría reactivar estas metaloproteinasas, debido al ambiente ácido que se produce. Este ambiente ácido permite la activación de la metaloproteinasas, pero su mejor rendimiento se alcanza en niveles de pH neutro, por lo que la actividad buffer de la dentina podría producir una mayor actividad proteolítica de las metaloproteinasas (21,32,33).

En otros estudios se ha comprobado un aumento de la producción de metaloproteinasas por parte de los odontoblastos durante el proceso de caries (31,33).

Durante el proceso de restauración, tanto los adhesivos de grabado y lavado como los autograbantes utilizados durante el proceso de restauración poseen una acidez capaz de activar la metaloproteinasas que se encuentran normalmente en la matriz de manera inactiva (34).

Estas metaloproteinasas activadas pueden degradar a través de la hidrólisis las fibras colágenas participantes del proceso de hibridación (7).

Esta actividad hidrolítica puede ser la responsable de la disminución y desaparición en algunas zonas de la capa híbrida formada en la dentina (25).

El ácido y los monómeros de los adhesivos interactúan ya sean eliminado o interactuando con el tejido mineralizado de la dentina, exponiendo la matriz colágena dentinaria e impregnando con los monómeros esta malla colágena, formando así la capa híbrida.

La estabilidad de esta estructura híbrida resultante es fundamental para la longevidad de la interfase diente restauración.

Diversos estudios han demostrado que la capa híbrida es inestable en medio acuoso debido a la hidrólisis que se produce, este proceso de degradación se explicaría debido a la acción de metaloproteinasas endógenas que ataca fibras colágenas que no fueron cubiertas durante el proceso adhesivo por los monómeros (25).

Además, otro estudio demostró que adhesivos autograbantes y de grabado y lavado provocan una liberación similar de metaloproteinasas 2 y 9 por parte de los odontoblastos. Este fenómeno de liberación endógena actuaría directamente a través del fluido dentinario (35).

Los monómeros ácidos contenidos en los adhesivos dentinarios producirían la activación de las metaloproteinasas inactivas presentes. Al ser grabada la dentina con ácido ortofosfórico, las metaloproteinasas latente se desnaturalizan rápidamente. Como resultado, las fibrillas de colágeno que no están completamente protegidas por los monómeros de resina durante la hibridación dentinaria, quedan altamente susceptibles a la degradación hidrolítica en el tiempo, reduciéndose la fuerza de unión (25).

Las metaloproteinasas, en situaciones de normalidad, son secretadas en forma latente y activadas extracelularmente (16,19,31,36). Muchos ácidos son conocidos por su activación de las metaloproteinasas. Un pH inicial bajo se da cuando los monómeros acídicos de la resina se acoplan a la dentina, esto desencadena la expresión de las metaloproteinasas por parte del complejo pulpo-dentinario, lo que lleva a su vez a una elevación de la colagenólisis y gelatinólisis a altos niveles (37). También hay quienes plantean que el ácido ortofosfórico las inactiva y son los sistemas adhesivos quienes las activan(37). Se ha descrito que son esos sistemas los responsables de la ruptura del triple hélice de las fibras colágenas y su consecuente degradación (25).

Esta actividad colagenolítica y gelatinolítica de los componentes de la matriz dentinaria puede ser suprimida por inhibidores de proteasas, “Tissue inhibitors of metalloproteinases” (TIMPs), quienes desarrollaron un rol inhibitor durante la dentinogénesis (30). Además, bajo condiciones fisiológicas, la actividad y expresión de estas metaloproteinasas es regulada a nivel de la transcripción del precursor de zimógenos a través de interacciones con componentes específicos de la matriz extracelular, lo que indicaría que la inhibición de metaloproteinasas podría ser beneficiosa en la preservación de la capa híbrida .

Se han identificado ciertas metaloproteinasas y sus TIMPs en estructuras dentarias humanas y se ha reportado que juegan un rol diferente en varios procesos fisiológicos y patológicos durante la formación y mantenimiento del complejo pulpo-dentinario humano. Entre estas metaloproteinasas, la distribución de gelatinasas con habilidad de degradar colágeno (MMP-2 y MMP-9) y sus inhibidores, es de particular interés, debido a que tienen un importante papel en la formación y mineralización dental, así como en el proceso de caries y en la degradación de la capa híbrida. De hecho, el desequilibrio entre metaloproteinasas activadas y sus TIMPs resulta en destrucción patológica o acumulación en la matriz extracelular (28).

3.6 Métodos de análisis de metaloproteinasas en dentina.

Debido a la importancia que las metaloproteinasas han adquirido en la adhesión y en la durabilidad de la capa híbrida, muchos autores han desarrollado estudios con diferentes metodologías para aclarar más específicamente su participación en aquellos procesos.

La presencia de MMP-2 en la corona dentaria no era signo necesariamente de su actividad, por lo que distintos investigadores, han realizado ensayos para establecer más específicamente la presencia, cantidad, concentración y actividad de las metaloproteinasas en las diferentes regiones de dentina coronaria. El paso previo en común de la mayoría de estos estudios fue la separación de corona y raíz dentaria en molares humanos extraídos, los que fueron desinfectados y luego seccionados en regiones de dentina interna (DI), media (DM) y externa (DE). Una vez desmineralizados éstos fueron pulverizados para así llevar a cabo los ensayos.

A continuación, se describen los diferentes tipos de ensayos utilizados para estudiar las metaloproteinasas en dentina humana coronaria.

3.6.1 Presencia y cantidad de metaloproteinasas en dentina.

a) ELISA: del inglés Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, es un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas. Es una técnica de inmunoensayo en la cual se detecta un antígeno inmovilizado mediante un anticuerpo unido a una enzima, lo que es capaz de generar un producto detectable como cambio de color o de algún otro tipo y así medir la concentración de proteínas en la muestra analizada, como es en este caso, metaloproteinasas (38).

La unión anticuerpo-enzima o antígeno-enzima se produce durante un determinado período de tiempo para producir una solución coloreada, la que puede ser cuantificada por medio de un espectrofotómetro como lo fue en el caso del estudio realizado por Lee W. Boushell et al en el año 2011 para detectar distribución y actividad de MMP-2 en dentina coronaria ante la presencia de caries (39).

Es así como se utilizó este test para determinar la concentración de MMP-2, en sus formas inmadura, madura y también complejo MMP-2/TIMP-2 en las diferentes regiones de la dentina. La concentración de MMP-2 basada en lo medido con ELISA fue mayor en dentina externa (DE) (incluyendo el límite amelo cementario), seguida por la región interna y por último la dentina media (36).

Niu L.N. et al en 2011 detectaron las concentraciones de MMPs (-2 y -9) y TIMPs (-1 y -2) a diferentes profundidades de la dentina coronal usando ELISA. Todas las pruebas se llevaron a cabo tres veces también. Las concentraciones finales de las cuatro proteínas en este caso (MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2) se expresaron como ng/mg, y se obtuvieron dividiendo los resultados por la concentración total de proteínas. En este estudio MMP-2 fue la gelatinasa principal de la dentina y se concentró en los odontoblastos, dentina interna (DI) y en la unión amelodentinaria (DE). TIMP-2 fue co-localizada con MMP-2, principalmente en los odontoblastos, pero su concentración era baja. Tanto MMP-9 y TIMP-1 mostraron una disminución de su distribución en la profundidad de las capas de dentina superficial o externa (DE), a pesar de eso la concentración de TIMP-1 fue mucho mayor que la de la MMP-9 (38).

b) Ensayo colorimétrico: QuantiSir analysis TM gene knockdown: Utilizado para cuantificar la cantidad de metaloproteinasas presentes en la dentina mineralizada como en la parcialmente desmineralizada. Este sistema de ensayo colorimétrico permite la medición directa de los niveles de proteínas específicas en lisados de células o tejidos (en este caso de dentina). La proteína marcada (MMP-3 esta vez) puede ser identificada mediante la utilización de anticuerpos objetivo-específicos y la cuantificación colorimétrica, a través de un sistema de reacción de un anticuerpo cromogénico. Se observó que una pequeña cantidad (17%) de MMP-3 está presente en forma de proteína sin consolidar (unbound

protein), mientras que el resto está unida a la matriz mineralizada. Los resultados indicaron claramente que la dentina mineralizada contiene más MMP-3 comparada con la desmineralizada (40).

c) Identificación inmunohistoquímica: Utilizada con el fin de medir la concentración de metaloproteinasas. Corresponde a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta reacción es visible al microscopio sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz, o produce coloración (38).

Los resultados obtenidos con este tipo de ensayo revelaron que MMP-2 está altamente concentrada en los odontoblastos, preentina y la unión amelodentinaria. MMP-9 se observó más en los odontoblastos y la preentina de la dentina interna, mientras que en la región media de la dentina coronal (DM) se encontró débil y casi imperceptible en dentina superficial o externa (DE). Tanto la tinción positiva de MMP-2 y MMP-9 se asoció principalmente a los lúmenes de los túbulos dentinarios en la región interna de dentina (DI), y con la matriz dentinaria en la dentina media (DM). Para TIMP-1, se observó un patrón de distribución similar a la MMP-9, excepto que la inmunorreactividad era más fuerte. En la unión amelodentinaria exhibió una tinción positiva débil. Además, las áreas de inmunorreactividad de TIMP-1 se encuentran principalmente en los lúmenes de los túbulos dentinarios. A diferencia de las otras tres proteínas, los TIMP-2 mostraron sólo tinción débil en los odontoblastos y preentina. Una doble marcación de inmunofluorescencia mostró que la MMP-2 está co-localizada con TIMP-2 principalmente en odontoblastos. Por otro lado, la co-localización de MMP-9 y TIMP-1 se pudo identificar en los odontoblastos y la dentina interna. La inmunorreactividad de TIMP-1 se encuentra principalmente en el lumen de los túbulos dentinarios de la dentina interna, mientras que de la MMP-9 se observó más predominantemente en los procesos de odontoblastos y en la matriz dentinaria de esta región dentinaria (38).

La identificación inmunohistoquímica de MMP-3 esta vez observada por SEM (Scanning Electronic Microscope) reveló también patrones de inmunomarcación positivos para MMP-3 predominantemente localizada en la red de colágeno fibrilar intertubular a lo largo de toda la dentina coronaria, lo que muestra que MMP-3, está directa o indirectamente unida a las fibrillas de colágeno, y por lo tanto presente en dentina humana sana (40).

d) Inmunoreactividad: Western blott: es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas y su concentración en una muestra determinada (una mezcla compleja de proteínas, como un extracto tisular, dentina, por ejemplo). Mediante una electroforesis se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc. Hay casi tantas posibilidades como tipos de electroforesis existen. Luego son transferidas a una membrana absorbente para poder buscar la proteína de

interés con anticuerpos específicos contra ella. Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática, fluorescencia entre otros métodos. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteínas.

Lee W. Boushell et al observaron en su estudio que la concentración media de MMP-2 por milígramo de proteína de dentina en las regiones dentinarias fue significativamente diferente. El patrón de concentración de MMP-2 fue DE>DI>DM. (36)

3.6.2 Actividad metaloproteinasas en dentina.

a) Zimografía gelatina: Es una técnica electroforética que permite observar actividad de enzimas. En este contexto, la actividad gelatinolítica y colagenolítica, es decir proteolítica, de las metaloproteinasas.

Se realiza con poliacrilamida y, a diferencia de las electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes, se utiliza en condiciones suaves (sin agentes reductores) para evitar la pérdida de actividad de las enzimas estudiadas.

Para el análisis de la actividad de las proteasas, la polimerización de la poliacrilamida se realiza en presencia de gelatina soluble. De esta manera el gel resultante contendrá gelatina (colágeno desnaturizado).

Luego de realizar la corrida electroforética de las muestras, el gel se lava en una solución con Tritón X100 y se incuba en un buffer apropiado que favorece la actividad de las proteasas. El resultado de este tipo de geles, es que en la zona donde se ubicó una proteasa la gelatina habrá sido degradada. Esta degradación se revela tiñendo el gel con colorantes que tengan afinidad por proteínas, observándose una zona blanca donde hubo degradación, es decir actividad (38).

Lee W. Boushell et al describieron la actividad gelatinolítica de la MMP-2 en dentina interior, media y exterior. La zimografía gelatina reveló actividad gelatinolítica en DI, DM y DE. Se detectó una débil actividad gelatinolítica de MMP-2 inmadura en los extractos de DI y DM. También se detectó débil actividad gelatinolítica en los extractos de DI y DM, lo que probablemente representa el dominio catalítico de la MMP-2. La concentración de MMP-2 fue más alta en el DE, seguida por DI y DM. La diferencia en las concentraciones medias de MMP-2 en DI, DM y DE fue estadísticamente significativa, lo cual indica que hay diferencias regionales en la concentración de MMP-2. El patrón de concentración media (DE> DI> DM) fue consistente también para todos los tres experimentos de ELISA (36).

Se han detectado también otras formas de gelatinasas; MMP-9 además de la ya mencionada MMP2 La más fuerte actividad gelatinolítica se encontró en la región interna de la dentina coronal, mientras que la más débil se detectó en dentina externa. La actividad proteolítica de MMP-2 fue aparentemente mayor que la de MMP-9 (38).

b) Zimografía caseína: Técnica electroforética utilizada para observar actividad enzimática. Se ha observado actividad proteolítica de MMP-3 en el polvo de dentina desmineralizada. El nivel detectado de MMP-3 en dentina pulverizada parcialmente desmineralizada fue de 2,732ng/ μ L mientras que en dentina mineralizada este número creció a 3,280 ng/ μ L. (40).

Con todos estos métodos de análisis de las metaloproteinasas se ha podido evidenciar que las colagenasas no sólo están presentes en la dentina, sino que también tienen actividad en ella.

3.7 Inhibidores de metaloproteinasas.

Diversos agentes se han testado para inhibir la acción de las metaloproteinasas. Esta actividad puede ser disminuida por agentes tanto endógenos como exógenos.

Los endógenos se originan en distintos tipos de células y corresponden a los llamados inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) los cuales se encuentran en la mayor parte del reino animal. En el caso del ser humano se han descrito TIMPs del 1 al 4, siendo el 3 aquel que posee un mayor espectro de acción. Inicialmente fueron reconocidos como inhibidores de las metaloproteinasas, pero actualmente se les reconoce un rol inhibitorio de múltiples desintegrin metaloproteinasas.

Los TIMPs tienen un rol regulador de las metaloproteinasas que ayudan en la conformación de la matriz extracelular actuando en múltiples sitios con enzimas específicas que tienen actividad inhibitoria sobre distintos tipos de metaloproteinasas de la matriz.

TIMPs poseen también actividad biológica independiente a las metaloproteinasas, incluyendo efectos sobre el crecimiento, diferenciación y migración celular, anti angiogénesis y actividad en la apoptosis celular (41).

En el caso de los inhibidores exógenos de las metaloproteinasas, se han realizado diversos estudios con el objetivo de limitar la liberación o efecto de éstas, intentando de esta manera impedir la degradación de la capa híbrida, intentando aumentar la duración de la interfase de unión entre la dentina y los materiales restauradores a lo largo del tiempo. Para esto se han utilizado diferentes inhibidores sintéticos de metaloproteinasas como EDTA, cloruro de benzalconio y clorhexidina.

3.7.1 EDTA.

Se ha experimentado con EDTA al 24% y al 17% en gel por 40-60 segundos, para la posterior utilización de cementos de resina autoadhesivos. Es una alternativa válida para prolongar la estabilidad de la unión resina-dentina ya que inhibe las metaloproteinasas (42).

A pH neutro es considerado un agente quelante de la dentina según su concentración y tiempo de aplicación. El EDTA disuelve la fase mineral dentinaria sin cambiar las proteínas de la dentina, lo que evita las principales alteraciones de la estructura fibrilar de colágeno. Esto le confiere estabilidad a la matriz orgánica. El grado de desmineralización de la dentina tras la aplicación de EDTA se reduce en comparación con el grabado con ácido fosfórico; se elimina hidroxiapatita selectivamente y hay una eliminación parcial del barro dentinario.

Al 17% por 60 segundos no provoca alteraciones en la superficie dentinaria. La reacción de quelación es autolimitante en presencia de calcio dentinario y se crea un compuesto de EDTA-Ca estable (42).

Se probó EDTA a una concentración de 24% para combinar sus propiedades de inhibición de metaloproteinasas con la eliminación de la capa de barro dentinario más pronunciada en un intento de promover una mejor interacción entre el cemento de resina y la dentina subyacente sin comprometer la resistencia de la unión. El pre-tratamiento de la dentina con EDTA al 24% en gel aumentó considerablemente la adherencia del cemento de resina autoadhesivo a dentina (42).

