



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

**EFFECTO REMINERALIZANTE DE UN AGENTE A BASE DE
FLÚOR Y GRAFENO SOBRE DISCOS DE ESMALTE
DESMINERALIZADO CON UN MODELO DE BIOPELÍCULA
DE *Streptococcus mutans* OBSERVADO EN MICROCT**

Elizabeth Paola Valdebenito Valencia

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Mario Diaz-Dosque

TUTOR ASOCIADO

Dra. Patricia Palma Fluxá

Dr. Rodrigo Cabello Ibacache

**Adscrito a Proyecto de Open Beauchef "Remineralizador
cariostático basado en flúor y grafeno"
Santiago - Chile
2019**



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

**EFFECTO REMINERALIZANTE DE UN AGENTE A BASE DE
FLÚOR Y GRAFENO SOBRE DISCOS DE ESMALTE
DESMINERALIZADO CON UN MODELO DE BIOPELÍCULA
DE *Streptococcus mutans* OBSERVADO EN MICROCT**

Elizabeth Paola Valdebenito Valencia

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Mario Diaz-Dosque

TUTOR ASOCIADO

Dra. Patricia Palma Fluxá

Dr. Rodrigo Cabello Ibacache

**Adscrito a Proyecto de Open Beauchef "Remineralizador
cariostático basado en flúor y grafeno"
Santiago - Chile
2019**

DEDICATORIA

A mi familia, pareja, amigos y quienes estuvieron a mi lado apoyándome.

A mi hijo Salvador. Eres todo para mí.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a la Universidad de Chile por formarme y entregarme las herramientas necesarias para mi desarrollo profesional.

A mis tutores Dr. Mario Diaz-Dosque, Dr. Rodrigo Cabello y Dra. Patricia Palma por hacerme parte de este proyecto y guiarme pacientemente en el transcurso de este trabajo. Por permitirme cumplir un sueño.

Al Laboratorio de Microbiología por su ayuda y disposición.

A aquellos profesores que con cariño y vocación me entregaron sus conocimientos y valores para desarrollarme como persona y profesional.

Por último, el más profundo agradecimiento a mi familia. A mi mamá por confiar en mí y acompañarme incondicionalmente en todas mis decisiones, a mi papá por inculcarme el valor del estudio y del trabajo y a mis hermanos, por compartir las angustias y gratificaciones de esta etapa.

A cada uno, Gracias.

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE	iii
RESUMEN	1
MARCO TEÓRICO	3
Introducción	3
A. Caries Dental	4
Biopelícula, mecanismos de acción	4
Proceso de Caries.....	5
Modelos bacterianos para el estudio de la caries	6
B. Remineralizantes	6
C. Evaluación de agentes remineralizantes	8
D. Declaración del problema.....	9
HIPÓTESIS	11
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Aspectos éticos.....	12
A. Preparación de las muestras de esmalte	12
B. Montaje de los bloques	13
C. Recolección de saliva e hidratación de los bloques de esmalte.	14
D. Formación de la biopelícula bacteriana	15
E. Tratamiento de desmineralización.....	17
F. Acidogenicidad de la biopelícula	18
G. Recolección de las muestras	19
H. Tratamiento remineralizador	19
I. Evaluación de densidad mineral y dureza superficial	21
J. Comparación de densidad mineral y microdurezas	22
RESULTADOS	23
A. Resultado ausencia de bacterias en saliva filtrada	23
B. Resultados control de pureza de <i>S. mutans</i>	23
C. Resultados de medición de pH	24

D.	Inspección visual de las muestras de esmalte.....	25
E.	Resultados mediciones de densidad mineral – microCT	26
F.	Resultados mediciones de dureza superficial - Vickers.....	29
	DISCUSIÓN.....	33
	CONCLUSIONES.....	38
	BIBLIOGRAFÍA.....	39
	ANEXOS	44

RESUMEN

Entre los propósitos de la odontología mínimamente invasiva está el de preservar la estructura dentaria, motivando el desarrollo de nuevos compuestos para el tratamiento de la caries dental. Para evaluar la eficacia de estos biomateriales es que, a través de modelos microbiológicos bacterianos de caries *in vitro*, se han utilizado herramientas que permiten visualizar y medir sus efectos sin alterar la superficie dentaria como son las pruebas imagenológicas ofrecidas por la microtomografía computarizada.

Dentro de este contexto, el objetivo de este trabajo es determinar la densidad mineral (microCT) y la microdureza superficial de discos de esmalte desmineralizados con un modelo monoespecie de *Streptococcus mutans* antes y después de la exposición de un agente a base de flúor y grafeno (BlueRemin®).

Para llevar a cabo estas mediciones se utilizó un modelo bacteriano monoespecie de *S. mutans* ATCC 25125 sobre discos de esmalte. Éstos se expusieron a sacarosa al 10%, cuatro veces al día por cinco minutos durante tres días para la simulación de un ambiente cariogénico, generando una zona de desmineralización. Posteriormente, las muestras fueron expuestas a un agente remineralizador: BlueRemin® y Fluoruro de amino de plata. Las tres zonas fueron evaluadas con pruebas de microdureza y densidad mineral (microCT).

Como resultado se obtuvo que la cepa de *S. mutans* se adhirió a los discos de esmalte formando biopelícula *in vitro*. Los valores de densidad mineral, medida en microCT y dureza superficial Vickers después de la exposición al modelo de biopelícula monoespecie de *S. mutans*, fueron menores a los valores iniciales. Los valores de densidad mineral y dureza superficial de la zona expuesta a BlueRemin® fue mayor a la zona desmineralizada pero menor a los valores iniciales.

En conclusión, se obtuvieron los siguientes resultados: 1) el modelo *in vitro* de biopelícula monoespecie de *S. mutans* es eficiente en el proceso de

desmineralización superficial sobre bloques de esmalte, 2) Los bloques desmineralizados expuestos a BlueRemin® aumentaron su densidad mineral y dureza superficial y 3) BlueRemin® tiene efecto remineralizante corroborados en microCT.

MARCO TEÓRICO

Introducción

La caries dental es una de las principales enfermedades dentro de las patologías orales, afecta a las personas no solo alterando su salud bucal, sino que también la calidad de vida de quienes la padecen (Hollister y cols., 1994). La Organización Mundial de la Salud (OMS) destaca que afecta alrededor del 60-90% de los escolares y la gran mayoría de los adultos, situándola como la principal causa de pérdida de dientes naturales (Petersen, 2008; OMS, 2012).

Los datos ofrecidos por la Global Burden of Disease advierten que las condiciones de salud oral empeoraron dramáticamente entre 1990 y 2015 en todo el mundo, atribuyendo el fenómeno a cambios demográficos, al crecimiento de la población y al envejecimiento. La población con mayor pérdida total de dientes se observó en América central, mientras que la población con más dientes permanentes cariados no tratados se observó en América del sur (Kassebaum y cols., 2015) a pesar de los programas enfocados a la prevención y promoción de la salud bucal y a la masificación del uso de fluoruros (Marthaler, 2004). Particularmente en Chile, los últimos estudios epidemiológicos de salud bucal reafirman esta tendencia, indicando que la prevalencia de caries a los 6 y 12 años es de un 70,4% y 62,5% respectivamente hasta casi el 100% en la población adulta (MINSAL, 2010).

Ante la creciente necesidad de combatir esta situación, es que la odontología moderna ha centrado su atención en la prevención para el control de la enfermedad, modificando el enfoque invasivo de la escuela tradicional y su práctica en los procedimientos restaurativos (FDI, 2002). Esta corriente, ha fomentado el desarrollo de nuevas biotecnologías y biomateriales para el tratamiento de la caries dental con el fin de preservar la estructura dentaria y controlar e incluso revertir las lesiones de caries cuando sea posible, minimizando la necesidad de usar técnicas destructivas y teniendo como principal objetivo alargar el tiempo funcional del órgano dental dentro de la cavidad oral en condiciones óptimas (Tyas y cols., 2000).

A. Caries Dental

La caries dental se define actualmente como un proceso patológico crónico, multifactorial que se caracteriza por la destrucción localizada de los tejidos duros dentales debido a los subproductos ácidos provenientes de la actividad metabólica de las bacterias presentes en la cavidad oral (Tanner AC y cols., 2016). La presencia de hidratos de carbono fermentables provenientes de los alimentos, permite que los microorganismos organizados en una biopelícula o placa bacteriana en la superficie dentaria (Bradshaw y cols., 2013; García-Godoy y Hics, 2008), generen ácidos orgánicos que descenden los valores de pH locales por debajo del valor crítico (pH 5,5) y como consecuencia de ello se desmineralice progresivamente el sustrato dental hasta su eventual cavitación (Hicks y cols., 2003).

Biopelícula, mecanismos de acción

Para la colonización bacteriana, es imprescindible la formación previa de una fina película de agregados salivales sobre la superficie del diente. La película adquirida corresponde a una delgada capa de proteínas y glucoproteínas contenidas en la saliva y el líquido crevicular, así como también de productos microbianos y celulares (Marsh, 2005). Su presencia puede estar asociada al estado de salud del hospedero proporcionando protección contra la desecación de las superficies orales, favoreciendo la maduración del esmalte y brindando mayor resistencia ante los agentes antimicrobianos (García-Godoy y Hics, 2008; Hoiby y cols., 2011). Cuando los microorganismos consiguen los sustratos necesarios para sobrevivir y persisten en el tiempo sobre la superficie dental, pueden organizarse formando una biopelícula, el que se define como una comunidad microbiana inmersa en una matriz orgánica de polisacáridos, proteínas, detritus alimentarios y epiteliales (Marsh, 2005).

Entre los precursores en la formación de biopelícula se encuentran principalmente *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces viscosus* y *Streptococcus mutans* (Lamont y cols., 1991; Forssten y cols., 2010).

