



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENT D'ESTOMATOLOGIA

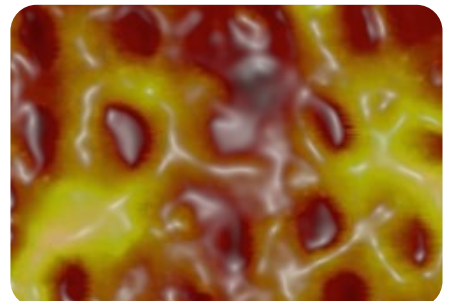
TESIS DOCTORAL

**ALTERACIONES EN LA
RUGOSIDAD DE LA SUPERFICIE
DENTINARIA, DESPUÉS DE LA
APLICACIÓN DE DOS AGENTES
BLANQUEADORES DE ALTA
CONCENTRACIÓN**

**PRESENTADO POR LA LICENCIADA:
MARÍA PALOMARES FORT**

**DIRECCIÓN: PROF. DR. D. LEOPOLDO FORNER NAVARRO
PROFA. DRA. DÑA. M^A CARMEN LLENIA PUY**

VALENCIA, 2015





VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

DEPARTAMENT D'ESTOMATOLOGIA

TESIS DOCTORAL

**ALTERACIONES EN LA
RUGOSIDAD DE LA SUPERFICIE
DENTINARIA, DESPUÉS DE LA
APLICACIÓN DE DOS AGENTES
BLANQUEADORES DE ALTA
CONCENTRACIÓN**

**PRESENTADO POR LA LICENCIADA:
MARÍA PALOMARES FORT**

**DIRECCIÓN: PROF. DR. D. LEOPOLDO FORNER NAVARRO
PROFA. DRA. DÑA. MA CARMEN LLENA PUY**

VALENCIA, 2015



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA
Departament d'Estomatologia

Unitat Docent de Patologia i Terapèutica Dentàries

D. Leopoldo Forner Navarro y D^a M^a Carmen Llena Puy, Profesor y Profesora Titulares del Departamento de Estomatología de la Facultad de Medicina i Odontología de la Universitat de València,

hacen constar que,

la tesis doctoral titulada “Alteraciones en la rugosidad de la superficie dentinaria después de la aplicación de dos agentes blanqueadores de alta concentración”, presentada por el licenciado D^a María Palomares Fort, ha sido realizada bajo nuestra dirección y que reúne las condiciones necesarias para su presentación y defensa.

Lo que firmamos a los efectos oportunos,

Prof. Dr. Forner Navarro

Prof^a Dr^a Llena Puy

Valencia, 14 de septiembre de 2015.

“Cuida tus Pensamientos
porque se volverán Actos.
Cuida tus Actos
porque se harán Costumbre.
Cuida tus Costumbres
porque formarán tu Carácter
Cuida tu Carácter
porque formará tu Destino.
Y tu Destino será tu Vida”

Gandhi

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, el Dr. Leopoldo Forner y la Dra. M^a Carmen Llena, que me enseñan cada día, por su ayuda y motivación constante para que este trabajo saliera adelante.

A Manolo y Cristina por su trabajo en la distancia.

A Manolo y José Luís por tener tanta paciencia y ayudarme con el Microscopio de Fuerzas Atómicas acompañándome en todas las horas que allí he pasado.

A mis compañeros de la Unidad de PTD por su consejo

A mis compañeros del Máster de Endodoncia por su cariño y compañerismo.

A mis padres, Jesús y Rosa porque sin ellos nada hubiera sido posible, por creer en mí e inculcarme todos los valores que han hecho posible que hoy haya llegado hasta aquí y porque nunca dudaron que lo conseguiría.

A mi hermana, Paula, mi eterna confidente, mi amiga, mi compañera. Por animarme en los momentos difíciles.

A Quique mi apoyo, por facilitarme y entender siempre mi trabajo, por estar ahí incondicionalmente y creer que este momento llegaría.

A María y mis primas por escucharme y su ayuda para que yo pudiera trabajar.

ÍNDICE

ANTECEDENTES	15
1.REPERCUSIÓN DEL AGENTE BLANQUEADOR SOBRE LA DENTINA	17
1.1.BASES DE LA TERAPÉUTICA DE LAS DISCOLORACIONES DENTALES.	17
1.1.1. EVOLUCIÓN DE LAS TÉCNICAS DE BLANQUEAMIENTO.	17
1.1.2. TÉCNICAS DE BLANQUEAMIENTO EN DIENTES CON UN TRATAMIENTO DE CONDUCTOS.	23
1.2. EFECTOS SECUNDARIOS DE LOS AGENTES BLANQUEADORES SOBRE EL ESMALTE Y LA DENTINA.	26
1.3. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA DENTINA	37
1.3.1.ORGANIZACIÓN DE LA DENTINA	37
1.3.2 MICRODUREZA DENTINARIA	37
1.3.3 ELASTICIDAD DE LA DENTINA	43
2.ANÁLISIS DENTINARIO CON MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS	44
2.1.FUNCIONAMIENTO DEL MICROSCOPIO DE FUERZAS ATÓMICAS.	44
2.2.UTILIZACIÓN DE LA MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS EN ODONTOLOGÍA	47

2.3.EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS SECUNDARIOS DE LOS AGENTES BLANQUEADORES SOBRE LOS TEJIDOS MINERALIZADOS DEL DIENTE MEDIANTE MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS.	52
---	----

JUSTIFICACIÓN	57
----------------------	----

OBJETIVOS	63
------------------	----

MATERIAL Y MÉTODOS	67
---------------------------	----

1.MUESTRA	69
-----------	----

1.1. TAMAÑO MUESTRAL.	69
-----------------------	----

1.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN	69
---	----

1.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN	69
-------------------------------	----

1.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	70
-------------------------------	----

1.3. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA	70
---------------------------------	----

1.4. ASIGNACIÓN A GRUPOS	70
--------------------------	----

2. PREPARACIÓN DE LOS DIENTES PARA SU OBSERVACIÓN CON MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS.	71
--	----

3.AGENTE Y PRODUCTOS BLANQUEADORES.	72
-------------------------------------	----

3.1. APLICACIÓN DE LOS PRODUCTOS SOBRE LA DENTINA	73
---	----

3.1.1. Peróxido de hidrógeno al 37,5%.	73
3.1.2. Peróxido de hidrógeno al 35%.	73
4. OBSERVACIÓN	75
4.1. IMÁGENES EN DOS DIMENSIONES $5\mu\text{m}^2$	
ANTES DE LA APLICACIÓN DE NINGÚN AGENTE	
BLANQUEADOR	82
4.1.1. Imágenes antes de aplicar peróxido de hidrógeno al	
35% de $5\mu\text{m}^2$	82
4.1.2. Imágenes antes de aplicar peróxido de hidrógeno al	
37,5% de $5\mu\text{m}^2$	84
RESULTADOS	89
1.EFECTOS DE LOS AGENTES BLANQUEANTES	
SOBRE LA SUPERFICIE DENTINARIA	91
1.1 EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDROGENO AL	
35% EN LA TOPOGRAFIA SUPERFICIAL DE LA	
DENTINA.	91
1.2 EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDROGENO AL	
37,5% EN LA TOPOGRAFIA SUPERFICIAL DE LA	
DENTINA.	96
2.ANÁLISIS DE LOS DATOS	101
2.1 RESULTADOS DE I.RAW MEAN	101

2.2 RESULTADOS DE I.RQ	103
2.3 RESULTADOS DE I.RA	104
2.4 RESULTADOS DE I.RMAX	106
2.5 RESULTADOS DE I.Z.RANGE	107
2.6 RESULTADOS DE I.S.A.D.	108
DISCUSIÓN	111
CONCLUSIÓN	123
BIBLIOGRAFÍA	127

ANTECEDENTES

1. REPERCUSIONES DEL TRATAMIENTO BLANQUEADOR SOBRE LA DENTINA.

1.1. BASES DE LA TERAPÉUTICA DE LAS DISCOLORACIONES DENTALES.

El blanqueamiento dental es el tratamiento más conservador que se utiliza en la terapéutica de las discoloraciones dentales.

Es uno de los procedimientos dentales más solicitados actualmente y, cada vez más, es considerado parte de la rutina habitual de una clínica odontológica.

1.1.1. EVOLUCIÓN DE LAS TÉCNICAS DE BLANQUEAMIENTO.

Los dientes blancos se asocian a conceptos como juventud y salud, de ahí el interés por conseguir una dentición con esas características, el cual se remonta a la existencia de algunos de los textos más antiguos, como muestra el

siguiente versículo bíblico: “Rojizos son sus ojos más que el vino y la blancura de sus dientes más que la leche” (Génesis 49:12), de la misma manera que, en la antigua China imperial, las viudas teñían sus dientes de negro como signo de renuncia a la belleza.

En la edad media, los barberos utilizaban una mezcla, denominada “aquafortis”, que contenía ácido nítrico, para blanquear los dientes. Pero, hay que remontarse al final del siglo XIX para encontrar el inicio de los procedimientos blanqueadores odontológicos contemporáneos. [Godstein y Graber, 1995; Godstein, 1997; Tonait, 2000; Cohen y Burns, 2002; Atin y cols., 2003; Guzmán 2003]. Así, Harlan (1884) publicó el uso de dióxido de hidrógeno de hidrógeno con este fin, producto que es la base de los tratamientos blanqueadores actuales.

Algunos de los episodios más relevantes en este proceso de desarrollo de técnicas de blanqueamiento dental se resumen a continuación.

- Dwinelle (1850) recomienda el uso de cal clorada para el blanqueamiento de dientes no vitales.
- Atkinson (1862) y Chappel (1877) describen el empleo del ácido oxálico como agente blanqueante. Se empiezan a realizar estudios para el

blanqueamiento dental utilizando materiales como el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) y el ácido clorhídrico, juntos o por separado, para el blanqueamiento interno (en dientes con tratamientos de conductos) o externo, de los dientes.

- Herman (1864) emplea una combinación de hidrocloreto de calcio y ácido acético, el cloro que se libera producía el blanqueamiento; a partir de entonces se ensaya con otras sustancias blanqueadoras como cloruro de aluminio, ácido oxálico, éter-peróxido-dióxido de hidrógeno, peróxido de sodio, ácido sulfuroso...
- Taft y Atkinson (1879) sugieren el uso de una solución clorada (solución de Labarraque).
- En 1885 se introduce la utilización de corriente eléctrica para producir calor y así acelerar el proceso de aclaramiento.
- Kirk (1889) emplea la corriente eléctrica para catalizar el proceso de blanqueamiento y en 1893 utiliza el peróxido de sodio.
- Garretson (1895): blanqueamiento no vital empleando cloro.
- Weskale (1895) recomienda una mezcla de peróxido de hidrógeno y éter, que para que sea más efectiva se activa con corriente eléctrica.

- Rosenthal (1911) sugiere el empleo de la luz ultravioleta.
- Kane (1916) descubre que el exceso de flúor en el agua potable provoca coloraciones oscuras en los dientes y emplea algodones con ácido clorhídrico para tratar casos de fluorosis, con termoactivación.
- Abbot (1918): pionero en el empleo de H₂O₂ al 37%, “superoxol”, activado con luz y calor.
- Marsh (1938) describe por primera vez el empleo intracameral de una mezcla de perborato de sodio y agua destilada para el blanqueamiento de dientes no vitales.
- Yonger (1942) aporta el primer tratamiento efectivo contra la fluorosis dental.
- Pearson (1958) retoma el blanqueamiento en dientes no vitales empleando calor.
- Nutting y Poe (1963) modifican la técnica citada por Marsh e introducen el denominado “blanqueamiento ambulatorio” o *walking bleach*, empleando peróxido de hidrógeno al 30% mezclado con perborato de sodio intracameramente.
- McInnes (1966): aplicación sobre los dientes de algodones impregnados con una solución preparada *in situ* de 5 ml de ácido clorhídrico al 36%, 5 ml de peróxido de hidrógeno al 30% y éter al 30%. Tras unos 18 minutos se aclaraban los dientes con agua y

se aplicaba una pasta de bicarbonato de sodio para neutralizar. Finalmente pulía los dientes.

- Cohen (1970) desarrolla el primer tratamiento para discoloraciones por tetraciclinas.
- Arens (1972) usa las técnicas de blanqueamiento termoactivado
- Zaragoza (1980) introduce la técnica termoactivada con peróxido de hidrógeno al 70% activado en una cubeta térmica).
- Mccloskey (1984) preconiza el empleo de una solución diluida de ácido clorhídrico frotándola contra el esmalte con bolas de algodón y prosiguiendo con la técnica de McInnes.
- Croll y Cavanaugh (1986): técnica erosivo-abrasiva con ácido clorhídrico y piedra pómez.
- Munro (1986) desarrolla el primer agente comercial blanqueador con peróxido de carbamida al 10%.
- Feinman y cols. (1989) sistematizan la técnica con peróxido de hidrógeno activado por calor.

Fue durante las décadas los 70 y los 80 cuando se comienza a usar altas concentraciones de peróxido de hidrógeno con fines blanqueadores, con y sin activación térmica o lumínica y se empiezan a describir efectos secundarios que afectan al complejo dentino-pulpar

(resorciones radiculares) y a los tejidos orales no mineralizados.

A finales de la década de los 80, algunos clínicos notaron fortuitamente que el antiséptico de peróxido de carbamida (Glyoxide[®]), usado en el tratamiento de úlceras aftosas en tejidos blandos y como desinfectante después de cirugía periodontal, mostraba como resultado un blanqueamiento significativo del esmalte dental, especialmente cuando se utilizaba con la técnica de cubetas como apósitos. Este producto libera un tercio de su concentración en forma de peróxido de hidrógeno.

Además de los peróxidos se siguen proponiendo productos alternativos: en 1990 se comercializa "Prema", una mezcla de ácido clorhídrico al 10% y piedra pómez; Miara y cols. (1991) introducen "Microclean", una mezcla de ácido clorhídrico, polvo de piedra pómez y peróxido de hidrógeno a baja concentración.

Haywood y Herman (1994) describen la técnica del blanqueamiento "en casa" con aplicador nocturno, utilizando un gel de peróxido de carbamida al 10%, en una cubeta prefabricada, durante 1-2 semanas. Esta técnica popularizó mucho el blanqueamiento dental.

En el periodo 1994-1999, se introdujeron nuevos medios de activación para los agentes de blanqueamiento

como: luz halógena, arco de plasma o diversos tipos de láser (argón, xenón, CO₂, “de diodos”).

Las últimas novedades incluyen la propuesta de activación de los peróxidos con plasma [Joiner 2006] [Zach y Cohen 1965] o el desarrollo [Riutord y cols. 2011; Forner y cols., 2012] de un producto basado en peróxido de carbamida a baja concentración activado enzimáticamente (lactoperoxidasa).

Actualmente está generalizado el uso de productos blanqueadores basados en peróxido de hidrógenos o de carbamida con o sin algún procedimiento de activación no calorífico.

1.1.2. TÉCNICAS DE BLANQUEAMIENTO EN DIENTES CON UN TRATAMIENTO DE CONDUCTOS.

El procedimiento de blanqueamiento se puede llevar a cabo en dientes vitales o en dientes no vitales.

Para el blanqueamiento en dientes no vitales el agente clásicamente empleado ha sido el peróxido de hidrógeno en diferentes concentraciones y/o el perborato de sodio.

También se utiliza peróxido de carbamida y percarbonato de sodio [Tonait, 2000; Atin, 2003]. Los tres últimos son precursores del peróxido de hidrógeno. El mecanismo de acción consiste en liberar radicales libres que producen la ruptura de las grandes moléculas discolorantes. Las mismas moléculas que producen la deseada acción blanqueante son también las responsables de los efectos secundarios de estas técnicas clínicas. [Ontiveros y Paravina 2009]

El agente activo principal de los agentes blanqueadores es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la concentración de este agente es variable, del 3% al 40%.

Diversos estudios *in vitro* han permitido establecer que el H_2O_2 , debido a su bajo peso molecular y habilidad para desnaturalizar proteínas, penetra los tejidos mineralizados y se difunde fácilmente a través de la matriz orgánica del esmalte y dentina, para ejercer su efecto blanqueante [Godstein y Graber, 1995; Benetti, 2004].

Debido a que los radicales libres del H_2O_2 tienen electrones no apareados, son extremadamente electrofílicos (reactivos) e inestables y atacarán casi cualquier molécula orgánica

con el fin de lograr estabilidad, generando otros radicales [Godstein y Graber 1995; Guzmán 2003].

Los radicales pueden reaccionar con la mayoría de enlaces insaturados, lo que resulta en una ruptura molecular y un cambio en la absorción de energía por parte de las moléculas orgánicas del esmalte pigmentado, dispuestas entre la sustancia inorgánica (cristales de hidroxiapatita). De este modo, se forman moléculas más simples y pequeñas que reflejan menos luz, creando un efecto de aclaramiento del color dental.

Así, al iniciar el proceso de blanqueamiento, los compuestos carbonados altamente pigmentados y de alto peso molecular, que poseen una conformación estructural en anillo con dobles enlaces insaturados, son abiertos y convertidos en estructuras lineales, las cuales tienen un menor peso molecular y son menos oscuras. Estas cadenas lineales son compuestos carbonados, habitualmente pigmentados de amarillo y presentan aún dobles enlaces. Sobre estas cadenas continuará la acción de los radicales libres para romper los dobles enlaces, por lo que son transformadas en estructuras hidrófilas, tipo alcohol, con enlaces saturados, las cuales suelen ser incoloras, por lo que el tejido dental se blanquea de

manera progresiva [Godstein y Graber, 1995; Guzmán 2003].

Pero si el agente de blanqueamiento se deja actuar por más tiempo, se alcanza el punto de saturación del material, estado en el cual hay rotura de enlaces proteicos y cambios, en los materiales que contienen carbono, a constituyentes aún menores, lo que se traduce en una degradación y pérdida de la matriz orgánica del diente [Godstein, 1997].

1.2. EFECTOS SECUNDARIOS DE LOS AGENTES BLANQUEADORES SOBRE EL ESMALTE Y LA DENTINA.

El peróxido de hidrógeno es una solución que puede ser utilizada tanto para el blanqueamiento vital como para el no vital. Se puede descomponer en diversas moléculas: oxígeno libre, hidroxilos, hidrogeniones o perhidroxilos.

El peróxido de carbamida es una solución muy inestable y se descompone en sus partes constituyentes rápidamente, así al entrar en contacto con los tejidos de la saliva, se

descompone en peróxido de hidrógeno, que se disocia a su vez en agua y oxígeno activo o en otras formas moleculares, mientras la urea se descompone en amoníaco y dióxido de carbono.

Los agentes blanqueadores pueden tener efectos deletéreos sobre los tejidos orales, entre ellos los tejidos mineralizados del diente.

En general cuando el peróxido se disocia, produce una bajada de pH en el medio en el que se encuentra de forma inmediata. Este efecto sobre el esmalte (y sobre la dentina), potencialmente, da lugar a un patrón de grabado ácido, cuya profundidad y características variarán en función del pH del producto y del tiempo de contacto [Llena y cols., 1992].

Este efecto en condiciones *in vivo*, puede resultar poco trascendente y completamente reversible, gracias a los mecanismos de remineralización propios del medio oral [Leonard y cols., 2001; Rittery cols., 2002].

Los estudios *in vitro*, demuestran una reducción de la microdureza del esmalte y de la dentina tras el tratamiento durante tres semanas con un agente blanqueador a base

de peróxido de carbamida (PC) al 10% [Basting y cols., 2001].

Al igual que en el efecto de grabado, los cambios en la microdureza del esmalte también varían en función del producto utilizado, aunque se trate de la misma concentración de agente blanqueador [Rodrigues y cols., 2001] existiendo una mayor disminución de la microdureza subsuperficial que de la superficial, produciéndose la destrucción de los cristales de hidroxiapatita y su transformación en cristales de ortofosfato cálcico [Cimilli y Pameijer, 2001].