Cabe destacar que el comportamiento del EDTA es diferente según el cemento con el que se trabaje. El gel de EDTA al 24% por 45 segundos mejora la unión de RelyX U100 a la dentina, mientras que disminuye la resistencia de la unión al usarlo por 60 segundos previo a RelyX ARC (42).

Osorio R. et al analizaron el comportamiento del EDTA como inhibidor de metaloproteinasas aplicándolo como agente de grabado. Su acción inhibidora no pudo ser apreciada ya que, tras la aplicación éste fue lavado con agua y removido casi en su totalidad, lo que impidió que quedaran residuos de EDTA suficientes que a lo largo del tiempo inhibieran a las metaloproteinasas. Para que esto se hubiese logrado debería haber quedado un exceso relativo de EDTA como para que una porción se inactivara con los iones calcio, y el EDTA restante actuara. El EDTA residual mínimo que quedó no causó inhibición de las metaloproteinasas (9).

3.7.2 Cloruro de benzalconio.

El cloruro de benzalconio (BAC) es un bactericida e inhibidor de la actividad viral. Algunos fabricantes de ácido ortofosfórico agregan BAC al 1% a sus grabantes.

En relación a la fuerza de adhesión, estudios de adhesión de brackets en esmalte demostraron que la incorporación de BAC a los adhesivos no interfirió en su fuerza de adhesión, pero tampoco la mejoró (43).

Además de su acción antiséptica, es también un surfactante catiónico. Se especuló que, debido a que el BAC es una molécula catiónica tal como la clorhexidina, ambos potentes agentes antimicrobianos, éste podía tener acción anti-MMPs (44).

Tezvergil-Mutluay et al realizaron ensayos para analizar la habilidad del BAC para inhibir las metaloproteinasas de la matriz dentinaria, específicamente MMP-2, MMP-8 y MMP-9 (44). La dentina coronal media de terceros molares de pacientes jóvenes (18-24 años) fue almacenada en una solución de agua y un antimicrobiano (0,02% ácido sódico) para prevenir el crecimiento de bacterias que contaminaran la muestra, por 30 días a 4°C. Se cortaron discos de dentina con fresas de alta velocidad y refrigeración, luego de lo cual fueron divididos cada uno en 4. Los cuartos de discos fueron inmersos en otro medio específico por 10 minutos para después ser pulverizados. Una mitad del polvo se dejó mineralizada mientras que la otra mitad se desmineralizó con ácido ortofosfórico al 10% a 25°C por 8 horas. Se lavaron ambas muestras y se dejaron inmersas en una solución buffer.

Para determinar si el cloruro de benzalconio puede inhibir metaloproteinasas se utilizó un kit de enzimas, metaloproteinasas (de AnaSpec Inc.) el cual tras una reacción química libera un producto de color. Gracias a la liberación de este producto coloreado es posible la cuantificación de la inhibición enzimática.

Agregando el inhibidor a diferentes concentraciones en un medio de incubación de enzimas, fue posible determinar si es que éstas podían inhibir la acción de las metaloproteinasas en el tiempo.

Se determinó la dosis de BAC con la que hubo inhibición de MMP-9. Una vez obtenida esa información se determinó la concentración de BAC utilizada, luego se usaron concentraciones más altas que se probaron con MMP-2 y -8.

Cuando MMP-9 fue incubada con concentraciones crecientes de BAC la enzima fue crecientemente inhibida, lográndose una inhibición de un 100% al utilizar BAC entre el 0,5 y 1,0%. Esto sucedió de igual forma para las tres metaloproteinasas; MMP-2, MMP-8 y MMP-9. Hubo una baja inhibición enzimática a concentraciones de cloruro de benzalconio de 0,05% o menores. Estos ensayos probaron la eficacia del BAC en la inhibición de metaloproteinasas.

Cabe destacar que la concentración de BAC en los medios de incubación fue continua, para lo cual fue necesario agregar este inhibidor en reiteradas ocasiones, de manera tal que, la concentración se mantuviera siempre constante. Esta medida es imposible de aplicar clínicamente. De hecho, al aplicar BAC al 0,5% a dentina desmineralizada por 10 o 60 segundos y luego inmersa en un medio de incubación, el porcentaje de inhibición cayó significativamente de un 85,7 a 55,4%, y a 57,1% respectivamente. Al embeber dentina desmineralizada en BAC al 1,0% por 10 o 60 segundos y luego, al igual que el caso anterior, ser inmersa en un medio de incubación, el porcentaje de inhibición fue de 63,6% y 66,1% respectivamente. Esto debido a que la concentración de BAC no fue constante, sino que éste fue aplicado sólo al inicio (38).

Los resultados obtenidos por Tezvergil-Mutluay et al indicaron que el cloruro de benzalconio se une a la dentina e inhibe metaloproteinasas de la matriz dentinaria. Las enzimas son particularmente susceptibles a su inactivación con BAC cuando sus propiedades surfactantes disocian la estructura terciaria tridimensional de las enzimas.

A un 0,5% o más, el cloruro de benzalconio inhibe las MMPs (-2, -8 y -9) en un 100%. Al ser la dentina inmersa en BAC al 0,5% por 10 segundos, la inhibición fue entre 55 y 66%, lo que significa que clínicamente se necesita su aplicación en dentina por 10 segundos para obtener una significativa inhibición de proteasas dentinarias (MMPs) por el cloruro de benzalconio, pero no total. Esto debido a que el BAC se une a la dentina desmineralizada, donde, además de unirse al colágeno difunde hacia adentro del agua intersticial en los túbulos dentinarios y los espacios interfibrilares. No se une realmente, sino que queda en el agua, por lo tanto, es fácilmente removido por el lavado, reduciéndose su unión en un 50%. Es el BAC residual el que queda fuertemente unido al colágeno de la dentina desmineralizada y es quien inhibe la acción de las metaloproteinasas (44).

3.7.3 Clorhexidina.

La clorhexidina es un antiséptico de amplio espectro, una bisguanida catiónica ampliamente utilizada. Se ha declarado que su uso sobre la dentina grabada, lavada y secada previene la degradación de las fibras colágenas (3). Así, además de su conocida acción como antiséptico, también actúa como un potente inhibidor de las metaloproteinasas (45,46).

A bajas concentraciones la clorhexidina ha mostrado un efecto inhibitorio de metaloproteinasas a través de mecanismos de quelación de cationes que secuestran iones metálicos como calcio y zinc, los que inhiben la activación catalítica de las metaloproteinasas (47).

Se ha demostrado que inhibe la actividad de las metaloproteinasas MMP-2, -8 y -9 directamente a concentraciones extremadamente bajas. Además, previene o minimiza la

autodegradación de las fibras colágenas expuestas en capas híbridas incorrectamente formadas, lo que contribuye a la estabilidad a largo plazo de la capa híbrida y su fuerza de unión (9,48-50).

También su aplicación después del grabado ácido podría aumentar la capacidad de los primers de impregnar a la dentina debido a ciertas propiedades como su fuerte carga iónica positiva; enlaces listos para los grupos fosfato y una fuerte afinidad a las superficies de los dientes que se incrementa con el grabado ácido (8).

Su aplicación previa a la imprimación del primer ayuda significativamente a disminuir el grado de reducción de fuerza de unión (bond strength) entre resina y dentina a lo largo del tiempo (51).

Al ser utilizada como una etapa más del proceso adhesivo ésta puede enlentecer o detener la reducción de la fuerza de unión entre la dentina y las resinas en el tiempo. También puede inhibir la degradación de fibras colágenas en la capa híbrida (9,47,52) .

Algunos investigadores, han aplicado una solución de digluconato de clorhexidina en concentraciones del 0,2% o 2% aplicándola directamente en la cavidad en motitas de algodón estériles embebidas en la solución, después de haber grabado con ácido ortofosfórico, lavado con agua y secado la cavidad dejando dentina húmeda expuesta (53,54). Otros autores han estudiado la acción de la clorhexidina incorporada a otros compuestos como primers y adhesivos tratando de esta manera de respetar el principio de simplicidad para los protocolos adhesivos obteniendo resultados variados (55,56).

4 Hipótesis.

4.1 Hipótesis nula.

- No existe diferencia significativa en relación a la influencia de la clorhexidina en los valores de resistencia adhesiva medidas en resistencia a la microtracción y resistencia a las fuerzas de cizallamiento a diferentes tiempos de almacenamiento para adhesivos de grabado y lavado, y adhesivos autograbantes de uno y dos tiempos pasos.

4.2 Hipótesis alternativa.

- Existe diferencia significativa en relación a la influencia de la clorhexidina en los valores de resistencia adhesiva medidas en resistencia a la microtracción y resistencia a las fuerzas de cizallamiento a diferentes tiempos de almacenamiento para adhesivos de grabado y lavado, y adhesivos autograbantes de uno y dos tiempos operatorios.

5 Objetivos.

5.1 General.

- Evaluar a distintos tiempos, los valores de resistencia a la microtracción y resistencia a las fuerzas de cizallamiento obtenidos con el uso de clorhexidina al 2% durante el protocolo de adhesión de adhesivos de grabado y lavado y adhesivos autograbantes de uno y dos pasos.

5.2 Específicos.

- Evaluar a las 72 horas, 3 y 6 meses los valores de resistencia a la microtracción y resistencia a las fuerzas de cizallamiento obtenidos con el uso de clorhexidina al 2% durante el protocolo adhesivo de adhesivos monocomponentes en la técnica grabado ácido y adhesivo.
- Evaluar a las 72 horas, 3 y 6 meses los valores de resistencia a la microtracción y resistencia a las fuerzas de cizallamiento obtenidos con el uso de clorhexidina al 2% durante el protocolo adhesivo de adhesivos autograbantes de dos pasos.
- Evaluar a las 72 horas, 3 y 6 meses los valores de resistencia a la microtracción y resistencia a las fuerzas de cizallamiento obtenidos con el uso de clorhexidina al 2% durante el protocolo adhesivo de adhesivos autograbantes de un paso (Single Bond universal de 3M ESPE).
- Comparar los valores de resistencia a la microtracción y resistencia a las fuerzas de cizallamiento obtenidos con y sin el uso de clorhexidina al 2% a las 72 horas, 3 meses y 6 meses utilizando distintos adhesivos.
- Comparar los tipos de fractura, adhesiva, cohesiva o mixta al realizar el test de resistencia a las fuerzas de cizallamiento con y sin el uso de clorhexidina al 2% a las 72 horas, 3 meses y 6 meses utilizando distintos adhesivos.

6 Material y método.

Para la realización de este estudio experimental in vitro se seleccionaron 216 terceros molares humanos superiores e inferiores libres de cualquier alteración de su integridad anatómica, libres de caries y de materiales de relleno de cualquier tipo. Durante el período de estudio se almacenaron hidratados en agua destilada a temperatura ambiente.

En la tabla 1 se señalan los grupos, sus componentes y su codificación.

Tabla 1: Identificación de los grupos, componentes y su codificación.

	Detalle de los componentes utilizados	Codificación
Grupo 1	Adper Scotchbond 1 XT + Clorhexidina.	ASB+CHX
Grupo 2	Adper Scotchbond 1 XT.	ASB
Grupo 3	Adper Prompt L-Pop + Clorhexidina.	APL+CHX
Grupo 4	Adper Prompt L-Pop	APL
Grupo 5	Single Bond Universal + Clorhexidina	SBU+CHX
Grupo 6	Single Bond Universal	SBU

6.1 Resistencia a la fuerza de cizallamiento.

Para el test de resistencia a las fuerzas de cizallamiento, 144 dientes se montaron en resina acrílica para facilitar la preparación de las muestras. Se eliminó parte de la superficie oclusal cortando horizontalmente el diente con la máquina de corte Isomet 100 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) para dejar expuesta la dentina y se desgastó con discos de lija grano 600 bajo una corriente constante de agua hasta dejar una superficie plana. A continuación, se efectuó la preparación de las muestras las que se dividieron en seis grupos de 24 dientes cada uno asignados de manera randomizada a través del software Stata, asignación que no fue conocida por el investigador. Cada grupo constaba de 24 dientes.

En el primer grupo (ASB+CHX) se aplicó ácido ortofosfórico al 37% por 15 segundos y se enjuagó con agua por 30 segundos. Posteriormente se secó ligeramente con aire y se dispuso con un micropincel un desinfectante cavitario de clorhexidina 2% (Cavity Cleanser, Bisco, Inc., Schaumburg, IL, USA) frotando durante 20 segundos, se enjuagó con agua en spray por 20 segundos y posteriormente se secó suavemente por 10 segundos. Posteriormente, se aplicó un adhesivo monocomponente Adper Scotchbond 1 XT de la empresa 3M (St. Paul, MN, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se restauró con la resina compuesta Filtek Z350 XT de la empresa 3M (St. Paul, MN, USA), aplicándola a través de un disco con un orificio central ($\varnothing = 3,0$ mm) (Ultradent, South Jordan, UT, USA) el cual se centró en el diente para obtener la barra de composite estandarizada para la prueba.

En el segundo grupo (ASB) se aplicó ácido ortofosfórico al 37% por 15 segundos y se enjuagó con agua por 30 segundos. Posteriormente, se secó ligeramente con aire y se aplicó un adhesivo monocomponente Adper Scotchbond 1XT de la empresa 3M (St. Paul, MN, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se restauró con la resina compuesta Filtek Z350 XT de la empresa 3M (St. Paul, MN, USA), aplicándola a través de un disco con un orificio central ($\varnothing = 3,0$ mm) (Ultradent, South Jordan, UT, USA) el cual se centró en el diente para obtener la barra de composite estandarizada para la prueba.

En el tercer grupo (APL+ CHX) se aplicó con un micropincel un desinfectante cavitario (clorhexidina 2%) frotando durante 20 segundos, se enjuagó con agua en spray por 20 segundos y posteriormente se secó suavemente por 10 segundos. A continuación, se aplicó un adhesivo autograbante Adper Prompt L-Pop de la empresa 3M (St. Paul, MN, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se restauró con la resina compuesta Filtek Z350 XT de la empresa 3M (St. Paul, MN, USA), aplicándola a través de un disco con un orificio central ($\varnothing = 3,0$ mm) (Ultradent) el cual se centró en el diente para obtener la barra de composite estandarizada para la prueba.

En el cuarto grupo (APL) se aplicó un adhesivo autograbante Adper Prompt L-Pop siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se restauró con la resina compuesta Filtek Z350 XT

de la empresa 3M, aplicándola a través de un disco con un orificio central ($\varnothing = 3,0$ mm) (Ultradent) el cual se centró en el diente para obtener la barra de composite estandarizada para la prueba.

En el quinto grupo (SBU+CHX) se aplicó con un micropincel un desinfectante cavitario (clorhexidina 2%) frotando durante 20 segundos, se enjuagó con agua en spray por 20 segundos y posteriormente se secó suavemente por 10 segundos. A continuación, se aplicó adhesivo Single Bond Universal de la empresa 3M (St. Paul, MN, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se restauró con la resina compuesta Filtek Z350 XT de la empresa 3M (St. Paul, MN, USA), aplicándola a través de un disco con un orificio central ($\varnothing = 3,0$ mm) (Ultradent) el cual se centró en el diente para obtener la barra de composite estandarizada para la prueba.

En el sexto grupo (SBU) se aplicó adhesivo Single Bond Universal siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se restauró con la resina compuesta Filtek Z350 XT de la empresa 3M (St. Paul, MN, USA), aplicándola a través de un disco con un orificio central ($\varnothing = 3,0$ mm) (Ultradent) el cual se centró en el diente para obtener la barra de composite estandarizada para la prueba.

Todas las muestras se almacenaron en un agua destilada en un ambiente a temperatura ambiente hasta el momento de realizar el test.

Se testaron 8 dientes de cada uno de los grupos a las 72 horas, mismo procedimiento se realizó a los 3 y a los 6 meses. Para realizar el test se utilizó el dispositivo de prueba de resistencia al cizallamiento de la empresa Ultradent (Utah, USA) y se realizó en la máquina de ensayos universal (Z100, Zwick Roell, Germany).

La resistencia al cizallamiento fue realizada con una velocidad del cabezal de 0,5 mm/min, y calculada en Mega pascales (MPa) tomando en consideración el área seccional de la muestra.