S. mutans es una bacteria cocácea Gram positivo y anaerobio facultativo, por lo que su crecimiento se ve favorecido por una concentración de CO₂ cercano al 10% (Lemos y cols., 2013), posee gran capacidad de producir ácidos orgánicos a partir de hidratos de carbono fermentables (acidogénico), es acidúrico al sobrevivir en un entorno ácido y es acidofílico. Sintetiza polisacáridos extracelulares a partir de la sacarosa, fructosa y glucosa, características que favorecen la adhesión inicial, la colonización y acumulación de la biopelícula sobre las superficies dentales (Lemos y cols, 2013; Marsh y cols., 2011). Las características de *S. mutans* permiten considerarla determinante en la formación, acumulación y sobrevivencia de la biopelícula y se le identifica como un agente etiológico primario en la aparición de la caries dental (García-Godoy y Hics, 2008).

Producto del metabolismo bacteriano establecido en la superficie dentaria, es que se generan altas concentraciones de protones (H⁺) provocando la solubilización de la hidroxiapatita: [Ca]₁₀[PO₄]₆ [OH]₂, mineral relevante en la composición del tejido dentario y que se dispone en forma de prismas en la matriz del esmalte desde el límite amelodentinario hasta la superficie. El componente mineral del esmalte se aproxima al 96% del cual el 37% del peso corresponde a calcio y el 52% a fosfato (Braly, 2007).

Proceso de Caries

La distribución de los depósitos microbianos sobre las superficies dentarias va a determinar la pérdida de mineral en el espesor del tejido dentario generando una lesión de caries, la que en su estado inicial se denomina *caries incipiente* y se ubica en el esmalte dental a nivel subclínico, es decir, las alteraciones son macroscópicamente invisibles (Balda y cols., 1999), sin embargo, si el medio precursor permanece desmineralizando los tejidos, se vuelven visibles por cambios en las propiedades ópticas de la superficie del esmalte como la pérdida de la translucidez, la apariencia blanca y opaca y el aspecto tizoso y sin brillo (Gugnani y cols, 2011). Esta etapa puede ser revertida restableciendo el equilibrio del medio con la utilización de productos como el flúor y la higiene bucal mejorada (Marinho y cols., 2003) pero cuando la tasa de desmineralización se mantiene en

el tiempo, el resultado es la pérdida de estructura con la consiguiente formación de una cavidad (Gómez, 2001).

Cuando la lesión ha atravesado el límite amelodentinario se establece la caries dentinaria, ésta progresa promoviendo cambios fisicoquímicos tales como disminución de la cantidad de mineral, cambios de color y activación de metaloproteinasas de la matriz degradando el componente orgánico del tejido, entre otros (Mazzoni y cols.,2016).

Modelos bacterianos para el estudio de la caries

Existe una variedad de modelos disponibles para estudiar los mecanismos involucrados en el proceso de la caries. Koo H y cols. en el 2003 fueron unos de los primeros en realizar un modelo bacteriano de caries monoespecie de *S. mutans*, formando biopelículas en un portaobjetos para visualizarla bajo microscopio. Ccahuana-Vasquez y Cury en el 2010, implementaron un modelo similar, pero exponiendo biopelícula monoespecie en esmalte de bovino a sacarosa al 10% varias veces al día, simulando lo que ocurre en la cavidad oral. La importancia de crear estos modelos es que permiten evaluar la acción de diversos agentes antimicrobianos sobre formación de biopelículas y zonas desmineralizadas de la superficie dental.

B. Remineralizantes

Los remineralizantes son compuestos a base de flúor que actúan sobre el medio bucal para que se produzca la precipitación de fosfatos y otras sales y fomenten el proceso natural de remineralización, en consecuencia, aumentan la resistencia a los componentes ácidos producidos por la placa bacteriana e inhiben y/o detienen el progreso de la caries dental (García-Godoy y Hics, 2008).

Dentro de estos agentes, es común encontrar el fluoruro, compuesto ampliamente utilizado en la odontología para incrementar la resistencia del esmalte al ataque de la caries (Marinho y cols., 2003).

En su aplicación tópica inhibe la desmineralización y promueve la remineralización a través de la formación de fluorapatita: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$, molécula más resistente al ataque ácido, disminuyendo el valor crítico de desmineralización a pH: 4.5 (Whelton y cols., 2004). Por otro lado, genera cambios en la carga superficial del diente, impidiendo la formación de la película adquirida y, por lo tanto, la adherencia de los microorganismos al diente (Núñez y cols., 2010).

Posteriormente, en el mercado se desarrolla un producto que combina los beneficios del fluoruro con la plata: el fluoruro diamino de plata $\text{AgF}_2(\text{NH}_3)_2$. Este compuesto tiene la capacidad de detener el proceso de caries y prevenir las nuevas lesiones de caries por la acción de la sal de plata que estimula la formación de dentina reparativa, también tiene efecto bactericida producto del ion plata y la capacidad de inhibir la desmineralización y favorecer la remineralización por el fluoruro (Rosenblatt y cols., 2009; Rajendra y cols., 2017). Entre sus desventajas se describe la tinción de las lesiones de caries tratadas: el esmalte se torna de color marrón oscuro o negro por acción de la oxido-reducción de la plata afectando la estética. Por otro lado, presenta un sabor metálico poco agradable y puede irritar la mucosa y encía contigua al diente tratado. La zona afectada toma un color blanquecino, transitorio, que revierte usualmente en uno o dos días. Puede existir sensibilidad postoperatoria. (Rosenblatt y cols., 2009).

Un nuevo material conocido como grafeno, ha demostrado tener propiedades muy beneficiosas en el ámbito biomédico como, por ejemplo, la inhibición del crecimiento de algunas cepas bacterianas sin dañar significativamente células mamíferas (Wenbing Hu y cols, 2010), evidenciando características bactericidas similares en patógenos dentales (Jianliang y cols., 2015).

El grafeno es un material derivado del grafito, una de las formas cristalinas del carbono. El grafeno de alta calidad es muy fuerte, ligero, casi transparente, un excelente conductor de calor y electricidad, consistente en una hoja plana de átomos de carbono unidas mediante enlaces covalentes constituidas por un solo átomo de espesor, posee una estructura hexagonal plana que asemeja a un panel de abejas (Geim y cols., 2007; Noselov y cols., 2007).

C. Evaluación de agentes remineralizantes

La evaluación de productos con capacidad mineralizante se realiza a través de variados métodos, uno de ellos es la microdureza. En el ámbito odontológico, ha permitido evaluar propiedades de materiales restauradores y valorar la respuesta de superficies dentales ante agentes externos. La dureza está definida como el grado de solidez producida por la cohesión existente entre sus partículas y su medición se basa en la capacidad del material a resistir deformación permanente frente al contacto de un indentador.

Dada la estructura del diente, se utilizan pruebas de microindentaciones tales como ensayos de Vickers y Knoop por su capacidad para medir la dureza de materiales muy finos, de regiones pequeñas y duras, relacionando la microdureza de la superficie con el contenido mineral (Kodaka y cols., 1992). En el ensayo de dureza Vickers, una carga de 1.961 Newton (N) durante 15 segundos se aplica sobre la muestra a estudiar, dejando una huella en forma de rombo y que, a través de sus diagonales, calcula automáticamente la microdureza Vickers a razón de la siguiente fórmula:

$$HV = K \cdot \frac{F}{d^2}$$

Donde:

K: Constante que depende de la máquina (para este caso K= 0,1891)

F: Carga aplicada (para este caso F= 1,961)

d: Longitud promedio de las diagonales de indentación

La simplicidad de la técnica ha permitido que sea frecuentemente utilizada para describir materiales odontológicos, demostrando ser una prueba segura como control de agentes remineralizantes (Salehzadeh K., 2015; Byeon SM, Lee MH, Bae TS., 2016) partiendo por la base, de que el esmalte tiene valores casi constantes a lo largo de su espesor, encontrándose en el rango de 270 a 360 Hv (Gutiérrez y cols.,2003).

Entre la gama de herramientas para analizar microestructuras se encuentran las pruebas imagenológicas, como la microtomografía computarizada (micro CT), que permiten caracterizar y visualizar muestras garantizando la integridad de su superficie. MicroCT es una técnica que logra la formación de imágenes microscópicas y tridimensionales de rayos X en alta resolución, las imágenes reconstruidas procesadas muestran la estructura interna de un objeto de forma no destructiva sin la necesidad de tratamiento, recubrimiento o vacío.

Su aplicación en el área odontológica es amplia, abarcando temas como la medición de la densidad mineral en esmalte y dentina, medición del hueso cortical, evaluación de la infiltración marginal alrededor de restauraciones y selladores, detección de cambios minerales en lesiones cariosas artificiales y medición de la profundidad de la caries dentinaria (Swain y cols., 2009). MicroCT ha probado ser una técnica sensible *in vitro* capaz de caracterizar y cuantificar las lesiones de caries basada en la posibilidad de medir densidades a lo largo de la superficie del esmalte y / o la dentina (Wong y cols., 2004).

D. Declaración del problema

Hoy en día, la Odontología mínimamente invasiva tiene como gran objetivo conservar la mayor cantidad posible de estructura dentaria sana, evitar su debilitamiento y disminuir la necesidad de tratamientos restauradores. Es de vital importancia la preservación de tejido dentario a través de la remineralización de tejidos expuestos a caries y la reorganización de la matriz orgánica, destacándose la acción de tratamientos remineralizantes, que no solo controlen la lesión de caries, si no que reviertan su estado sin la necesidad de utilizar técnicas destructivas.

Para tal objetivo, es que han surgido variados compuestos, tales como el fosfopéptido caseína - fosfato de calcio amorfo (CCP-ACP) y el diamino fluoruro de plata, que han resultado beneficiosos y efectivos como remineralizantes, pero con ciertas desventajas que afectan al paciente, como la sensibilidad y la estética respectivamente. Actualmente, nuevos productos impulsan a la ciencia para definir

sus propiedades y beneficios en el ámbito odontológico, uno de ellos es BlueRemin®, material desarrollado por un equipo multidisciplinario de la Universidad de Chile, que basa su formulación en flúor y grafeno, reuniendo las propiedades bactericidas, cariostáticas y remineralizantes sin acción caustica sobre los tejidos gingivales y estéticos en su aplicación. Su formulación está protegida por solicitud de patente chilena N°201602960.