Contrariamente a lo mencionado hasta ahora, con algunos agentes blanqueadores, a base de PC al 10%, se aprecia un aumento de la microdureza subsuperficial en el esmalte [Akal y cols., 2001].

El peróxido de hidrógeno puede ejercer efectos adversos tanto sobre la fase orgánica como sobre la inorgánica de los tejidos mineralizados del diente.[Lewinstein, 1994; Rotstein, y cols., 1996; Atin, y col. 2003].

Sobre el esmalte, Auschill y cols. (2002) compararon tres tipos de productos de blanqueamiento, ninguno de los cuales ocasionó cambios en la estructura superficial del

esmalte, dato similar al que fue encontrado por White y cols. (2002).

Turkun y cols. (2002) al estudiar el peróxido de carbamida al 10% (Colgate® y Starbrite®) encontraron que, justo al finalizar el tratamiento, la porosidad de la superficie del esmalte tuvo un incremento en el grupo de Colgate® mientras que el grupo de Starbrite® mostró alteraciones erosivas en la superficie. A los 3 meses, la morfología de la superficie del esmalte en el grupo Colgate® fue similar a la de los dientes no tratados. Las erosiones encontradas en el grupo Starbrite® disminuyeron y las superficies fueron casi similares a la de los dientes no tratados. Concluyeron que aunque hubo alteraciones con los dos productos, al cabo de 3 meses hubo reversión del proceso.

Kwon y cols. (2002), por su parte, encontraron una capa no uniforme de alteraciones morfológicas y diferentes grados de porosidad sobre las superficies.

Lewinstein y cols. (2003) realizaron un estudio en el cual se comprobó que el peróxido de hidrógeno al 30% reduce la dureza del esmalte y la dentina, situación que está relacionada con el tiempo que permanece en contacto con estas estructuras del diente, encontrándose disminución de la dureza de la dentina a los 5 minutos y a

los 15 minutos en el esmalte, demostrando con esto que el peróxido de hidrógeno afecta no sólo los componentes inorgánicos a través de una desmineralización ácida (al 30% tiene un pH de 2-3), si no que daña también el componente orgánico de la dentina, lo que puede ser probablemente causado por desnaturalización del colágeno por parte de los radicales libres del H_2O_2 . La reducción de la dureza de los tejidos duros puede asumirse como disolución y degradación. En este mismo estudio, la mezcla perborato/peróxido al 30% no redujo la dureza ni del esmalte ni de la dentina, lo que podría atribuirse al pH básico de la mezcla (pH=8).

El aumento en la solubilidad de la dentina y del cemento puede incrementar su susceptibilidad a la resorción; cuando se mezcla perborato con peróxido al 3% se consigue una reducción doce veces menor, comparándola con una concentración al 30% [Atin y cols., 2003].

En un estudio mediante microscopía electrónica de barrido y espectrofotometría de rayos X, se analizó el efecto del H_2O_2 al 30% y del peróxido de carbamida al 10% sobre el esmalte, la dentina y el cemento, evidenciándose en los tres tejidos una alteración en la proporción calcio/fósforo, así como en los niveles de potasio y azufre, por parte del H_2O_2 al 30%, lo que indica una alteración en la fase inorgánica; por otra parte los productos comerciales de

peróxido de carbamida al 10%, con un pH que va de 6 a 6,5 alteraron la dentina y el cemento [Rotstein y cols., 1996]

También se ha descrito que los peróxidos ocasionan una reducción en la resistencia a la fractura, así como un efecto adverso sobre las propiedades biomecánicas de la dentina, en tanto que la mezcla con perborato no muestra efectos adversos [Atin y cols., 2003]

Sobre la dentina, estudios *in vitro* con peróxido de carbamida al 10%, demuestran una reducción inicial de la microdureza, que se recupera tras su conservación en saliva durante 14 días [Freitas y cols., 2002].

El peróxido de hidrógeno al 7% produce cambios en la superficie y en la microdureza del esmalte en estudios *in vitro* [Lopes y cols., 2002].

Otro aspecto importante es la resistencia al desgaste del diente blanqueado, la cual no parece verse afectada aún cuando el antagonista sea un cuerpo cerámico [Clelland y cols., 2002].

Shanon y cols. (1993) encontraron alteraciones significativas en la superficie del esmalte de dientes expuestos al peróxido de carbamida al 10% durante 15 horas diarias durante cuatro semanas e indicaron que los

efectos del peróxido de carbamida al 10% son modificados gracias a la acción de la saliva que produce un efecto remineralizante sobre el esmalte.

Mcracken y Haywood (1995) estudiaron el efecto del peróxido de carbamida al 10% sobre la superficie del esmalte y concluyeron que éste no afecta a su microdureza.

Pinheiro y cols. (1996), en un estudio *in vitro* de varios agentes blanqueadores a base de peróxido de carbamida con diferentes concentraciones, hallaron que el peróxido de carbamida al 16% producía una disminución en la microdureza.

Zalkind (1996), usando microscopía electrónica, comparó el efecto de cuatro agentes blanqueadores con diferentes contenidos a diferentes periodos de tiempo y enunció que los cambios en la superficie del esmalte estaban en relación directa al tiempo de exposición.

Rostein y cols. (1996) compararon el efecto del peróxido de carbamida, del peróxido de hidrógeno y del perborato de sodio y hallaron que los peróxidos produjeron pérdida de calcio y de fósforo.

Ernst (1997) observó, en un estudio *in vitro* con un microscopio electrónico de barrido, que los agentes blanqueadores produjeron alteraciones morfológicas más leves en la superficie del esmalte que el ácido fosfórico al 37%.

Haywood (2002) sostiene que durante una profilaxis se eliminan 5-10 micras de esmalte y también de 5 a 50 micras en los procesos de colocación de bandas. Por ello, los posibles efectos sobre la superficie del esmalte producidos por el proceso de blanqueamiento deben considerarse mínimos.

El proceso de blanqueamiento puede producir alteraciones morfológicas en la superficie dentinaria, alteraciones en la composición de la dentina, puede aumentar la permeabilidad e incluso producir resorciones radiculares y en algunos estudios también han citado cambios en las propiedades biomecánicas. [Jiang y cols.,2007; Joiner 2006; Jakubinek y cols., 2008]

En un estudio realizado por Hegedüs y cols. (1999) usando un espectroscopio infrarrojo, se demostró que existe relación directa entre la aplicación de peróxido de hidrógeno y de peróxido de carbamida y la dureza de la superficie del esmalte. Este estudio mostró que las

concentraciones de fosfato disminuyeron notablemente después de aplicar peróxido de hidrógeno y que, además, la concentración de dicho peróxido es directamente proporcional a la pérdida de estructura biológica del esmalte. La exposición de peróxido de hidrógeno al 30% fue la que mostró las alteraciones más severa. Concluyeron que el peróxido a esta concentración no sólo afectaba a la estructura superficial sino también a la superficie interna del esmalte debido a su bajo peso molecular y a su capacidad oxidativa

Atin y cols. (2004) concluyeron que el uso de concentraciones altas de peróxido de hidrogeno combinadas con técnicas caseras de blanqueamiento reducen sustancialmente la microdureza del esmalte encontrando que se pierden minerales en los procesos de blanqueamiento dental.

Neslihan y cols. (2006) estudiaron los efectos de la aplicación de un agente blanqueador sobre la superficie del esmalte. Encontraron que dejar actuar el peróxido de carbamida durante dos horas y seguidamente almacenar los dientes en saliva artificial durante veinticuatro horas conlleva una desmineralización del esmalte que se extiende hasta 250 μm de profundidad en la subsuperficie del esmalte.

Unlu y cols. (2004) estudiaron *in situ* e *in vitro* cómo afectan los procedimientos de blanqueamiento dental a la dureza y a la pérdida de calcio y analizaron la morfología de la superficie del esmalte. Encontraron valores de dureza inferiores en las pruebas realizadas *in vitro* comparadas con las halladas *in situ*. También encontraron que en el primer periodo de exposición al agente blanqueador se reportaron las pérdidas más altas de niveles de calcio.

Se ha descrito que el uso de agentes blanqueadores erosiona los prismas del esmalte generando estrías cerca de la unión amelodentinaria. La mayoría de los defectos fueron localizados en dirección a las estrías de Retzius.

También se ha concluido que existe relación entre el uso de peróxido de hidrógeno y la disminución de los valores de la dureza en el esmalte. Adicionalmente, encontraron que la concentración de calcio mostró un decrecimiento, en promedio, del 13-15% del peso, la concentración de fósforo disminuyó 1,34% del peso y la relación Ca/P decreció en un 1,47% [Rodrigues y cols., 2005].

En el estudio de Lewinstein y cols. (2004), se estudiaron los efectos que tiene la aplicación de agentes blanqueadores y la subsiguiente aplicación de flúor en las muestras estudiadas, encontrando hallazgos importantes para la práctica clínica. El primero es que, al igual que en los estudios anteriores, las técnicas de blanqueamiento en el consultorio y en el domicilio alteran de forma directa la dureza del esmalte. En segundo lugar, que los mayores valores de reducción de la microdureza se encontraron en las muestras donde el peróxido de hidrógeno tiene mayor concentración y cuando se deja actuar por un periodo de tiempo mayor. Tercero, que las técnicas en la consulta reducen más el valor de microdureza que las técnicas domiciliarias. En cuarto lugar, la aplicación de flúor, después de realizar el procedimiento de blanqueamiento, puede restaurar la dureza de la superficie reblandecida del esmalte y la dentina [Okte, y cols.,2006].

La utilización de sistemas de blanqueamiento dental genera reblandecimiento o disminución de la dureza de la superficie y de las capas subsecuentes, también en los materiales restauradores, como los composites [Hannig y cols., 2007]. Las capas profundas de los composites también se afectan [Bistey y cols., 2007].

Sin embargo, en un estudio realizado por Turker y cols. (2002) la dureza superficial de los composites Filtek Supreme y Esthe-x disminuyó, aunque sin diferencias estadísticamente significativas.

Dos estudios describieron que el contacto del peróxido de hidrógeno con resina generaron efectos adversos en el sellado marginal, afectando directamente a la microdureza del material debido a la generación de microfracturas en su superficie [Scout,y Simmelink 1974; Addy y cols., 2004].

1.3. CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE LA DENTINA.

1.3.1. ORGANIZACIÓN DE LA DENTINA.

La dentina constituye la mayor parte de la estructura dental y sus propiedades son determinantes en casi todos los procedimientos relacionados con la terapéutica dental restauradora.

Es importante conocer las propiedades mecánicas de la dentina para entender cómo se distribuyen y absorben las fuerzas originadas durante la masticación y para predecir

alteraciones que pueda sufrir debido a los procedimientos restauradores, la edad y la patología.

Las propiedades de la dentina dependen básicamente de su estructura y composición.

La dentina está compuesta, en aproximadamente un 50% de su volumen, por contenido mineral (cristales de hidroxiapatita ricos en carbonatos y pobres en calcio), en un 30% por matriz orgánica, en su mayor parte colágeno de tipo 1, mientras que un 20% de su volumen es fluido, similar al plasma sanguíneo. [Legeros 1990]

Su microestructura está dominada por la presencia de túbulos dentinarios. Los túbulos están rodeados por una región peritubular hipermineralizada, y que a su vez se haya embebida en una matriz intertubular, formada principalmente por colágeno de tipo I, que engloba, configurando un entramado, cristales de hidroxiapatita y fluido dentinario. Los túbulos se extienden desde la cámara pulpar hasta la unión amelodentinaria. Estos conductillos varían en número y pueden representar desde el 1% (0,8 mm de diámetro) del área total de la superficie de la dentina, junto a la unión amelodentinaria, hasta aumentar, en la proximidad a la pulpa, a un 22% (2,5 mm de diámetro) del área total de superficie de la dentina. Esta organización determina un comportamiento anisotrópico de

la dentina, es decir, las propiedades del substrato difieren según la dirección considerada. [Pashley y cols., 1989]

La pre dentina es la matriz orgánica no mineralizada de la dentina situada entre la capa de odontoblastos y la dentina mineralizada. Sus componentes incluyen proteoglicanos y colágeno. La mineralización de la matriz de dentina comienza en el incremento inicial de la dentina del manto. Los cristales de hidroxiapatita comienzan a acumularse en vesículas matriciales en el interior de la pre dentina. Estas vesículas brotan desde los procesos citoplasmáticos de los odontoblastos. [Cohen y cols., 2002]

El proceso de mineralización progresiva da lugar a la dentina, con las características estructurales ya mencionadas. La primera dentina que se forma en un diente se denomina dentina primaria. A partir del nacimiento, la dentina que se va formando de una manera regular, se conoce como dentina secundaria, sin cambios morfoestructurales significativos. [Gomez y Campos, 1999; Trowbridge y cols. 2002]

La dentina secundaria de los dientes de los mamíferos se caracteriza por la presencia de túbulos, los cuales se forman alrededor de las proyecciones citoplasmáticas de los odontoblastos (fibrillas de Thomes), que atraviesan todo el espesor de la dentina desde la pulpa hasta la confluencia

de la dentina con el esmalte. Estos túbulos son más anchos en su porción más cercana a la pulpa. En la vecindad con el límite amelodentinario, los túbulos dentinarios se ramifican en una o más ramas terminales. [Gomez y Campos 1999; Mjör 1985; Mjör 2002]

Se ha observado que la dentina peritubular está más mineralizada que la dentina intertubular y en consecuencia, es más dura, ésta está localizada entre los anillos de dentina peritubular y constituye la masa principal de la dentina circumpulpar. El término dentina interglobular designa la matriz orgánica que permanece no mineralizada debido a que los glóbulos de mineralización no se fusionan. Esto se observa con mayor frecuencia en la dentina secundaria inmediatamente debajo de la dentina del manto, donde es más probable que el patrón de mineralización sea globular en lugar de por aposición. [Davis 1998]

El fluido dentinario libre es un ultrafiltrado de sangre en los capilares de la pulpa y su composición es similar a la del plasma. El líquido fluye hacia fuera entre los odontoblastos, hacia el interior de los túbulos de dentina y eventualmente escapa a través de pequeños poros hacia el esmalte. Se ha demostrado que la presión tisular de la pulpa es mayor que en la cavidad oral lo que explica la dirección del flujo. La exposición de los túbulos como resultado de una fractura dentaria o durante la preparación de una cavidad a menudo

trae como consecuencia la aparición de líquido en la superficie expuesta de la dentina en forma de gotitas diminutas. Este movimiento de líquido hacia el exterior puede ser acelerado deshidratando la superficie de dentina con aire comprimido, calor seco o con la aplicación de un papel absorbente, maniobras frecuentes en la terapéutica restauradora dental. Se piensa que el rápido flujo de líquido a través de los túbulos es una de las causas de la sensibilidad de la dentina. [Cohen y cols., 2002; Abramovich y Abraham 1984]

1.3.2. MICRODUREZA DENTINARIA.

La dentina es la parte mineralizada de complejo dentino-pulpar, y una de sus características es la dureza, la cual puede definirse como la resistencia de un material a la deformación permanente, y se relaciona con otras propiedades como la elasticidad o la generación y propagación de estrés biomecánico. Existe una relación lineal entre la resistencia, el módulo de elasticidad y la dureza.

Los valores publicados de microdureza de la dentina oscilan entre los 250 y 800 MPa dependiendo de la localización de la medida con respecto al esmalte y a la pulpa. Pashley y cols. (1985) observaron una relación inversa entre la dureza de la dentina y la densidad tubular.

Puesto que los ensayos de microindentación no permiten medir la dureza de estructuras individuales como la dentina peritubular e intertubular, el desarrollo de nuevas técnicas han permitido determinar si esta disminución de la dureza se debe a la morfología de la dentina o bien a diferencias en las propiedades de los constituyentes de la dentina. [Pashley y cols., 1995; Craig y cols., 1958; Pashley y cols. 1985]

El nanodurómetro emplea cargas entre 0,001-5 g (pocos mNw), resultando en indentaciones con profundidades inferiores a 1 mm en materiales duros. La profundidad de la indentación se monitoriza *in situ* durante la carga y la descarga, y se puede calcular la dureza y el módulo de Young a partir de la curva carga-desplazamiento sin necesitar información visual. Sin embargo, esta técnica no permite la localización exacta en dimensiones medidas en micras, haciendo difícil distinguir la dentina peritubular de la intertubular. Otro inconveniente de este procedimiento es la imposibilidad de mantener los especímenes hidratados, con lo que los valores obtenidos son mayores que los reales. [Marshall y cols. 1997]

La incorporación de un indentador en un microscopio de fuerzas atómicas ha permitido medir la dureza y rigidez de especímenes completamente hidratados, usando una precisión de nanómetros. De esta forma, se ha establecido

la dureza de la dentina peritubular (de $2,45 \pm 0,14$ GPa), que es varias veces más dura que la dentina intertubular [kinney y cols. 1996] . El contenido en mineral de la primera es del 95% de su volumen, a diferencia del de la dentina intertubular que es del 30% de su volumen. La dentina intertubular profunda es 4 veces más blanda que la dentina intertubular superficial ($0,51 \pm 0,02$ GPa cerca de la unión amelodentinaria y $0,13 \pm 0,01$ GPa cerca de pulpa). Por lo tanto, se puede concluir que la disminución de la dureza de la dentina observada con las técnicas de nanoindentación es debida a la disminución de dureza de la dentina intertubular y no a la mayor densidad de los túbulos de la dentina.[kinney y cols. 1996; kinney y cols. 1999]

1.3.3. ELASTICIDAD DE LA DENTINA.

El módulo de elasticidad o de Young puede definirse como el cociente entre la tensión aplicada a un material y la deformación elástica producida (es decir, que pueda recuperarse tras el cese de la carga).

La dentina mineralizada es relativamente rígida (1020 GPa). La elasticidad propia de la dentina tiene gran importancia funcional, ya que permite compensar la rigidez del esmalte, amortiguando los impactos masticatorios. La elasticidad dentinaria varía de acuerdo al porcentaje de sustancia orgánica y al agua que contiene [Sano y cols

1995] La microscopía de fuerzas atómicas ha demostrado que la dentina peritubular es mucho más rígida que la dentina intertubular y que su módulo es más uniforme, mientras que el de la dentina intertubular varía en función de la distribución de la apatita en la matriz de colágeno [kinney y cols. 1996]

2. ANÁLISIS DENTINARIO CON MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS.

2.1. FUNCIONAMIENTO DEL MICROSCOPIO DE FUERZAS ATÓMICAS.

El microscopio de fuerzas atómicas es un instrumento mecánico-óptico capaz de detectar fuerzas del orden de los piconewtons. Al rastrear una muestra, es capaz de registrar continuamente su topografía mediante una sonda o punta afilada de forma piramidal o cónica. La sonda va acoplada a un listón o palanca microscópica muy flexible de sólo unos 200 μm de longitud.

Este tipo de microscopio explora la superficie de la muestra con una punta de radio de curvatura de 20 a 60 nm que se localiza al final de un *cantilever*. Las fuerzas entre la punta y la muestra provocan la deflexión del mismo; simultáneamente, un detector mide esta deflexión a medida que la punta se desplaza sobre la superficie de la muestra generando una micrografía de la superficie. La fuerza interatómica que contribuye a la deflexión del *cantilever* es la fuerza de Van der Waals. [Cruz y Castrellón-Urbe, 2005]

Al final de esa punta se tiene un átomo o unos pocos átomos, lo que permite analizar la superficie al nivel de un único átomo, es decir un átomo contra otro átomo, es la fuerza entre esos dos átomos. El átomo utilizado en la punta puede ser de cualquier tipo, lo importante es tener una estructura lo suficientemente afilada o que al final acabe en un único átomo que sobresale con respecto a los demás, porque es ese el que da la fuerza que se podrá medir.