Después de realizada la prueba de resistencia al cizallamiento las superficies fueron observadas en un microscopio estereoscópico para identificar el tipo de fractura, las cuales fueron clasificadas en adhesiva (falla entre el diente y la restauración), cohesiva en dentina (falla en la dentina) cohesiva en composite (Falla dentro de la restauración) y mixta (Adhesiva y cohesiva).

6.2 Resistencia adhesiva a la microtracción.

Para las pruebas de resistencia adhesiva a la microtracción 72 dientes se montaron en resina acrílica para facilitar la preparación de las muestras. Se eliminó parte de la superficie oclusal cortando horizontalmente el diente con la máquina de corte Isomet 100 (Buehler, Lake Bluff, IL, USA) para dejar expuesta la dentina y se desgastó con discos de lija grano 600 bajo una corriente constante de agua hasta dejar una superficie plana.

A continuación, se efectuó la preparación de las muestras las que se dividieron en seis grupos de 12 dientes cada uno.

En el primer grupo se aplicó ácido ortofosfórico al 37% por 15 segundos y se enjuagó con agua por 30 segundos. Posteriormente, se secó ligeramente con aire y se dispuso con un micropincel un desinfectante cavitario (clorhexidina 2%) frotando durante 20 segundos, se enjuagó con agua en spray por 20 segundos y posteriormente se secó suavemente por 10 segundos. Posteriormente se aplicó un adhesivo monocomponente Adper Scotchbond 1 XT siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se restauró con la resina compuesta Filtek Z350 XT de la empresa 3M (St. Paul, MN, USA) formando un bloque de 5 mm de altura en la superficie dentinaria del diente desgastado, utilizando la técnica incremental y siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el segundo grupo se aplicó ácido ortofosfórico al 37% por 15 segundos y se enjuagó con agua por 30 segundos. Posteriormente, se secó ligeramente con aire y se aplicó un adhesivo monocomponente Adper Scotchbond 1XT siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se restauró con la resina compuesta Filtek Z350 XT, formando un bloque de 5 mm de altura en la superficie dentinaria del diente desgastado, utilizando la técnica incremental y siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el tercer grupo se aplicó con un micropincel un desinfectante cavitario (clorhexidina 2%) frotando durante 20 segundos, se enjuagó con agua en spray por 20 segundos y se secó suavemente por 10 segundos. A continuación, se aplicó un adhesivo autograbante Adper Prompt L-Pop siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se restauró con la resina compuesta Filtek Z350 XT de la empresa 3M, formando un bloque de 5 mm de altura en la superficie dentinaria del diente desgastado, utilizando la técnica incremental y siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el cuarto grupo se aplicó un adhesivo autograbante Adper Prompt L-Pop siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se restauró con la resina compuesta Filtek Z350 XT de la empresa 3M, formando un bloque de 5 mm de altura en la superficie dentinaria del diente desgastado, utilizando la técnica incremental y siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el quinto grupo se aplicó con un micropincel un desinfectante cavitario (clorhexidina 2%) frotando durante 20 segundos, se enjuagó con agua en spray por 20 segundos y se secó

suavemente por 10 segundos. A continuación, se aplicó un adhesivo Single Bond Universal siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se restauró con la resina compuesta Filtek Z350 XT de la empresa 3M, formando un bloque de 5 mm de altura en la superficie dentinaria del diente desgastado, utilizando la técnica incremental y siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las muestras se almacenaron en un agua destilada en un ambiente a 37 ° C. hasta el momento de realizar el test.

En el sexto grupo se aplicó adhesivo Single Bond Universal siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se restauró con la resina compuesta Filtek Z350 XT de la empresa 3M, aplicándola a través de un disco con un orificio central ($\varnothing = 3,0$ mm) (Ultradent) el cual se centró en el diente para obtener la barra de composite estandarizada para la prueba, formando un bloque de 5 mm de altura en la superficie dentinaria del diente desgastado, utilizando la técnica incremental y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Todas las muestras se almacenaron en un agua destilada en un ambiente a 37 ° C. hasta el momento de realizar el test.

Se testeó 4 dientes de cada uno de los grupos a las 72 horas, mismo procedimiento se realizó a los 3 y 6 meses. Para realizar el test se efectuó la preparación de las muestras seccionando los dientes restaurados longitudinalmente en los ejes "x" e "y" usando una sierra de diamante en una máquina Isomet 1000 para obtener barras con un área de sección transversal de 1mm² con aproximadamente 5 mm de material compuesto y 5 mm de tejido de la dentina. (Siguiendo el método de Pashley) (57).

Cada barra se unió al dispositivo específico para esta prueba con pegamento en base a cianocrilato. Posteriormente, se realizó el test de resistencia a la microtracción para cada una de las barras en la máquina de ensayos universal (Z100, Zwick Roell, Germany) con una velocidad de cabezal de 0.5mm/minuto y medida en Mpa.

Después de realizar la prueba, cada uno de las barras se evaluó bajo un microscopio estereoscópico para identificar los tipos de fractura (Cohesiva, adhesiva o mixto).

7 Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de las pruebas de resistencia a las fuerzas de cizallamiento y de resistencia a la micro tracción, los datos fueron analizados a través de ANOVA de un solo factor y pruebas de post-hoc utilizando un nivel de significancia de 0.05. De esta manera se analizaron los datos de los distintos métodos adhesivos, en los grupos con y sin clorhexidina y en relación con el tiempo de almacenamiento.

8 Resultados.

8.1 Resistencia a las fuerzas de cizallamiento.

Los valores de resistencia a las fuerzas de cizallamiento se muestran en la tabla 2, divididas de acuerdo al sistema adhesivo, uso y ausencia de clorhexidina y tiempos de almacenamiento.

Para todos los tiempos de almacenamiento Adper prompt L muestra los menores valores de adhesión. Al comparar los valores de los sistemas adhesivos para los mismos tiempos de almacenamiento se advierte que los grupos de Adper scotch Bond con y sin clorhexidina (ASB+CHX y ASB) respectivamente, y los grupos de Single bond Universal con y sin clorhexidina (SBU +CHX y SBU) presentan los valores mayores de adhesión a las 72 horas no habiendo diferencia significativa entre ellos ($P \geq 0.05$).

El tratamiento con clorhexidina aumenta los valores de resistencia al cizallamiento para todos los sistemas adhesivos a los 3 y 6 meses. En cambio, a las 72 horas no existen diferencias significativas al comparar los valores de resistencia al cizallamiento entre los grupos con o sin clorhexidina ($P \geq 0.05$).

Al comparar los valores de resistencia al cizallamiento a los 3 meses de almacenamiento, todos los grupos equivalentes, (mismo sistema adhesivo comparando el uso o no de clorhexidina) en aquellos grupos con clorhexidina presenta mayores valores de adhesión que los no tratados ($P \leq .05$).

En este mismo sentido, a los 3 meses cuando se comparan entre sí todos los protocolos adhesivos que usaron clorhexidina, (ASB+CHX), (APL+CHX) y (SBU+CHX), el grupo 5 (SBU+CHX) presenta los más altos valores de adhesión presentando diferencias significativas con el grupo 1 (ASB+CHX) ($P=0.000$) y con el grupo 3 (APL+CHX) ($P =0.000$).

Los grupos 1 (ASB+CHX) y 3 (APL+CHX) no presentaron diferencias significativas entre ellos ($P=0.966$).

Al comparar los grupos sin tratamiento de clorhexidina a los tres meses, el grupo de Single Bond (SBU) presenta los más altos valores de adhesión con diferencias significativas con el grupo de Adper Scotch bond (ASB) ($P=0.000$) y el grupo 4 de Adper prompt L (APL) ($P =0.000$), no existiendo diferencia estadísticamente significativa entre los grupos 2 y 4 ($P =0.958$).

Al evaluar los valores de adhesión a los seis (6) meses de almacenamiento todos los grupos sin tratamiento con clorhexidina disminuyen sus valores al compararlos con los grupos respectivos con tratamiento con clorhexidina ($P \leq 0.05$).

Los valores de resistencia al cizallamiento del sistema adhesivo Single Bond Universal independiente del uso o no de clorhexidina presenta los valores más altos de adhesión, ($P \leq 0.05$).

En relación a los grupos tratados con clorhexidina, el grupo 5 (SBU+ CHX) presenta significativamente los más altos valores de adhesión, ($P \leq 0.05$) en relación a los otros grupos tratados.

Los otros dos grupos con clorhexidina (ASB+CHX) y (APL+CHX) no presentan diferencias entre ellos ($p \leq 0,887$) a los 6 meses de almacenamiento.

Situación similar ocurre entre los grupos no tratados con clorhexidina donde Single Bond Universal (SBU) obtiene los valores más altos de resistencia al cizallamiento con diferencias significativas al compararlos con Adper Scotch Bond (ASB) ($P = .005$) y Prompt L pop (APL) ($P = 0.001$). no existiendo diferencias entre los otros dos grupos no tratados (ASB) y (APL) ($p=0.990$).

Al analizar los valores de resistencia al cizallamiento de cada sistema adhesivo a distintos tiempos de almacenamiento, la mayoría de los grupos presenta una disminución de los valores a los tres y seis meses. ($P \leq 0.05$), excepto para los grupos uno (ASB+CHX) y tres (APL+CHX), los cuales no muestran diferencias entre estos dos tiempos de almacenamiento ($P \geq 0.05$).

El grupo 2 (ASB) presenta una disminución significativa entre las 72 horas y los tres meses ($P = 0.000$) y también entre los tres y seis meses ($P = 0.044$).

Los grupos 4 (APL) y 6 (SBU) muestran una disminución estadísticamente significativa a los seis meses en relación a los 3 y seis meses de almacenamiento. ($P \leq 0.05$).

El grupo 5 (SBU+CHX) presenta un comportamiento distinto ya que los valores obtenidos a los tres meses son significativamente altos en relación a las 72 horas ($P = 0.000$) seis meses ($P =0 .000$).

En relación al patrón de falla, tal como se observa en la figura 1, en todos los grupos la falla mixta es la más observada, presentándose entre el 75 y 100% de los casos. La segunda falla más observada fue la cohesiva en dentina y por último la falla adhesiva fue observada en

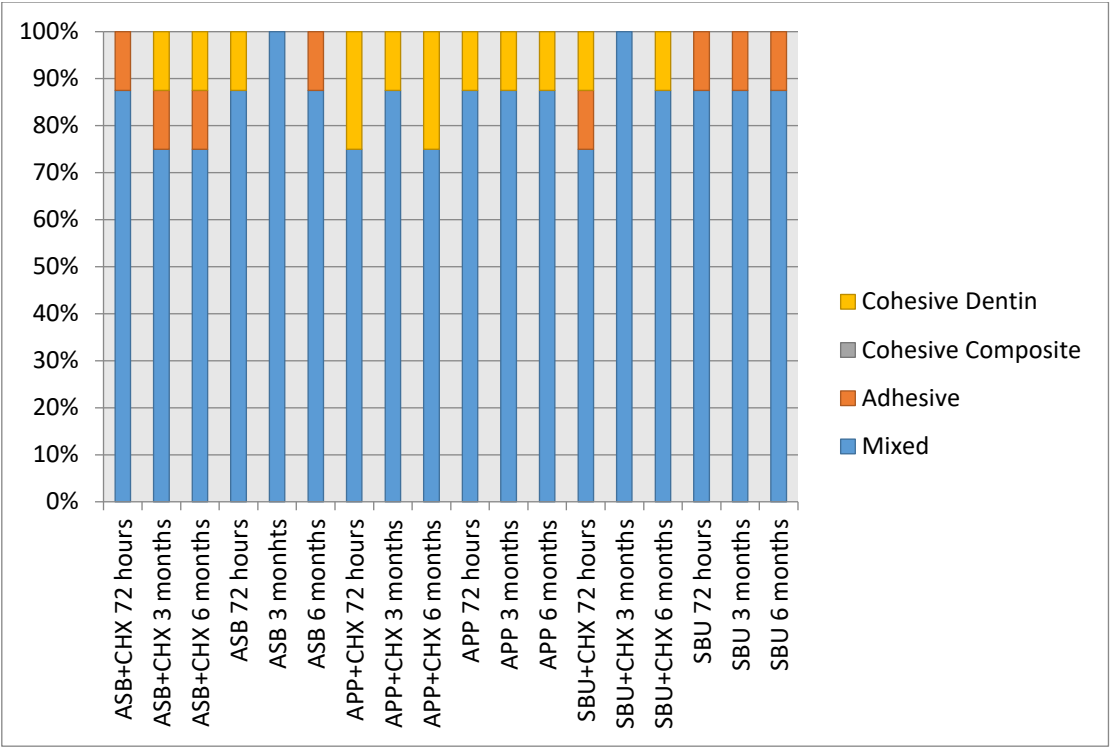
un rango entre el 0 y el 12,5%. La falla cohesiva en la resina compuesta no fue observada en ninguna de las muestras.

Tabla 2: Valores de Resistencia al cizallamiento (Desviación estándar) con los distintos tiempos de almacenamiento.

	72 hours	3 months	6 months
G1 – ASB + clorhexidina	28.98(4.99) Aa	20.91(4.57) Cb	16.57(1.19) Bb
G2 – ASB	24.87(3.20) ABa	12.42(4.32) Db	8.05(2.33) Dc
G3 – APL + clorhexidina	19.43(6.08) BCa	22.66(5.30) BCa	17.59(2.19) Ba
G4 – APL	17.13(3.56) Ca	14.26(3.66) Da	7.48(1.13) Db
G5 – SBU + clorhexidina	24.61(2.68) ABb	38.78(4.18) Aa	22.71(1.89) Ab
G6 – SBU	25.39(2.38) ABa	28.28(4.04) Ba	11.70(2.21) Cb

Las letras mayúsculas señalan diferencias entre columnas y minúsculas entre líneas. Si se repite la misma letra para la misma columna o misma fila significa que no existe diferencia significativa.

Figura 1: Distribución del modo de falla en relación al tiempo de almacenamiento, uso de clorhexidina y sistema adhesivo para la prueba de cizallamiento.



8.2 Resistencia a las fuerzas de micro tracción.

Los valores de resistencia a la micro tracción son presentados en la tabla 3.

El test ANOVA muestra en algunos grupos diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en relación a los tiempos de almacenamiento. ($p \leq 0.05$).

El tratamiento de la dentina con clorhexidina significó en algunos grupos, un aumento en los valores de adhesión en comparación con los grupos sin tratamiento, dependiendo del tiempo de almacenamiento.

Es así, como a las 72 horas ninguno de los grupos equivalentes presentó diferencias significativas entre el tratamiento o no con clorhexidina ($p \geq 0.05$).

Sin embargo, cuando se comparan distintos sistemas adhesivos con el mismo tratamiento dentinario sin clorhexidina, existen diferencias entre el grupo (APL), el que presenta valores significativamente menores comparado con el grupo 2 (ASB) ($p=0.010$) y el grupo 6 (SBU) ($p=0.004$).

A los tres meses de almacenamiento, se observa una disminución de los valores de resistencia a la micro tracción en los grupos 2 y 6 no tratados cuando se compara con los respectivos grupos 1 y 5 tratados con clorhexidina, en otras palabras, los protocolos adhesivos mencionados presentan valores mayores cuando la clorhexidina es aplicada ($p \leq 0.05$).

El grupo 5 (SBU+CHX) muestra los más altos valores de resistencia a la micro tracción comparados con los otros grupos tratados con clorhexidina. Los valores del grupo 5 son significativamente más altos que los del grupo 1 (ASB+CHX) ($p=0.007$) y que los del grupo 3 (APL+CHX) ($p=0.000$), los cuales no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Al comparar los grupos sin tratar, no existen diferencias significativas entre los grupos.

En el análisis de las muestras con 6 meses de almacenamiento se observa un patrón similar al que se observa en los datos obtenidos a los tres meses de almacenamiento; con una diferencia importante ya que ahora para todos los grupos las muestras tratadas con clorhexidina tienen valores de resistencia a la micro tracción mayores a aquellos que no fueron tratadas ($p \leq 0.05$).

Tal como a los tres meses, el grupo 5 (SBU+CHX) presenta los valores más altos de adhesión, aunque sin diferencia significativas con el grupo 1 (ASB+CHX). Tampoco se observan diferencias significativas entre estos los últimos grupos 1 y 3.

Por otra parte, al analizar los grupos en los cuales no se aplicó clorhexidina tampoco existen diferencias significativas entre los grupos. ($p \geq 0.05$).