Es importante entonces, aportar evidencia acerca de la eficacia de BlueRemin® *in vitro* para brindar información acerca de la posibilidad de sumar un elemento terapéutico más para el manejo de las lesiones de caries.

Dentro de este contexto es que se propone resolver la siguiente pregunta:

¿Existe un efecto remineralizante de BlueRemin® in vitro sobre zonas desmineralizadas de esmalte no cavitadas obtenidas en un modelo experimental de lesiones de caries?

HIPÓTESIS

BlueRemin® tiene un efecto remineralizante *in vitro* sobre zonas desmineralizadas de esmalte, no cavitadas, obtenidas en un modelo experimental de lesión de caries.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de BlueRemin® como agente remineralizante en esmalte sobre zonas desmineralizadas, sin cavitación, generadas *in vitro* a través de microCT y pruebas de microdureza superficial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar un modelo *in vitro* de desmineralización, en muestras de esmalte, por acción de una biopelícula de *S. mutans*.
- Determinar densidad mineral (microCT) y microdureza superficial en un modelo de caries *in vitro*, en discos de esmalte, antes y después de la exposición a BlueRemin®.
- Determinar densidad mineral (microCT) y microdureza superficial en un modelo de caries *in vitro*, en discos de esmalte, antes y después de la exposición a fluoruro diamino de plata.
- Comparar el efecto remineralizante (densidad mineral y microdureza superficial) de BlueRemin® y fluoruro diamino de plata en un modelo de caries *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El tipo de estudio es experimental *in vitro*, en el que se utiliza un modelo de caries descrito por Ccahuana-Vásquez y Cury, 2010. Para su efecto, como especie bacteriana cariogénica formadora de biopelícula se utilizó *S. mutans* ATCC 25175, la fuente de carbohidrato fue sacarosa al 10%, los cuales se expusieron sobre la superficie de esmalte de terceros molares humanos incluidos. El modelo nos permitió obtener una zona desmineralizada simulando una lesión de caries no cavitada que luego fue expuesta a 2 agentes remineralizantes: Fluoruro diamino de plata y BlueRemin®. Los cortes de sustrato dental fueron evaluados por microdureza de Vickers y densidad mineral a través de microCT antes y después de la exposición del modelo de caries y una vez aplicado el agente remineralizante.

Aspectos éticos

Debido al uso de molares humanos y saliva natural como sustrato para obtener esmalte y para la formación de película adherida respectivamente, el estudio fue previamente evaluado por el Comité de Ética Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Por lo tanto, los voluntarios firmaron un consentimiento informado donde se aclaraban los objetivos, la importancia y relevancia del estudio, así como los procedimientos a realizar.

A. Preparación de las muestras de esmalte

Las muestras de esmalte fueron obtenidas de cortes en bloque de terceros molares incluidos humanos, sin contacto con el medio oral. Éstos fueron proporcionados voluntariamente por pacientes que han sido sometidos a exodoncias por indicación de profesional. Su almacenamiento fue en solución de timol para ser conservados hasta el día de su uso.

Los bloques de 5 x 3 x 6 mm fueron obtenidos por cortes de caras libres de terceros molares con un disco de acero diamantado de 0,20mm de grosor, del que se obtuvieron 24 muestras. Cada una de ellas fue dividida en 3 zonas iguales: A, B y C.

B. Montaje de los bloques

En cada muestra se delimitó la zona de trabajo B y C, aislando la superficie de la zona A con barniz de uñas Petrizzio® color rojo n°183 la cual corresponde al grupo control.

Paralelamente, se confeccionó un armazón metálico para cada bloque de esmalte para lograr la suspensión de las muestras sobre los pocillos de una placa de cultivo celular de polietileno marca Trueline (USA). Para unir las muestras al armazón metálico, se utilizó resina compuesta Filtek Z350 (3M) en la superficie opuesta a la de trabajo sin grabado ácido previo. Los 24 bloques con su armazón fueron distribuidos sobre placas de petri para esterilizarlos bajo una campana de flujo laminar exponiéndolos 30 minutos por lado a luz UV.

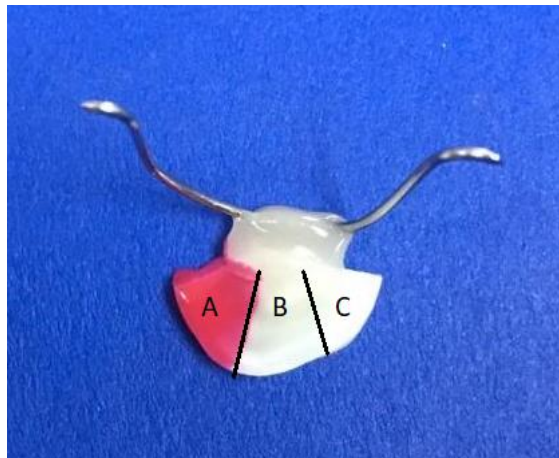


Figura 1 Muestra de esmalte ensamblada en estructura metálica que permite su suspensión en placa de cultivo. La muestra está dividida en 3 zonas: zona A pintada con esmalte de uñas rojo, zonas de trabajo B y C.

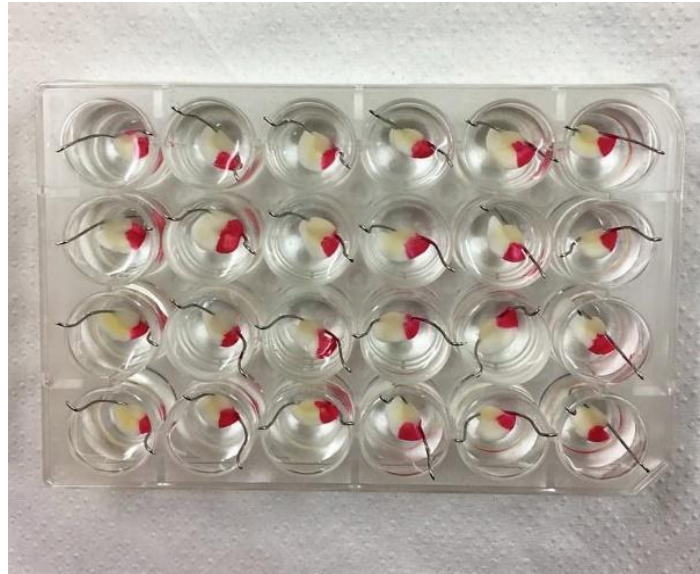


Figura 2 Placa de cultivo con las muestras dispuestas en cada pocillo

C. Recolección de saliva e hidratación de los bloques de esmalte.

Se recolectó 120mL de saliva de un individuo sano en 3 tubos centrifuga estériles. Luego la saliva fue traspasada a un sistema de filtro desechable y estéril tipo Thermo Scientific™ Nalgene™ Rapid-Flow™, 165-0045, de 0,45µm obteniendo 80mL de saliva.

Para comprobar la ausencia de bacterias, se sembraron 20 µL de saliva filtrada en agar TYCS, incubando en estufa por 48 horas a 37°C en condiciones de capnofilia.



Figura 3 Proceso de filtrado de saliva

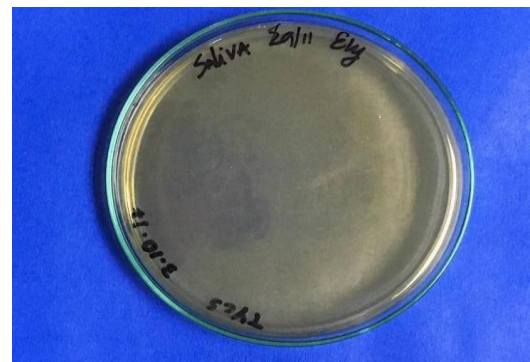


Figura 4 Agar TYCS con siembra de saliva

Ya comprobada la ausencia de bacterias en saliva, se depositaron 2 mL de saliva filtrada en cada uno de los 24 pocillos de la placa de cultivo.

Paralelamente, las muestras de esmalte se mantuvieron durante 30 minutos en agua destilada estéril para su hidratación, las que fueron dispuestas con su armazón de sostén sobre la placa de cultivo celular con saliva filtrada utilizando una pinza estéril bajo campana de flujo laminar. La placa de cultivo, con las muestras de esmalte sumergidas en saliva filtrada, se cerró y se mantuvo sobre un Tape Shake durante 30 minutos dentro de la estufa a 37°, logrando bañar con saliva la superficie de las muestras e inducir la formación de película salival adherida sobre ellas.

D. Formación de la biopelícula bacteriana

Para la formación de biopelícula se utilizó la cepa de referencia de *S. mutans* ATCC 25175 proporcionado por el área de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

El medio de cultivo utilizado fue Triptona Levadura Cisteína agar (TYCS agar). Cada medio de cultivo se preparó según protocolo y especificaciones del fabricante. La preparación de las placas de cultivo fue bajo campana de flujo laminar con el objetivo de reducir el riesgo de contaminación. Se incubaron durante 24 horas a 37°C para descartar contaminación. Posteriormente fueron almacenadas a 4°C hasta el día de su utilización.

Luego de corroborar que los medios de cultivo estaban estériles, se procedió a inocular 100µL de las cepas de *S. mutans* ATCC 25175, llevándose a cabo en torno a un mechero a gas para mantener estéril la zona de trabajo. Luego, fueron incubadas en condiciones de microaerofilia a 37°C durante 48 horas.