La técnica consiste en trasladar las medidas que se realizan a imágenes, se sigue la superficie y se genera una fuerza, un movimiento vertical que es detectado y que se convierte en imágenes, asignando una escala entre blanco y negro al punto más alto que se mide y al punto más bajo. Esas imágenes reflejan las alturas por donde se ha movido

la punta para seguir el perfil de la superficie. Con este sistema se pueden revelar los átomos y la especie química a la que pertenecen. [Cruz y Castrellón-Urbe, 2005]

El Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), en 2007 perfeccionó la técnica empleada por los microscopios atómicos. La nueva técnica, denominada Phase Imaging AFM, permite realizar medidas tanto en aire como en medios líquidos o fisiológicos. El desarrollo de esta técnica podría tener aplicaciones en la biomedicina, la nanotecnología, la ciencia de materiales o estudios medioambientales.

El microscopio de fuerzas atómicas puede realizar dos tipos de medidas: imagen y fuerza. En el modo de imagen, la superficie es barrida en el plano de la superficie (X-Y) por la punta. Durante el barrido, la fuerza interatómica entre los átomos de la punta y los átomos en la superficie muestral provoca una flexión del listón. Esta flexión es registrada por un sensor adecuado (normalmente una balanza óptica) y la señal obtenida se introduce en un circuito o lazo de realimentación.

2.2. UTILIZACIÓN DE LA MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS EN ODONTOLOGÍA.

Tradicionalmente, el método para obtener información acerca de la microestructura tanto del esmalte como de la dentina era a través del microscopio electrónico de barrido.

Con el microscopio de fuerzas atómicas se obtiene una mejor calidad de imagen con menos artefactos.

En Odontología se han realizado diversos estudios utilizando microscopio de fuerzas atómicas, principalmente para observar la morfología y las propiedades nanomecánicas de la superficie del esmalte antes y después de haber sido sometida a la acción de bebidas ácidas o incluso la acción de la propia saliva [Frank y cols., 2004].

La microindentación mediante indentadores de Vickers o Knoop ha sido utilizada para medir los cambios de dureza que se producen en la superficie del esmalte cuando está en contacto con bebidas ácidas, sin embargo, recientemente, se ha comenzado a utilizar el microscopio de fuerzas atómicas para esta actividad, en especial combinado con la nanoindentación, permitiendo observar

no sólo los cambios en la dureza sino también cambios producidos en el módulo de elasticidad [Marshall y cols., 2001].

El microscopio de fuerzas atómicas ha sido utilizado para examinar la unión amelodentinaria [Marshall y cols., 2001]. Esta estructura es la zona de transición entre tejidos con diferente grado de calcificación, y presenta algunas particularidades que se tienen que tener en consideración. Sin embargo, existe poca información acerca de las variaciones que aquí pueden aparecer. Lin y cols. (1993) fundamentaron que dicha estructura contiene cortes y microcortes, así como también fibras de colágeno de tipo I que provienen de la dentina y se fusionan para formar fibras más bastas que cruzan la unión amelodentinaria y se insertan en el esmalte. Estos autores consideran que esta región es esencial para prevenir grietas en el esmalte, que pueden propagarse a la dentina a través de la interfase teniendo consecuencias catastróficas.

Pioch y Staehle (1996) examinaron los cortes que aparecen en la unión amelodentinaria de dientes humanos y bovinos para valorar la dureza de esta zona y tratar de prevenir las fracturas que pueden aparecer, concluyendo que la mayoría de las fracturas no ocurren verdaderamente en ese punto.

También Xu y cols. (1998) usaron la microindentación para la valoración de la dureza, resistencia y módulo de elasticidad de la misma zona, obteniendo valores de 0,57 GPa de dureza y 20 GPa de módulo de elasticidad para la dentina, y en el esmalte, valores de 3,0-3,6 GPa de dureza y 80-94 GPa de módulo de elasticidad, con una resistencia de 0,5-1,3 MPa.m^{1/2}, pero no pudieron encontrar fracturas en la dentina.

White y cols. (2000) estudiaron el gradiente de microdureza a lo largo del límite amelodentinario y encontraron una región de unos 100 µm de ancho en la cual la microdureza va decreciendo desde el esmalte hacia la dentina.

Recientemente, la microindentación ha supuesto un gran avance para el estudio de esta estructura tan compleja permitiendo hacer indentaciones más pequeñas que las utilizadas en los test de microdureza llevados a cabo en los estudios anteriormente nombrados.

Con esta técnica es posible comprobar las propiedades de los materiales aplicando una menor carga que en los tests de microdureza así como una mejor localización espacial. Además, como con la nanoindentación se puede

determinar el módulo de Young, y la respuesta tanto estática como dinámica de los materiales.

A pesar de todas las ventajas, la nanoindentación convencional no permite precisar la posición de las indentaciones. Este inconveniente se puede superar con el microscopio de fuerzas atómicas, que permite modificar simultáneamente la imagen topográfica y la rigidez mientras hace una indentación en un lugar específico, antes o después de formar la imagen [Marshall y cols., 2001].

Se ha comprobado que esta técnica microscópica es una poderosa herramienta para la observación directa, consiguiendo mediciones de los cristales de esmalte de alta resolución [Farina y cols., 1999]. Cuando se compara el microscopio de fuerzas atómicas con el microscopio de transmisión, para evaluar estructuras dentarias, se concluye que el primero ofrece un mayor contraste de las superficies, una mayor resolución de imagen y que es un instrumento que puede aportar nueva información sobre la estructura dentaria.

La nanoindentación es, actualmente, la herramienta óptima para el estudio de la superficie erosionada del esmalte [Lippert y cols., 2004].

Este microscopio permite obtener imágenes en medios húmedos y sobre superficies no conductoras [Farina y cols.;1999].

Gracias a este instrumento se pueden observar los cambios que pueden llegar a producir los irrigantes, como el hipoclorito y el EDTA, en la dentina en los tratamientos endodóncicos [Baron y cols., 2013].

El empleo de la microscopia de fuerzas atómicas en el estudio de tejidos dentales permite obtener imágenes de alta resolución y con un elevado contraste, por lo que se puede considerar un excelente medio para caracterizar estructuralmente estos sistemas. El tamaño de partícula, su ordenamiento, empaquetamiento, la existencia de fracturas, la morfología y rugosidad de las superficies, son algunas de las propiedades que pueden determinarse a través del microscopio de fuerzas atómicas.

2.3. EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS SECUNDARIOS DE LOS AGENTES BLANQUEADORES SOBRE LOS TEJIDOS MINERALIZADOS DEL DIENTE MEDIANTE MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS.

El uso de esta técnica microscópica comenzó con el estudio de los cambios de microrrugosidad que se producen en la superficie del esmalte después de aplicar productos de blanqueamiento [Ljubisa y cols., 2007].

La dureza y el módulo de elasticidad en la dentina completamente mineralizada han sido analizados en diferentes estudios, el rango aceptado varía de 0,2-0,8 GPa; y el módulo de elasticidad está dentro de un rango entre 10-20 GPa. Sin embargo, en poco estudios se ha comprobado el módulo de elasticidad de la dentina desmineralizada. A pesar de ello, hay estudios que se han llevado a cabo para esta labor en condiciones de hidratación de la dentina, mediante el método de indentación, con pequeños desplazamientos, reflejando la verdadera naturaleza de la matriz de colágeno [Balooch y cols., 1998].

Los túbulos, así como superficies dentarias enteras, que han sido observadas con el microscopio de fuerzas

atómicas, han sufrido cambios en la rugosidad y en la morfología al ser sometidas a diferentes agentes acondicionadores y esas variaciones varían entre las diferentes muestras en función del agente empleado [Silikas y cols., 1999].

Hegedüs y Bistey (1999) analizaron y evaluaron los efectos que podría generar el peróxido de hidrógeno contenido en algunos agentes blanqueadores. Utilizaron 15 incisivos humanos, aplicaron peróxido de hidrógeno y utilizaron un microscopio de fuerzas atómicas para observar los efectos producidos por aquél. Encontraron pérdida de la estructura orgánica del esmalte superficial. Debido al bajo peso molecular del peróxido de hidrogeno, éste puede penetrar en la estructura del esmalte y, con el proceso de oxidación generado, se producen rupturas en la estructura y se presentan fallas en la subsuperficie y en la superficie del esmalte. Así mismo, demostraron que si la concentración de peróxido de hidrógeno es mayor, igualmente mayores serán las fracturas y la profundidad de éstas [Efeoglu y cols., 2006].

El microscopio de fuerzas atómicas también ha sido utilizado para valorar cambios morfológicos, tanto cuantitativa como cualitativamente. Para ello se prepararon unas muestras dentarias y fueran expuestas a diferentes

sustancias; agua, bebida a base de zumo de grosella, y zumo de limón. Los resultados obtenidos fueron que la máxima pérdida de sustancia se produjo cuando la muestra fue expuesta a zumo de limón. Con estos resultados lo que se concluyó es que el microscopio de fuerzas atómicas es útil para medir estadios muy tempranos de disolución del esmalte, que de otro modo no podrían llegar a observarse, además de que dicha disolución es diferente en función de la sustancia con la que entre en contacto la muestra y siempre es dependiente del tiempo de exposición [Finke y cols., 2000].

En otro estudio, realizado por Lippert F. y cols. (2004), se pretendía demostrar la diferencia de susceptibilidad a la desmineralización que existe entre el esmalte de dientes deciduos y dientes permanentes. Para ello, se sometieron las muestras de estudio a diferentes bebidas (cola, limonada, zumo y agua). Los resultados mostraron que las cuatro bebidas tienen efecto erosivo y en tres de ellas se producen cambios en las propiedades nanomecánicas, como son la dureza y la disminución del módulo de elasticidad, a excepción del agua, en la que dichas propiedades no varían. La cola y la limonada son las que mayor efecto desmineralizante muestran, el aumento del tiempo de exposición produce un incremento del efecto

erosivo en estas sustancias, no siendo dependiente del tiempo el efecto del zumo. No se encontraron diferencias significativas de susceptibilidad a la desmineralización entre esmalte deciduo o permanente.

El análisis de la nanoindentación con el microscopio de fuerzas atómicas ha sido utilizado para medir la nanodureza, el módulo de elasticidad y la resistencia a la fractura de la unión amelodentinaria, ya que ésta es una zona compleja donde interaccionan el esmalte y la dentina.

Los resultados obtenidos muestran que que la dureza y el módulo de elasticidad son prácticamente iguales en la dentina y en el esmalte a 10 μm de la unión amelodentinaria, sin embargo, en la propia unión, el valor, tanto de la nanodureza como del módulo de elasticidad es mucho mayor en el esmalte que en la dentina [Marshall Jr. y cols., 2001].

En un estudio realizado previamente por nuestro grupo con el microscopio de fuerzas atómicas observamos que los agentes blanqueadores tienen repercusión tanto en la rigidez como en la fuerza de adhesión de la dentina y esos cambios son distintos en función del agente utilizado, produciéndose mayores cambios nanoestructurales con el uso del peróxido de hidrógeno al 35% en comparación con

el del peróxido de carbamida al 30%. En nuestro estudio se produjo una disminución de la rigidez y de la viscosidad o fuerza de adhesión, después de someter las muestras al procedimiento de blanqueamiento, tanto al utilizar peróxido de carbamida al 30% como al utilizar peróxido de hidrógeno al 35%. Sin embargo, tanto la disminución de viscosidad como el aumento de rigidez es más marcado con el peróxido de hidrógeno al 35%. La región de la dentina que más afectada por el uso de los peróxidos es la dentina intertubular [Forner y cols. 2009].

JUSTIFICACIÓN

En épocas anteriores la odontología tuvo un fin prioritario, aliviar el dolor, pero actualmente, cada vez más, el paciente demanda tratamientos con fines estéticos, ya que en nuestra sociedad la estética es uno de los valores más importantes.

Los tejidos dentarios se pueden ver afectados por distintas circunstancias etiológicas que pueden producir cambios en su coloración.

Con las diferentes técnicas clínicas de blanqueamiento dental se pueden eliminar las discoloraciones dentales, o, al menos, tratar de modificar el color de los dientes, dándoles un aspecto más claro.

El tratamiento blanqueador es un procedimiento clínico eficaz, pero que puede producir efectos no deseados, aunque la mayor parte de ellos son evitables o minimizables cuando tras un adecuado diagnóstico se sigue un protocolo terapéutico cuidadoso.

El procedimiento de blanqueamiento se puede llevar a cabo en dientes vitales o en dientes no vitales (con un tratamiento de conductos efectuado previamente). Dentro de cada uno de estos grandes grupos podemos diferenciar

entre blanqueamiento en la consulta o blanqueamiento domiciliario, cada uno de ellos utiliza principios activos a diferentes concentraciones y siguiendo distintos protocolos clínicos.

Pero realmente una de las cosas que más preocupa a los/as pacientes es la rapidez del procedimiento clínico, es decir, notar rápidamente, los resultados. Por ello se ha ido aumentando la concentración de los agentes blanqueadores y, como contrapartida, ese aumento en la concentración podría producir cambios a nivel nanoestructural.

Existen muchos estudios sobre cambios en la microestructura, así como sobre el comportamiento químico y mecánico del esmalte tras ser sometido a un tratamiento blanqueador. La mayoría de estos resultados se han obtenido con microscopio electrónico de barrido, así como ensayos de microdureza. Sin embargo, el uso del microscopio de fuerzas atómicas y la nanoindentación, permiten evaluar cambios a nivel nanoestructural.

La mayor parte de las investigaciones realizadas centran sus estudios en el esmalte, haciendo referencia al blanqueamiento vital. Dado que en el blanqueamiento no vital la dentina es un tejido que también entra en contacto con los productos blanqueadores, se pretende evaluar

como ese aumento de concentración, en los agentes blanqueadores, puede tener repercusión en dicha zona, así como también cómo influye esa concentración en función del tiempo de aplicación.

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar, *in vitro*, el efecto del proceso de blanqueamiento con peróxido de hidrógeno de alta concentración sobre la nanoestructura de la dentina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

2.2.1. Comparar la acción del peróxido de hidrógeno al 35% y al 37,5%, sobre la rugosidad de la dentina.

2.2.2. Comparar la acción del peróxido de hidrógeno al 35% y al 37% sobre la rugosidad en función del número de aplicaciones del agente blanqueador.

MATERIALY

MÉTODOS

Para determinar cambios en las propiedades nanoestructurales de la dentina cuando entra en contacto con productos blanqueadores de alta concentración, se reprodujeron tratamientos blanqueadores sobre especímenes de dentina, tras lo cual se midieron los cambios en la rugosidad de la superficie de la misma, tal y como se detalla a continuación.

1. MUESTRA.

1.1. TAMAÑO MUESTRAL.

Se utilizaron 16 discos de dentina, cada uno de ellos procedente de un diente distinto.

1.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN.

Los especímenes dentinarios se obtuvieron a partir de dientes humanos extraídos, tras obtener el consentimiento informado de los/as pacientes. El procedimiento experimental fue aprobado por el Comité de Ética de la Universitat de València.

1.2.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- Molares permanentes.

- Cada espécimen debía conservar intacto tanto el esmalte como la dentina.

1.2.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- Dientes que no fueran molares.
- Dientes con lesiones cariosas.
- Dientes con cualquier tipo de restauración.
- Dientes sometidos a tratamientos de blanqueamiento previos.
- Dientes que no tuvieran su estructura coronal íntegra.

1.3. CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA.

Los dientes fueron esterilizados con radiaciones gamma y mantenidos en agua a 4°C hasta su utilización.

1.4. ASIGNACIÓN A GRUPOS.

Los especímenes ($N = 16$) fueron asignados de manera aleatoria a cada uno de los dos grupos de estudio, en función de la concentración de peróxido de hidrógeno utilizada ($n_i = 8$).

2. PREPARACIÓN DE LOS DIENTES PARA SU OBSERVACIÓN CON MICROSCOPIA DE FUERZAS ATÓMICAS.

De las coronas de los dientes se obtuvieron secciones transversales de 1mm de grosor (fig. 1), de forma que cada lámina contuviera dentina y esmalte. Para ello se hizo un corte en la corona del diente, con la ayuda de un disco diamantado montado en una pieza de mano (discos de separación TX, Dentaaurum, Ispringen, Alemania) de 26 mm de grosor y 22 mm de diámetro. El fragmento dentario se adelgazó mediante una pulidora Grinder/Polisher Model 900 (South Bay technology Inc., Los Ángeles, EE.UU.). Finalmente el grosor se comprobó con la ayuda de un medidor de espesores Baxlo 4001 (Baxlo Precision, Barcelona, España).



Fig.1 Discos de dentina de 1mm de espesor

A continuación fueron pulidos con pasta de diamante de 1 y 0,25 μm y para terminar, se limpiaron con agua destilada en una cuba de ultrasonidos, para eliminar todo el barrillo dentinario que hubiera podido quedar, durante 20 minutos.

Antes de ser observados en el microscopio de fuerzas atómicas, los especímenes, fueron sumergidos en ácido clorhídrico al 25% durante 5 segundos.

3. AGENTE Y PRODUCTOS BLANQUEADORES.

En el presente estudio se usó, como agente blanqueador, peróxido de hidrógeno, el cual fue utilizado en dos concentraciones (35 y 37,5%). Este principio activo fue utilizado bajo dos formas de presentación comerciales. Los productos usados se describen a continuación.

Opalescence Endo (Ultradent Products, Inc. 505 W. 10200 South Jordan, EE.UU.), peróxido de hidrógeno al 35%. Se presenta en una jeringa dosificadora de 1,2 ml (fig. 2). Su consistencia es de gel, presenta un ph entre 3 y 5.



Fig.2 Opalescence Endo. Peróxido de hidrógeno 35%

Pola Office Plus (SDI, Victoria, Australia), peróxido de hidrógeno al 37,5%, presentado en una jeringa dosificadora de 2,8 ml, con doble tubo (fig. 3), para permitir la mezcla del contenido de ambos tubos a medida que se aplica el gel directamente sobre el espécimen. Este producto presenta un ph 7, según el fabricante.

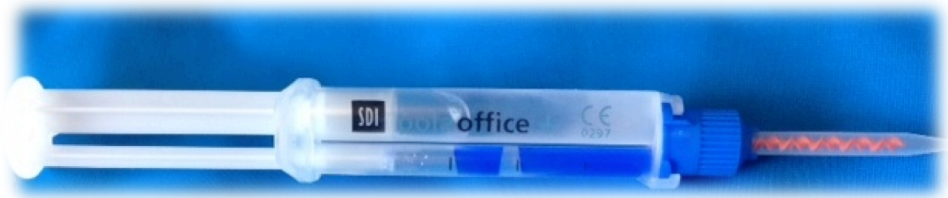


Fig.3 Pola Office Plus. Peróxido de hidrógeno 37,5%

3.1. APLICACIÓN DE LOS PRODUCTOS SOBRE LA DENTINA

3.1.1. Peróxido de hidrógeno al 37,5%.

Sobre la mitad de los especímenes se reprodujo un protocolo clínico de blanqueamiento característico del producto usado. Así, se hicieron 3 sesiones de tratamiento, separadas entre sí una semana. En cada sesión se hicieron 3 aplicaciones del producto blanqueador de 10 minutos de duración, comenzando con el espécimen seco. Tras las tres aplicaciones, el espécimen fue lavado con agua, para eliminar cualquier resto de producto blanqueador, y secado con aire a presión.

Antes de cada observación con el microscopio de fuerzas atómicas, el espécimen fue conservado durante 2 horas en suero fisiológico para su estabilización.