Cuando se comparan los valores de resistencia a la micro tracción en los grupos en relación a los distintos tiempos de almacenamiento de cada grupo, se observa que no existen diferencias significativas en estos valores al comparar los distintos tiempos de almacenamiento, ($p. \geq 0.05$), a excepción del grupo 2 (ASB) donde se observa una disminución estadísticamente significativa a los tres y 6 meses de almacenamiento y para el grupo 5 donde se observa un incremento de los valores de adhesión comparado con los valores obtenidos a las 72 horas.

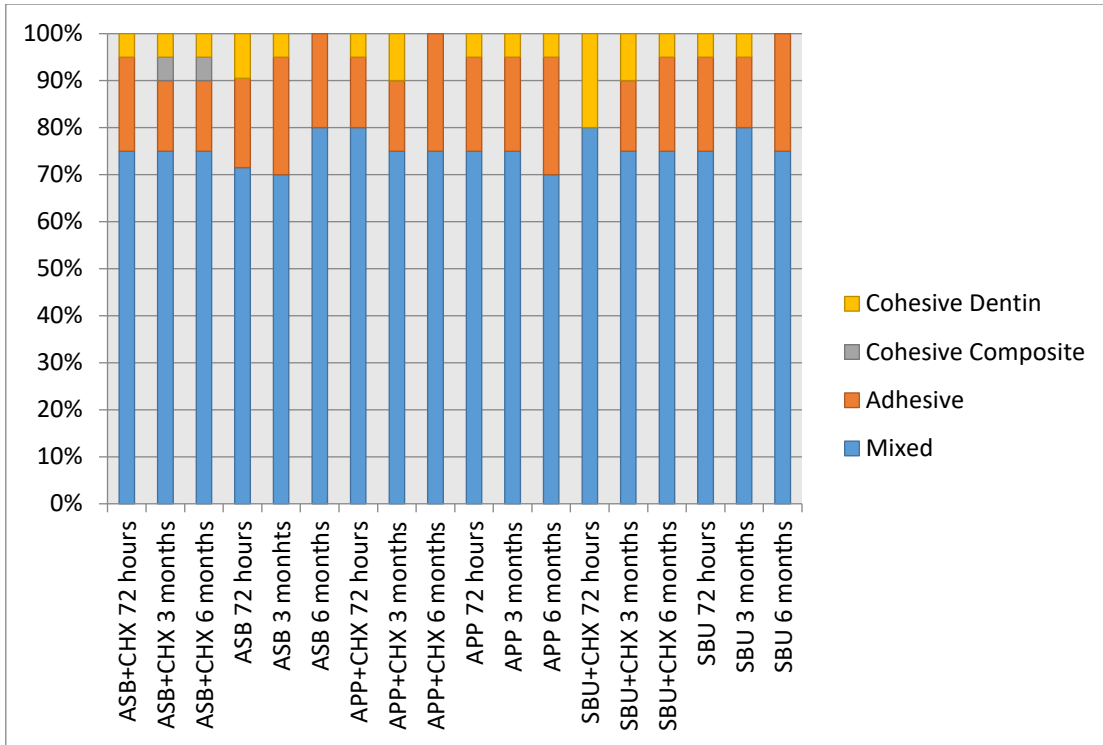
En relación al patrón de falla, los datos pueden ser observados en la figura 2. Al igual que en el caso de la prueba de cizallamiento, la falla mixta es la más observada en todos los grupos, presentándose entre el 70 y 80% de los casos. La segunda falla más observada fue la adhesiva en dentina con un rango de 15 a 25% de los casos y por último la falla cohesiva fue observada en un rango entre el 5 y el 20%.

Tabla 3: Valores de Resistencia a la microtracción. (Desviación estándar) con los distintos tiempos de almacenamiento.

	72 hours	3 months	6 months
G1 – ASB + clorhexidina	26.28(9.29) ABa	32.26(10.33) Ba	31.73(5.18) ABa
G2 – ASB	28.56(5.83) Aa	19.82(7.65) Cb	23.39(5.69) CDb
G3 – APL + clorhexidina	24.21(7.52) ABa	28.51(13.18) BCa	27.37(4.40) BCa
G4 – APL	20.14(4.87) Ba	20.86(6.13) Ca	20.51(5.66) Da
G5 – SBU + clorhexidina	28.43(9.78) Ab	44.11(12.09) Aa	36.88(6.65) Aa
G6 – SBU	29.24(7.90) Aa	23.54(12.09) BCa	23.62(7.07) CDa

Las letras mayúsculas señalan diferencias entre columnas y minúsculas entre líneas. Si se repite la misma letra para la misma columna o misma fila significa que no existe diferencia significativa.

Figure 2: Distribución del modo de falla en relación al tiempo de almacenamiento, uso de clorhexidina y sistema adhesivo para la prueba de microtracción.



9 Discusión.

La degradación enzimática de la matriz de colágeno por enzimas derivadas del huésped, tales como las metaloproteinasas (MMP), desempeñan un papel importante en la destrucción de la interfase diente restauración(58). Distintos estudios han encontrado que estas enzimas pueden activarse luego de la aplicación del sistema adhesivo sobre la dentina, dejándola por tanto expuesta a estos agentes colagenolíticos (54,56), dando como resultado una alteración de la capa híbrida y la subsecuente disminución de la fuerza adhesiva en el tiempo.

Para intentar disminuir esta actividad colagenolítica y bloquear así la acción enzimática, se ha investigado el rol benéfico que podría tener la aplicación de clorhexidina a la dentina (54,59,60).

En este estudio, se observó que el uso de clorhexidina dentro del protocolo adhesivo aumenta los valores de resistencia a la micro tracción, en comparación con los grupos no tratados. Este hecho se observa al comparar los datos después de 3 y 6 meses de almacenamiento de las muestras. En el caso de las muestras almacenadas por 72 horas, no hubo diferencias entre los grupos equivalentes tratados y no tratados con clorhexidina.

A las 72 horas el sistema adhesivo autograbante (APL) de un solo paso presentó menor fuerza de unión cuando no se aplicó clorhexidina Grupo 4 (APL) en comparación con el grupo 2 (ASB) y el grupo 6 (SBU).

A los 3 meses, al comparar cada uno de los sistemas adhesivos con y sin el uso de clorhexidina, todos mostraron una disminución en la resistencia al cizallamiento cuando no se aplicó clorhexidina en el protocolo adhesivo.

En el caso del sistema de adhesivo universal (SBU+CHX), éste presentó los valores de resistencia al cizallamiento más altos de todos los grupos. A los 6 meses, nuevamente se observó el mismo patrón, y todos los adhesivos mostraron mayores fuerzas de unión cuando se aplicó clorhexidina.

El uso de clorhexidina mostró una fuerza de adhesión mejorada en comparación con grupos sin el tratamiento de dentina con este desinfectante de cavidad. Otros autores han mostrado un aumento en la durabilidad de adhesión de los sistemas adhesivos (10,54), así como un efecto bactericida después de 5 minutos de contacto directo (61) y una menor expresión de microfiltración (54) cuando se realizó el tratamiento clorhexidina de la dentina.

En relación a los valores de resistencia a la micro tracción y los tiempos de almacenamiento, en este estudio, se observó que, en la mayoría de los sistemas adhesivos, los valores no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres tiempos de

almacenamiento. Esto está de acuerdo con otros estudios, que mostraron que la mayoría de los adhesivos no presentaron una disminución significativa en μ TBS incluso después de 1 año de almacenamiento en saliva artificial (61).

La única diferencia significativa se encontró en el grupo 2 (ASB) donde se observa una disminución a los 3 y 6 meses, y en el caso del grupo 5 donde se observa un aumento en los valores a los tres meses al compararlo con los datos obtenidos a las 72 horas de almacenamiento.

Por su probable significancia clínica es deseable los valores de resistencia a la microtracción, no disminuyan en el tiempo ya que esto significa que el proceso de hidrólisis aún no ha afectado significativamente la capa de unión diente restauración.

La hidrólisis es un proceso químico que rompe los enlaces covalentes entre los polímeros mediante la adición de agua a los enlaces éster, dando como resultado la pérdida de la masa de resina, que es considerada como una de las principales razones de degradación de la resina dentro de la capa híbrida. Las fuerzas de unión creadas por los adhesivos dentinarios con el tiempo (62). En nuestro estudio, sólo el Grupo 2 (ASB), no clorhexidina tratados, presentó una disminución en la resistencia de la unión después de 3 y 6 meses de almacenamiento en agua destilada.

Ningún grupo con clorhexidina mostró individualmente diferencias en la resistencia a la microtracción luego de 3 y 6 meses de almacenamiento. El efecto de la adición de clorhexidina a los adhesivos ha sido estudiado previamente, mostrando un potencial para prevenir o minimizar la degradación de los enlaces resina-dentina en un período de almacenamiento de 1 año (59). Sin embargo, un estudio con un tiempo de almacenamiento más largo fue capaz de discriminar una diferencia en los valores de resistencia a la microtracción después de 2 años de almacenamiento (54). Los resultados de esos autores describieron una reducción en la de resistencia a la microtracción significativamente mayor para especímenes sin tratamiento con clorhexidina, así como pérdida de integridad de la capa híbrida y aumento de la microfiltración. También observaron que, para los especímenes tratados con clorhexidina, se observó ausencia de microfiltración después de 2 años de almacenamiento (54).

La investigación del tipo de falla permite identificar el área más débil de la interfase diente restauración mediada por los adhesivos. En los resultados observados en este estudio, los fracasos mixtos fueron los más frecuentes independiente de los tiempos de almacenamiento o de la aplicación de clorhexidina, lo que sugiere que se mantuvo una estabilidad de la interfase dentro del período de tiempo estudiado.

Posiblemente, el aumento en el tiempo de almacenamiento o el uso de métodos combinados de envejecimiento como el termociclado, hubieran permitido observar diferentes patrones de falla.

Es bien sabido que el tipo de sistema adhesivo utilizado en los procedimientos de restauración puede afectar su desempeño clínico y longevidad. Los adhesivos de "grabado y lavado" implican una fase de grabado con ácido fosfórico (14,63). Los adhesivos dentales universales más recientes consisten en copolímeros (tales como ácido poliacrílico), cargas y las moléculas de silano, y pueden usarse en protocolos adhesivos de grabado y lavado o en una técnica de auto-grabado. Las MMP pueden activarse mediante el simple paso de acondicionar la dentina con ácido fosfórico (47). En los sistemas adhesivos de auto-grabado, es menos pronunciada esta activación (9,47), lo que puede traducirse en una disminución de la degradación de la interfase.

En este estudio, este hecho no se observó, ya que el sistema adhesivo de grabado y lavado no mostró una mayor degradación en comparación con el sistema adhesivo autograbante de un paso. Este hecho puede explicarse porque el sistema adhesivo autograbante utilizado (APL) presenta un pH muy bajo (= 1,0).

Sin embargo, por su menor acidez los sistemas adhesivos autograbante "medianos" son menos propensos a activar las MMP, en comparación al uso de sistemas adhesivos autograbantes "fuertes", donde de mayor manera se puede promover su liberación (35,47). Dado que el adhesivo Universal (SBU) de un paso utilizado en nuestro estudio presenta un pH = 2,7, es probable que sea menos capaz de activar las MMP endógenas de la dentina, lo que puede explicar los mayores resultados de unión dentinaria obtenidos después de los tiempos de almacenamiento de 3 meses y 6 meses, en comparación con los otros sistemas adhesivos (64).

La clorhexidina, incluso cuando se usa en bajas concentraciones, podría inhibir dicha actividad y detener la degradación de la enzima (5) independientemente si se utiliza una estrategia de grabado y lavado o adhesivos autograbantes.

Por otra parte, la simplificación en el procedimiento de aplicación clínica, disminuyendo el número de etapas del proceso adhesivo, puede resultar en menores fuerzas de unión o en una adhesión incompleta si el procedimiento no es bien realizado (14,55,65,66).

Es por esto que se han propuesto distintos procedimientos clínicos para optimizar la unión y reducir el envejecimiento, como el tiempo de polimerización prolongado y el uso de inhibidores de MMPs (16,65), tal como se realizó en este estudio. Por lo tanto, el uso de sistemas adhesivos simplificados debe elegirse con precaución y, si es posible, acompañado siempre de protocolos de desinfección tales como clorhexidina u otros protocolos de unión optimizados.

En relación a la resistencia a las fuerzas de cizallamiento el uso de clorhexidina dio lugar a valores más altos en todos los grupos de sistemas adhesivos de dentina después de 3 y 6 meses.

A las de 72 horas de almacenamiento los valores que comparaban los grupos tratados con clorhexidina o no tratados permanecieron estadísticamente sin diferencias significativas(67), lo que coincide con otros estudios donde se analiza la fuerza adhesiva a las 24 horas de realizados los cuerpos de prueba

Después de 3 meses, ya sea cuando la dentina se trató con clorhexidina o no, el sistema de adhesivo Single Bond Universal presentó valores de resistencia de unión por cizallamiento más altos en comparación con los otros grupos, con el mismo tratamiento con dentina. Después de 6 meses, nuevamente, el sistema adhesivo Universal presentó mayores valores de resistencia de unión por corte, ya sea cuando la dentina se trató con clorhexidina o no, en comparación con otros sistemas adhesivos dentro de los mismos tratamientos dentinarios.

El adhesivo APL mostró, después de 6 meses de almacenamiento, resultados similares a los del sistema adhesivo de grabado y lavado a pesar de ser autograbante y poseer un pH relativamente bajo (pH = 1,0) aunque sus valores de resistencia al cizallamiento, son significativamente más bajos que los del adhesivo single bond universal tanto al comparar los grupos con tratamiento como los sin tratamiento de clorhexidina.

Por tanto, el uso de este desinfectante en el tratamiento de la dentina demostró mejorar la resistencia a las fuerzas de cizallamiento de los sistemas adhesivos dentinarios en el tiempo, lo que concuerda con varios otros estudios (5,54,64,66,68).

Como ya se mencionó el adhesivo Single Bond Universal de pH = 2,7 mostró mayores valores de resistencia de unión en todos los periodos de tiempo. Posiblemente, este sistema adhesivo activó menos MMPs que el sistema ASB y esto más una unión intermediada por la partícula 10-metacriloiloximecil dihidrogeno fosfato monómero (MDP) presente en su composición, la que es capaz de unirse químicamente a la dentina (69,70) y permite una interacción química efectiva entre MDP e hidroxiapatita, formando una nano-capa estable que podría resultar en una fase más fuerte en la interfaz adhesiva, aumentando la resistencia mecánica de la interfaz adhesiva (15,69,70), que también puede explicar los valores de resistencia de unión por cizallamiento más altos obtenidos por este sistema adhesivo, ya sea cuando se usa con clorhexidina o no.

Los resultados más bajos de los grupos de APL del sistema adhesivo incluso en el tiempo de almacenamiento de 72 horas, en comparación con los otros sistemas adhesivos, también pueden estar relacionados con su característica de sistema autograbante de un paso. Se ha demostrado que los sistemas adhesivos simplificados necesitan incluir más agua en su composición, lo que puede aumentar su degradación (14,71). Sin embargo, como se ha mencionado, después de 6 meses, este sistema adhesivo no presentó diferencia estadística en comparación con los grupos de sistemas adhesivos de grabado y lavado, independiente si recibió o no el tratamiento con clorhexidina.

Por las razones ya enumeradas se rechaza la hipótesis nula ya que se comprueba que existe diferencia significativa en relación a la influencia de la clorhexidina en los valores de resistencia adhesiva medidas en resistencia a la microtracción y resistencia a las fuerzas de cizallamiento a diferentes tiempos de almacenamiento para adhesivos de grabado y lavado, y adhesivos autograbantes de uno y dos tiempos operatorios.