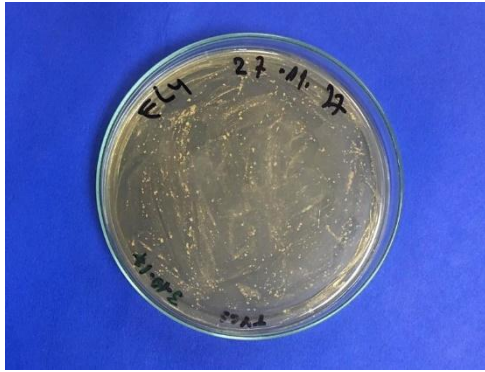


Figura 5 Placa petri con medio de cultivo TYCS con siembra de cepa S. mutans ATCC 25175

Una vez obtenidas las colonias de *S. mutans*, se realizó un análisis micro y macromorfológico para corroborar la pureza del cultivo y luego fueron resembradas en caldo TSB suplementado con glucosa 0,1mM. Este caldo fue incubado a 37° durante 48 hr.



Figura 6 Caldo TSB con inóculo bacteriano

Posteriormente, en un tubo centrifuga se preparó el caldo inicial compuesto por 40 mL de caldo TSB y 4 mL de sacarosa al 10% (en proporción 1:10), este tubo corresponde al grupo control (tubo n°1). En un segundo tubo (tubo n°2) se preparó un caldo inicial y 2 mL del inóculo bacteriano anteriormente preparado, ajustado al 0.5 McFarland. Los 2 tubos centrífuga se sometieron a agitación en vortex.

Sobre 2 de los 24 pocillos de una placa de crecimiento celular, se depositaron 2 mL de caldo preparado en el tubo n°1 (pocillo A1 y B2) y sobre los 22 restantes se transfirieron 2 mL del caldo preparado en el tubo n°2.

Bajo una campana de bioseguridad nivel IIA, se traspasó con pinza estéril cada muestra sumergida en saliva filtrada a esta nueva placa de cultivo con caldo inicial. Se dejó por 48 horas a 37°C.



Figura 7 Placa de cultivo con muestras sumergidas en saliva.

Pasadas las 48 horas, las muestras fueron lavadas para eliminar residuos de sacarosa, sumergiéndolas 4 veces en una nueva placa de cultivo celular con 2 mL de NaCl 0,9%. Posteriormente, se reubican en una placa de crecimiento celular con las mismas condiciones anteriores. Este procedimiento se repitió cada 4 horas por un período de 12hrs.

E. Tratamiento de desmineralización

En un nuevo tubo centrífuga, se prepararon 45mL de caldo TSB y 5 mL de glucosa 0,1mM. De esta nueva solución, se depositaron 2 mL en cada pocillo de una nueva placa de crecimiento.

Las muestras de esmalte fueron traspasadas a esta nueva placa y al pasar una hora, con una pinza estéril y bajo campana de bioseguridad, cada bloque es sumergido en una solución de sacarosa al 10% durante 5 minutos. Luego de ello, cada bloque fue lavado mediante 3 inmersiones en una placa con NaCl 0,9% y luego, devuelto a una nueva placa de cultivo con caldo TSB y glucosa. Este procedimiento de exposición a sacarosa 10% y posterior lavado con NaCl 0,9% se repitió 4 veces al día en los siguientes horarios: 8:30 –11:00 – 13:30 – 16:00

durante 3 días seguidos. Cada mañana, antes de la primera exposición a sacarosa, el caldo de cultivo de cada pocillo es renovado por uno fresco (TSB + glucosa) y vuelve a ser renovado al final del día posterior a la última exposición a sacarosa, esto con el fin de mantener las cepas bacterianas fisiológicamente activas.

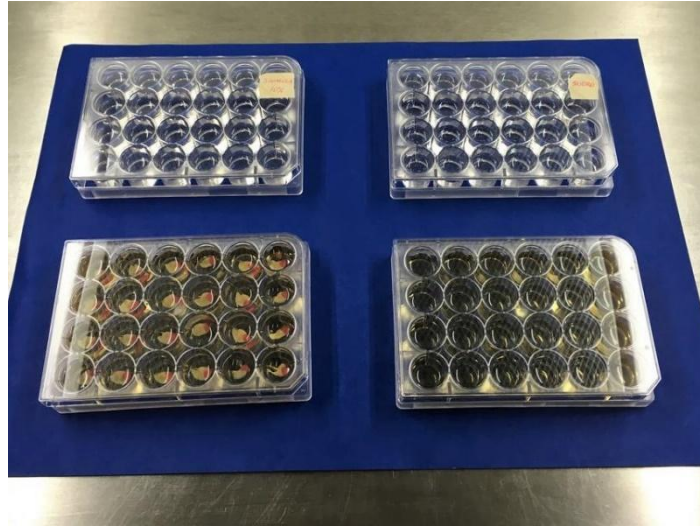


Figura 8 Placas de cultivo con diferentes medios de cultivo a usar durante proceso de desmineralización.

F. Acidogenicidad de la biopelícula

Para determinar la producción de ácidos por parte de la biopelícula se midió el pH de los medios de cultivos con Thermo Scientific™ Orion™ STAR A211 directamente en el medio.

Las mediciones se realizaron 2 veces al día antes de cada renovación de medio de cultivo.

G. Recolección de las muestras

Luego de ser sometidas al proceso de desmineralización, las muestras fueron retiradas de su placa de cultivo y depositadas en una nueva con clorhexidina al 0,12% durante 5 minutos. Posteriormente, se llevó a cabo una remoción mecánica de la biopelícula con un cepillo de dientes suave marca Colgate®, se sumergieron en otra placa con agua destilada durante 5 minutos y finalmente fueron dispuestas ordenadamente en un papel absorbente 10 minutos por cada lado.

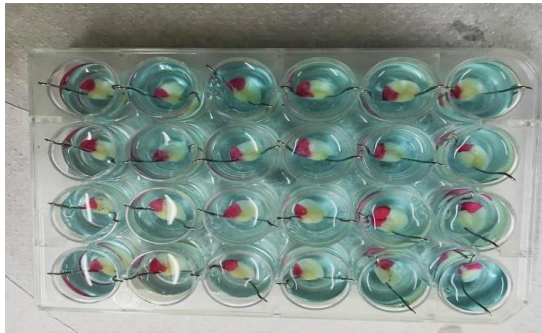


Figura 9 Muestras en placa con CHX

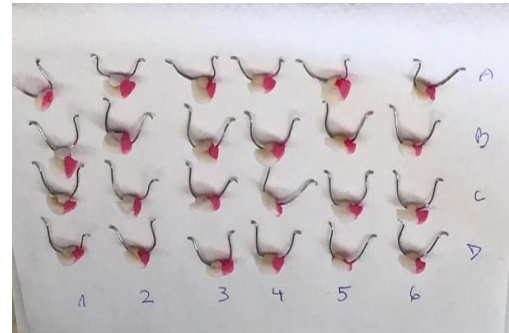


Figura 10 Muestras en papel absorbente posterior a la remoción mecánica de biopelícula.

H. Tratamiento remineralizador

Tras obtener los bloques con esmalte desmineralizada, las muestras se limpiaron y secaron con una motita de algodón estéril para evitar interferencias entre el producto remineralizante y la humedad.

Con un micropincel se aplicó el nuevo agente remineralizante a base de grafeno BlueRemin® dejando actuar sobre la zona C durante 2 minutos. Posteriormente, se retiró con agua destilada. Luego, se dejó en saliva filtrada por 16 horas a 37° para simular las condiciones del medio oral.

Como control positivo de remineralización, se aplicó un producto remineralizante disponible en el mercado sobre una muestra elegida al azar. La exposición fue con Fluoruro diamino de plata (FAGamin®, Tedequim S.R.L., Córdova – Argentina), aplicándose con un micropincel en la zona C de la muestra y dejándolo actuar

durante 2 minutos. Posteriormente, se retira el agente remineralizante con agua destilada y se deja en saliva filtrada durante 16 horas a 37°C para simular las condiciones del medio oral.

Se incluyeron los siguientes controles:

- Control negativo de desmineralización: Corresponde a una de las muestras sin desmineralizar, en donde se depositó caldo estéril y, por ende, no hubo formación de biopelícula.
- Control positivo de desmineralización: Se llevó a cabo mediante la desmineralización con ácido ortofosfórico al 37%, según indicación del fabricante para esmalte, sobre la otra muestra sin desmineralizar.
- Control negativo de remineralización: Una de las muestras expuestas al proceso de desmineralización con cultivo de *S. mutans* se mantuvo en saliva filtrada sin aplicación de remineralizante.