3.1.2. Peróxido de hidrógeno al 35%.

A la otra mitad de los elementos muestrales se les aplicó este agente blanqueador durante tres sesiones de tratamiento separadas entre sí una semana. En cada sesión se efectuaron tres aplicaciones. Entre las aplicaciones se dejaron pasar 5 días. Tras cada aplicación, el espécimen fue lavado con agua, para eliminar cualquier resto de producto blanqueador, y secado con aire a presión.

Antes de cada observación con el microscopio de fuerzas atómicas, el espécimen fue conservado durante 2 horas en suero fisiológico para su estabilización.

4. OBSERVACIÓN.

Las observaciones y medidas obtenidas se han efectuado gracias al uso de un microscopio de fuerzas atómicas.

El microscopio de fuerzas atómicas utilizado fue el Nanoscope IIIa, Multimode 8 versión 5.30r2 (Bruker, Berlín, Alemania).

La punta de nanoindentación seleccionada fue la OTR8-10, de 0,56 N/m (Bruker, Alemania, Berlín), que presenta una constante de Mayer de 20 N/m (resistencia de la punta al doblarse), Nanoprobe TM SPM tips (Bruker Alemania, Berlín), con un radio de curvatura de 20 nanómetros.

GEOMETRIA	PIRAMIDAL
ALTURA DE LA PUNTA	2.5-3,5 μ m
ÁNGULO FRONTAL	36+/-2°
ÁNGULO LATERAL	36+/-2°
ÁNGULO TRASERO	36+/-2°
RADIO DE LA PUNTA(NOM)	15nm
RADIO DE LA PUNTA(MAX)	20nm

Tabla1.Características geométricas de la punta.(Bruker, Alemania)

El MultiMode SPM, consta de siete principales componentes de *hardware*: SPM, controlador, ordenador, teclado, ratón, monitor de pantalla y monitor de control. El MultiMode SPM AFM utiliza un voladizo microfabricado hecho de silicio o nitruro de silicio con una punta afilada que toca físicamente la superficie de interés. El voladizo rastrea y escanea la muestra mientras se mide la deflexión u oscilación de amplitud. Estas mediciones se realizan con un sistema de seguimiento óptico que utiliza un fotodetector segmentado para seguir el reflejo de un diodo láser de la parte posterior del voladizo. Los cambios detectados en la flexión del voladizo u oscilación se corrigen a un valor de consigna mediante el accionamiento del voladizo de Z a través de un piezo de retroalimentación controlada. Estos voltajes de corrección enviados a la Z piezo se registran y se correlacionan con un factor de calibración de tensión distancia con el fin de determinar la altura a una coordenada dada XY (Samy E.,y cols., 2010).

Cada zona explorada formaba una región de $5 \mu\text{m}^2$

En cada zona de $5 \mu\text{m}^2$ se analizaron los siguientes parámetros.

- *Image Raw Mean*,
- *Image Rq*,
- *Image Ra*,
- *Image R max*,
- *Image Z Range*,
- *Image Surface Area Difference*,

Donde:

Image Raw Mean es la rugosidad media de la imagen expresada en nm;

Image Rq, también conocida como *Image RMS*, representa el promedio de la diferencia de altura entre los picos y los valles, expresada en nm;

Image Ra es la rugosidad media de la imagen en valor absoluto, es la desviación de la altura de la superficie media desde el plano medio expresada en nm;

Image R max, es igual que *Image Z*, y es la diferencia entre la rugosidad máxima y mínima de la imagen, es decir, la distancia vertical entre el punto más alto y el más bajo de la imagen;

Image Z Range, es la distancia vertical máxima entre los puntos de datos más altos y bajos en la imagen, expresada en nm;

Image Surface Area Difference, representa la diferencia entre el área de la superficie tridimensional y bidimensional o imagen en huella de la imagen estudiada; expresada en porcentaje.

Tras la exploración realizada en las debidas condiciones, el *software* Nanoscope 8.10 del equipo proporciona los datos para calcular los distintos parámetros.

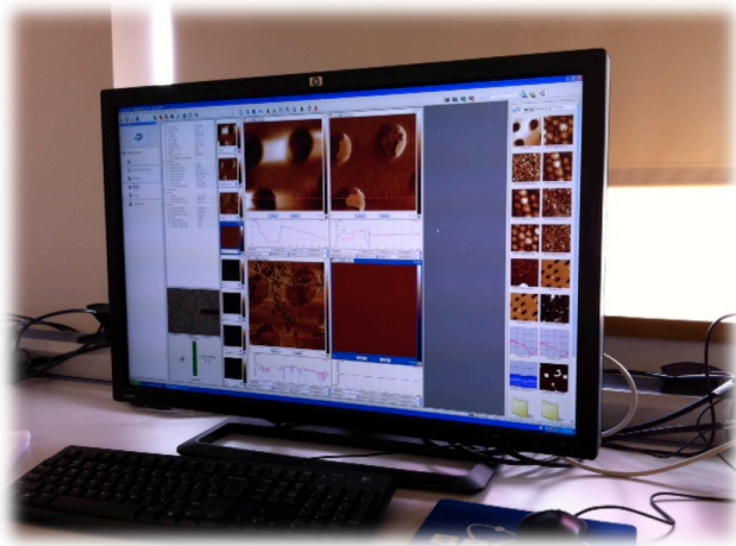


Fig. 4 AFM Nanoscope IIIA,multimode 8

La obtención de los parámetros de rugosidad se realizó con el AFM Nanoscope IIIA (Fig.4) mediante *tapping*, que es un método de contacto intermitente. Las áreas, de $5\ \mu\text{m}^2$, se predeterminaban previamente sobre una imagen obtenida con una velocidad de barrido de 0,5 Hz.

Primero, se obtiene imágenes bidimensionales de $10\ \mu\text{m}^2$ (Fig.5 y Fig.6) y a partir de esa área se elige una zona donde se observan túbulos y dentina intertubular y, en segundo lugar, se selecciona un área de $5\ \mu\text{m}^2$

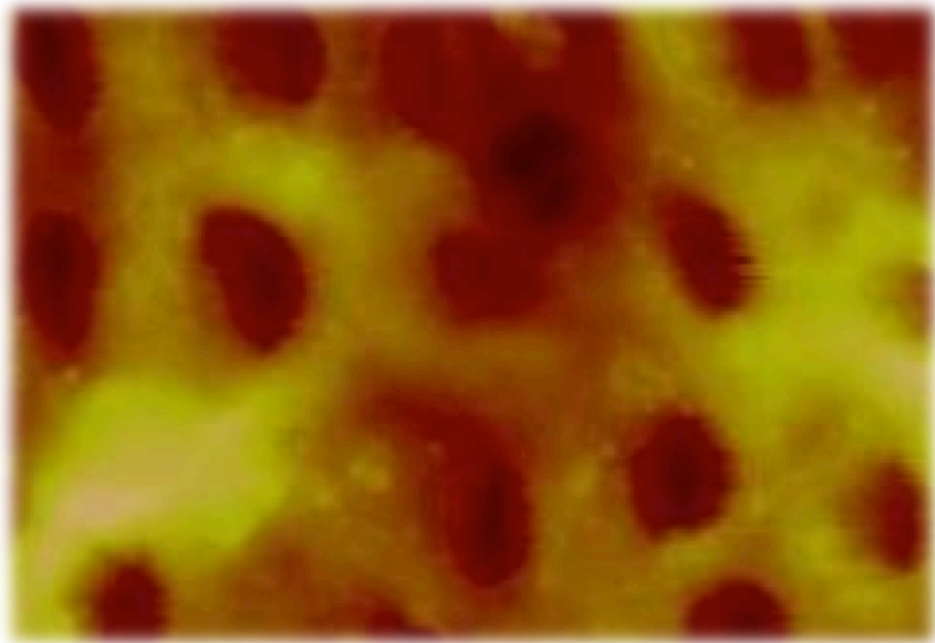


Fig.5 Imagen con el AFM Nanoscope IIIa., mediante *tapping* Tamaño $10\ \mu\text{m}^2$

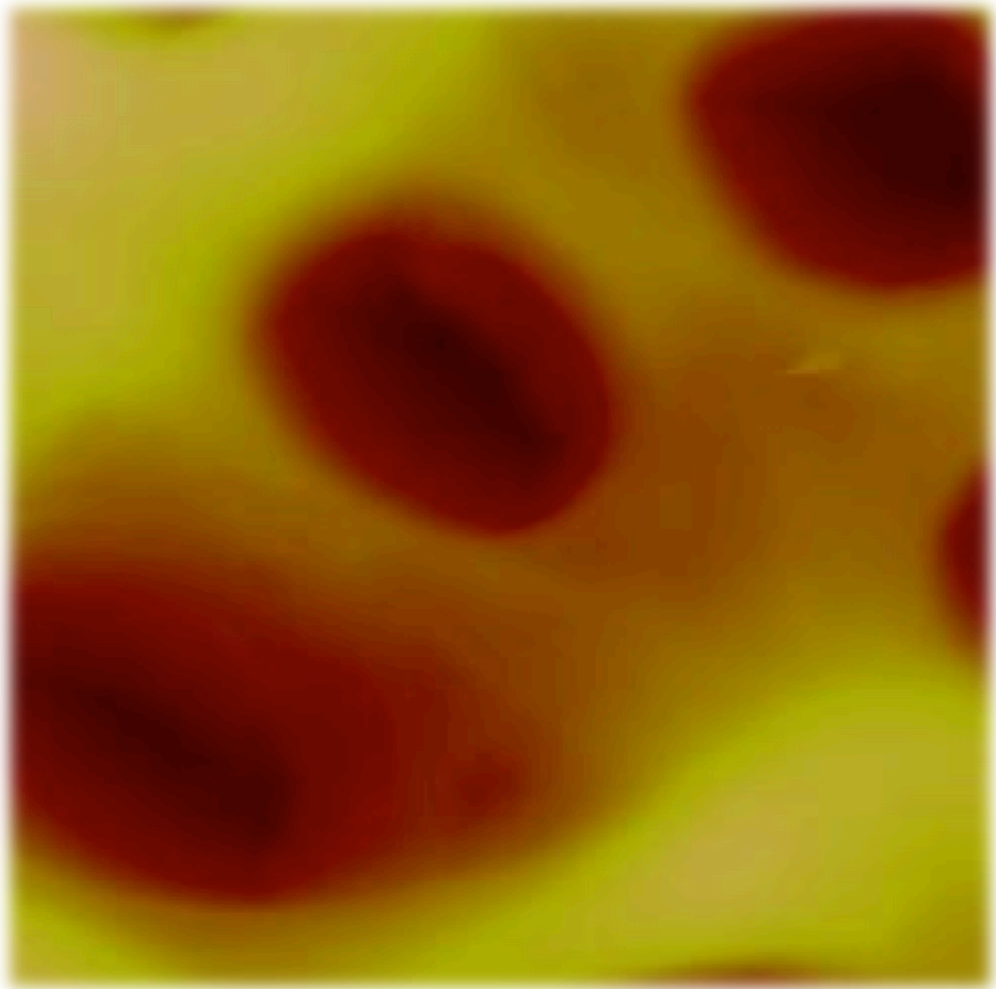
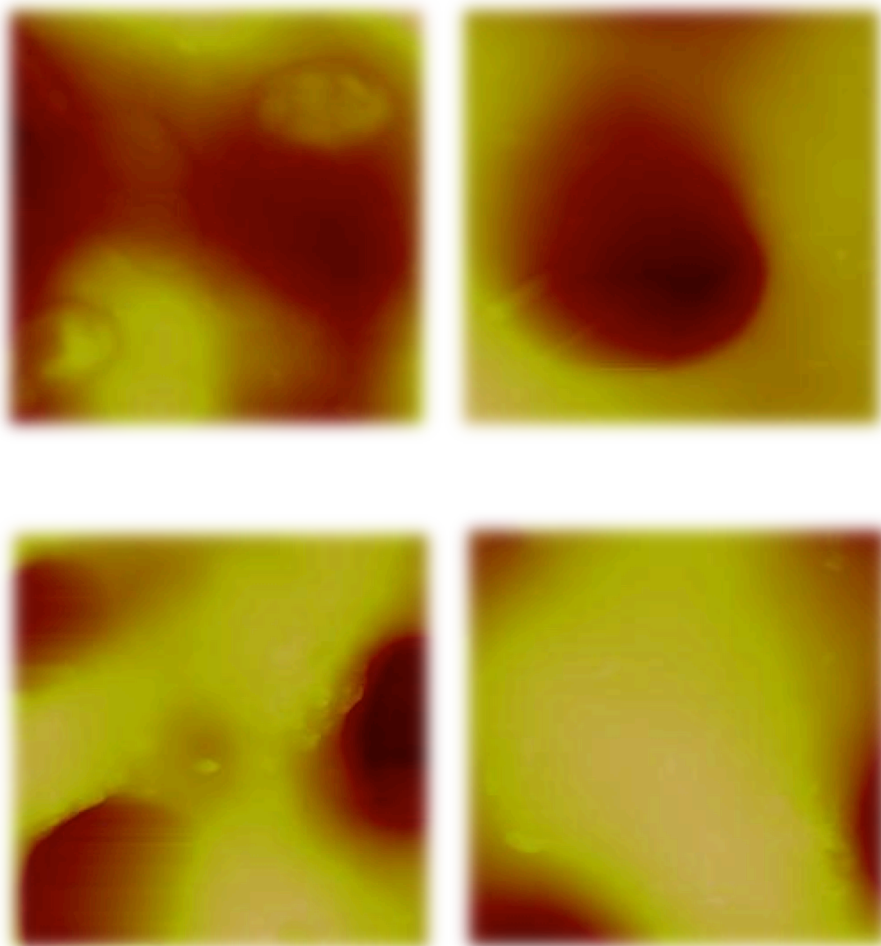
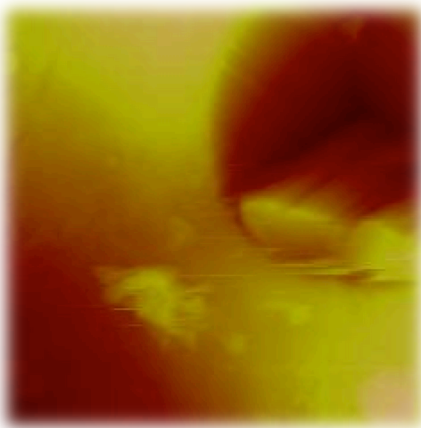
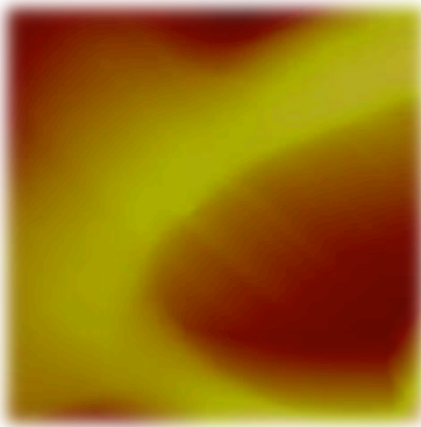


Fig.6 Imagen con el AFM Nanoscope IIIa., mediante *tapping* Tamaño $10\ \mu\text{m}^2$
donde se observan menos tubulos que la anterior.

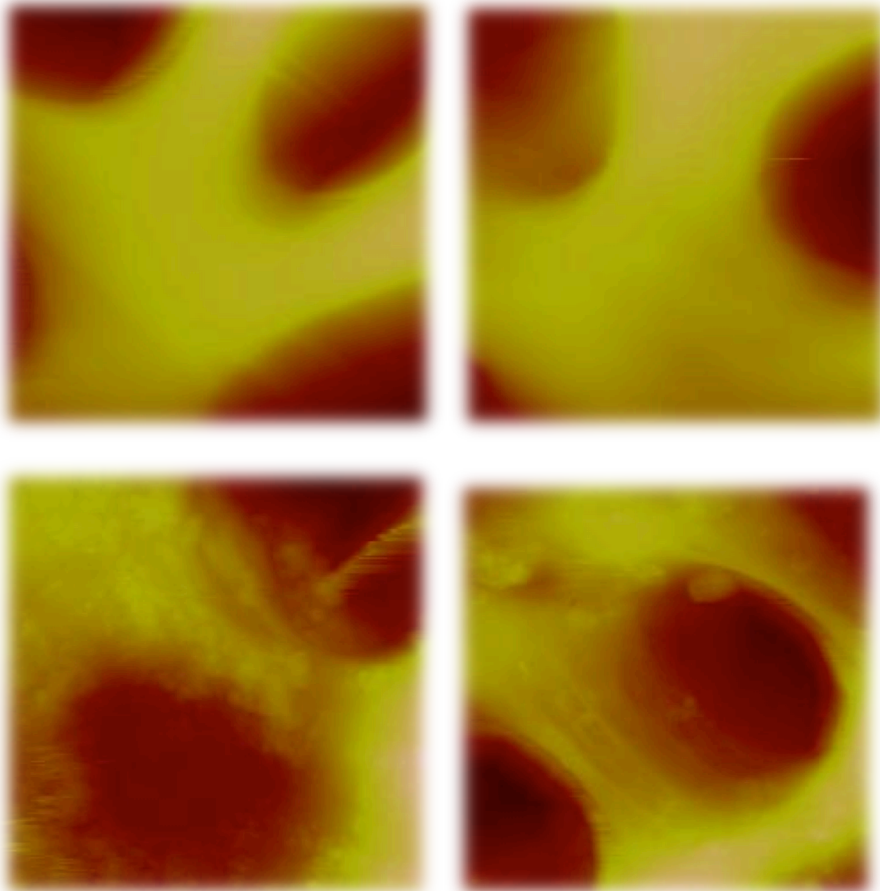
**4.1. IMÁGENES EN DOS DIMENSIONES $5\mu\text{m}^2$
ANTES DE LA APLICACIÓN DE NINGÚN AGENTE
BLANQUEADOR**

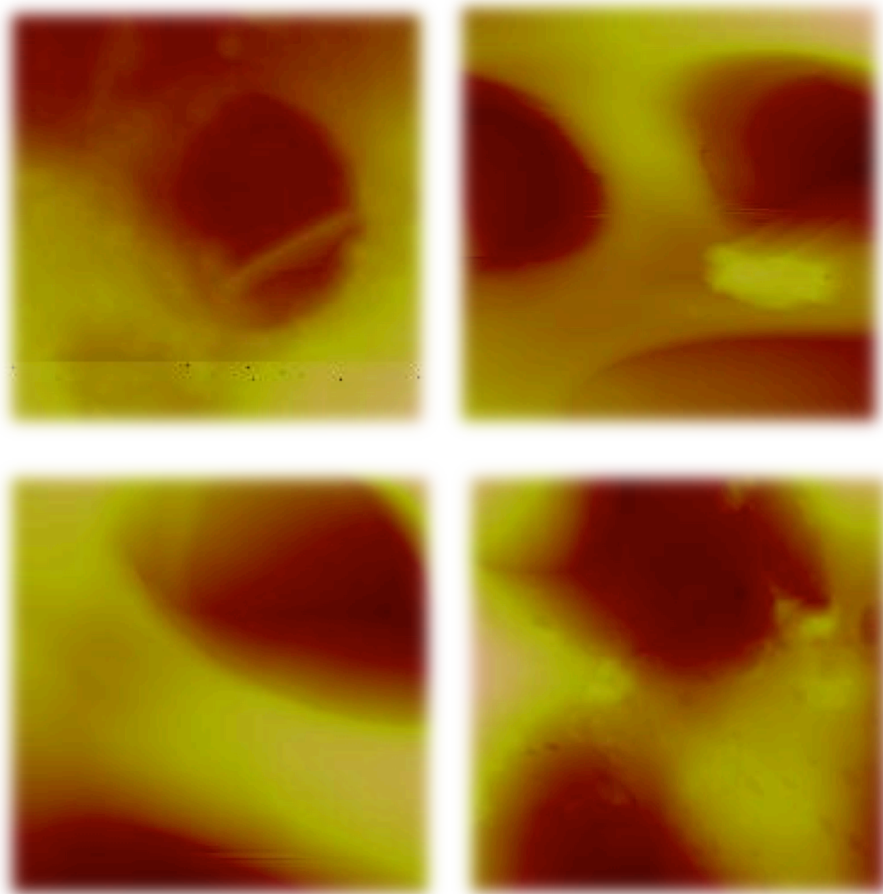
**4.1.1. Imágenes antes de aplicar peróxido de hidrógeno al
35% de $5\mu\text{m}^2$**





4.1.2. Imágenes antes de aplicar peróxido de hidrógeno al 37,5% de $5\mu\text{m}^2$





Como se puede observar al tomar las imágenes es importante que exista en cada una de ellas túbulos dentinarios rodeados de dentina intertubular.