10 Conclusiones.

Con las limitaciones de este estudio, se demostró que:

- El aumento de los tiempos de almacenamiento disminuye la resistencia adhesiva, ya que la mayoría de los sistemas adhesivos resultaron en una disminución de la resistencia adhesiva al cizallamiento y a la microtracción después del almacenamiento, lo que coincide con estudios previos.
- Al evaluar a las 72 horas, 3 y 6 meses el uso de clorhexidina al 2% durante el protocolo adhesivo de adhesivos monocomponentes en la técnica grabado ácido y lavado los valores de resistencia testeados no presentan diferencias significativas a las 72 horas entre los grupos no tratados y tratados con clorhexidina al 2% y si presenta diferencias significativas al comparar tratados y no tratados a los 3 y 6 meses.
- En el caso de los adhesivos autograbantes de dos pasos (SBU), no se observan diferencias significativas a las 72 horas entre los grupos no tratados y tratados con clorhexidina al 2% y si presenta diferencias significativas al comparar tratados y no tratados a los 3 y 6 meses en los valores de resistencia a las fuerzas de cizallamiento.
- Para este mismo adhesivo, en el caso de la resistencia a la microtracción sólo se observan diferencias significativas a los 6 meses al comparar grupos tratados y no tratados con clorhexidina.
- Los valores de adhesión analizados con el uso de clorhexidina al 2% durante el protocolo adhesivo de adhesivos autograbantes de un paso (Single Bond universal de 3M ESPE) mostró que no existen diferencias significativas a las 72 horas entre los grupos tratados y no tratados con clorhexidina, pero si existen diferencias significativas a los 3 y 6 meses al comparar tratados y no tratados.
- Al comparar los valores de resistencia a la microtracción de los distintos sistemas adhesivos en los grupos tratados con clorhexidina a las 72 horas no se observan diferencias significativas entre ellos. A los 3 meses existen diferencias significativas entre el adhesivo autograbante de dos pasos y de un paso en favor del segundo (SBU+CHX) y a los 6 meses las diferencias son significativas entre las muestras tratadas con el adhesivo autograbante de un paso (SBU+CHX) y el grupo 1(ASB+CHX) al compararlos con el sistema autograbante de dos pasos (APL+CHX).
- Al comparar los tipos de fractura, adhesiva, cohesiva o mixta al realizar el test de resistencia a las fuerzas de cizallamiento con y sin el uso de clorhexidina al 2%% a las 72 horas, 3 meses y 6 meses utilizando los distintos sistemas adhesivos se observa que, en la mayoría de los casos, prevalece la fractura mixta.
- Existen diferencias significativas que permiten indicar el uso de clorhexidina como parte del proceso adhesivo de las resinas compuestas para los distintos protocolos adhesivos.

- El adhesivo autograbante Single Bond Universal muestra valores de adhesión similares al sistema adhesivos de grabado y lavado Adper Scotch Bond y mayores al sistema de autograbado Adper Prompt L testado.

11 Significancia Clínica.

La adición de clorhexidina al 2% frotando durante 20 segundos la superficie dentinaria expuesta y luego enjuagando con agua en spray por 20 segundos y luego secando suavemente por 10 segundos durante el protocolo de sistemas autoadhesivos de un paso con MDP es recomendado ya que podría ayudar a aumentar la longevidad de las restauraciones al disminuir la actividad de las metaloproteinasas, permitiendo una mayor integridad de la capa híbrida en el tiempo, considerando que entre los factores clínicos de éxito se encuentra una correcta indicación y el cumplimiento estricto de los protocolos clínicos de restauración.

El protocolo adhesivo comparativamente simple de los adhesivos autograbantes de un tiempo operatorio con MDP permitirían este paso previo sin aumentar considerablemente las fallas relacionadas con la variabilidad asociada al operador.

12 Perspectivas futuras.

Las investigaciones que se realizan actualmente para reducir la actividad colagenolítica de las metaloproteinasas se enfocan en la adición de inhibidores de metaloproteinasas en los sistemas adhesivos, lo que permite disminuir el efecto de las MMP durante un tiempo pero que inicialmente podrían reducir la resistencia al cizallamiento de las restauraciones.

Nuevas líneas de investigación futuras podrían incluir el desarrollo de protocolos adhesivos que incluyan el uso de distintos elementos que reduzcan la liberación de las metaloproteinasas durante el proceso adhesivo.

13 Bibliografía.

(1) Durham J, Ohrbach R. Oral rehabilitation, disability and dentistry. *J Oral Rehabil* 2010 06;37(6):490-494.

(2) Vaidyanathan TK, Vaidyanathan J. Recent Advances in the Theory and Mechanism of Adhesive Resin Bonding to Dentin: A Critical Review. *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART B-APPLIED BIOMATERIALS* 2009;88B(2):558-78.

(3) Carrilho MRO, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res* 2007 01;86(1):90-94 5p.

(4) Spencer, P. (1,2), Wang Y(1), Katz JL(1). Identification of collagen encapsulation at the dentin/adhesive interface. *J Adhes Dent* 2004 / 01 / 01 /;6(2):91-95.

(5) Hebling J(1), Pashley DH(2), Tay, F.R. (2,5), Tjäderhane, L. (3,4). Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *J Dent Res* 2005 / 08 / 01 /;84(8):741-746.

(6) Brackett MG, Tay FR, Brackett WW, Dib A, Dipp FA, Mai S, et al. In Vivo Chlorhexidine Stabilization of Hybrid Layers of an Acetone-Based Dentin Adhesive. *JOURNAL OF ESTHETIC AND RESTORATIVE DENTISTRY* 2011;23(5):349-50.

(7) Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, et al. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res* 2015 02;94(2):241-251.

(8) Chang Y-, Shin D-. Effect of chlorhexidine application methods on microtensile bond strength to dentin in class i cavities. *Oper Dent* 2010 / 11 / 01 /;35(6):618-623.

(9) Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena M, Pashley D, Tay F, et al. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. *Eur J Oral Sci* 2011;119(1):79-85.

(10) Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, et al. Influence of Chlorhexidine Concentration on the Durability of Etch-and-Rinse Dentin Bonds: A 12-month In Vitro Study. *J Adhes Dent* 2009;11(3):191-8.

(11) Kaya B, Uyar R. Original article: Influence on smile attractiveness of the smile arc in conjunction with gingival display. *American Journal of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics* 2013;144:541-547.

(12) Nakabayashi N. Bonding of restorative materials to dentine: the present status in Japan. *Int Dent J* 1985 / 06 / 01 /;35(2):145-154.

- (13) BUONOCORE MG. A Simple Method of Increasing the Adhesion of Acrylic Filling Materials to Enamel Surfaces. *J Dent Res* 1955 12;34(6):849.
- (14) De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, et al. A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *J Dent Res* 2005 02;84(2):118-132.
- (15) Yoshihara K, Yoshida Y, Nagaoka N, Hayakawa S, Okihara T, De Munck J, et al. Adhesive interfacial interaction affected by different carbon-chain monomers. *Dent Mater* 2013 08;29(8):888-897.
- (16) Breschi L, Mazzoni A, Ruggeri A, Cadenaro M, Di Lenarda R, De SD. Dental adhesion review: aging and stability of the bonded interface. *Dent Mater* 2008 01;24(1):90-101.
- (17) Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, et al. Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *J Dent Res* 2011 08;90(8):953-968.
- (18) Perdigão J. Dentin bonding as a function of dentin structure. *Dent Clin North Am* 2002 04;46(2):277.
- (19) Danyang W, Ling Z, Fang L, Shuai X, Jihua C. Study of the types of matrix metalloproteinases involved in dentin bonding interface degradation. (English). *West China Journal of Stomatology* 2014 08;32(4):394.
- (20) Chaharom M, Ajami AA, Kimyai S, Abbasi A. MMP-Inhibitory Effect of Chlorhexidine Applied in a Self-etching Adhesive. *J Adhes Dent* 2011 03;13; 10(2; 49):111; 10054-10057.
- (21) Shan-chuan Zhang MK. The Role of Host-derived Dentinal Matrix Metalloproteinases in Reducing Dentin Bonding of Resin Adhesives. *国际口腔科学杂志: 英文版 / International Journal of Oral Science* 2009(4):163.
- (22) Stanislawczuk R(1), Zander-Grande C, Reis A(1), Loguercio AD(1), Amaral RC(2), Gagler D(3). Chlorhexidine-containing acid conditioner preserves the longevity of resin-dentin bonds. *Oper Dent* 2009 / 07 / 01 /;34(4):481-490.
- (23) Stanislawczuk R, Reis A, Loguercio AD. A 2-year in vitro evaluation of a chlorhexidine-containing acid on the durability of resin–dentin interfaces. *J Dent* 2011;39:40-47.
- (24) Yiu C, Hiraishi N, Tay FR, King NM. Effect of Chlorhexidine Incorporation into Dental Adhesive Resin on Durability of Resin-Dentin Bond. *J Adhes Dent* 2012;14(4):355-62.

- (25) Pashley DH(1), Tay FR(2), Yiu C(2), Hashimoto M(3), Breschi L(4), Carvalho RM(5), et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004 / 03 / 01 /;83(3):216-221.
- (26) Collares FM, Rodrigues SB, Leitune V, Celeste RK, de Araujo F, Samuel S. Chlorhexidine Application in Adhesive Procedures: A Meta-Regression Analysis. *J Adhes Dent* 2013;15(1):11-8.
- (27) Mazzoni A, Carrilho M, Papa V, Tjäderhane L, Gobbi P, Nucci C, et al. MMP-2 assay within the hybrid layer created by a two-step etch-and-rinse adhesive: Biochemical and immunohistochemical analysis. *J Dent* 2011;39:470-477.
- (28) Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res* 2003 05/02;92(8):827-839.
- (29) Osorio R, Yamauti M, Osorio E, Ruiz-Requena M, Pashley D, Tay F, et al. Effect of dentin etching and chlorhexidine application on metalloproteinase-mediated collagen degradation. *Eur J Oral Sci* 2011 02;119(1):79-85.
- (30) Bourd-Boittin K, Fridman R, Fanchon S, Septier D, Goldberg M, Menashi S. Matrix metalloproteinase inhibition impairs the processing, formation and mineralization of dental tissues during mouse molar development. *Exp Cell Res* 2005;304:493-505.
- (31) Charadram N, Farahani R, Harty D, Rathsam C, Swain MV, Hunter N. Regulation of reactionary dentin formation by odontoblasts in response to polymicrobial invasion of dentin matrix. *Bone*. 2012;50(1):265-275. doi:10.1016/j.bone.2011.10.031. *Bone* 2012;50(1):265-275 doi:10 1016/j bone 2011 10 031 .
- (32) Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, et al. Role of Dentin MMPs in Caries Progression and Bond Stability. *J Dent Res* 2015 02;94(2):241.
- (33) Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res* 2006 01;85(1):22-32.
- (34) Lehmann, N. (1,2,3,4,5,6), Debret, R. (1,2,7), Roméas, A. (1,2,3,4,5,6), Magloire, H. (1,2,3,4,5,6), Bleicher, F. (1,2,3,4,5,6,9), Sommer, P. (1,2,7), et al. Self-etching increases matrix metalloproteinase expression in the dentin-pulp complex. *J Dent Res* 2009 / 01 / 01 /;88(1):77-82.
- (35) Mazzoni A, Scaffa P, Carrilho M, Tjäderhane L, Di Lenarda R, Polimeni A, et al. Effects of Etch-and-Rinse and Self-etch Adhesives on Dentin MMP-2 and MMP-9. 2013.

- (36) Boushell LW, Kaku M, Mochida Y, Yamauchi M. Distribution and relative activity of matrix metalloproteinase-2 in human coronal dentin. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ORAL SCIENCE* 2011;3(4):192-9.
- (37) Mazzoni A, Pashley DH, 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. *Biomaterials* 2006;27:4470-4476.
- (38) Niu LN, Zhang L, Jiao K, Li F, Ding YX, Wang DY, et al. Localization of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2 in human coronal dentine. *J Dent* 2011 8;39(8):536-542.
- (39) Boushell LW(1), Nagaoka H(1), Nagaoka H(2), Yamauchi M(2). Increased matrix metalloproteinase-2 and bone sialoprotein response to human coronal caries. *Caries Res* 2011 / 11 / 01 /;45(5):453-459.
- (40) Mazzoni A, Papa V, Nato F, Carrilho M, Tjäderhane L, Ruggeri J, Alessandra, et al. Immunohistochemical and biochemical assay of MMP-3 in human dentine. *J Dent* 2011;39:231-237.
- (41) Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. 2010.
- (42) Stape THS(1), Barreto BCF(1), Aguiar FHB(1), Martins LR(1), Menezes MS(2), Quagliatto PS(2). Influence of matrix metalloproteinase synthetic inhibitors on dentin microtensile bond strength of resin cements. *Oper Dent* 2012 / 07 / 01 /;37(4):386-396.
- (43) Vicente, A. (1,2), Bravo LA(1). Influence of an etchant and a desensitizer containing benzalkonium chloride on shear bond strength of brackets. *J Adhes Dent* 2008 / 01 / 01 /;10(3):205-209.
- (44) Tezvergil-Mutluay A, Mutluay MM, Gu L, Zhang K, Agee KA, Carvalho RM, et al. The anti-MMP activity of benzalkonium chloride. *J Dent* 2011;39:57-64.
- (45) Chang Y, Shin D. Effect of chlorhexidine application methods on microtensile bond strength to dentin in Class I cavities. *Oper Dent* 2010 11/20;35(6):618-623.
- (46) Pashley DH(1), Tay FR(2), Yiu C(2), Hashimoto M(3), Breschi L(4), Carvalho RM(5), et al. Collagen degradation by host-derived enzymes during aging. *J Dent Res* 2004 / 03 / 01 /;83(3):216-221.
- (47) De Munck J, Van dS, Mine A, Van Landuyt KL, Poitevin A, Opdenakker G, et al. Inhibition of Enzymatic Degradation of Adhesive-Dentin Interfaces. *J Dent Res* 2009 12;88(12):1101-1106.

(48) Brackett MG(1), Tay FR(2), Brackett WW(3), Dib A(3), Dipp FA(4), Mai S(5), et al. In vivo chlorhexidine stabilization of hybrid layers of an acetone-based dentin adhesive. Oper Dent 2009 / 07 / 01 /;34(4):379-383.

(49) Collares FM, Rodrigues SB, Leitune V, Celeste RK, de Araujo F, Samuel S. Chlorhexidine Application in Adhesive Procedures: A Meta-Regression Analysis. J Adhes Dent 2013;15(1):11-8.

(50) Talungchit S, Jessop JLP, Cobb DS, Qian F, Geraldeli S, Pashley DH, et al. Ethanol-wet Bonding and Chlorhexidine Improve Resin-Dentin Bond Durability: Quantitative Analysis Using Raman Spectroscopy. J Adhes Dent 2014 09;16(5):441.

(51) Breschi L, Cammelli F, Visintini E, Mazzoni A, Vita F, Carrilho M, et al. Influence of chlorhexidine concentration on the durability of etch-and-rinse dentin bonds: a 12-month in vitro study. J Adhes Dent 2009 06;11(3):191-198.

(52) Carrilho, M.R.O. (1,4), De Goes, M.F. (1), Di Hipólito, V. (1), Carvalho RM(2), Geraldeli S(3), Tay FR(4), et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. J Dent Res 2007 / 01 / 01 /;86(1):90-94.

(53) Loguercio AD, Stanislawczuk R, Polli LG, Costa JA, Michel MD, Reis A. Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin-dentin bond strength durability. Eur J Oral Sci 2009 10;117(5):587-596.

(54) Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L, et al. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: A 2-year in vitro study. Dental Materials 2010;26:320-325.

(55) Zhou J, Tan J, Chen L, Li D, Tan Y. The incorporation of chlorhexidine in a two-step self-etching adhesive preserves dentin bond in vitro. J Dent 2009;37:807-812.

(56) De Munck J, Mine A, Van den Steen P,E., Van Landuyt K,L., Poitevin A, Opdenakker G, et al. Enzymatic degradation of adhesive-dentin interfaces produced by mild self-etch adhesives. Eur J Oral Sci 2010 10;118(5):494-501.

(57) Pashley DH, Carvalho RM, Sano H, Nakajima M, Yoshiyama M, Shono Y, et al. The Microtensile Bond Test: A Review. J Adhes Dent 1999 Winter1999;1(4):299.

(58) Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, Geraldeli S, et al. Optimizing dentin bond durability: Control of collagen degradation by matrix metalloproteinases and cysteine cathepsins. Dental Materials 2013 1;29(1):116-135.

(59) Stanislawczuk R, Pereira F, Muñoz MA, Luque I, Farago PV, Reis A, et al. Effects of chlorhexidine-containing adhesives on the durability of resin-dentine interfaces. J Dent 2014 01;42(1):39-47.

(60) Lafuente D. SEM analysis of hybrid layer and bonding interface after chlorhexidine use. *Oper Dent* 2012 03/20;37(2):172-180.

(61) André CB, Gomes BPFA, Duque TM, Stipp RN, Chan DCN, Ambrosano GMB, et al. Dentine bond strength and antimicrobial activity evaluation of adhesive systems. *J Dent* 2015 04;43(4):466-475.

(62) Tay FR, Pashley DH. Have dentin adhesives become too hydrophilic? *J Can Dent Assoc* 2003 12;69(11):726-731.

(63) Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, et al. State of the art etch-and-rinse adhesives. *Dental Materials* 2011 1;27(1):1-16.