Figura 11 Muestras expuestas en BlueRemin®

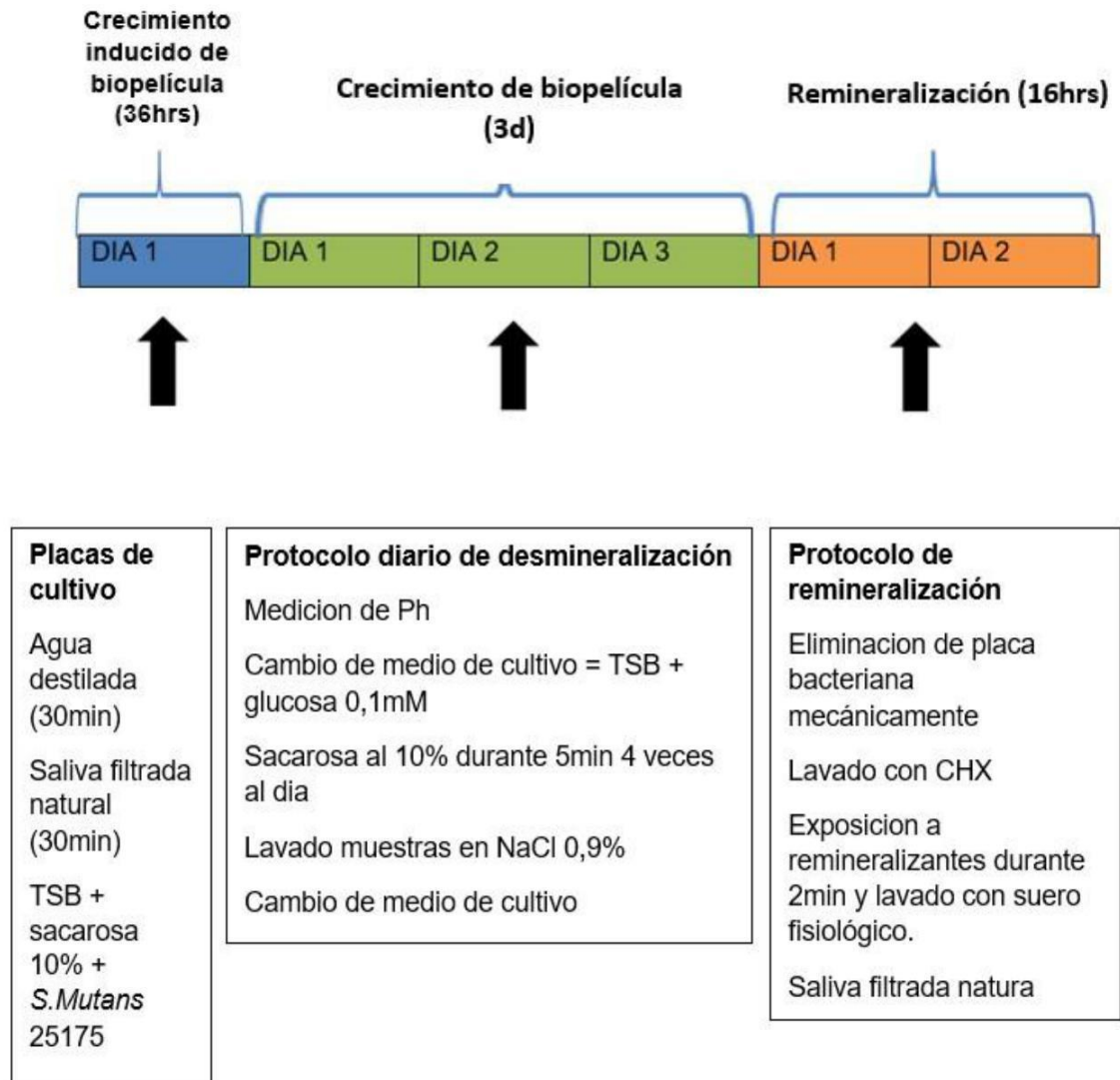


Figura 12 Esquema resumen de desmineralización y remineralización.

I. Evaluación de densidad mineral y dureza superficial

Para evaluar el grado de remineralización se realizó la medición de densidad mineral (DM) con una unidad SkyScan 1272 (SkyScan®, Bruker, Bélgica), se utilizó el software CTvox® (v. 3.0) para la reconstrucción de la imagen y CTAn® (V 1.13) para el procesamiento y análisis. La dureza superficial (DS) con un microindentador de Vickers Struers Duramin (USA) del Laboratorio de Ciencias de los Materiales de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Chile con una carga de 1.961 Newton (N) por 10 segundos. en las 3 zonas definidas en cada

una de las muestras. El cálculo promedio de las 3 mediciones de la zona A, correspondiente a zona control, se denominó densidad mineral 1 (DM1) y dureza superficial 1 (DS1). Las mediciones promedio de la zona B desmineralizada nos entregó el valor denominado densidad mineral 2 (DM2) y dureza superficial 2 (DS2). La evaluación correspondiente en la zona C, lugar en donde actuó el agente remineralizador, siguió el mismo protocolo de las dos mediciones anteriores.

J. Comparación de densidad mineral y microdurezas

Se realizó la comparación de la diferencia de dureza entre cada grupo, inicial de las muestras, la dureza de los especímenes desmineralizados y los especímenes remineralizados.

Para el análisis estadístico de la densidad mineral y dureza superficial se realizaron las siguientes pruebas:

- Test de Shapiro-wilk: Con el objetivo de determinar el tipo de distribución de las medidas de cada grupo (normal o no normal).
- Test de Students: En caso de obtener medidas con distribución normal, se utilizó este test para comparar los promedios entre las zonas A, B y C para establecer si existen diferencias significativas entre ellos.
- Test de Wilcoxon: En caso de obtener medidas con distribución no normal, se utilizó este test para comparar los promedios entre las zonas A, B y C y establecer si existían diferencias significativas entre ellos.

RESULTADOS

A. Resultado ausencia de bacterias en saliva filtrada

Al inspeccionar las placas de agar TYCS con saliva filtrada se comprobó la ausencia de colonias, como se puede observar en la Figura 13.

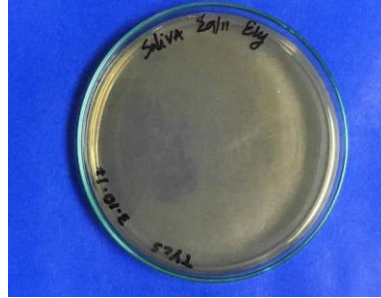


Figura 13 Placa de agar TYCS con ausencia de bacterias en saliva filtrada

B. Resultados control de pureza de *S. mutans*

En primer lugar, para los controles de pureza se realizó una inspección visual de la siembra de cada pocillo sobre una placa con agar TYCS. En la Figura 14 se observan colonias uniformes, con aspecto de vidrio esmerilado y al tocarlas con el asa de platino no se disgregan.



Figura 14 Control de pureza de *S. mutans* sobre agar TYCS

Luego, se tomó una muestra de cada una de las 24 zonas del agar TYCS y se preparó un frotis que se tiñó con Gram observando al microscopio solamente la presencia de cocáceas Gram positivo agrupados en cadenas, como se muestra en la Figura 15.

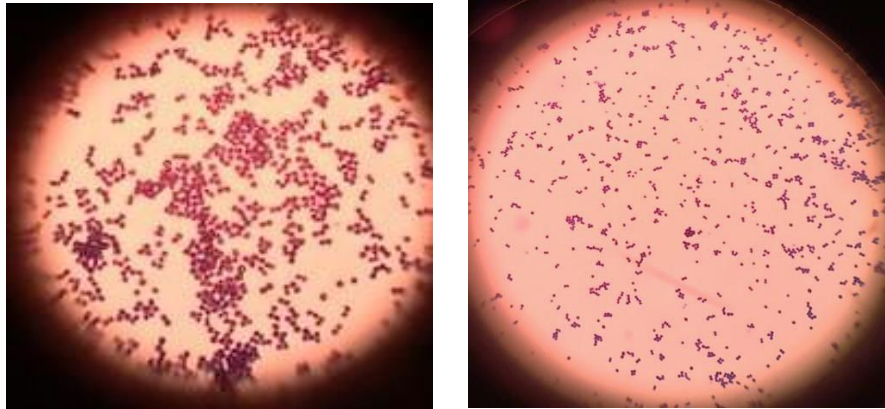


Figura 15 Imágenes, con distinto aumento, de microscopio óptico con tinción Gram

C. Resultados de medición de pH

La tabla 1 muestra el pH promedio obtenido de los pocillos por cada día de trabajo.

El pH promedio de los 3 días para los pocillos con la cepa de *S. mutans* fue de 4,7

El pH promedio de los 3 días para los 2 pocillos control fue de 6,4

<i>Día</i>	<i>pH cepa S. mutans</i>	<i>pH grupo control</i>
1	4,0	6,3
2	5,4	6,3
3	4,8	6,5

Tabla 1 Promedio por día de mediciones de pH

D. Inspección visual de las muestras de esmalte

En la Figura 16 se exponen imágenes y descripción de las distintas etapas de las muestras de esmalte, tanto en su estado inicial como en el proceso de desmineralización durante los 3 días de exposición a modelo de caries. También se presentan los controles y las muestras con tratamiento remineralizante.


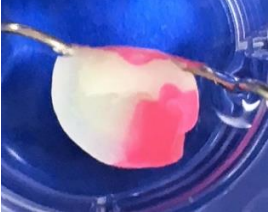
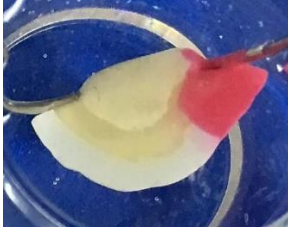

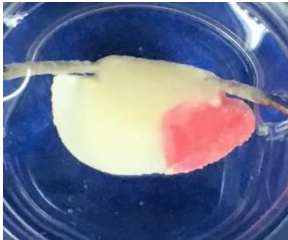

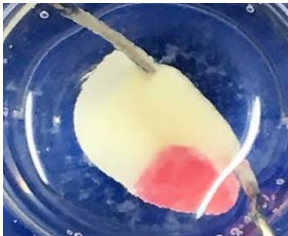

	<p>Estado inicial</p> <p>Muestra de esmalte previa exposición a modelo desmineralizante. La superficie se observa brillante y lisa.</p>		<p>Control negativo de desmineralización</p> <p>Superficie en caldo estéril. No se altera el aspecto inicial del esmalte.</p>
	<p>Biopelícula día 1</p> <p>Formación de biopelícula sobre bloque de esmalte. Se comienza a visualizar pérdida de brillo.</p>		<p>Control positivo de desmineralización</p> <p>Muestra expuesta a Acido ortofosfórico. El esmalte se vuelve opaco y blanco tizoso.</p>
	<p>Biopelícula día 2</p> <p>Se observa una delgada capa blanca en la superficie de la muestra.</p>		<p>Muestra con tratamiento remineralizante</p> <p>Muestra expuesta a BlueRemin. La zona remineralizada vuelve a recuperar brillo y color.</p>
	<p>Biopelícula día 3</p> <p>Se evidencia la presencia de placa bacteriana. Se realiza control de pureza en agar TYCS.</p>		<p>Control positivo de remineralización</p> <p>Muestra expuesta a Fluoruro diamino de plata. La superficie es brillante y marrón.</p>

Figura 16 Muestras de esmalte en distintas etapas y condiciones.