Cualquiera de estas imágenes del software se puede convertir en una imagen tridimensional para poder analizar la topografía de la dentina.

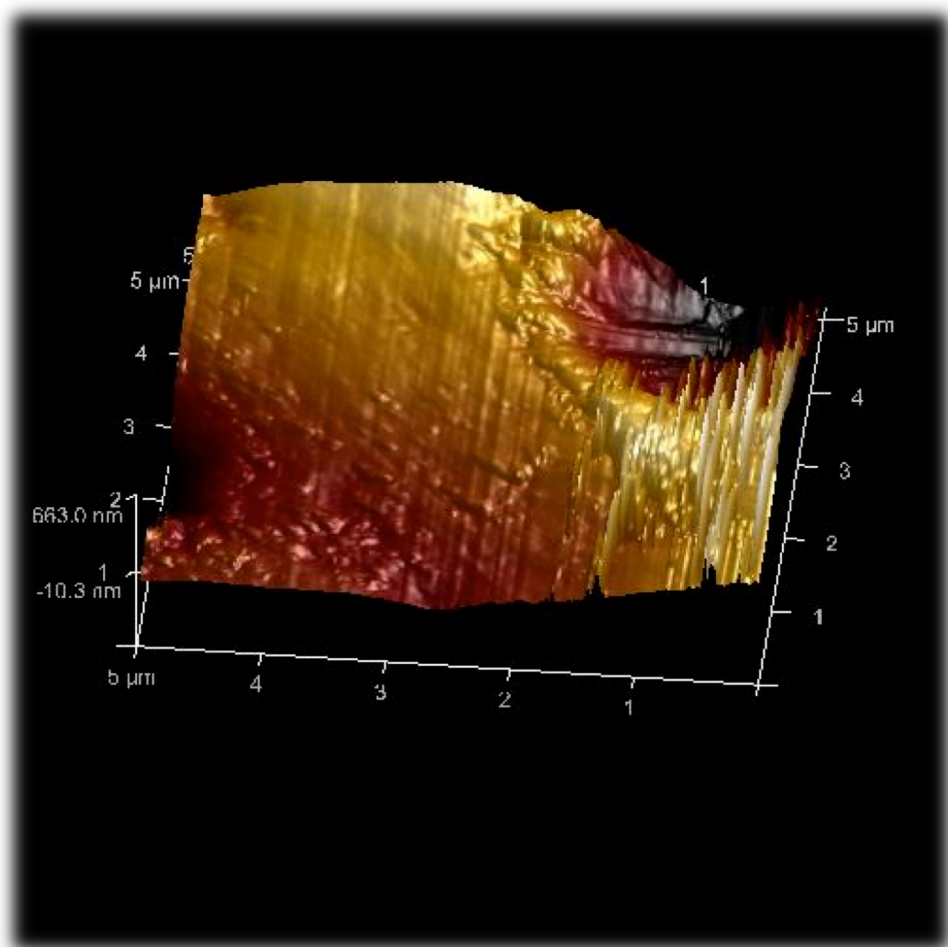


Fig.7. Imagen con el AFM Nanoscope IIIa., mediante *tapping* Tamaño $5\mu\text{m}^2$

En la imagen tridimensional que muestra la figura 8 se observa la topografía de la superficie dentinaria. Con esta presentación se puede rotar la imagen 360° para ver cualquier alteración, ver la profundidad de los túbulos e incluso medirla gracias al *software* anexo.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los valores para cada variable y momento del estudio se procesaron mediante el paquete estadístico IBM SPSS 21.0

Para comparar los dos grupos en cada momento del estudio, se utilizó el test no paramétrico U de Mann Whitney.

Las comparaciones dentro de cada grupo entre los valores iniciales y los hallados en los diferentes momentos del estudio se efectuaron mediante el test no paramétrico de Friedman.

Cuando se halló significación estadística, los grupos dos a dos se compararon mediante el test de Wilcoxon.

En todos los casos, se consideró una significación estadística de $p < 0,05$.

RESULTADOS

1.EFECTO DE LOS AGENTES BLANQUEANTES SOBRE LA SUPERFICIE DENTINARIA

1.1 EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDROGENO AL 35% EN LA TOPOGRAFIA SUPERFICIAL DE LA DENTINA

En primer lugar presentaremos el aspecto morfológico de la dentina tras la aplicación de peróxido de hidrógeno al 35%.

En las figuras 8 a 11, se muestran imágenes de $5\mu\text{m}^2$ donde se aprecia la topografía de la dentina, antes de aplicar peróxido de hidrógeno al 35% y tras cada una de las tres aplicaciones. Se aprecian los cambios morfológicos progresivos a lo largo del proceso.

En la figura 8, se aprecia una imagen de dentina, de una de las muestra antes de aplicar ningún agente blanqueante. Se observa una imagen tridimensional donde se aprecian 2 túbulos uno de mayor profundidad y uno de menor, son las zonas que se ven más oscuras, mientras que la dentina intertubular aparece homogénea.

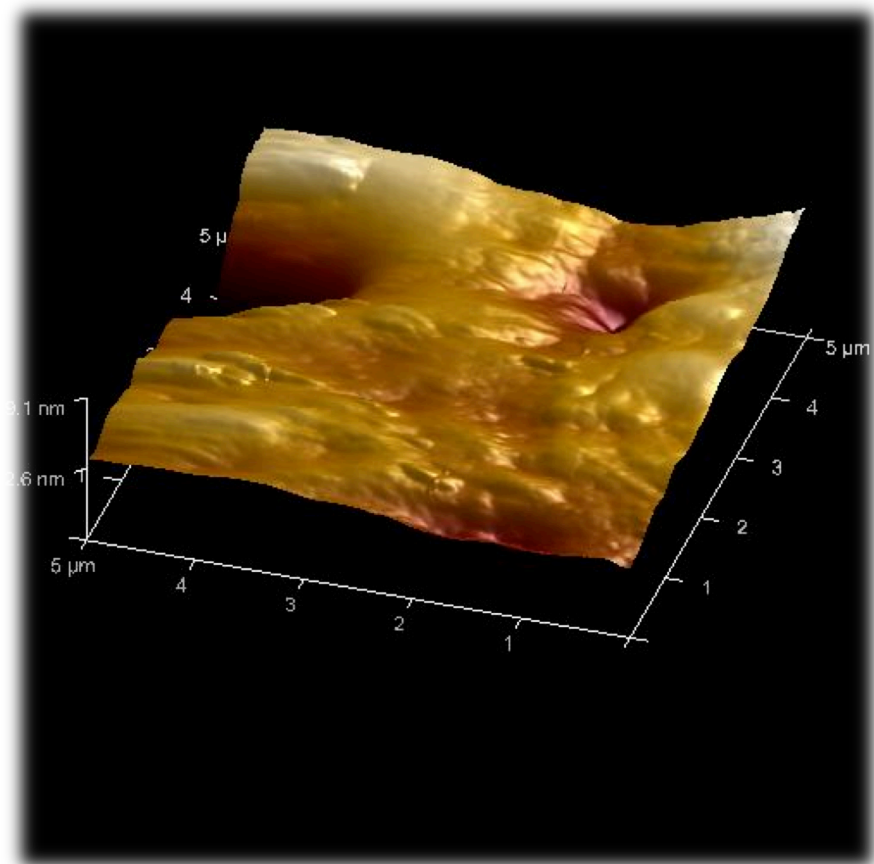


Fig.8 Imagen tridimensional de la superficie de la dentina antes de la aplicación del agente blanqueador

En la figura 9, se muestra una imagen tridimensional de dentina en la que se ha realizado la primera aplicación de peróxido de hidrógeno al 35%, se pueden apreciar también dos túbulos dentinarios, uno de ellos no se ve completo en la imagen. La dentina intertubular se intuye ligeramente más irregular.

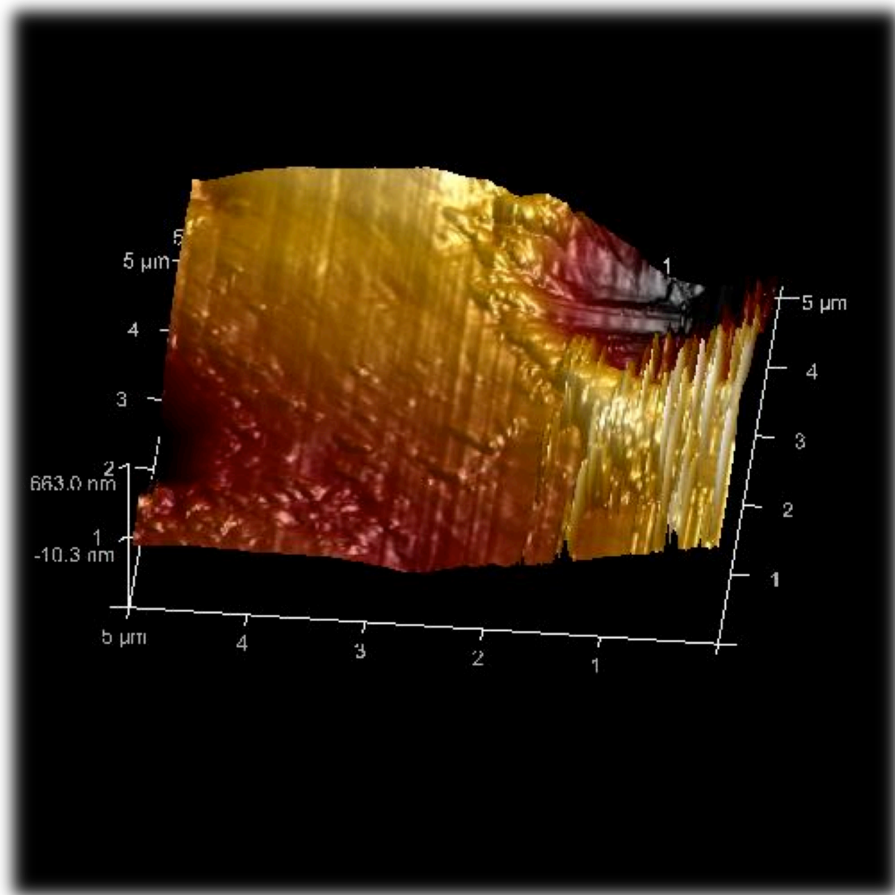


Fig.9 Imagen tridimensional de la superficie de la dentina después de la primera aplicación de peróxido de hidrógeno al 35%

En la figura 10 se aprecia la imagen tridimensional de dentina tras la segunda aplicación de peróxido de hidrógeno al 35 %, en la dentina intertubular se ve como una malla más irregular que la que se apreciaba en la figura 8.

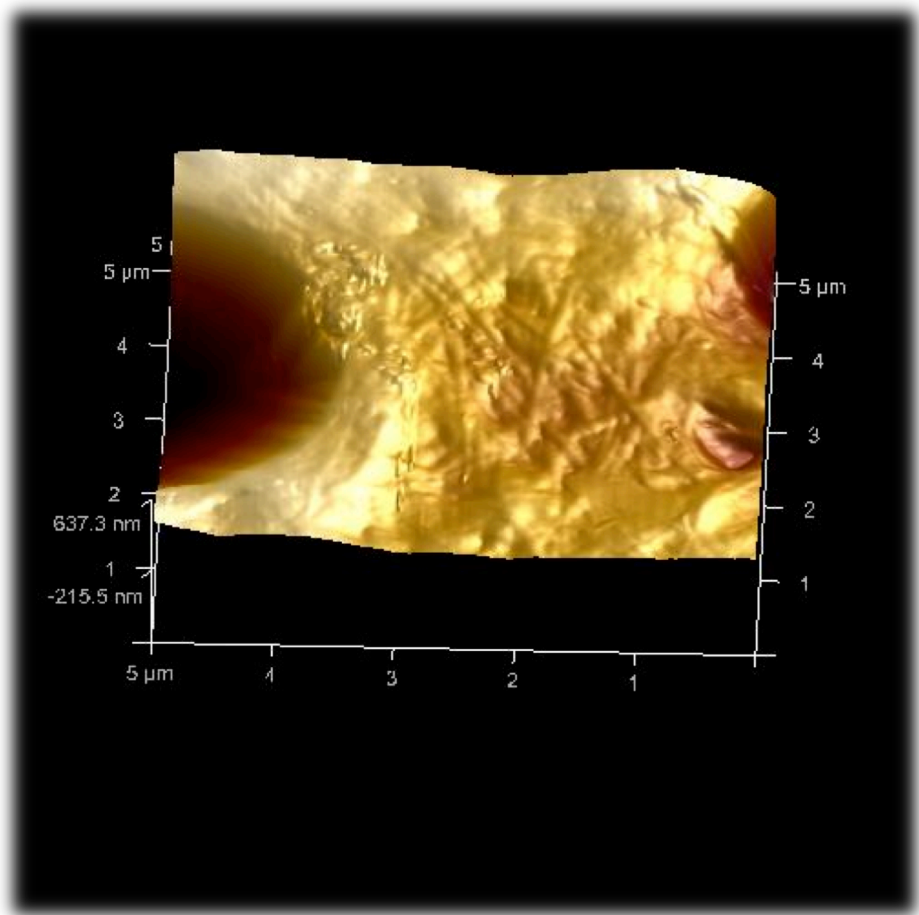


Fig.10 Imagen tridimensional de AFM de la superficie de la dentina después de la segunda aplicación del peróxido de hidrógeno al 35%

En la figura 11, se aprecia una muestra de dentina tras la tercera aplicación de peróxido de hidrógeno al 35%, se puede ver claramente que la dentina intertubular presenta un aspecto muy irregular.

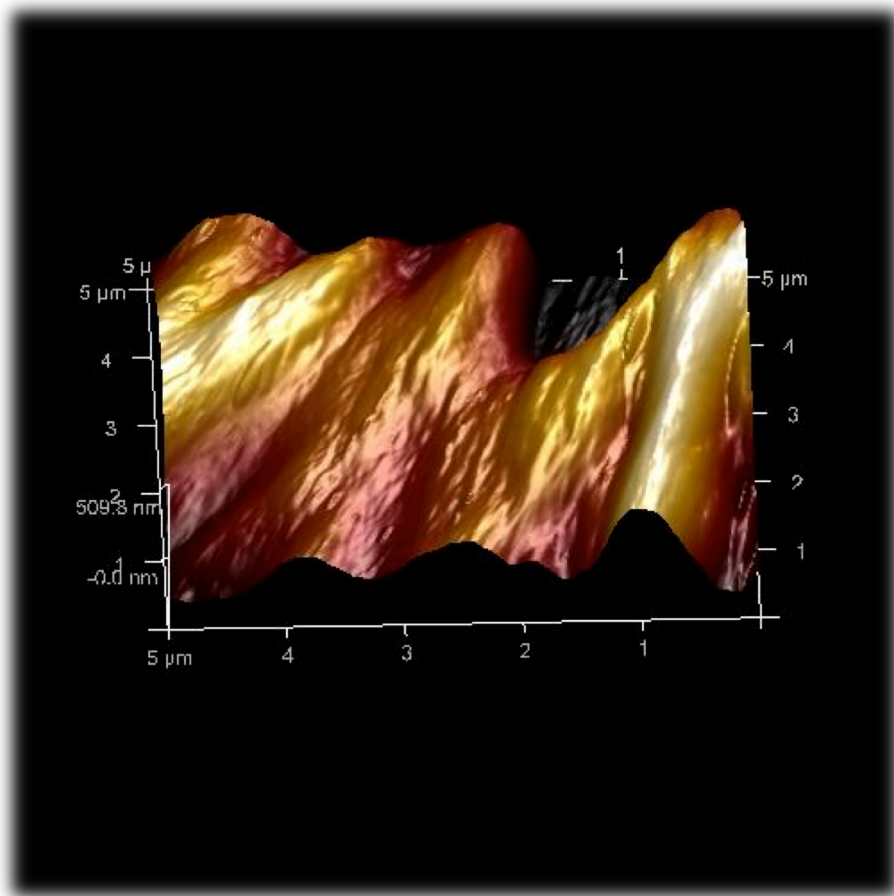


Fig.11 Imagen tridimensional de AFM de la superficie de la dentina después de la tercera aplicación de peróxido de hidrógeno al 35%

1.2 EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDROGENO AL 37,5% EN LA TOPOGRAFIA SUPERFICIAL DE LA DENTINA

En las figuras 12 a 15, se muestran las imágenes topográficas de la dentina en muestras de dentina de $5\mu\text{m}^2$ antes y tras cada una de las aplicaciones de peróxido de hidrógeno al 37,5%

En la figura 12, antes de aplicar ningún agente blanqueante, se aprecia un túbulo dentinario, justo en el centro de la imagen rodeado de una dentina intertubular perfectamente lisa.

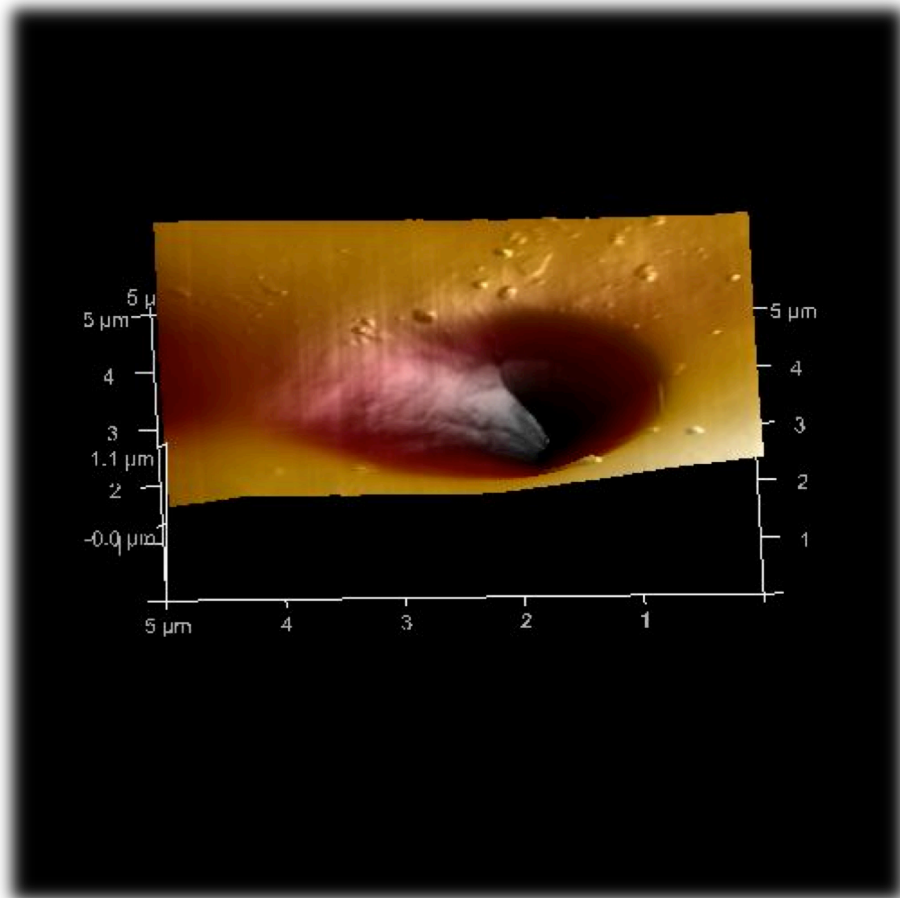


Fig.12 Imagen tridimensional de la superficie de la dentina antes de la aplicación del agente blanqueador

En la figura 13, se aprecia un túbulo dentinario de mayor tamaño y dos túbulos dentinarios incompletos a ambos extremos de la imagen. Aunque ya se le ha realizado una aplicación de peróxido de hidrógeno al 37,5%, la superficie de la dentina intertubular se ve bastante lisa y homogénea.