(64) Zheng P, Zaruba M, Attin T, Wiegand A. Effect of Different Matrix Metalloproteinase Inhibitors on Microtensile Bond Strength of an Etch-and-Rinse and a Self-etching Adhesive to Dentin. *Oper Dent* 2015 Jan;40(1):80.

(65) Cadenaro M(1), Antonioli F(1), Di Lenarda, R. (1), Biasotto M(1), Contardo L(1), Breschi, L. (1,4), et al. Degree of conversion and permeability of dental adhesives. *Eur J Oral Sci* 2005 / 12 / 01 /;113(6):525-530.

(66) Zhou J, Tan J, Yang X, Cheng C, Wang X, Chen L. Effect of Chlorhexidine Application in a Self-etching Adhesive on the Immediate Resin-Dentin Bond Strength. *J Adhes Dent* 2010 01;12(1):27.

(67) Chaharom M, Ajami AA, Kimyai S, Abbasi A. Effect of chlorhexidine on the shear bond strength of self-etch adhesives to dentin. 2013.

(68) Mohammed Hassan, A. (1,2), Baroudi K(1), Ali Goda, A. (2). The effect of different disinfecting agents on bond strength of resin composites. *International Journal of Dentistry* 2014 / 01 / 01 /;2014.

(69) Yoshida Y, Yoshihara K, Nagaoka N, Hayakawa S, Torii Y, Ogawa T, et al. Self-assembled Nano-layering at the Adhesive Interface. *J Dent Res* 2012;91(4):376-81.

(70) Muñoz, M.A. (1,2), Luque I(1), Hass V(1), Reis A(1), Loguercio AD(1), Bombarda NHC(1). Immediate bonding properties of universal adhesives to dentine. *J Dent* 2013 / 05 / 01 /;41(5):404-411.

(71) Samimi P(1), Khoroushi M(1), Alizadeh M(2), Davoodi A(2), Shirban F(3). Effect of dentin dehydration and composite resin polymerization mode on bond strength of two self-etch adhesives. *Contemporary Clinical Dentistry* 2016 / 01 / 01 /;7(1):16-20.

14 Articulos submitted.

14.1 International Journal of Morphology. Tracking number: IJM 211-17.

"*In-vitro* comparative study of the use of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of different dentin adhesives: a 6 months evaluation".

Title Page

***In-vitro* comparative study of the use of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of different dentin adhesives: a 6 months evaluation**

Estudio comparativo in vitro del uso de clorhexidina al 2% sobre la resistencia de unión microtensil de diferentes adhesivos dentinarios: una evaluación de 6 meses

Subtitle: Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of different dentin adhesives

Cristián Bravo* ; Camila S Sampaio* ; Ronaldo Hirata ; Regina M Puppim-Rontani*** ; Juan Ricardo Mayoral**** ; Lluís Giner******

* College of Dentistry, Universidad de los Andes, Santiago, Chile.

** New York University College of Dentistry, New York, USA.

*** University of Campinas - Piracicaba Dental School, Piracicaba, SP, Brazil.

**** College of Dentistry, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain.

Corresponding author:

Cristián Bravo

Department of Biomaterials, ^[1]_[SEP] College of Dentistry, Universidad de los Andes, Av Monseñor Alvaro del Portillo 12,455, Las Condes, Santiago, Chile. Fax: 212-995-4244. Email: cbravop@uandes.cl

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the effect of chlorhexidine (CHX) dentin treatment on microtensile bond strength (μ TBS) of adhesive systems in different storage times. Occlusal enamel was removed from ninety third-molars and flat surfaces of middle dentin were exposed. Teeth were randomly divided in 6 groups according to adhesive system (etch-and-rinse : Adper Scotchbond 1XT - ASB ; self-etch: Adper Prompt L-Pop – APP; and universal: Single Bond Universal - SBU) and chlorhexidine (CHX) dentin treatment (2% CHX application for 20s prior Primer). After resin composite build up, teeth were sectioned to obtain beam specimens and divided in 3 subgroups (n=5): 72h, 3 and 6 months storage times. After the storage times, teeth were tested in tension until failure (0.5mm/min). SEM was performed to observe hybrid layer of adhesive systems. Data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey tests. At 72h, all equivalent groups (same adhesive system, different dentin treatments) maintained their μ TBS when compared CHX-treatment. At 3 and 6 months, non-treated CHX groups showed less μ TBS than CHX-treated ones. Six months storage time did not significantly decrease μ TBS, except for G2-ASB. The effect of CHX on dentin μ TBS depends on storage times and adhesive systems. While immediate μ TBS was not affected by CHX treatment, CHX improved dentin μ TBS after 3 and 6 months.

KEY WORDS: Microtensile bond strength, Dentin, Chlorhexidine, Dentin adhesives, Adhesion

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del tratamiento con clorhexidina (CHX) de la dentina sobre la resistencia de la unión microtensil (μ TBS) de los sistemas adhesivos en diferentes tiempos de almacenamiento. Se retiró el esmalte oclusal de noventa terceros molares y se expusieron superficies planas de la dentina media. Los dientes se dividieron al azar en 6 grupos de acuerdo con el sistema adhesivo (con grabado ácido: Adper Scotchbond 1XT-ASB, auto-grabado: Adper Prompt L-Pop-APP y universal: Single Bond Universal-SBU) y el tratamiento de la dentina con clorhexidina (CHX) (aplicación de CHX al 2% 20s antes del Primer). Después de la aplicación de la resina compuesta, los dientes fueron seccionados para obtener muestras en forma de barras y divididos en 3 subgrupos (n = 5) con tiempos de almacenamiento de 72h, 3 y 6 meses. Después de los tiempos de almacenamiento, los dientes se sometieron a tensión hasta la fractura (0,5 mm / min). SEM se realizó para observar la capa híbrida de sistemas adhesivos. Los datos se analizaron mediante ANOVA unidireccional y pruebas de Tukey. A las 72h, todos los grupos equivalentes (el mismo sistema adhesivo, diferentes tratamientos de dentina) mantuvieron su μ TBS cuando se comparó el tratamiento CHX. A los 3 y 6 meses, los grupos CHX no tratados mostraron menos μ TBS que los tratados con CHX. Seis meses de tiempo de almacenamiento no disminuyó significativamente el μ TBS, excepto para el G2-ASB. El efecto de CHX sobre la dentina μ TBS depende del tiempo de almacenamiento y de los sistemas adhesivos. Mientras que el μ TBS inmediato no se vio afectado por el tratamiento con CHX, CHX mejoró la μ TBS a dentina después de 3 y 6 meses.

PALABRAS CLAVE: Resistencia de la unión microtensil, Dentina, Clorhexidina, Adhesivos dentinarios, Adhesión

INTRODUCTION

Adhesive interface is one of the most concerned factors related to the long term of resin composite restorations. Clinically, bonding failure is frequently associated with retention loss of adhesive restorations, marginal defects, lack of marginal adaptation and marginal discoloration, which can decrease the restoration durability (Heintze *et al.*, 2010; Hickel *et al.*, Peumans *et al.*).

Although immediate bonding is usually successful, after certain time, the longevity of the adhesive interface remains questionable due to challenging physical and chemical factors, such as occlusal forces, expansion and contraction stresses related to temperature changes, among others (Breschi *et al.*, 2008).

Matrix Metalloproteinases (MMPs) belong to a group of zinc- and calcium- dependent enzymes that cleave native collagenous tissues. It is well known that dentin matrix contains such MMPs, and that once they are activated by odds such as adhesive procedures, they can slowly degrade the collagen fibrils of resin-infiltrated hybrid layers (De Munck *et al.*, 2010; Pashley *et al.*). So, in order to increase the long term of restorative procedures, multiple studies have focused on methods to preserve dentine bonding (Andre *et al.*; Breschi *et al.*, 2008; Hirata *et al.*; Nishitani *et al.*, 2013; Stanislawczuk *et al.*; Tekce *et al.*). One of the most commonly used MMPs enzyme inhibitor is chlorhexidine (CHX), since it prevents the destruction of the adhesive interface over time (Tekce *et al.*).

A recent study showed MMP activation due to adhesive application (Breschi *et al.*, 2010), which is a matter of concern when dealing with adhesive restorations. This same research also showed an adhesive-activated enzyme inhibition with CHX application. It is thought that CHX can inhibit the MMP activity in the hybrid layer, increasing the long-term durability of resin-dentin bonds (Breschi *et al.*, 2010). Addition of CHX to adhesives was capable of preventing and minimizing the degradation of resin-dentin bonds over a 1-year period (Stanislawczuk *et al.*). The absence of nanoleakage in CHX-treated specimens also demonstrates a well-preserved hybrid layer due to its inhibiting effect on dentin MMP-2 activity (Breschi *et al.*, 2010).

Several approaches have been proposed for adhesive bonded restorations, and different types of adhesive systems might promote also different patterns of bond strength. Results in loss of adhesion of resin composites to dentin can be measured as a significant decrease in the microtensile bond strength (μ TBS) (Armstrong *et al.*). The etch-and-rinse approach relies on acid etching of both enamel and dentin to increase the permeability of resins in those substrates (Pashley *et al.*). Application of 37 wt.% phosphoric acid demineralizes 5–8 μ m of the intertubular dentin matrix surface, creating nanometer-sized porosities within the underlying collagen fibrillar matrix (Pashley *et al.*). This allows infiltration of solvated comonomers into and around collagen fibrils to gain retention for tooth colored resin-composite fillings (Vaidyanathan *et al.*). On the other hand, the self-etching approach is based on the absence of a separate etching step, as they contain acidic monomers that simultaneously ‘condition’ and ‘prime’ the dental substrate. Consequently, this approach has been claimed to be user-friendlier (shorter application time, less steps) and less technique-sensitive (no wet-bonding, simple drying) (Van Meerbeek *et al.*). Lastly, Universal adhesives represent the newest generation of adhesives in the market. Although they are designed under the “all-in-one” concept of the one-step self-etch adhesives, it is possible to use them also in the etch-and-rinse mode (Tekce *et al.*).

Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of chlorhexidine dentin treatment on the microtensile dentin bond strength of different adhesive systems (etch-and-rinse, self-etch and

universal) at different storage times (72 hours, 3 months and 6 months). The hypothesis tested were that (1) CHX treatment would result in higher bond strengths compared to groups without CHX treatment; and (2) increased storage times would present higher degradations in microtensile bond strengths.

MATERIAL AND METHOD

Samples Preparation

Ninety sound and freshly extracted human third molars were obtained according to protocols approved by Universidad de Los Andes, Chile, Institutional Review Board. Teeth were cleaned and kept in distilled water at room temperature until their use.

The following adhesive systems were used: one etch-and-rinse (ASB, Adper Scotchbond 1XT, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA), one self-etch (APP, Adper Prompt L-Pop, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA) and one universal (SBU, Single Bond Universal, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA) in the self-etch mode, each of them being used with and without a dentin treatment with a cavity disinfectant before primer/adhesive application (CHX, 2% Chlorhexidine, Cavity Cleanser, Bisco, Inc., Schaumburg, IL, USA), applied for 20s.

After cleaning, teeth were randomly divided in six groups (n=15 each): G1-ASB+CHX; G2-ASB; G3-APP+CHX; G4-APP; G5-SBU+CHX; G6-SBU. All groups were restored with the same resin composite (Filtek Z350, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA).

Application protocol for each group was performed as follows: **G1 (ASB+CHX)** – dentin etch for 15s (37% ScotchBond Etchant, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA), water rinse for 30s and gently dry with a cotton pellet. Application of CHX with a microbrush for 20s and lightly air-dry for 10s. Application of the single-component adhesive Adper Scotchbond 1XT followed by light-polymerization (Bluephase G2, Ivoclar Vivadent) according to manufacturer's instructions. Resin composite incrementally build-up until 5mm height (5 increments, 1mm each) with Filtek Z350 XT (3M ESPE), each layer being light-polymerized for 20s (Bluephase G2, Ivoclar Vivadent); **G2(ASB)** – G2 followed the same steps previously described for G1, except for the application of CHX; **G3(APP+CHX)** – Application of CHX as previously described, application of the self-etch adhesive system Adper Prompt L-Pop followed by light-polymerization according to manufacturer's instructions. Resin composite build-up was performed following the same steps previously described for G1. **G4(APP)** – G4 followed the same steps previously described for G3, except for the application of CHX; **G5(SBU+CHX)** – Application of CHX followed by application of the universal adhesive system and light-polymerization according to the self-etch protocol of the manufacturer's instructions. Resin composite build-up performed following the same steps previously described for G1. **G6(SBU)** – G6 followed the same steps previously described for G5, except for the application of CHX.

Microtensile Bond Strength Test (μ TBS)

Teeth were mounted in acrylic resin in order to facilitate sample preparation. Occlusal enamel of each tooth was removed perpendicular to the long axis and flat surfaces of middle dentin were exposed with a slow speed diamond saw (IsoMet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, USA). Cut surfaces were polished with 620-grit SIC paper discs (Buehler) in order to standardize the smear layer for the bonding procedures.

After the restoration procedures, teeth were stored in water for 24h before cutting procedures. Afterwards, restored teeth were serially sectioned longitudinally to the bonded interface with a low-speed diamond saw in a precision cutting machine (IsoMet 1000, Buehler) under water cooling to obtain bonded beams specimens with a cross-sectional area of approximately 1mm^2 , with approximately 5mm of resin composite material and 5mm of dentin tissue. The exact dimension of each beam was measured using a digital caliper and 4 sticks were evaluated per tooth. Teeth were subdivided into 3 subgroups, according to the storage time ($n=5$ each): 72h, 3 months and 6 months (distilled water at room temperature).

After the designed storage period, each beam was fixed to a microtensile device with a cyanoacrylate-based adhesive (Zapit, Dental Ventures of America, Corona, CA, USA) and attached to a universal testing machine (Z100, Zwick Roell, Germany). Specimens were tested with a head speed of 0.5mm/min and loaded until failure. The cross-sectional area of each specimen was divided by the peak tensile load at failure to calculate the bond strength in MPa.

Stereoscopic Microscopy and Scanning Electronic Microscopy

After completing the test, each beam was evaluated with a stereoscopic microscope in order to identify the types of failures: adhesive (failure between tooth and restoration material); cohesive in composite (failure within the restoration material); cohesive in dentin (failure within dentin); or mixed (both cohesive and adhesive). Scanning electronic microscopy was used to analyze the hybrid layers among the different adhesive systems.

Statistical Analysis

One-way ANOVA and Post-hoc tests were conducted to compare the groups with and without CHX treatment of each separate adhesive protocol, at each storage time.

RESULTS

Mean average of dentin bond strength of adhesive systems for the three evaluation storage times, according to CHX treatment, are shown in Table 1. Results data revealed a statistical difference between groups regarding storage times, for 72 hours, 3 months and 6 months ($p\leq 0.05$). Also, statistical difference was observed when compared CHX treatment ($p\leq 0.05$), and adhesive systems ($p\leq 0.05$).

The CHX dentin treatment resulted in either significant increased ($p\leq 0.05$) bond strength or maintenance ($p\geq 0.05$) of the bond strength compared to the same equivalent group without the CHX dentin treatment, depending on the storage times. At 72 hours, none of the compared equivalent groups (same adhesive system, CHX-treated versus non-treated) presented significant difference in bond strengths ($p\geq 0.05$). However, when different adhesive systems were compared at the same

dentin treatment, Group 4 (APP) presented significantly lower bond strength compared to G2 - ASB ($p=0.010$) and G6 - SBU ($p=0.004$).

When evaluated 3 months storage time, a significant decrease ($p\leq 0.05$) was observed for all non-treated groups when compared to the respective CHX-treated groups. All groups presented higher bond strengths when CHX was applied ($p\leq 0.05$). Moreover, when comparing adhesive systems within the same dentin treatment, G5 - SBU+CHX showed the highest bond strength, significantly different than G1 - ASB+CHX ($p=0.007$) and G3 - APP+CHX ($p=0.000$), which were not significantly different within each other ($p\geq 0.05$). Comparing the non-CHX treated groups, G2 (ASB) and G4 (APP) presented the lowest bond strengths, although not significantly different than G6 (SBU) ($p\geq 0.05$).

After 6 months storage time, the same pattern as of the 3 months time was observed. For all groups, the treatment with CHX promoted higher bond strength values ($p\leq 0.05$). Again, G5 (SBU+CHX) presented higher bond strength, although not significantly different ($p=0.067$) than G1 (ASB+CHX). Group 3 (APP+CHX) also did not show a statistical difference ($p=0.179$) compared to G1 (ASB+CHX). On the other hand, when no CHX was applied, the self-etching group (G4 - APP) showed the lowest values of bond strength, although not significantly different than G2 (ASB - $p=0.628$) and G6 (SBU - $p=0.546$).