E. Resultados mediciones de densidad mineral – microCT

Para cada uno de los bloques se obtuvo una medición de densidad mineral inicial (DM1) en la zona A, luego de la exposición a la biopelícula se obtuvo una segunda medición (DM2) en la zona B, posteriormente una medición final (DM3) en la zona C que fue expuesta al nuevo agente remineralizador.

El análisis estadístico Shapiro-Wilk supone los datos normalmente distribuidos.

La Tabla 2 muestra los promedios de las mediciones de densidad mineral de cada uno de los bloques de esmalte en las tres etapas, densidad inicial, densidad después de la exposición a modelo bacteriano monoespecie y densidad después de la aplicación del agente remineralizante.

<i>Muestra</i>	<i>DM1 (mg/cm³)</i>	<i>DM2 (mg/cm³)</i>	<i>DM3 (mg/cm³)</i>
A1(CN)	3,22987	3,22508	3,21599
A2	3,19115	2,94145	3,05672
A3	3,12681	3,07722	3,11995
A4	3,11842	3,04329	3,10690
A5	3,07163	3,01341	3,06310
A6	3,18476	3,06065	3,12572
B1	3,24243	3,19761	3,22877
B2 (CP)	3,15021	3,60043	3,50998
B3	3,23995	2,98470	3,20689
B4	3,06159	2,97002	2,99121
B5	3,17780	2,99284	3,10064
B6	3,32705	3,12513	3,19434
C1	3,29267	3,07279	3,12130
C2	3,20654	3,12482	3,15276
C3	3,12489	3,03731	3,10886
C4	3,21952	3,05033	3,18867
C5	3,11812	3,03465	3,08282
C6	3,15791	3,07933	3,11756
D1 (FDP)	3,14869	3,10030	3,26033

Muestra	DM1 (mg/cm ³)	DM2 (mg/cm ³)	DM3 (mg/cm ³)
D2 (SR)	3,20379	3,09133	3,08965
D3	3,26988	3,16191	3,19698
D4	3,08317	2,94758	3,00844
D5	3,21188	3,13029	3,18404
D6	3,27619	3,05902	3,15983

Tabla 2 Promedio por bloques de esmalte, densidad mineral inicial (DM1), densidad en zona desmineralizada (DM2) y densidad en zona remineralizada (DM3). Muestra A1: Control negativo de desmineralización (CN): sin desmineralización ni tratamiento remineralizador. Muestra B2: Control positivo de desmineralización (CP): desmineralizada con Ac. Ortofosfórico sin tratamiento remineralizante. Muestra D1: Tratada con Fluoruro diamino de plata (FDP). Muestra D2: Expuesto a medio sin remineralizar (SR).

El análisis estadístico muestra que la diferencia, entre la densidad inicial y la densidad mineral después de la exposición a la biopelícula de *S. mutans* cepa ATCC 25175, es estadísticamente significativa con un $p < 0,0001$. La diferencia entre los valores de densidad de los bloques de esmalte una vez expuestos a la biopelícula de *S. mutans* y los alcanzados posteriormente a la aplicación del nuevo agente remineralizante, resulta ser estadísticamente significativo con un $p < 0,0001$.

Luego de los resultados alcanzados, se obtuvo el promedio de los valores de la densidad mineral inicial de todos los bloques de esmalte el cual fue 3,1847 mg/cm³ con un intervalo de confianza del 95% entre 3,154 y 3,213 mg/cm³, la desviación estándar es de 0,071.

El promedio de densidades después de la exposición al modelo microbiológico monoespecie de *S. mutans* fue de 3,058 mg/cm³, lo que es estadísticamente significativo con un 95% de confianza, entre 3,029 y 3,088 y $p < 0,0001$, la desviación estándar es de 0,067. Luego de tratar los bloques de esmalte con el nuevo agente remineralizante, el promedio de los valores de densidad fue de 3,125 mg/cm³ con un intervalo de confianza del 95% entre 3,095 y 3,156 mg/cm³, la desviación estándar es de 0,065. La diferencia promedio observada entre las mediciones después de la exposición al modelo microbiológico y la media final

luego de la aplicación del agente remineralizante es de $0,070 \text{ mg/cm}^3$ con un 95% de confianza y un intervalo entre $0,093$ y $0,048 \text{ mg/cm}^3$. Esta diferencia es estadísticamente significativa con un $p < 0,0001$.

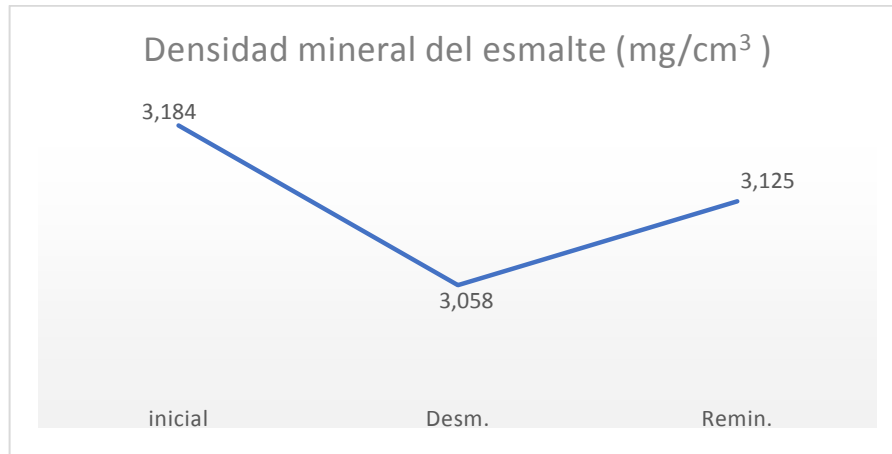


Figura 17 Gráfico con promedio de densidad mineral en bloques de esmalte inicial, después de exposición a desmineralizante y luego aplicado el agente remineralizador BlueRemin®.

De acuerdo a los datos obtenidos, se obtuvo el porcentaje de densidad mineral de las muestras de esmalte medidos a través de microCT en su estado inicial, desmineralizado y la alcanzada posterior a la aplicación del nuevo agente BlueRemin® (Figura 18). El alcance remineralizante de BlueRemin® se muestra en la Figura 19.

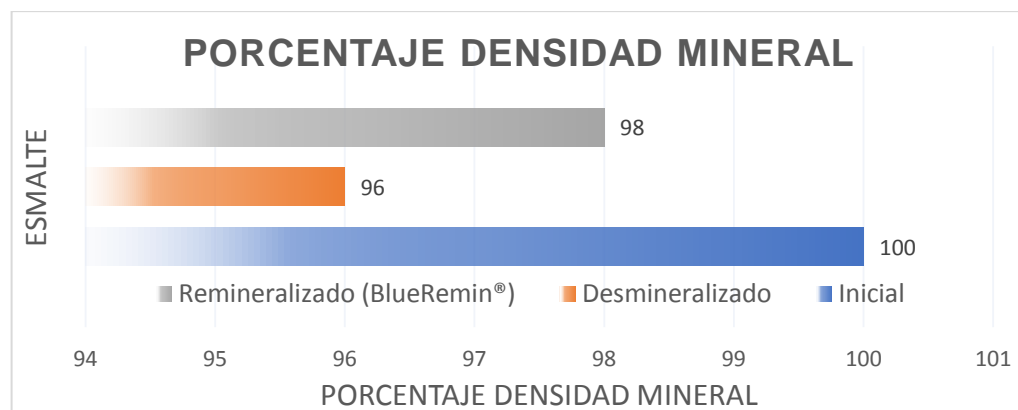


Figura 18 Gráfico con porcentaje de densidad mineral en bloques de esmalte en su estado inicial, desmineralizado y remineralizado con BlueRemin®.

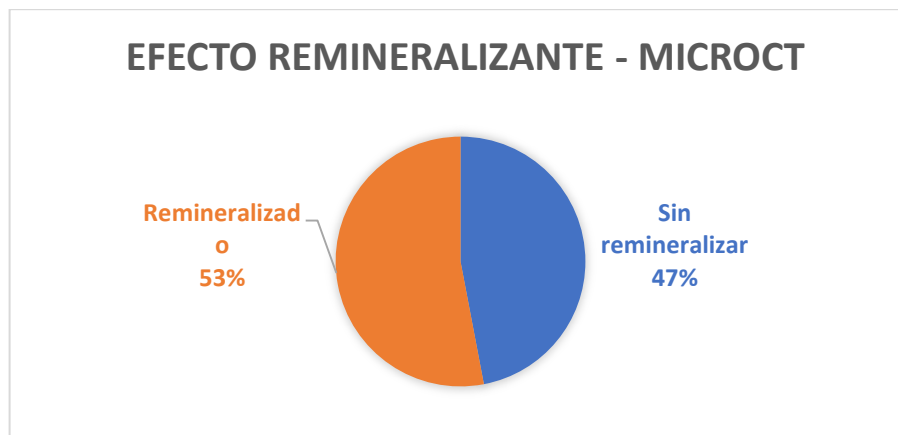


Figura 19 Efecto remineralizante de BlueRemin® en zona expuesta a modelo bacteriano desmineralizante, en términos de densidad mineral, observado en microCT.

F. Resultados mediciones de dureza superficial - Vickers

Para cada uno de los bloques se obtuvo una medición de dureza de Vickers inicial (DS1) mediante 6 indentaciones en la zona A, luego de la exposición a la biopelícula se obtuvo una segunda medición (DS2) mediante 6 indentaciones en la zona B, posteriormente una medición final (DS3) en la zona C que fue expuesta al nuevo agente remineralizador.

El análisis estadístico Shapiro-Wilk muestra que los datos se distribuyen de manera normal.