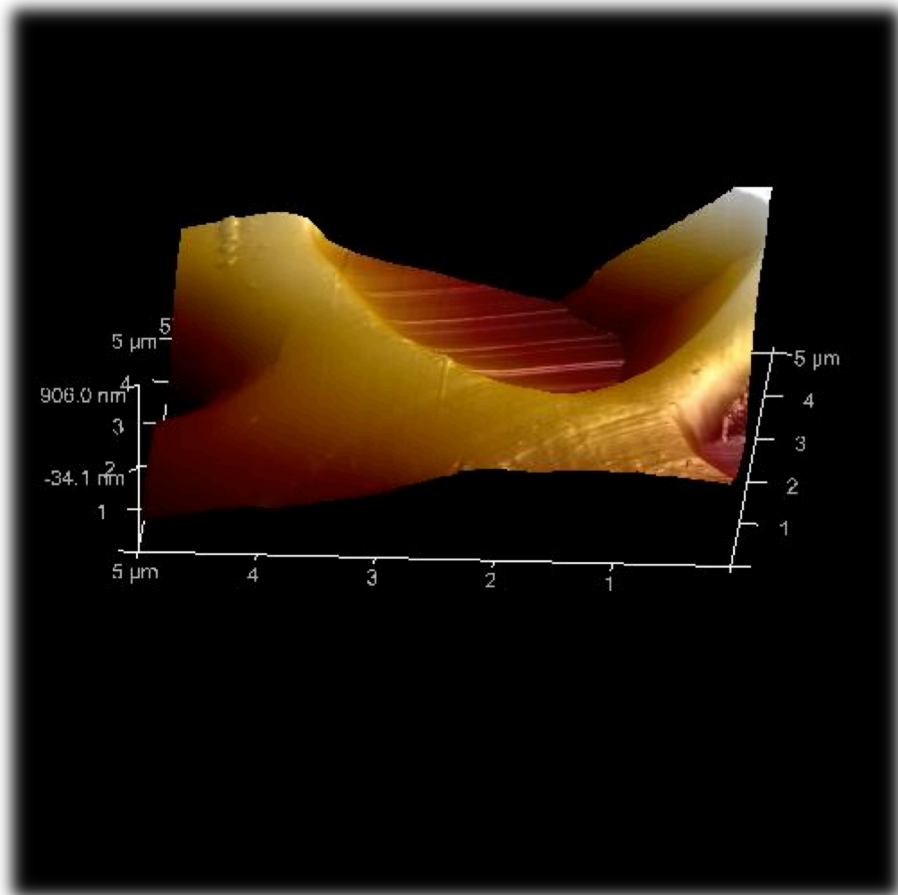


Fig.13 Imagen tridimensional de la superficie de la dentina después de la primera aplicación de peróxido de hidrógeno al 37,5%

En la figura 14, se aprecia la dentina tras la segunda aplicación de peróxido de hidrógeno al 37,5% aunque existen unas ligeras imperfecciones en la dentina intertubular la superficie dentinaria continua siendo homogénea

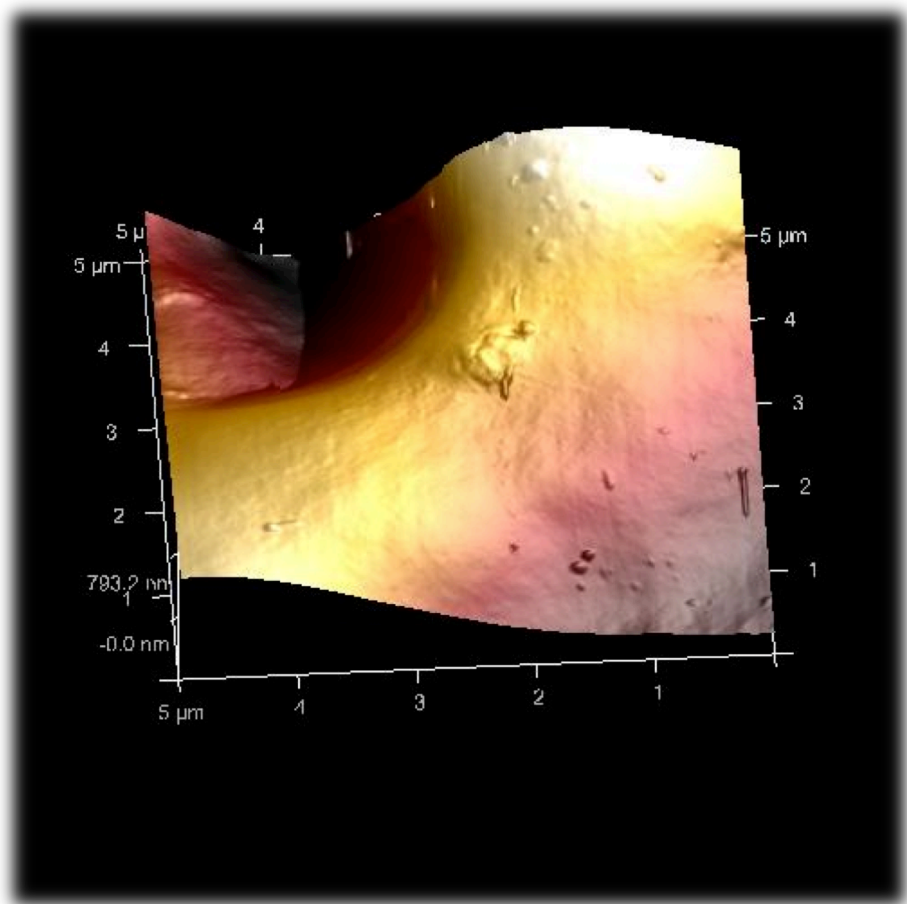


Fig.14 Imagen tridimensional de AFM de la superficie de la dentina después de la segunda aplicación del peróxido de hidrógeno al 37,5%

En la figura 15, se aprecian dos túbulos dentinarios y en la dentina intertubular con algunas irregularidades e imperfecciones aunque menos que en la figura 11.

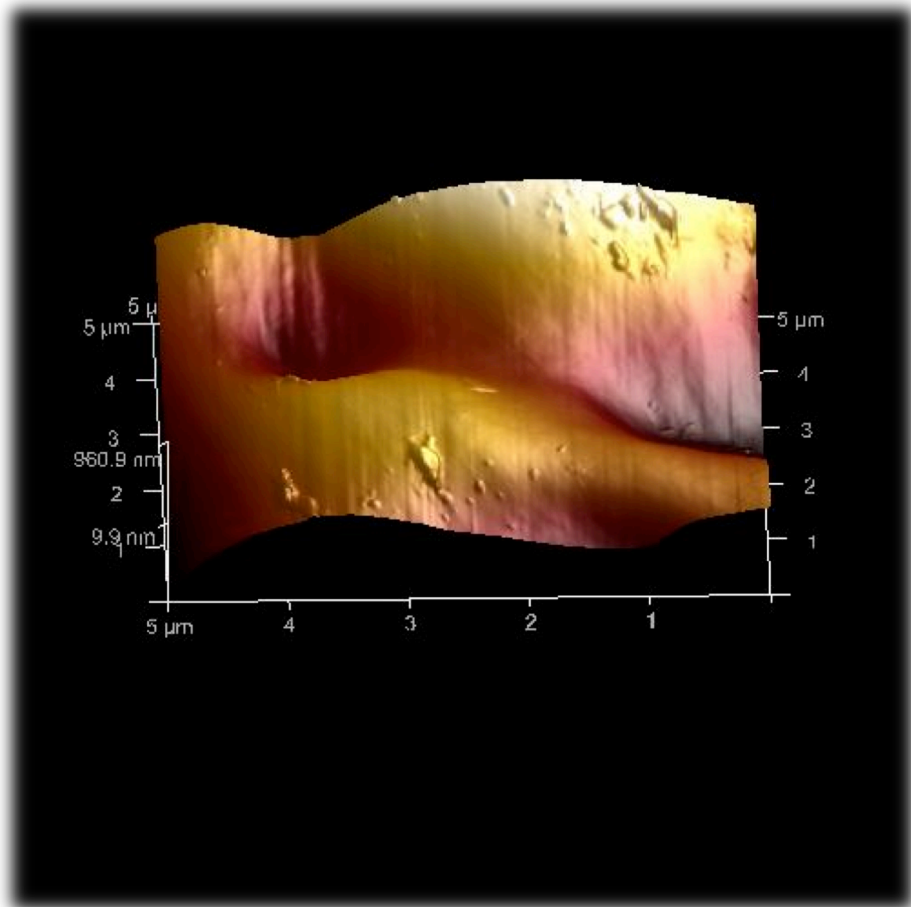


Fig.15 Imagen tridimensional de AFM de la superficie de la dentina después de la tercera aplicación de peróxido de hidrógeno al 37,5%

2. ANÁLISIS DE LOS DATOS

2.1 RESULTADOS DE I.RAW MEAN

En la tabla 1, se muestra la rugosidad media expresada en nanómetros (I.RAW MEAN)

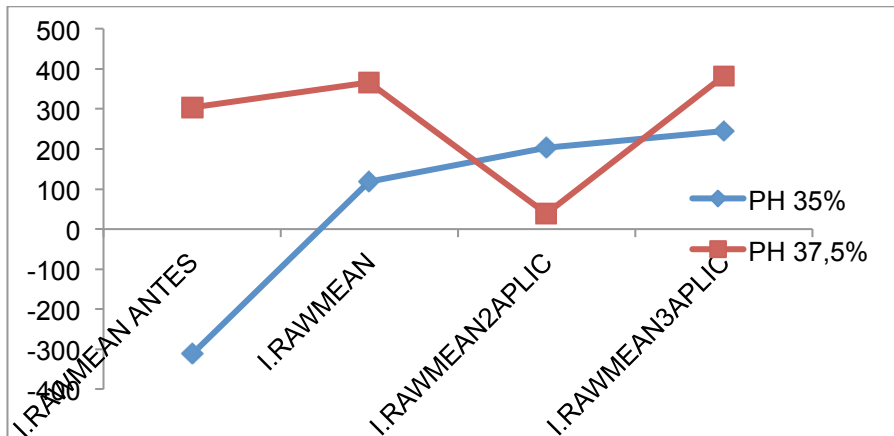
Tal como se aprecia en la tabla 1, se halló una gran variabilidad para los dos grupos en todos los momentos del estudio. Tras aplicar el test no paramétrico U de Mann Whitney, no se hallaron diferencias significativas para los valores medios de I.RAWMEAN en los diferentes momentos del estudio entre los dos grupos evaluados.

El valor de I.RAWMEAN antes de la aplicación del peróxido de hidrógeno al 35% fue significativamente inferiores al hallado tras la tercera aplicación $p=0,037$. No se hallaron diferencias significativas entre los valores iniciales y los hallados en los diferentes momentos del estudio para el grupo 2, al que se le aplica peróxido de hidrógeno al 37,5% ($p>0,05$). Las comparaciones pre y pos-tratamiento se realizaron mediante el test de Wilcoxon.

n= 8 en cada grupo		Media nm	D. estándar	p
I.RAW MEAN ANTES	PH 35%	-311,47	529,65	0,115
	PH 37,5%	303,50	745,27	
I.RAW MEAN 1APLIC	PH 35%	117,76	473,54	0,916
	PH 37,5%	367,00	781,34	
I.RAW MEAN 2APLIC	PH 35%	203,22	266,77	0,345
	PH 37,5%	38,15	789,05	
I.RAW MEAN 3APLIC	PH 35%	245,38	361,24	0,563
	PH 37,5%	382,37	456,14	

Tabla 1. Valores medios, desviación estándar de I.RAWMEAN

En la gráfica 1, se aprecia la evolución de los valores para la rugosidad media expresada en nanómetros en ambos grupos. En el grupo PH 35%, la rugosidad de la dentina fue aumentando progresivamente, mientras que en el grupo tratado con PH al 37,5%, se halló un pico de rugosidad muy bajo tras la segunda aplicación, mientras que en el resto de los momentos del estudio, los valores se hallaron entre 300 y 400 nm.



Gráfica 1. Evolución de IRAWMEAN en ambos grupos

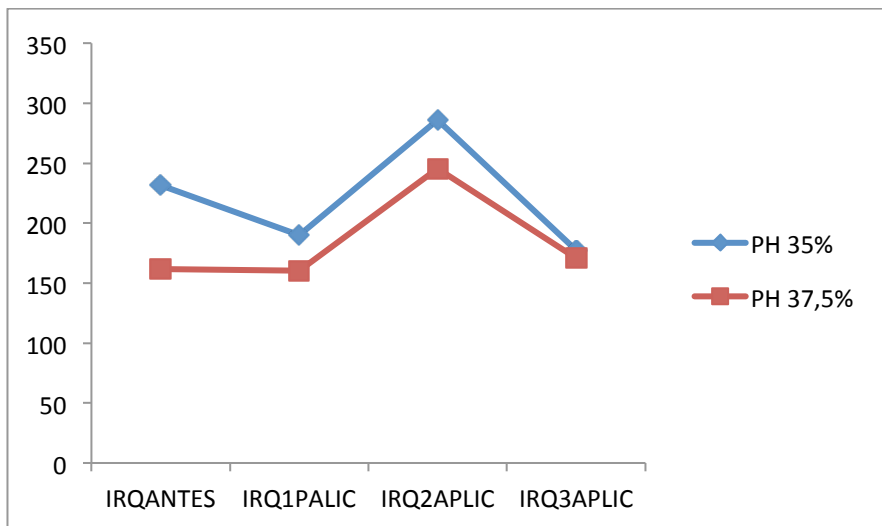
2.2 RESULTADOS DE I.RQ

El valor promedio de la diferencia entre los picos y valles expresado en nanómetros, corresponde al I.RQ. En la tabla 2, se aprecia que al final del estudio los valores medios de I.RQ fueron casi idénticos en ambos grupos. No se hallaron diferencias significativas entre los dos grupos en ninguno de los momentos del estudio. Dentro de cada grupo no se hallaron diferencias entre los valores iniciales y los valores hallados en cada momento del estudio ($p > 0,05$).

n= 8 en cada grupo		Media nm	D. estándar	p
I.RQ ANTES	PH 35%	231,47	95,18	0,156
	PH 37,5%	161,70	103,97	
I.RQ 1PALIC	PH 35%	190,06	98,99	0,674
	PH 37,5%	160,37	60,94	
I.RQ 2APLIC	PH 35%	285,87	118,98	0,462
	PH 37,5%	245,31	120,22	
I.RQ 3APLIC	PH 35%	177,38	50,27	0,674
	PH 37,5%	171,00	58,98	

Tabla 2. Valores medios, desviación estándar de IRQ

En la gráfica 2, se aprecia que ambos grupos se comportaron de forma muy similar a lo largo de estudio. Tras la segunda aplicación, ambos grupos presentaron un pico en los valores de I.R.Q.



Gráfica 2: Evolución de I.R.Q. en ambos grupos

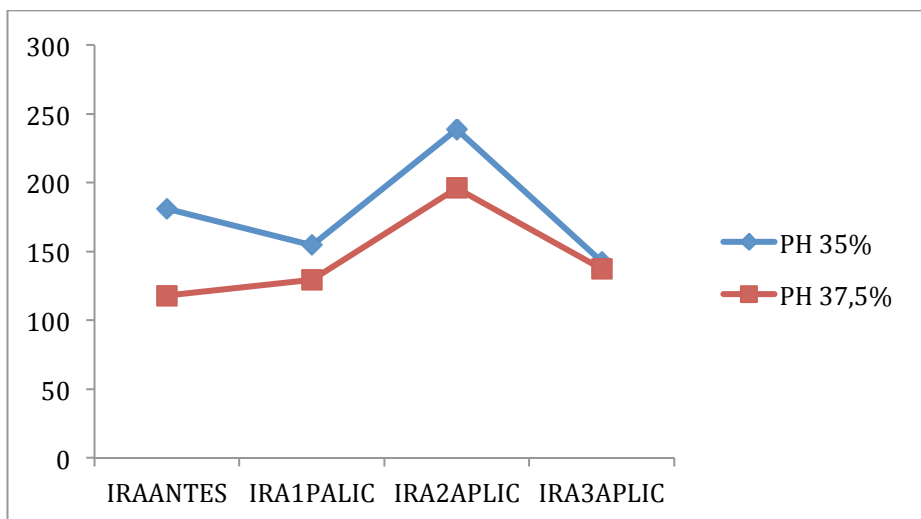
2.3 RESULTADOS DE I.R.A

La rugosidad media en valor absoluto, se expresa en el parámetro I.R.A. En la tabla 3, se aprecia que al final del estudio los valores medios de I.R.A. fueron muy similares en ambos grupos. No se hallaron diferencias significativas entre los dos grupos de estudio en ninguno de los momentos, al igual que ocurría con I.R.Q.

n= 8 en cada grupo		Media	D.estándar	p	
I.RA ANTES	PH 35%	181,11	74,17	0,141	
	PH 37,5%	118,05	97,62		
I.RA 1PALIC	PH 35%	154,35	88,44		0,793
	PH 37,5%	129,26	51,14		
I.RA2 APLIC	PH 35%	238,50	100,09	0,529	
	PH 37,5%	195,88	106,46		
I.RA3 APLIC	PH 35%	142,60	44,69	0,495	
	PH 37,5%	137,48	54,56		

Tabla 3. Valores medios, desviación de IRA

En la gráfica 3, se aprecia que ambos grupos se comportaron de forma muy similar, al igual que sucedió con el parámetro anterior. Dentro de cada grupo no se hallaron diferencias entre los valores iniciales y los valores hallados en cada momento del estudio ($p > 0,05$).