Concerning the same groups in different storage times, most of the groups maintained their bond strengths ($p\geq 0.05$), except for G2 (ASB), where a significant decrease in bond strength was observed after 3 ($p=0.000$) and 6 months ($p=0.037$) storage times compared to the baseline; and for G5 (SBU+CHX), where a different pattern was observed and bond strength results from 3 and 6 months were significantly higher compared to 72h ($p\leq 0.05$).

When evaluating failure patterns, whatever the storage time or CHX application evaluated, mixed failures were the most observed within groups, ranging from 70-80%. Adhesive failure was the second most observed one, ranging from 15-25%. Cohesive failure in dentin ranged from 5-20%, and cohesive failure in composite was only observed in one group (Figure 1). Scanning electronic microscopy images depicted longer resin tags for the etch-and-rinse adhesive system (ASB), followed by the 'strong' self-etch adhesive system (APP), and only a smear layer interaction for the universal adhesive (SBU) (Figure 2).

DISCUSSION

Enzymatic collagen matrix degradation by host-derived enzymes such as MMPs plays a significant role in the destruction of bonded interfaces (Tjaderhane *et al.*). Studies have found that these enzymes can be activated by the simple adhesive system application on dentin substrate, leaving it exposed to collagenolytic activity and starting a degradation of the dentin-bonded interface (Breschi *et al.*, 2010; De Munck *et al.*, 2010), resulting in loss of adhesion of resin composites to this substrate, which can be measured as a decrease in bond strength. However, this fact is still contradictory, since it has been reported an increased dentin MMP activity when phosphoric acid is used (Breschi *et al.*, 2010; De Munck *et al.*, 2009), while other studies reported that phosphoric acid decreased dentin MMP activity under different experimental conditions (Mazzoni *et al.*). Self-etching adhesives have also been shown to increase (Lehmann *et al.*; Nishitani *et al.*, 2006) or not affect MMPs activity (De Munck *et al.*, 2009). Thus, in order to surpass this problem and block enzymatic degradation while preserving hybrid layers, the application of CHX to dentin has been investigated (Breschi *et al.*, 2010;

Stanislawczuk *et al.*, Tekce *et al.*).

The first research hypothesis, which tested whether CHX dentin treatment would result in higher bond strengths compared to non-treated groups, was accepted. This fact was more observed after 3 and 6 months of storage times, while 72h bond strength was not affected when analyzing the same equivalent groups (same adhesives compared with or without CHX treatment). However, at this period of time, the one-step self-etching adhesive system (APP) presented lower bond strengths when no CHX was applied (G4 – APP) compared to both G2 – ASB and G6 – SBU. At 3 months, all equivalent groups showed a decrease in bond strength when no CHX was applied, and the Universal adhesive system (SBU) presented the highest bond strength values when CHX was applied. At 6 months, again the same pattern was observed, and all adhesives showed higher bond strengths when CHX was applied.

It is well known that adhesion to enamel and dentin play different roles in longevity of resin composite restorations. Due to the complex approach that is bonding to dentin, different methods have been studied in order to improve its adhesion, such as the application of plasma (Hirata *et al.*), benzalkonium chloride (Tekce *et al.*), ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) (Tekce *et al.*), chlorhexidine (Breschi *et al.*, 2010; Nishitani *et al.*, 2013; Stanislawczuk *et al.*; Tekce *et al.*), amongst others. Regarding all those methods, CHX is the most studied one (Andre *et al.*; Breschi *et al.*, 2010; Nishitani *et al.*, 2013; Stanislawczuk *et al.*; Tekce *et al.*), with good performance results when concerning MMP inhibition and longevity of the adhesive interface (Breschi *et al.*, 2010).

Chlorhexidine is an amphipathic molecule that binds to several proteins by a cation-chelating mechanism (Negrelo *et al.*). By a similar chelating mechanism, chlorhexidine prevents binding of ions such as zinc or calcium to the MMP, and so inhibits its catalytic activity (Negrelo *et al.*). In our study, the use of CHX showed improved bond strength when compared to groups without the dentin treatment with this cavity disinfectant. Others authors had shown an increase in the bond durability of adhesive systems (Breschi *et al.*, 2010; Tekce *et al.*), as well as a bactericidal effect after 5 minutes of direct contact¹ and a lower interfacial nanoleakage expression (Breschi *et al.*, 2010) when CHX treatment of dentin was performed.

The second research hypothesis, that tested whether the increased storage times would present higher degradations in the microtensile bond strengths or not, was partially accepted. In our study, for most of the adhesive systems, the μ TBS kept consistent even after 6 months of storage time. This is in accordance to other studies, which showed that most of adhesives did not present a significant decrease in μ TBS even after 1 year of storage in artificial saliva (Andre *et al.*).

Hydrolysis is a chemical process that breaks covalent bonds between the polymers by addition of water to ester bonds, resulting in loss of the resin mass, which is considered as one of the main reasons for resin degradation within the hybrid layer, contributing to the reduction in bond strengths created by dentin adhesives over time (Tay *et al.*). In our study, only Group 2 (ASB), non-CHX treated, presented a decrease in bond strength after 3 and 6 months of storage in distilled water.

All groups with CHX application showed no difference on 3 and 6 months evaluation. The effect of addition of CHX to the adhesives was tested before, showing a potential for preventing or minimizing the degradation of the resin–dentine bonds in 1 year storage time (Stanislawczuk *et al.*). However, a study with a longer storage time was able to discriminate a difference in μ TBS after 2 years of storage (Breschi *et al.*, 2010). Results from those authors depicted a reduction on μ TBS

significantly higher for specimens without CHX dentin treatment, as well as loss of hybrid layer integrity and increased nanoleakage (Breschi *et al.*, 2010). On the other hand, they also observed that for the specimens treated with CHX, absence of nanoleakage was observed after 2 years of storage (Breschi *et al.*, 2010).

The investigation of failure pattern is an important tool in order to identify the weakest area of the dentine-composite interface created by adhesives (Andre *et al.*). Within the results observed in this study, mixed failures were the most seen independent on the storage times or application of CHX. It demonstrated that bonded interface could have remained stable within the periods of times. This finding can be explained by the relative short storage time (6 months), which was not enough to indicate changes in dentin-composite interface over time for most of the adhesives. Possibly, increased storage times would have been able to present different failure patterns, once it was proved a decrease in bond strength after 2 years storage time (Breschi *et al.*, 2010), although it was not seen after 1 year storage (Andre *et al.*).

It is known that the type of adhesive system used on restoration procedures may affect their clinical performance and longevity (Heintze *et al.*, 2010). 'Etch-and-rinse' adhesives involve a separate etch-and-rinse phase with phosphoric acid (Pashley *et al.*), while 'self-etch' adhesives are based on the use of non-rinse acidic monomers that simultaneously condition and prime dentin (Van Meerbeek *et al.*), and showed by SEM to penetrate deeper into dentin, when compared to self-etch protocols. The most recent universal (multi-mode) dental adhesives consist of co-polymers (such as polyacrylic acid), fillers and silane molecules, and can be used in either etch-and-rinse or self-etch approaches (Tekce *et al.*). MMPs can be activated by the simple step of conditioning dentin with phosphoric acid (De Munck *et al.*, 2009). Thus, the use of etch-and-rinse adhesive systems might produce a higher activation of endogenous MMPs in dentin, while in self-etching adhesive systems it is less pronounced (De Munck *et al.*, 2009; Osorio *et al.*, 2011), which can be translated in decreased interface degradation. In our study, this fact was not observed, since the etch-and-rinse adhesive system did not show a higher degradation compared to the self-etch adhesive system. This fact can be explained because, in our study, the self-etching adhesive system presents a really low pH (=1.0). It is known that, although 'mild' self-etching adhesive systems are less prone to activate MMPs, when using 'strong' self-etching adhesive systems, their releasing can be promoted (De Munck *et al.*, 2009). Following this idea, regarding the use of the universal adhesive system in a self-etching approach, our results corroborates to previous studies (De Munck *et al.*, 2009). Since the Universal adhesive used in our study presents a pH=2.7, likely it was less capable of activating endogenous MMPs from dentin, which may explain the higher dentin bond strength results obtained after storage times of 3 months and 6 months, compared to the other adhesive systems. The pHs of each adhesive system and acid etching can also explain the SEM micrographs. The etch-and-rinse adhesive system promoted longer resin tags due to the use of the phosphoric acid, while the 'strong' self-etch adhesive system showed shorter resin tags and the universal adhesive system showed just a few resin tags and only a interaction with the smear layer. Acid treatment of dentin facilitates the release of the MMPs enzymes, without entering direct into contact with the enzyme and therefore without destroying it (De Munck *et al.*, 2009). Chlorhexidine, even when used in low concentrations, might be able to inhibit such activity and arrest the degradation of the hybrid layers, mostly in etch-and-rinse adhesive systems (Hebling *et al.*).

Irrespective of the etch-and-rinse or the self-etch strategy, by combining hydrophilic and ionic resin monomers into the bonding agent, such as in simplified adhesives (i.e. two-step etch-and-rinse and one-step self-etch systems), the bonded interface lacks a nonsolvated hydrophobic resin

coating (Breschi *et al.*, 2008). Any kind of simplification in the clinical application procedure might result in lower bond strengths, incomplete adhesive films polymerization and increased adhesive permeability (Cadenaro *et al.*). However, various clinical procedures were proposed to optimize bonding and reduce aging, such as extended polymerization time and use of MMPs inhibitors (Breschi *et al.*, 2008; Cadenaro *et al.*), as used in this study. Thus, the use of simplified adhesive systems must be chosen with caution, and if possible, accompanied by disinfection protocols such as CHX or other optimized bonding protocols. Further studies should focus on the long term of simplified adhesive systems.

Under the limitations of this study, it can be concluded that CHX application influences on dentin adhesion in different time storages and adhesive procedures. When CHX dentin treatment was used, higher bond strengths values were seen compared to the same groups without treatment, for 3 and 6 months. The use of CHX treatment for all simplified bonding procedures, being etch-and-rinse, 'strong' self-etch or universal adhesive systems, can improve the bond strength to dentin substrate.

14.2 Brazilian Oral Research. Manuscript ID: BOR-2017-0032.

"Effect of 2% chlorhexidine on dentin shear bond strength of different adhesive systems: a 6 months evaluation"

Effect of 2% chlorhexidine on dentin shear bond strength of different adhesive systems: a 6 months evaluation.

Running Title: Effect of 2% chlorhexidine on shear bond strength of different adhesive systems.

Bravo, C^a ; Sampaio, CS^a ; Hirata, R^b ;Mayoral, JR^c ; Giner, L^{ca} Department of Biomaterials, College of Dentistry, Universidad de Los Andes, Santiago, Chile

^b Department of Biomaterials and Biomimetics, New York University College of Dentistry, New York, NY, USA

^c Department of Restorative Dentistry, College of Dentistry, Universitat Internacional de Catalunya, Barcelona, Spain.

ABSTRACT

Objectives: The aim of this study was to evaluate the effect of chlorhexidine dentin treatment on shear bond strength of different adhesive systems after different storage times.

Materials and Methods: One hundred and forty four human third molars were sectioned parallel to the occlusal surface to expose midcoronal dentin, polished with silicon carbide abrasive papers, and randomly divided in 6 groups of 24 each. Groups were divided according to adhesive systems and dentin treatment used: G1 (ASB+CHX – etch-and-rinse

adhesive system Adper Scotchbond 1XT + treatment with chlorhexidine 2% for 20s prior Primer); G2 (ASB); G3 (APP+CHX – self-etch adhesive system Adper Prompt L-Pop + CHX); G4 (APP); G5 (SBU+CHX - universal adhesive system Single Bond Universal + CHX); and G6 (SBU). Resin composite build up was performed for all groups with Filtek Z350 XT. Teeth were then subdivided according to storage times (n=8): 72h, 3 months and 6 months. After the designed storage times, shear bond strength was measured at a crosshead speed of 0.5 mm/min. Data were analyzed with one-way analysis of variance and Tukey-HSD tests.

Results: At 72 hours, all equivalent groups (same adhesive system, different dentin treatment) showed no significant difference in their bond strengths, when compared the CHX dentin treatment ($P \geq 0.05$). The self-etch adhesive system groups (with or without CHX) presented lower bond strengths compared to other adhesive systems ($P \leq 0.05$). After 3 and 6 months, all CHX-treated groups presented significantly higher bond strengths compared to the equivalent non-treated groups ($P \leq 0.05$). For both periods of times, the adhesive system Single Bond Universal presented the highest bond strength values within the same dentin treatment ($P \leq 0.05$), while the etch-and-rinse Adper Scotchbond 1XT and the self-etch Adper Prompt-L-Pop systems were not significantly different from each other, also within the same dentin treatments [3 months (with CHX - $P = .966$; without CHX - $P = .958$) and 6 months (with CHX - $P = .887$; without CHX - $P = .990$)].

Conclusion: Findings from this study suggests that dentin disinfection with chlorhexidine is indicated for all classes of adhesive systems, either etch-and-rinse, self-etch or universal ones, in order to improve dentin bond strength in the long term.

Keywords: adhesive systems, shear bond strength, chlorhexidine, dentin adhesion

INTRODUCTION

Although bonding to enamel is already well established in literature, the durability between dentin and adhesive systems within hybrid layers may not be that long and stable,(1-3) and has been shown to be multifactorial in nature. Long-term studies had proved that bond strength of resin-bonded dentin decreased over time due to collagen degradation.(4-6)

Degradation of hybrid layer can occur due to a series of factors. Among them, many researches had been focused on activation of endogenous matrix metalloproteinases (MMPs).(2, 4, 7-10) MMPs are a group of zinc-calcium-dependent enzymes that regulate the physiological and pathological mechanisms of collagen-based tissues.(11) Although they are present in their latent form within the dentin substrate,(12) when the inorganic scaffold surrounding the collagen fibrils of dentin is missing due to caries and/or acid etching, collagen fibers become denuded and express MMP activity, which begins the degradation process.(11)

In order to inactivate MMPs and/or improve dentin bond strength, different strategies have been proposed.(13, 14) The most commonly recommended is the application of CHX to dentin.(2-4, 9, 10, 15-18) CHX has an inhibitory effect on the endogenous collagenolytic MMPs activity,(9) so, it has beneficial effects on the preservation of dentin bond strength, and also a broad spectrum of action against both Gram-positive and Gram-negative microbes.(19)

However, chlorhexidine pre-treatment can be a problem if it interferes with the bonding procedures and application of adhesive resin to dentine. Generally, a potential problem in the use of a disinfectant before dentin bonding agents can be the possibility of

an adverse effect on the bond strength of the composite resins.(15-17)

Another issue of great importance among the several factors that may interfere with the quality of bonding remains on the type of adhesive systems used. During the bonding procedure with etch-and-rinse adhesive systems, dentin is demineralized by the action of phosphoric acid.(2, 20) This process exposes a dense layer of fibrils of the organic matrix, composed primarily of type I collagen and proteoglycan, which must be completely infiltrated with the adhesive resin to form the hybrid layer,(21, 22) a hard task to be achieved due to the organic nature of dentin. The incomplete impregnation of collagen fibers and the need of protection against the degrading mechanisms present in the oral cavity environment, led to the development of the second category, an adhesive using the self-etch strategy(23). In this strategy, there is no need to apply a preliminary phosphoric acid gel on dental substrates, as dentine demineralization and priming occur simultaneously. The dissolved hydroxyapatite crystals and residual smear layer are then incorporated in the hybridized complex.(24) Considering the differences in professional judgment regarding the selection of the adhesive strategy and number of steps, some manufacturers have released more versatile adhesive systems that include etch-and-rinse (two step) and self-etch (one or two step) options, the so called 'universal' adhesive systems.(25)

Discrepant results are found regarding dentin bond strength of different adhesive systems after the use of CHX. Its use has been shown to either increase(2, 4, 9, 10, 18, 24) or decrease(15-17) dentin bond strengths. Moreover, acid etching has shown to activate MMPs in dentin, which occurs differently when an acid-etching is directly put in contact to dentin or when 'strong' self-etching adhesives get in contact with it.(3, 8, 26) These discrepancies make this a subject of great interest in restorative dentistry and warrants investigation.

Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of the use of a CHX dentin disinfecting solution after different periods of storage times (72h, 3 months and 6 months) on the shear bond strength of different types of adhesive systems, one etch-and-rinse, one self-etch and one universal. The hypothesis tested were that (1) CHX dentin treatment would result in higher shear bond strength values when compared to groups without dentin treatment; (2) different adhesive systems would result in different shear bond strength values; and (3) increased storage times would result in decreased shear bond strength values.

MATERIAL AND METHODS

In this study, one hundred and forty-four sound and freshly extracted human third molars were used. Teeth were obtained according to protocols approved by Universidad de Los Andes, Chile, Institutional Review Board. They were cleaned and stored in distilled water at room temperature until their use.

Teeth were mounted in acrylic resin to facilitate sample preparation. Roots were removed and the crowns were sectioned with a low-speed diamond disk saw under water-cooling to expose mid-coronal dentin. The exposed surfaces were abraded in a semi-automatic polishing machine (IsoMet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) with 620 grit silicon carbide abrasive paper under water-cooling, in order to standardize smear layer.

The following adhesive systems were used: one etch-and-rinse (ASB, Adper Scotchbond 1XT, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA), one self-etch (APP, Adper Prompt L-Pop, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA) and one universal (SBU, Single Bond Universal, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA), each of them being used with and without a previous dentin treatment

with a cavity disinfectant (CHX, 2% Chlorhexidine, Cavity Cleanser, Bisco, Inc., Schaumburg, IL, USA), applied for 20s.

Teeth were then randomly divided in six groups (n = 24 each): G1-ASB+CHX; G2-ASB; G3-APP+CHX; G4-APP; G5-SBU+CHX; G6-SBU. All groups were restored with the same resin composite (Filtek Z350, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA).

Application protocol for each group was performed as follows: **G1 (ASB+CHX)** – dentin etch for 15s (37% ScotchBond Etchant, 3M ESPE, St. Paul, MN, USA), water rinse for 30s and gently dry with a cotton pellet. Application of CHX with a microbrush for 20s and lightly air-dry for 10s. Application of the single-component adhesive Adper Scotchbond 1XT followed by light-polymerization (Bluephase G2, Ivoclar Vivadent) according to manufacturer's instructions. Resin composite was incrementally build-up through a disc with a central orifice ($\varnothing=3.0$ mm and 4mm high), which was centered on the tooth to obtain the standardized composite bar for the test (2 increments, 2mm each) with Filtek Z350 XT (3M ESPE), each layer being light-polymerized for 20s (Bluephase G2, Ivoclar Vivadent); **G2(ASB)** – G2 followed the same steps previously described for G1, except for the application of CHX; **G3(APP+CHX)** – Application of CHX as previously described, application of the self-etch adhesive system Adper Prompt L-Pop followed by light-polymerization according to manufacturer's instructions. Resin composite build-up was performed following the same steps previously described for G1. **G4(APP)** – G4 followed the same steps previously described for G3, except for the application of CHX; **G5(SBU+CHX)** – Application of CHX as previously described, application of the universal adhesive system followed by light-polymerization according to the self-etch protocol of the manufacturer's instructions. Resin composite build-up was performed following the same steps previously described for G1. **G6(SBU)** – G6 followed the same steps previously described for G5, except for the application of CHX.

After the restorative procedures, each group was then subdivided into 3 subgroups, according to different storage times (n=8 each): 72 hours, 3 months and 6 months. Teeth were storage in distilled water at room temperature.

Shear Bond Strength Test

After the designed storage time period, each specimen was placed in a universal testing machine (Z100, Zwick Roell, Germany) and shear bond strength was measured at a crosshead speed of 0.5 mm/min. The shear bond strength of composite resin to dentin was recorded in Newtons (N) and calculated in MPa taking into account the cross-sectional area of the composite buildup.

Stereoscopic Microscopy and Scanning Electronic Microscopy

After the shear bond strength testing procedure, the fractured surfaces were examined in a stereoscopic microscope aiming to identify the types of failures, which were classified as: adhesive (failure between tooth and restoration material), mixed (both cohesive and adhesive), cohesive in dentin (failure within dentin) or cohesive in composite (failure within resin composite restoration) Some specimens were sputter coated with gold and prepared for SEM examination (JSM-5600LV, JEOL, Tokyo, Japan), with different magnifications to analyze the hybrid layers among the different adhesive systems. Hybrid layers were exposed with a slow speed saw and dentin was dissolved by sequential rinses in hydrochloric acid and sodium hypochlorite to reveal resin penetration.

Statistical Analysis

One-way ANOVA and Post-hoc tests were conducted to compare the groups with and without CHX treatment of each separate adhesive protocol, at each storage time.

RESULTS

Shear bond strength means of the different adhesive systems and different storage times, according to CHX dentin treatment, are shown in Table 1. Statistical tests revealed difference between groups when evaluated storage times (72 hours, 3 months and 6 months; $P \leq .05$). It was also observed statistical difference evaluated dentin treatment with CHX ($P \leq .05$), and adhesive systems ($P \leq .05$).

CHX dentin treatment proved to increase shear bond strength for all adhesive systems after 3 and 6 storage times. After 72 hours, none adhesive systems showed statistical difference, even with the use of CHX, although CHX dentin treatment slightly increased the values for groups 1 (ASB+CHX) and 3 (APP+CHX). For all storage times, group 4 (APP) showed the lowest values of shear bond strength.

At 72 hours, none of the equivalent groups (same adhesive system, comparing CHX dentin treatment) presented significant difference in shear bond strengths ($P \leq .05$). When different adhesive systems were compared within this period of storage time, groups 1 (ASB+CHX), 2 (ASB), 5 (SBU+CHX) and 6 (SBU) presented the highest values of shear bond strength, not being significant different between each other ($P \geq 0.05$). Groups from the self-etching adhesive system Prompt-L-Pop presented the lowest values, although the use of CHX increased them. Group 3 (APP+CHX) were not significant different than groups 2 (ASB), 5 (SBU+CHX) and 6 (SBU) ($P \geq .05$). Group 4 (APP) presented the lowest shear bond strengths, although not different than group 3 (APP+CHX) ($P = .862$).

After 3 months storage time period, all equivalent groups (same adhesive system, comparing CHX treatment) presented higher values when CHX treatment was applied ($P \leq$

.05). Moreover, when evaluating different adhesive systems after CHX dentin treatment, G5 (SBU+CHX) presented the highest values of shear bond strength, significant different than G1 (ASB+CHX) ($P = .000$) and G3 ($P = .000$). Groups 1 and 3 were not significant different between each other ($P = .966$). When evaluating non-CHX dentin treated groups, again the Universal adhesive system (G6 – SBU) presented the highest bond strength values, significant different than G2 (ASB) ($P = .000$) and G4 (APP) ($P = .000$). Groups 2 and 4 were not different between each other ($P = .958$).

When 6 months storage time was evaluated, results from the adhesive systems without the use of CHX dropped more drastically for all groups, and all adhesive systems showed decreased results when CHX was not applied ($P \leq .05$). The Universal adhesive system presented higher shear bond strengths values either when dentin was treated with CHX or not ($P \leq .05$). Regarding the CHX-treated groups, G5 (SBU+CHX) presented the highest bond strengths, significant different than the other CHX-treated groups ($P \leq .05$). Groups 1 (ASB+CHX) and 3 (APP+CHX) were not significant different between each other ($P \leq .0887$). When non-CHX treated groups were evaluated, G6 (SBU) presented the highest shear bond strengths, significant different than G2 (ASB) ($P = .005$) and G4 (APP) ($P = .001$). G2 and G4 did not present statistical significant difference ($P = .990$).

Regarding the same group within different storage times, most of the groups presented a significant decrease in shear bond strength after 3 and 6 months ($P \leq .05$), except for G3 (APP+CHX), that did not show statistical difference between the different periods of time ($P \geq .05$). Group 1 (ASB+CHX) presented a decrease in SBS after 3 and 6 months, being statistically different than 72h ($P \leq .05$), but not different between each other ($P = .096$). G2 (ASB) presented a significant decrease from 72h to 3 months ($P = .000$) and also from 3 to 6 months ($P = .044$). Groups 4 (APP) and 6 (SBU) only showed a decrease after 6 months, statistically different than 72h and 3 months storage times ($P \leq .05$). Group

5 (SBU+CHX) presented a different pattern, and results after 3 months were significantly higher compared to 72h ($P = .000$) and 6 months ($P = .000$).

When evaluating failure patterns, whatever the storage time or CHX application evaluated, mixed failures were the most observed within groups, ranging from 75-100%. Cohesive failure in dentin was the second most observed one, ranging from 0-25%. Adhesive failure ranged from 0-12.5%, and cohesive failure in composite was not observed (Figure 1). Scanning electronic microscopy images depicted longer resin tags for the etch-and-rinse adhesive system (ASB), followed by the 'strong' self-etch adhesive system (APP), and only a smear layer interaction for the universal adhesive (SBU) (Figure 2).

DISCUSSION

Until nowadays, with novel adhesive systems, dentin bonding remains difficult because of its unique organic nature. In order to develop increased bond strength and decreased bonding degradation, different approaches have been studied,(13, 14) such as dentin CHX application.(2, 4, 9, 10, 18, 21) In our study, the dentin treatment with CHX resulted in higher shear bond strength of all groups of dentin adhesive systems after 3 and 6 months, although after 72 hours the values comparing CHX-treated or non-treated groups remained statistically insignificant, thus partially accepting the first hypotheses. Dentin treatment with CHX has shown distinct results in the literature. Among the contradictory results related to CHX application in dentin, studies had shown a decrease in bond strength after CHX application,(15-17) while others the opposite results (2, 4, 9, 10, 18, 21). In our study, the use of this disinfectant on dentin treatment proved to be effective in improving the shear bond strengths of simplified dentin adhesive systems, going in accordance to several other studies.(2, 4, 9, 10, 18)

CHX is an amphiphilic molecule that binds to various proteins by a cation-chelation mechanism, and may inhibit the catalytic activity of MMPs by binding with Zn^{+2} or Ca^{+2} .(4) CHX has proved to significantly lower the loss of bond strength and nanoleakage seen in acid-etched resin-bonded dentin artificially aged for 2 years.(4) The use of CHX can inhibit matrix metalloproteinases (MMPs), which can be activated via contemporary bonding agents and auto-degrade collagen fibers within the dentin hybrid layer.(3, 8)

Another issue that can affect the bond strength is the capability of an adhesive system of activate MMPs. Adhesive systems with higher pHs seems to activate less those enzymes, and thus showing less degradation over time.(3, 8) This fact was observed in our study, thus accepting the second hypothesis, which showed that different adhesive systems would result in different shear bond strength values. After 3 months, either when dentin was treated with CHX or not, the Single Bond Universal adhesive system presented higher shear bond strengths values compared to the other groups, with the same dentin treatment. After 6 months, again, the Universal adhesive system presented higher shear bond strengths values either when dentin was treated with CHX or not, compared to other adhesive systems within the same dentin treatments.

Although the adhesive system APP is presented as a self-etch approach, its pH is relatively low (pH=1.0), and in this case, showed, after 6 months of storage time, results similar as the etch-and-rinse adhesive system ASB, which with uses an acid etching of also a low pH (pH=0.1). On the other hand, the universal adhesive of pH=2.7 showed higher values of bond strength in all periods of time. Possibly, this adhesive system activated less MMPs in the dentin, thus promoting lower hybrid layer degradation.(8) It was showed before that mild self-etch adhesive systems were less prone to release those enzymes when compared to strong self-etch adhesive systems.(3, 8) The pH values can also explain the SEM images shown in this study, where the lowest pH achieved in the dentin treatment, the

deepest the resin tags. Moreover, the universal adhesive system used in this study presents 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate monomer (MDP) in their composition, a molecule that is capable of bonding chemically to dentine. (25, 27) It was shown an effective chemical interaction between MDP and hydroxyapatite, forming a stable nano-layer that could result in a stronger phase at the adhesive interface, increasing the mechanical strength of the adhesive interface,(25, 27) which can also explain the higher shear bond strength values obtained by this adhesive system, either when used with CHX or not. The lower results of the adhesive system APP groups even in the 72 hours storage time, compared to the other adhesive systems, can be related to its low pH. Very low pH and the high hydrophilicity might have a detrimental effect on the mechanical stability as a result of excessive water sorption. It was showed that its porous hybrid layer facilitates diffusion of water through the adhesive layer.(28) However, as it has been mentioned, after 6 months, this adhesive system did not present statistical difference when compared to the etch-and-rinse adhesive system groups, being either when dentin was treated with CHX or not.

The third research hypotheses, that tested whether increased storage times would decrease shear bond strength was also accepted, since most of the adhesive systems groups resulted in a degradation of the shear bond strength after storage. The storage medium may simulate the time and conditions to which restorations will be exposed in the mouth, and this is of great value in the evaluation of bond strength degradation.(29) In general, water, artificial saliva and mineral oil are the media most used for storage in *in vitro* tests for evaluating bond strength degradation over time. These results go in accordance with other studies, which show a significant decrease in dentin bond strength over time.(4, 8) However, groups treated with CHX presented less degradation compared to the non-treated ones, going in accordance to a study that showed that the use of CHX as an MMP inhibitor resulted in the arrest of the *in vivo* degradation of the hybrid layers after six months

in an etch-and-rinse adhesive system.(9) Thus, long-term *in vivo* studies still warrants investigation in the CHX dentin treatment scenario of different types of adhesive systems.

CONCLUSION

Within the limitations of this laboratory study, it may be stated that dentin treatment with chlorhexidine increases the bond strength of different adhesive systems when evaluated in different storage times. This fact seems to be more pronounced after storage times of 3 and 6 months, respectively, while immediate 72 hours bond strength was not affected by CHX treatment. The Universal adhesive system presented better bond strength results after 3 and 6 months, either when using or not CHX dentin treatment. The authors highly indicate the use of CHX dentin treatment when dealing with any adhesive system.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank 3M ESPE for donation of the materials.

15 Carta aprobació Comissió Acadèmica Doctoral.



Sr. Cristián Bravo Palma

Benvolgut Sr.

Per la present, li comunico que la Comissió Acadèmica del Doctorat en odontologia, en la seva sessió del **23 de novembre del 2012**, i un cop estudiada la seva sol·licitud ha acordat:

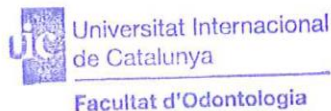
S'acorda admetre al Sr. Cristián Bravo Palma al Període de Recerca del Doctorat en Odontologia.

S'acorda aprovar el Projecte de Tesi titulat "In-vitro comparative study of the use of 2% Chlorhexidine on microtensile bond strength and shear bond strength on diferent dentin adhesives" i nomenar el Dr. Juan Ricardo Mayoral i el Dr. Lluís Giner com a Directors de la Tesi.

Adicionalment, s'informa que la normativa de la UIC estableix que cal obtenir una avaluació favorable del Comitè d'Ètica en la Recerca, abans de la posada en marxa de la investigació. Haurà d'aportar aquest informe quan l'obtingui.

Aprofito l'avinentesa per saludar-la cordialment,

Dra Montserrat Mercadé i Bellido
Coordinadora Comissió Acadèmica de Doctorat en Odontologia
Facultat d'Odontologia



Sant Cugat del Vallès, 23 de novembre del 2012

16 Carta aprobació Comité de ètica.



CARTA APROVACIÓ DIRECTA PROJECTE PEL CER

Codi de l'estudi: EST-ELM-2012-02

Versió del protocol: 1.0

Data de la versió: 14/12/12

Títol: "In-vitro comparative study of the use of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength and shear bond strength on different dentin adhesives"

Sant Cugat del Vallès, 19 de desembre de 2012

Investigador: Cristián Bravo Palma

Títol de l'estudi: "In-vitro comparative study of the use of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength and shear bond strength on different dentin adhesives"

Benvolgut(da),

Valorat el projecte presentat, el CER de la Universitat Internacional de Catalunya, considera que, el contingut de la investigació, no implica cap inconvenient relacionat amb la dignitat humana, respecte als animals, ni atempta contra el medi ambient, ni té conflictes econòmics i d'interessos.

Per aquests motius, el Comitè d'Ètica de Recerca, **RESOLT FAVORABLEMENT**, emetre aquest **CERTIFICAT D'APROVACIÓ**, per que pugui ser presentat a les instàncies que així ho requereixin.

Em permeto recordar-li que si en el procés d'execució es produís algun canvi significatiu en els seus plantejaments, hauria de ser sotmès novament a la revisió i aprovació del CER.

Atentament,

Dr. Josep Argemí
President CER-UIC