La Tabla 3 muestra los promedios de las mediciones de dureza de Vickers de cada uno de los bloques de esmalte en las tres etapas, dureza inicial, dureza después de la exposición a modelo bacteriano monoespecie y dureza después de la aplicación del agente remineralizante.

<i>Muestra</i>	<i>DS1 (Hv)</i>	<i>DS2 (Hv)</i>	<i>DS3 (Hv)</i>
----------------	-----------------	-----------------	-----------------

<i>Muestra</i>	<i>DS1 (Hv)</i>	<i>DS2 (Hv)</i>	<i>DS3 (Hv)</i>
A1 (CN)	213	205	201
A2	274,5	166,5	226
A3	313	192	302
A4	343	157	258
A5	253,6	94,9	112,18
A6	267	142	201
B1	368	151	193
B2 (CP)	294	83	81,2
B3	249	147,93	175
B4	217	157,5	170
B5	256,5	131,7	147
B6	233,3	178,33	223
C1	253,83	197	235
C2	223	94,1	159,33
C3	222,33	142	215
C4	240	126	239,16
C5	243,66	95,1	190
D1 (FDP)	298	135	206
D2 (SR)	271	223,66	221
D2	289	109	228
D3	291	155	213
D4	317	113	153
D5	237,83	192	214
D6	262	90,5	167

Tabla 3 Promedio por bloques de esmalte, dureza inicial (DS1), dureza en zona desmineralizada (DS2) y dureza en zona expuesta a agente remineralizante (DM3). Muestra A1: Control negativo de desmineralización (CN): sin desmineralización ni tratamiento remineralizador. Muestra B2: Control positivo de desmineralización (CP): desmineralizada con Ac. Ortofosfórico sin tratamiento remineralizante. Muestra D1: Tratada con Fluoruro diamino de plata (FDP). Muestra D2: Expuesto a medio sin remineralizar (SR).

El análisis estadístico muestra que la diferencia, entre la dureza inicial y la dureza después de la exposición a la biopelícula de *S. mutans* cepa ATCC 25175, es estadísticamente significativa con un $p < 0,0001$. La diferencia entre los valores de dureza de los bloques de esmalte una vez expuestos a la biopelícula de *S. mutans*

y los alcanzados posteriormente a la aplicación de BlueRemin®, resulta ser estadísticamente significativo con un $p < 0,0001$.

Luego de los datos conseguidos, el promedio de los valores de dureza inicial de todos los bloques de esmalte fue de 267,939 Hv con un intervalo de confianza del 95% entre 251,045 Hv y 284,833 Hv, la desviación estándar es de 40,007. El promedio de durezas después de la exposición al modelo microbiológico monoespecie de *S. mutans* fue de 145,055 Hv con un intervalo de confianza del 95% entre 128,617 Hv y 161,493 Hv, la desviación estándar es de 37,074. La diferencia entre dureza inicial y dureza luego de la exposición al modelo microbiológico corresponde a 124,158 Hv, lo que es estadísticamente significativo con un 95% de confianza y $p < 0,0001$. Luego de tratar los bloques de esmalte con el nuevo agente remineralizante el promedio de los valores de dureza fue de 201,033 Hv con un intervalo de confianza del 95% entre 180,595 Hv y 221,471 Hv, la desviación estándar es de 43,668. La diferencia promedio observada entre las mediciones después de la exposición al modelo microbiológico y la media final luego de la aplicación del agente remineralizante es de -59,405 Hv con un 95% de confianza y un intervalo de confianza entre 84,540 Hv y 34,270 Hv, esta diferencia es estadísticamente significativa con $p < 0,0001$.



Figura 20 Gráfico con promedio de dureza superficial en bloques de esmalte inicial, después de exposición a desmineralizante y luego aplicado el agente remineralizador BlueRemin®.

De acuerdo a los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de dureza superficial de las muestras de esmalte en su estado inicial, desmineralizado y la alcanzada posterior a la aplicación del nuevo agente BlueRemin® (Figura 21). El alcance remineralizante de BlueRemin® se muestra en la Figura 22.

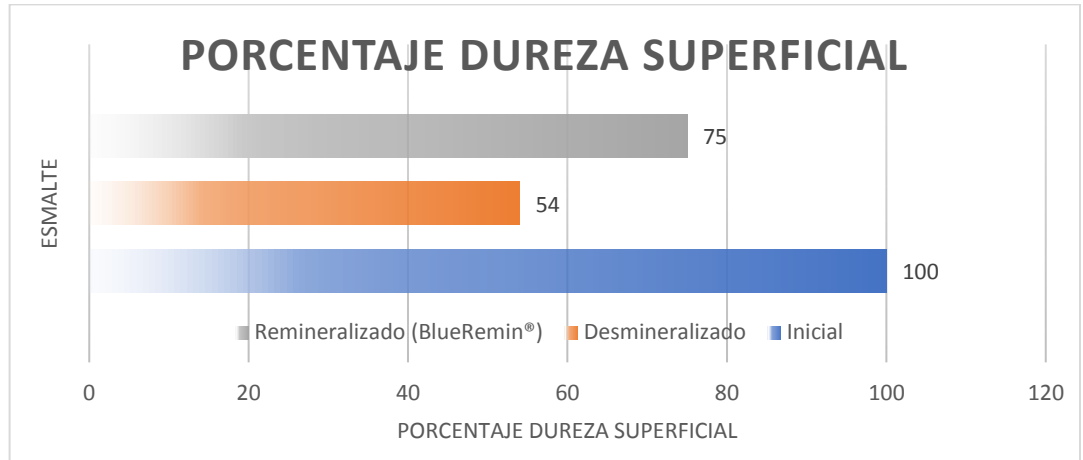


Figura 21 Gráfico con porcentaje de dureza superficial en bloques de esmalte en su estado inicial, desmineralizado y remineralizado con BlueRemin®.

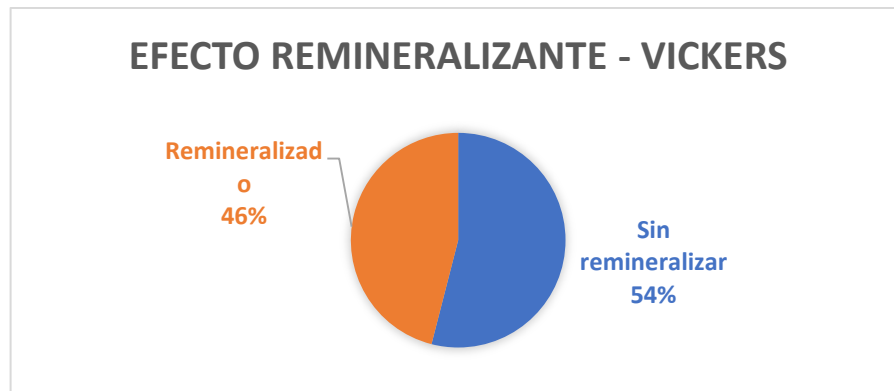


Figura 22 Efecto remineralizante de BlueRemin® en zona expuesta a modelo bacteriano desmineralizante, en términos de dureza superficial Vickers.

DISCUSIÓN

El modelo de caries *in vitro* es una importante herramienta para evaluar los cambios que sufre el sustrato dentario ante una biopelícula expuesta a diferentes sustancias y condiciones. Los resultados obtenidos en este estudio confirman la capacidad del modelo bacteriano mono especie de *S. mutans* ATCC 25175 de agregarse y formar biopelícula *in vitro* sobre la superficie del esmalte y producir lesión de caries. Además, el modelo responde a las modificaciones bioquímicas con acción remineralizante. Ello concuerda con estudios previos como el realizado por Ccahuana-Vasquez y Cury en el 2010 y Giacaman y cols., el 2012, donde, a partir de un modelo microbiológico mono especie de *S. mutans*, estudiaron el potencial cariogénico de los carbohidratos y los efectos de antimicrobianos en la inhibición de la caries. Del mismo modo, también coincide con Cavalcanti y cols., quien en el 2014 comparó dos modelos de biopelícula, una mono especie de *S. mutans* y otra multiespecie, destacando la utilidad de los modelos para evaluar la remineralización de la superficie dentaria y la composición, la arquitectura y reacción de la biopelícula respectivamente, ante la exposición de carbohidratos y fluoruro.

Para estudiar el desarrollo de la caries, también se han utilizado otros modelos donde se exponen discos de hidroxiapatita (HA) continuamente a carbohidratos en medio anaeróbico, sin embargo, son condiciones que no representan lo que ocurre *in vivo* (Guggenheim et cols. 2004).

Al comparar un modelo bacteriano para lograr la desmineralización del sustrato versus la exposición a ácidos orgánicos libres, el primero nos permite manejar los complejos factores que conforman el proceso natural de una lesión de caries, desde el uso de distintos carbohidratos hasta la exposición con variados microorganismos formadores de biopelícula.

Por otro lado, un modelo *in vitro* nos permite controlar factores experimentales, tales como la contaminación y el manejo estéril de las muestras, sin embargo, ciertas limitaciones presentan estos modelos debido a la dificultad de controlar el

total de las interacciones ambientales que dan lugar en la cavidad oral, como el tiempo de exposición a carbohidratos, la presencia continua de saliva y los diferentes microorganismos que conforman la complejidad de la biopelícula dental (Steiner y cols., 2007; Seeman y cols., 2005).

En este caso, la elección de este modelo *in vitro* nos permite evaluar esmalte dental humano expuesto a biopelícula mono especie: *S. mutans*, una de las principales bacterias formadoras de biopelícula con capacidad de generar ácidos y polisacáridos a partir de la sacarosa llevando a la desmineralización del esmalte y a la caries dental (Forssten y cols., 2010). Estas características la hacen apropiada para estudiar sus efectos en la superficie del esmalte, como se puede observar en variados estudios previos de Steiner en el 2007 y Ccahuana-Vasquez y Cury en el 2010.