Gráfica 3 Evolución de IRA en ambos grupos

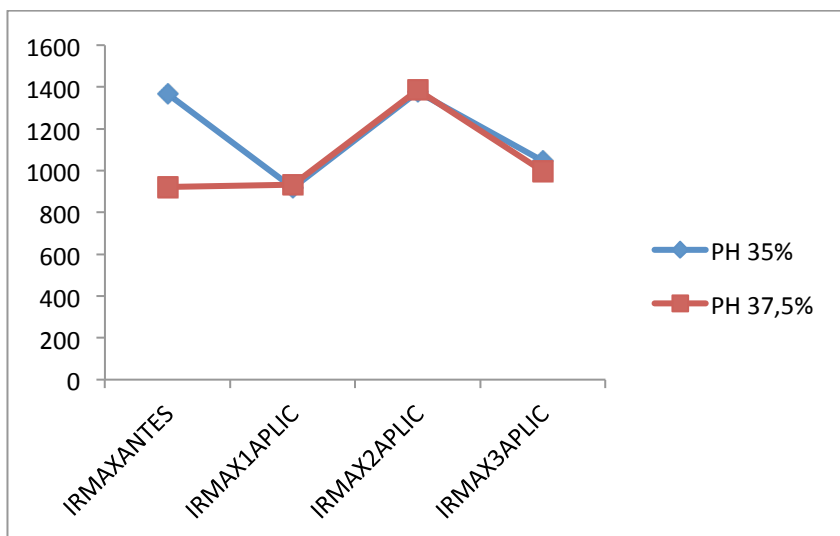
2.4 RESULTADOS DE I.RMAX

La diferencia entre la rugosidad máxima y mínima, es decir entre el punto más alto y más bajo de la imagen (I.RMAX), se muestra en la tabla 4, excepto en el momento inicial, en el resto de los momentos del estudio los valores de I.RMAX fueron superponibles para ambos grupo, tal como se ve gráficamente en la gráfica 4. Dentro de cada grupo no se hallaron diferencias entre los valores iniciales y los valores hallados en cada momento del estudio ($p > 0,05$).

n= 8 en cada grupo		Media	D. estándar	p
I.RMAX.ANTES	PH 35%	1369,00	564,97	0,093
	PH 37,5%	922,00	515,71	
I.RMAX.1APLIC	PH 35%	917,75	450,85	1
	PH 37,5%	933,50	321,49	
I.RMAX.2APLIC	PH 35%	1378,38	634,64	0,916
	PH 37,5%	1386,38	620,49	
I.RMAX.3APLIC	PH 35%	1046,13	283,04	1
	PH 37,5%	997,38	221,19	

Tabla 4. Valores medios y desviación estándar de I.RMAX

A partir de la primera aplicación tanto en las muestras sometidas a peróxido de hidrógeno 35% como las sometidas a peróxido de hidrogeno al 37,5%, se comportan de forma similar, tras la segunda aplicación se halló un aumento de I.RMax, es decir, aumentó la distancia vertical entre el punto más alto y más bajo de la imagen.



Gráfica 4. Evolución de IRMAX en ambos grupos

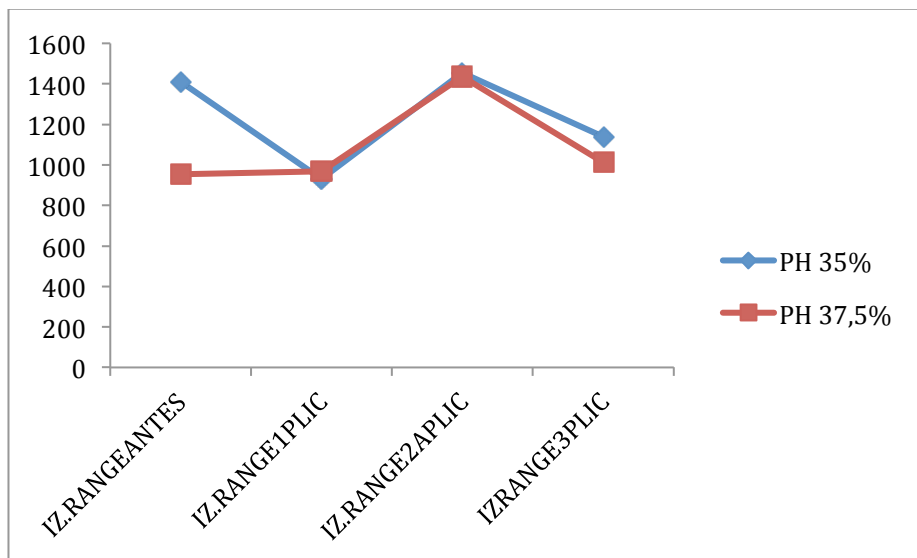
2.5 RESULTADOS DE I.Z.RANGE

I.Z.RANGE, es un parámetro similar al anterior, muestra la distancia entre el punto más alto y más bajo de la imagen, de hecho su comportamiento ha sido similar para ambos parámetros, y los valores absolutos bastante superponibles. En la tabla 5 se muestran los valores para ambos grupos

n= 8 en cada grupo		Media	D. estándar	P
I.Z..RANGE ANTES	PH 35%	1409,75	589,41	0,066
	PH 37,5%	954,00	522,26	
I.Z..RANGE 1PLIC	PH 35%	931,00	455,94	0,753
	PH 37,5%	967,88	348,48	
I.Z..RANGE 2APLIC	PH 35%	1454,38	701,14	0,916
	PH 37,5%	1435,88	635,22	
I.Z..RANGE 3PLIC	PH 35%	1138,13	343,07	0,529
	PH 37,5%	1011,88	221,55	

Tabla 5. Valores medios y desviación estándar de I.Z.RANGE

Los valores para I.Z.RANGE se muestran gráficamente en la gráfica 5, se aprecia que ésta gráfica es superponible a la anterior. No se hallaron diferencias significativas entre los valores iniciales y los valores para cada momento del estudio ($p>0,05$).



Gráfica 5. Evolución de I.Z.RANGE en ambos grupos

2.6 RESULTADOS DE I.S.A.D.

La diferencia entre el área tridimensional y bidimensional o imagen en huella expresado en porcentaje se representa en el valor I.S.A.D.

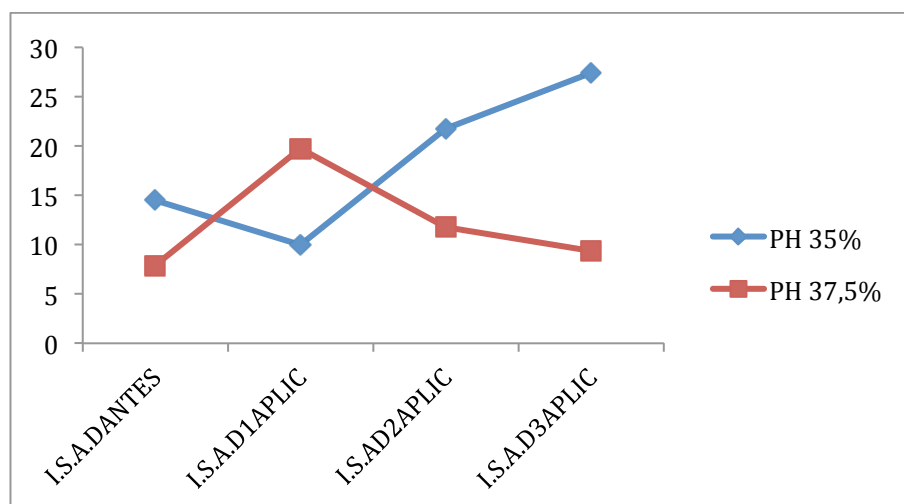
En la tabla 6, se aprecia, que excepto tras la primera aplicación, los valores I.S.A.D fueron superiores para el grupo al que se le aplica peróxido de hidrógeno al 35%, aunque sin diferencias

significativas con el grupo en el que se aplicó al 37,5 %, mostrándose una tendencia a aumentar los valores tras la segunda y tercera aplicación de peróxido de hidrógeno al 35% y un descenso en el grupo en el que se aplicó al 37,5%.

n= 8 en cada grupo		Media	D. estándar	p
I.S.A.DANTES	PH 35%	14,47	12,05	0,208
	PH 37,5%	7,89	4,678	
I.S.A.D 1APLIC	PH 35%	9,98	6,216	0,674
	PH 37,5%	19,75	27,38	
I.S.A.D 2APLIC	PH 35%	21,78	15,69	0,208
	PH 37,5%	11,75	7,16	
I.S.A.D 3APLIC	PH 35%	27,42	51,65	0,462
	PH 37,5%	9,39	5,79	

Tabla 6. Valores medios y desviación estándar del.S.A.D

En la gráfica 6 se muestra la evolución de I.S.A.D en ambos grupos. Tampoco dentro de cada grupo se hallaron diferencias entre los valores iniciales y los valores paron cada momento del estudio ($p>0,05$).



Gráfica 6. Evolución de I.S.A.D en ambos grupo

DISCUSIÓN

Existe controversia respecto a los efectos del blanqueamiento en los tejidos duros dentales, sobretodo hay estudios referentes al esmalte, y existe menos bibliografía referente al efecto de los agentes blanqueadores sobre la dentina.

Todas estas variaciones producidas por los agentes de blanqueamiento sobre las estructuras mineralizadas del diente han sido estudiadas mediante diversas técnicas de microscopía, la más utilizada hasta ahora había sido la técnica de microscopía electrónica, sin embargo recientemente se ha incorporado para el estudio de todos estos cambios la microscopía de fuerzas atómicas que presenta ciertas ventajas sobre la técnica hasta ahora utilizada.

Encontramos en la bibliografía muchos autores que han realizado estudios del efecto del blanqueamiento dental empleando diferentes concentraciones [Bitter,1992; Llena y cols.,1992; Haywood y cols.,1994Lopes y cols.,2002;Türkuny cols.,2002;White y cols.,2002;Haywood 2002; Sulieman y cols.,2004;Bistey y cols.,2007; Forner y cols.,2009;Azrak y cols.,2010]

Con el AFM se estudia directamente la superficie de la muestra, ya que no es necesario cubrirla de ninguna capa conductora.

Además con el AFM se puede analizar la superficie en condiciones ambientales ya que no se requiere el empleo de alto

vacío. Permitiendo evaluar la influencia del ambiente en la morfología y microestructura de las superficies.

Podemos evitar la interacción con la superficie permitiendo el análisis de estructuras delicadas sin alterarlas.[Hegedüs y cols.,1999]

Además de información cualitativa podemos obtener información cuantitativa a través del cálculo de la rugosidad media de una determinada superficie

La disminución de la dureza puede ser debida a un aumento de la permeabilidad de la dentina [Healing y cols., 1995]

En nuestro trabajo el efecto de los agentes blanqueadores sobre la superficie dentinarias se analiza utilizando parámetros como IRQ y IRA coincidiendo con otros autores como Hegedüs y cols.,1999; Nizam y cols.,2005;Pedreira de Freitas y cols.,2011, que realizaron sus estudios sobre cambios en la rugosidad en el esmalte.

Sin embargo nosotros en nuestro estudio también analizamos otros parámetros como IR.Max, I. Z. Range, I.S.A.D. y I.Raw Mean.

El modo *tapping* que utilizamos en el AFM, es un modo de contacto intermitente, no continuo, evitando que la superficie dentinaria sufra cambios topográficos por el efecto de la punta y este hecho en nuestro estudio es relevante ya que nuestras

muestras han sido modificadas mediante agentes blanqueadores.[El Fininat y cols.,2001]

Hegedüs y cols.,1999 evaluó los cambios generados en el esmalte al aplicar peróxido de hidrógeno 30% pero pasadas 28horas, viendo que tanto I.RA y I.RQ aumentan. Nosotros evaluamos estos datos pero pasada una semana y realizando varias aplicaciones, a las 2 semanas y pasadas 3 semanas. Tratando de simular el protocolo clínico de blanqueamiento en dientes no vitales. Hemos visto que existe un aumento para todos los parámetros estudiados, en la mayoría de las muestra en la segunda aplicación pero no es estadísticamente significativo.

En un estudio realizado por Salah M. y cols.,2010 se compara el efecto del peróxido de carbamida al 16% sobre la superficie de esmalte y sobre la superficie de dentina, en cuanto a Ra. En dientes de pacientes sanos y dientes con pacientes urémicos. En este estudio se observa que existe un aumento de Ra más en la dentina que en el esmalte y ese aumento es mayor en los dientes de los pacientes sanos, coincidiendo con nuestros resultados donde también existe una tendencia al aumento de I.Ra, aunque no es progresivo conforme se van realizando las aplicaciones.

La mayoría de los estudios realizados para analizar los cambios en la rugosidad después de la utilización de agentes blanqueantes, analizan la superficie del esmalte. Sin embargo

existen artículos donde se observa el cambio de la rugosidad de la dentina, en cuanto a I.Ra después de la utilización de irrigantes.[Talita T. Y cols.,2013]

En 2005 Nizam y cols.,corroboraron, al igual que ocurre en nuestro estudio pero ellos en el esmalte, que la aplicación de peróxido de hidrógeno al 30% durante 24 horas también produce una aumento estadísticamente significativo de Rq y Ra.

Al igual que en nuestro trabajo Sato y cols.,2013 confirmaron que existe una aumento de la rugosidad en la superficie del esmalte después del tratamiento con peróxido de hidrógeno al 35%, aunque ellos utilizan imágenes del AFM de $10 \mu\text{m}^2 \times 10 \mu\text{m}^2$ y su investigación está centrada en los cambios en el esmalte y no en la dentina, como la mayoría de los artículos revisados, que hacen referencia a la acción de agentes blanqueantes.

El AFM se ha utilizado para acceder a los parámetros cuantitativos y cualitativos de rugosidad en el campo de la investigación de materiales dentales .Los parámetros que se analizar son RMS o I.Rq, así como la rugosidad promedio, I.Ra, son parámetros que están siendo ampliamente usados para proporcionar superficie de análisis cuantitativo de imágenes de AFM. En este estudio de Varanda E. y cols., 21013, el objetivo fue evaluar, utilizando AFM, la rugosidad superficial y la morfología superficial de dos composites dentales diferentes, uno que contiene nanopartículas y el otro que es resina

microhíbrida, después del uso de dos agentes de blanqueamiento en práctica clínica. En este estudio, las imágenes de AFM mostraron que el uso de agentes de blanqueamiento causa cambios sólo en la superficie Esthet X que es de resina microhíbrida, tanto cualitativa como cuantitativamente. En este contexto, Dogan et al. (2008), en su estudio AFM, observó que el uso de agentes blanqueadores redujo la rugosidad superficial de composites microhíbridos y de nanopartículas y la superficie de los primeros se veía más afectada.

En un estudio realizado en 2010 por Pedreira y cols., midieron los cambios morfológicos producidos sobre la superficie del esmalte al aplicar peróxido de hidrógeno al 35% y obtuvieron un aumento para los valores de I.Rq (RMS) y Ra estadísticamente significativos lo mismo ocurre en un estudio realizado por Sun y col., en 2011, donde utilizan peróxido de hidrógeno al 30% y también se produce un aumento de I.Rq y Ra.

En el estudio realizado por Chng y cols., 2005 tanto la dentina peritubular como la intertubular se ven afectadas por el peróxido de hidrógeno, parece ser que la dentina peritubular es más resistente al peróxido de hidrógeno que la intertubular, esto puede ser debido a la diferencia de composición que puede existir entre las dos.

La dentina peritubular está más mineralizada que la intertubular y esta última presenta mayor proporción de matriz orgánica, pero nosotros en este trabajo analizamos la dentina intertubular y peritubular simultáneamente sin hacer diferencias entre una y otra. [Piesco, 1994].

Otros estudios que han utilizado el microscopio de fuerzas atómicas, muestran un ataque de la dentina peritubular debido a la propiedad ácida del peróxido de hidrógeno. [Marshall y cols., 1993] [Marshall y cols., 1997]

Los peróxidos, son los productos más utilizados para el blanqueamiento dental, su utilización a diferentes concentraciones y con diferentes características de pH, hacen que se comporten de forma diferente sobre las estructuras duras del diente. En general cuando el peróxido se disocia, produce una bajada de pH en el medio en el que se encuentra, de forma inmediata, este efecto sobre el esmalte y sobre la dentina, potencialmente, da lugar a un patrón que recuerda al del grabado ácido, cuya profundidad y características variarán en función del pH del producto y del tiempo de contacto [Llena y cols., 1992].

También Joiner en 2007 corroboró que en la acidez de los peróxidos de hidrógeno esta la causa del efecto desmineralizante de estos productos.

La variación de los efectos de los agentes de blanqueamiento está en función de diferentes factores como son el pH del agente de blanqueamiento, la capacidad tampón de la dentina, y el tamaño y la densidad de los túbulos dentinales [Chng y cols., 2002].

Ronstein en 1992, halló que los agentes blanqueadores pueden originar alteraciones en la estructura del diente. Así, en el esmalte, ocurre una reducción significativa en la relación Ca/P después de un tratamiento con soluciones de peróxido de hidrógeno

Algunos estudios demuestran una disminución de los componentes orgánicos de la dentina por oxidación de las proteínas [Rotstein y cols., 1992] [Rotstein y cols., 1996].

En nuestro estudio al utilizar los dos productos blanqueantes de alta concentración, el grupo 1, al que se le aplica el Opalescence Endo, que es peróxido de hidrógeno al 35% con un ph de entre 3 y 5, y al grupo 2, al que se le aplica Pola Office plus, que es peróxido de hidrógeno al 37,5%. Vemos que existe un mayor aumento de la rugosidad al utilizar el Opalescence Endo, debido a que este producto posee un ph más bajo y por tanto tiene más efecto desmineralizante sobre la estructura dentinaria y ello produce un aumento de la rugosidad.

Nuestros resultados son comparables con los obtenidos por Sa y cols., en 2012 donde utilizaron peróxido de hidrógeno al 35% y

al 38% con un ph de 4.03 y 7.52 respectivamente. Constatando una desmineralización en los dos casos pero más acentuada con el producto de peróxido de hidrógeno al 35%.

También Sun y cols., compararon dos peróxidos de hidrógeno al 30% con distinto ph, uno de ph 3,6 y otro de ph 7 aplicada en una única sesión de 4 horas, ambos productos mostraron una desmineralización del esmalte pero, se observó una superficie más porosa en el producto con ph 3.6. Tal y como ocurre en nuestro estudio, donde el producto con ph más ácido es el que produce más alteraciones en la rugosidad.

En el estudio de Hairul y cols., 2005 después del blanqueamiento se observa un cambio evidente de la micro y nanoestructura. Más acentuado en la dentina intertubular que en la peritubular, ese cambio es el resultado de una disminución en la dureza y en el módulo de Young.

El incremento de la fragilidad de la estructura coronal del diente, es el resultado de la deshidratación de la dentina y el esmalte [Walton y Rotstein, 1996].

Muchos autores han analizado el efecto de los peróxidos de hidrógeno en cuanto a cambios estructurales en el esmalte (Llena y cols., 1992; Britter y Sanders., 1993; Hegedüs y cols., 1999), pero realmente hay poca bibliografía que describa como estos peróxidos afectan a la estructura dentinaria [Forner y cols., 2009]

Actualmente existe poca bibliografía sobre los efectos de los agentes blanqueantes sobre la estructura dentinaria a nivel nanoestructural, ya que la mayoría de estudios están centrados en la repercusión de estos agentes sobre el esmalte.

Después de corroborar que los agentes blanqueantes de alta concentración producen alteraciones nanoestructurales, en cuanto a rugosidad [Salah M y cols.,2010], alteración en el módulo de Young y alteración en la dureza de la dentina [Forner y cols., 2009], nos planteamos como estas alteraciones pueden afectar a la capacidad de adhesión de la dentina.

CONCLUSIONES

Tras el análisis de los efectos de dos agentes blanqueadores de alta concentración, sobre la superficie de la dentina y respondiendo a los objetivos planteados, se puede concluir lo siguiente, dentro de las limitaciones del presente estudio:

1. El peróxido de hidrógeno al 35 % y al 37,5 % se comportaron de forma similar respecto a los cambios de rugosidad provocados en la dentina.
2. Los parámetros evaluados indicativos de variaciones en la rugosidad de la dentina fueron similares en ambos grupos al inicio y al final del estudio.

Las variaciones en los parámetros estudiados no siguieron una tendencia homogénea a lo largo del estudio, apreciándose en la mayoría de ellos un ascenso tras la segunda aplicación y un descenso tras la tercera aplicación, volviendo a valores similares a los iniciales

BIBLIOGRAFÍA

1. Abramovich Abraham. Histología y embriología dentaria. Mundi, Buenos Aires, 1984; 70-89
2. Akal N, Over H, Olmez A, Bodur H. Effects of carbamide peroxide containing bleaching agents on the morphology and subsurface hardness of enamel. Journal of Clinical Pediatric Dentistry. 2001; 6: 245-293.
3. Albers H. Odontología Estética Selección y Colocación de Materiales. 2ª Edición Barcelona Editorial Labor S.A. 1991
4. Ari H, Ungor M. In vitro comparison of different types of sodium perborate used for intracoronar bleaching of discoloured teeth. Journal of Endodontics. 2002; 35:433-436.
5. Attin T, Muller T, Patyk A, Lennon AM. Influence of different bleaching systems on fracture toughness and hardness of enamel. Operative Dentistry. 2004b; 29:188-195
6. Attin T, Hannig C, Wiegand A, Attin R. Effect of bleaching on restorative materials and restoration-a systematic review. Dental Materials. 2004, 20:852-861.

7. Azrak B, Callaway A, Kurth P, Willershausen B. Influence of bleaching agents on surface roughness of sound or eroded dental enamel specimens. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2010; 22:391-399
8. Baron M, Llana MC, Forner L, Palomares M, González-García C, Salmerón-Sánchez M. Nanostructural changes in dentin caused by endodontics irrigants. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2013; 18: 733-736
9. Basting RT, Rodriguez Junior AL, Serra MC. The effect of 10% carbamide peroxide bleaching material on microhardness of sound and demineralized enamel and dentin in situ. *Operative Dentistry*. 2001; 26: 531-539.
10. Benetti AR, Valera MC, Mancini MN, Miranda CB, Balducci I. In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber. *Journal of Endodontics* . 2004; 37:120-124.
11. Bernard Tovati. Paul Miara. Dan Nathanson. *Odontología Estética y Restauraciones Cerámicas*. Editorial Masson. Barcelona Edición Española. 2000. .
12. Bistey Tamas. Nagy Isrvan P. Simó Anett. Hegedus Csaba. In Vitro FT-IR study of the effects of hydrogen peroxide on superficial tooth enamel. *Journal of Dentistry* .2007; 35: 325-330.

13. Camejo M, González O, Solórzano A, Balda R. Protección dentino-pulpar. Acta Odontológica Venezolana. 1999; 37:98-105
14. Canalda, C. Endodoncia: técnicas clínicas y bases científicas. Editorial Masson. Barcelona.1999.
15. Casey LJ, Schindler WG, Murata SM, Burgess JO. The use of dentinal etching with endodontic bleaching procedures. Journal of Endodontics.1989;15:535-538.
16. Chng HK, Palamara JEA, Messer HH. Effect of hydrogen peroxide and sodium perborate on biomechanical properties of human dentine. Journal of Endodontics 2002;28:62-7.
17. Chng HK, Ramli HN, Yap AUJ, Lim CT. Effect of hydrogen peroxide on intertubular dentine. Journal of Dentistry 2005; 33: 363-369.
18. Cimilli H, Pameijer CH. Effect of carbamide peroxide bleaching agents on the physical properties and chemical composition of enamel. American Journal of Dental Research .2001; 14: 63-66.
19. Clelland NL, Dorosti Y, Seghi RR. Effects of carbamide peroxides on wear resistance and color change of enamel opposing porcelain. Journal Prosthodontics. 2002; 11: 81-85.

20. Cohen,S, Burns R. Vías de la pulpa 8ª edición. Editorial Mosby 2002.Barcelona. Pag.754-756
21. Costas F. y Wong M. Intracoronar Isolating Barriers: Effect of location on root leakage and effectiveness of bleaching agents. Journal of Endodontics 1991;17:365-367.
22. Crampton N, Thomson N.H., Kirkham J, Gibson C.W., Bonass W.A. Imaging RNA polymerase-amelogenin gene complexes with single molecule resolution using atomic force microscopy. European Journal of Oral Sciences. 2006; 114 (Suppl.1): 133-138.
23. Davis W.L. Histología y embriología bucal. Editorial McGraw hill, México, 1998, pág. 144-160.
24. Efeoglu Neslihan, Wood David J. Efeoglu Candan. Thirty- five percent hydrogen peroxide application causes in vitro demineralization of enamel. Dental Materials. 2006; 23: 900-904.
- 25.El Feninat F,Elouatik S,Ellis T.H, Sacher E, Stangel I. Quantitative assessment of surface roughness as measured by AFM: application to polished human dentin. Applied Surface Science 2001;183: 205-215
26. Farina M., Schemmel A., Weissmüller G, Cruz R., Kachar B., Bisch S.and P.M.. Atomic Force Microscopy

study of tooth surfaces. *Journal of Structural Biology*.1999;125 : 39-49

27. Finke Manuela, Klaus D. Jandt, David M. Parker. The early stages of native enamel dissolution studied with Atomic Force Microscopy. *Journal of Colloid and Interface Science* 2000;232:156-164

28. Forner L, Salmerón-Sánchez M, Palomares M, Llana M.C, and Amengual J. The Use of Atomic Force Microscopy in Determining the Stiffness and Adhesion Force of Human Dentin After Exposure to Bleaching Agents. *Journal of Endodontics*. 2009;35:1384-1386

29. Forner L, Amengual J, Llana MC, Riutord P. Therapeutic effectiveness of a new enzymatic bleaching dentifrice. *European Journal of Esthetic dentistry*. 2012

30. Freitas PM, Basting RT, Rodriguez JA, Serra MC. Effects of two 10% peroxide carbamide bleaching agents on dentin microhardness at different time intervals. *Quintessence International*. 2002; 33: 370-375.

31. Goldstein R, Graber D. Complete Dental Bleaching. *Quintessence Books*. 1995.

32. Goldstein R. In-Office Bleaching: Where we came from and , where we are today. *The Journal of the American Dental Association*. 1997; 128: 11S-15S

33. Gomez M, Campos A. Histología y embriología bucodental. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. 1999. Pág. 175-225
34. Guzmán. Biomaterials odontológicos de uso clínico. Ecoe editorial. Bogotá. Tercera Edición 2003
35. Hairul Nizam B.R, Lim C.T, Chng H.K, Yap A.U.P. En : Nanoindentation study of human premolars subjected to bleaching agent. Journal of Biomechanics. 2005; 38: 2204-2211
36. Hannig C, Duong S, Becker K, Brunner E, Kahler E, Attin T, Effect of bleaching on subsurface micro-hardness of composites and a polyacid modified composite. Dental materials. 2007; 23:198-203
37. Haywood VB, Greening of the tooth-amalgam interface during extended 10% carbamide peroxide bleaching of tetracycline-stained teeth: a case report. Journal of Esthetic and Restorative Dentistry 2002; 14:12- 17.
38. Haywood VB, Leonard RH, Nelson CF, Brunson WD. Effectiveness, side effects and long-term status of nightguard vital bleaching. The Journal of the American Dental Association. 1994; 125: 1219-1226

39. Healing I, Parson A, Ronstein I. Effect of bleaching agents on dentin permeability to *Streptococcus Faecalis*. *Journal of Endodontics*. 1995; 21: 540-542.
40. Hegedüs C, Bistey T, Flora-Nagy E, Jenei A. An atomic Force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *Journal of Dentistry*. 1999; 27: 509-515.
41. Jakubinek M, O'Neill C, Felix C, Price R. Temperature excursions at the pulp-dentin junction during the curing of light-activated dental restorations. *Dental Materials*. 2008; 24:1468-1476.
42. Joiner A. The bleaching of teeth: a review of the literature. *Journal of Dentistry*. 2006; 34(7):412– 419.
43. Kaneko J, Inoue S, Kawakami S, Sano H. Bleaching effect of sodium percarbonate on discolored pulpless teeth in vitro. *Journal of Endodontics*. 2000; 26:25-28.
44. Kinney JH, Salooch M, Marshall SJ, Marshall GW, Weih TM. Atomic Force Microscope measurements of the hardness and elasticity of peritubular and intertubular human dentin. *Journal Biomechanical Engineering*, 1996; 118: 133-135.
45. Kinney JH, Salooch M, Marshall SJ, Marshall GW, Weih TM. Hardness and Young's modulus of peritubular

and intertubular dentine. Archives Oral Biology 1996; 41: 9-13.

46. Kinney JH, Salooch M, Marshall GW, Marshall SJ. A micromechanics model of the elastic properties of human dentine. Archives of Oral Biology. 1999;44:813-822

47. LeGeros. Chemical and crystallographic events in the caries process. Journal Dental Research 1990; 69: 567-574.

48. Leonard RH, Eagle jc, Garland GE, Matthews Kp, Rudd AL, Phillips C. Nightguard vital bleaching and its effect on enamel surface morphology. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry** 2001; 13: 132-139.

49. Lewinstein I, Hirschfeld Z, Stabholz A Roststein I .Effect of hydrogen peroxide and sodium perborate on the microhardness of human enamel and dentin. Journal of Endodontics 1994; 20: 61-63.

50. Lewinstein I, Fuhrer N, Churaru N, Cardash H. Effect of different peroxide bleaching regimens and subsequent fluoridation on the hardness of human enamel and dentin. En: The Journal Of Prosthetic Dentistry. 2004;92: 337-342

51. Lin CP, Douglas WH, Erlandsen SL. Scanning electron microscopy of Type I collagen at the dentin-enamel junction of human teeth. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1993; 41: 381-388
52. Lippert F, Parker David M, Jandt Klaus D. In situ remineralisation of surface softened human enamel studied with AFM nanoindentation. *Surface Science*. 2004; 553: 105-114.
53. Lippert F, Parker David M, Jandt Klaus D. Susceptibility of deciduous and permanent enamel to dietary acid-induced erosion studied with atomic force microscopy nanoindentation. *European Journal of Oral Sciences* 2004;112: 61-66.
54. Ljubisa M, Rainer AJ, Nebojsa L, Meter G. Micromorphology of enamel surface after vital tooth bleaching. *Journal of Endodontics*. 2007;33: 607-610
55. Llana Puy M^aC, Forner Navarro L, Ferrandez A., Faus Llacer V. Effet de deux agents pour blanchiment sur la surface de l'email. etude "in vitro". *Bull Group Int Rech Science Stomatology et Odontology*. 1992; 35: 117-120.
56. Lopes GC, Bonisconi L, Baratieri LN, Vieira LC, Monteiro JR. Effect of bleaching agents on the hardness and morphology of enamel. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**. 2002; 14: 24-30.

57. Marshall GW Jr, Ballooch M, Gallagher RR, Gansky SA, Marshall SJ. Mechanical properties of the dentinoenamel junction: AFM studies of nanohardness, elastic modulus, and fracture. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001; 54: 87-95.
58. Marshall GW Jr, Ballooch M, Tench RJ, Kinney JH, Marshall SJ. Atomic force microscopy of acid effects on dentin. *Dental Materials* 1993;9: 265-268.
59. Marshall GW, Marshall SJ, Kinney JH, Salooch M. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *Journal of Dentistry* 1997; 25: 441-458.
60. Marshall GW Jr, Inai N, Wu- Magidi IC, Balooch M, Kinney JH, Tagami J. Dentin demineralization: effects of dentin depth, pH and different acids. *Dental Materials* 1997; 13: 338-343.
61. Microscopio de Fuerza Atómica". Encuentro de Investigadores en Ingeniería Eléctrica. Memorias. Marzo 17-18
62. Mjör L. Dentin-Predentin complex and its permeability pathology and treatment overview. *Journal Dental Research*.1985; 64:621-627.
63. Mjör I. Pulp-Dentin biology in restorative. *Dentistry Quintessence*. 2002

64. Nathoo S. The Chemistry and Mechanisms of Extrinsic and Intrinsic Discoloration. *Journal of the American Dental Association*.1997; 128: 6S-10S
65. Nizam BRH, Lim CT, Chng HK, Yap AUJ. Nanoindentation study of human premolars subjected to bleaching agent. *Journal of Biomechanics* 2005; 38: 2204-2211
66. Okte Z, Villalta P, Garcia-godoy F, Lu H, Powers JM. Surface hardness of resin composites after staining and bleaching. *Operative Dentistry*. 2006; 31:623-628
67. Ontiveros JC, Paravina RD. Color change of vital teeth exposed to bleaching performed with and without supplementary light. *Journal of Dentistry* 2009;37:840-847.
68. Pashley DH. Dentin: a dynamic substrate. A review. *Scan Microscopy*. 1989; 3: 161-176.
69. Pashley D, Okabe A, Parham P. The relationship between dentin microhardness and tubule density. *Endodontics and Dental Traumatology*.1985;1:176-179.
70. Pashley DH, Sano H, Ciucchi S, Yoshiyama M, Carvalho RM. Adhesion testing of dentin bonding agents: A review. *Journal Dental Materials* 1995; 11: 117-125.

71. Perinka L, Sano H, Hosoda H. Dentin thickness, hardness, and Ca-concentration vs bond strength of dentin adhesives. *Journal Dental Materials*, 1992; 8: 229-233.

72. Pedreira De Freitas AC, Cardoso L, Brossi S. AFM analysis of bleaching effects on dental enamel microtopography. *Applied Surface Science* 2010;256: 2915-2919

73. Pedreira De Freitas AC, Botta SB, Teixeira Fde S, Salvadori MC, Garonetto N. Effects of fluoride or nanohydroxiapatite on roughness and gloss of bleached teeth. *Microscopy Research and Technique* 2011;74: 1069-1075.

74. Piesco NP. Histology of dentin. In: Avery JK, editor. *Oral development and histology*. 2nd ed. New York: Theime Medical Publishers; 1994.

75. Pioch Th, D'Souza PD, Staehle HJ, Duschner H. Resine-dentine interface studied by SEM&CLSM *European Microscopy and Analysis*. 1996; 17-18

76. Ritter AV, Leonard RH Jr, St Georges AJ, Caplan DJ, Haywood VB. Safety and stability of nightguard vital bleaching to 12 years post-treatment. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 2002; 14: 275-285.

77. Robinson C, Yamamoto K, Connell S.D., Kirkham J, Nakagaki H, Smith A.D. The effects of fluoride on the nanostructure and surface pK of enamel crystals: an atomic force microscopy study of human and rat enamel. *European Journal of Oral Sciences* 2006;114 (Suppl 1) 99-114.

78. Rodrigues J, Marchi G, Ambrosano G, Heymann H, Pimienta L. Microhardness Evaluation of in situ vital bleaching on human dental enamel using a novel study desing. *Academy Of Dental Material*. 2005; 21:1059-1067.

79. Rodrigues JA, Basting RT, Serra MC, Rodrigues Junior AL. Effects of 10% carbamide peroxide blñeaching material on enamel microhardness. *American Journal of Dentistry*. 2001; 14: 41-67.

80. Rotstein I, Dankner E, Goldman A, Heling I, Stabholz A, Zalkind M. Histochemical analysis of dental hard tissues following bleaching.*Journal of Endodontics*.1996 ;22: 23-25.

81. Rotstein I, Lehr Z, Gedalia I. Effect of bleaching agents on inorganic components of human dentin and cementum. *Journal of Endodontics*. 1992; 18: 2930-2933.

82. Rotstein I, Zyskind D, Lewinstein I, Bamberger. Effect of different protective base materials on hydrogen

peroxide leakage during Intracoronal bleaching In Vitro. Journal of Endodontics 1992;18:114-117.

83. Rotstein I. In Vitro Determination and quantification of 30% hydrogen peroxide penetration through dentin and cementum during Bleaching. Journal of Endodontics 1991;72: 602-606.

84. Sa Y, Chen D, Liu Y, Wen W, XU M, Jiang T, Wang Y. Effects of two in-office bleaching agents with different ph values on enamel surface structure and color:an in situ vs in vitro study. Journal of Dentistry. 2012;40:26-34

85. Salah Hasab Mahmoud, Abeer El Sayed Elembaby, Ahmed Ragheb Zaher, Mohammed El –Awady Grawish, Heba M Elsabaa, Salwa Abd El-Raof El –Negoly, Mohamed Abdel Kader Sobh. Effect of 16% Carbamide Peroxide Bleaching Gel on Enamel and Dentin Surface Micromorphology and Roughness of Uremic Patients: An Atomic Force Microscopic Study. European Journal of Dentistry. 2010; 4:175-182

86. Sally J. Marshall, Mehdi Balooch, Stefan Habelitz, Guive Balooch, Richard Gallagher, Grayson W. Marshall. The dentin-enamel junction-a natural, multilevel interface. Journal of the European Ceramic Society 2003; 23: 2897-2904.

87. Sano H, Takatsu T, Ciucchi S, Russell CM, Pashley DH. Tensile properties of resin-infiltrated demineralized

human dentin. Journal of Dental Research.1995; 74: 1093-1102.

88. Sato C, Rodrigues F.A , Garcia D.M, Vidal C.M.P, Pashley D.H, Tjäderhane L, Carrilho M.R, Nascimento F.D, and Tersariol I.L.S. Journal Dental Research. 2013; 92(2):187-192

89. Scout DC, Simmelink. Structural aspects of dental caries. Journal of Dentistry Research 1974;53:161-164.

90. Silikas N, Watts D.C, England K.E.R., Jandt. Klaus.D. Surface fine structure of treated dentine investigated with tapping mode atomic force microscopy. Journal of Dentistry.1999; 27:137-144.

91. Sulieman M, Addy M, Macdonald E, Rees J.S. A safety study in vitro for The effects of An in-office bleaching system on the integrity of enamel and dentine. Journal Of Dentistry. 2004 32:581-590

92. Sun L, Liang S, Sa Y, Wang Z, Ma X, Jiang T, Wang Y. Surface alteration of human tooth enamel subjected to acidic and neutral 30% hydrogen peroxide. Journal of Dentistry 2011;39:686-692

93. Talita Tartari, Anivaldo Pereira Duarte Junior, José Otávio Carrera Silva Júnior, Eliza Burlamaqui Klautau, Mario Honorato Silva e Souza Junior, Patrícia de Almeida Rodrigues Silva e Souza. Etidronate from Medicine to

endodontics: effects of different irrigation regimes on root dentin roughness. *Journal of Applied Oral Science*. 2013;21(5):409-15

94. Tonait B *Odontología estética y Restauraciones Cerámicas*. Primera Edición 2000. Ed. Masson.Barcelona

95. Trowbridge H, Kim S, Suda H. Estructura y funciones del complejo dentino-pulpar. En: Cohen S, Burns R. 8va edición. Editorial Mosby. Capítulo 11.2002

96. Turker S.B, Biskin T. The effect of bleaching agents on the microhardness of dental aesthetic restorative materials. EN: *Journal of Oral Rehabilitation*. 2002; 29: 657.661

97. Unlu N, Cobankara K, Altinoz C, Ozer F. Effect of home bleaching agents on the microhardness of human enamel and dentin. En: *Journal of Oral Rehabilitation*.2004; 31: 57-61.

98. Van Meerbeek S, Willems G, Celis JP, Roos JR, Sraem M, Lambrechts P, Vanherle G. Assessment by nano-indentation of the hardness and elasticity of the resin-dentin bonding area. *Journal Dental Research* 1993; 10:1434-1442

99. Walton R.E., Rotstein I, Bleaching of discoloured teeth: Internal and external. In: Walton R.E. Torabinejad

M. (Eds.), Principles and Practice of Endodontics, Second ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 1996; 385-400

100. White Sn, Paine ML, Luo W, Sarikaya M, Fong H, Yu A, Li ZC, Snead ML. The Dentino-enamel junction is a broad transitional zone uniting dissimilar bioceramic composites. *Journal of the American Ceramic Society* 2000; 83: 238-240.

101. Xu HHk, Smith DT, Jahanmir S, Romberg E, Kelly JR, Thompson Vp, Rekow ED. Indentation damage and mechanical properties of human enamel and dentin. *Journal of Dental Research* 1998; 77: 472-480

102. Zach L, Cohen G. Pulp response to externally applied heat. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*. 1965; Apr.;19:515–530.