A partir de esto, se puede determinar que el modelo utilizado es considerado como un método eficaz para estudiar los mecanismos de desmineralización y los efectos de remineralizantes en la superficie de esmalte dental.

De acuerdo con lo que se pudo observar en este estudio, luego de la exposición de los bloques de esmalte a una biopelícula de *S. mutans*, se pudo visualizar un cambio en la superficie expuesta del esmalte apreciando la formación de una película amarilla pálida y rugosa versus la superficie no expuesta, que mantenía el color y brillo propio del esmalte. La presencia de placa bacteriana también se asocia al bajo pH obtenido, la valoración de la acidez es distintiva de una biopelícula mono especie de *S. mutans*, una de las especies más acidogénicas, característica asociada al potencial cariogénico, así también se ha visto en estudios previos de Ccahuana-Vasquez y Cury 2010 y Giacaman et cols. 2012.

Los valores de densidad mineral, observado en microCT, luego de la exposición a la biopelícula bacteriana indicaron una disminución de la densidad mineral de los bloques de esmalte en comparación con la muestra perteneciente al grupo control (muestra A1) y concordante con la muestra B2 desmineralizada con Ac. Ortofosfórico al 37%. Este resultado es afín con los valores obtenidos de dureza

superficial, donde las muestras desmineralizadas mostraron tener menor resistencia a las pruebas de Vickers, por tanto, la dureza superficial luego de la exposición a biopelícula bacteriana fue menor a la muestra control. Los resultados logrados también concuerdan con variados estudios, como los realizados por Giacaman y cols., en 2012 y Ccahuana -Vásquez y Cury en 2010, quienes realizaron diseños experimentales de biopelícula y desmineralización sobre esmalte, obteniendo resultados similares respecto a la dureza superficial. Así en el modelo llevado a cabo en este estudio, muestra un cambio significativo ($p < 0,05$) en la densidad mineral de las muestras.

Actualmente, ante la necesidad de combatir las primeras fases de la caries dental, ha obligado a la industria a desarrollar agentes que permitan la prevención y/o tratamiento no operatorio para intervenir tempranamente la pérdida de minerales en el tejido dental. En este aspecto, la remineralización del esmalte, que ocurre de manera natural en el medio ambiente oral, puede ser fomentada por agentes externos de origen químico que buscan favorecer el proceso de la remineralización a través del desplazamiento del equilibrio hacia la formación de la sal y con ello, fortalecer la pieza dental a partir de la incorporación de minerales que le otorguen mayor resistencia a su estructura química, disminuyendo la susceptibilidad ante el ataque ácido bacteriano y la consecuente pérdida de tejido dentario.

Son muchos los autores que coinciden en la capacidad del flúor para ayudar a tratar las caries evitando la desmineralización del diente. Una revisión sistemática realizada por Benson y cols., el 2013 concluyó que el riesgo de desarrollar manchas blancas, asociado al tratamiento ortodóntico, disminuía notablemente ante el uso de fluoruro.

Marinho y cols. el 2005, compara diferentes presentaciones del fluoruro tópico para la prevención de la caries dental en niños y adolescentes, concluyendo que el fluoruro, en cualquiera de sus formas tales como crema dental, enjuague bucal, geles y barnices, previene la caries dental logrando menos dientes cariados,

perdidos y obturados y propone la aplicación combinada de ellos en pacientes de alto riesgo.

Los beneficios del flúor han sido ampliamente estudiados, Chaudhary y cols., el 2013 evaluaron la microdureza superficial del esmalte tras la desmineralización del esmalte y posterior a la aplicación de dentífricos con distinta concentración de fluoruro y sin flúor y observaron la disminución de la microdureza superficial del esmalte en los bloques que fueron desmineralizados y la recuperación de ésta después del tratamiento con dentífricos fluorados. También se ha demostrado, a través de este método, el éxito del Fluoruro diamino de plata como remineralizante cariostático en lesiones cariosas inducidas por *S. mutans* (Chu C. y cols., 2012), esta evidencia nos permite definir al fluoruro diamino de plata como control positivo de remineralización.

Prueba de la eficacia de diferentes barnices fluorados en sustratos desmineralizados es que también se ha evaluado su contenido mineral a través de la microCT, observando un aumento significativo de la densidad mineral en los grupos expuestos a flúor reflejando su efecto remineralizante (Sleibi y cols., 2018).

En este trabajo, la aplicación de BlueRemin® en las muestras desmineralizadas expresaron un aumento en la densidad mineral observadas en microCT, remineralizando en un 53% de acuerdo a lo perdido en el proceso de desmineralización y, por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre BlueRemin® y el Fluoruro diamino de plata tanto en densidad mineral como en dureza superficial. Conforme a estos datos, podemos concluir que BlueRemin® tiene efecto remineralizante.

En este estudio, se utilizó la microCT para evaluar el efecto remineralizante de una única aplicación de BlueRemin® en muestras desmineralizadas mediante un modelo de biopelícula monoespecie de *S. mutans*, este método permite el microanálisis tridimensional de las muestras sin dañarlas durante su escaneo, dando lugar al desarrollo de nuevos estudios que permitan evaluar sus

propiedades ante una biopelícula más compleja y las aplicaciones de este nuevo agente remineralizante como tratamiento contra el desarrollo de la caries dental.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que:

El modelo bacteriano monoespecie de *S. mutans* es eficiente en el proceso de desmineralización superficial sobre bloques de esmalte.

Los bloques desmineralizados expuestos a Fluoruro diamino de plata aumentaron su dureza superficial y densidad mineral.

La microCT proporciona información cuantitativa respecto a la densidad mineral del sustrato, siendo una técnica útil y de fácil aplicación en muestras pequeñas de esmalte que han sufrido un proceso de desmineralización y remineralización.

El nuevo agente remineralizador basado en flúor y grafeno aumentó la dureza superficial y la densidad mineral de todas las muestras de esmalte desmineralizadas, sugiriendo su actividad remineralizante.

La capacidad remineralizante de BlueRemin® comparado con el FDP no evidenció diferencias estadísticamente significativas, por tanto, de acuerdo a los datos analizados, podrían ser equivalentes en la capacidad remineralizante.

BIBLIOGRAFÍA

Balda R, Solórzano A, González O (1999). Tratamiento de la enfermedad de caries dirigido al agente causal. Uso de los fluoruros. Acta. Odont. Venez, 3: 284-7.

Benson P, Parkin N, Dyer F, Millett DT, Furness S, Germain P (2013). Fluorides for the prevention of early tooth decay (demineralised white lesions) during fixed brace treatment. Cochrane Database of Systematic Reviews, 12. Art. No.: CD003809.

Bradshaw D, Lynch R (2013), Diet and the microbial aetiology of dental caries: new paradigms. Int Dent J, 63: 64–72.

Braly A, Darnell L, Mann A, Teaford M, Weihs T (2007). The effect of prism orientation on the indentation testing of human molar enamel. Arch Oral Biol. 52(9): 856-860.

Cavalcanti Y, Mendonça M, Bertolini W, Cury A, Andaló L, Cury J (2014) A three-species biofilm model for the evaluation of enamel and dentin demineralization, Biofouling, 30:5,579-588.

Ccahuana-Vásquez R, Cury J. (2010). S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. Braz. oral res., 24: 135-41.

Chaudhary A, Ingle N, Kaur N, Gupta R (2013). Effect of Fluoridated Dentifrices on Microhardness of Enamel Surface: InVitro Study. Journal of Advanced Oral Research, 4(1).

Chu C, Mei L., Seneviratne C, Lo E (2012). Effects of silver diamine fluoride on dentine carious lesions induced by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces naeslundii* biofilms. Int. J. Paediatr. Dent. 22:2–10.

FDI (Federacion Dental Internacional) - 2012. Minimal Intervention in the Management of Dental Caries 2002.

Forssten S, Björklund M, Ouwehand A (2010). *Streptococcus mutans*, Caries and Simulation Models. *Nutrients*, 2(3); 290–298.

Garcia-Godoy F, Hics J (2008). Maintaining the integrity of the enamel surface. The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *JADA*, 139: 25S–34S.

Geim A, Novoselov K (2007). La subida del grafeno *Nat. Mater.* 6: 183 – 191

Giacaman R, Muñoz M, Ccahuana-Vasquez R, Muñoz-Sandoval C, Cury J (2012). Effect of fluoridated milk on enamel and root dentin demineralization evaluated by a biofilm caries model. *Caries Res.* 46: 460–466.

Gómez S (2001). Fluorterapia en Odontología. Para el niño y el adulto. Tercera Edición. Ed. Por. Grant. Educacional Colgate. Santiago.

Guggenheim B, Guggenheim M, Gmür R, Giertsen E, Thurnheer T (2004). Application of the Zürich biofilm model to problems of cariology. *Caries Res.* 38: 212–222.

Gugnani N, Pandit I, Srivastava N, Gupta M, Sharma M (2011). International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): A New Concept. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry.* 4(2): 93-100.

Gutiérrez M, Reyes J (2003). Microhardness and chemical composition of human tooth. *Mat Res.*6(3): 367–73.

Hics J, Garcia-Godoy, Flaitz C (2003). Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in a dynamic process of demineralization and remineralization. *J. Clin. Pediatr. Dent.* 28: 47–52.

Hoiby J, Ciofu N, Johansen H (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. *Int. J. Oral. Sci.* 3: 55–65.

Hollister M, (1994). The Association of Oral Status with Systemic Health, Quality of Life, and Economic Productivity. *Journal of dental education.* 57: 901-12.

Jianliang H, Xiaodan Z (2015), Killing Dental Pathogens Using Antibacterial Graphene Oxide, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7: 5605–5611.

Kassebaum N, Smith A, Bernabé E, Fleming T, Reynolds A, Vos T, Murray C, Marcenes W (2017). Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. GBD 2015 Oral Health Collaborators. *J Dent Res.* 96(4): 380-387.

Kodaka T, Debari K, Yamada M, Kuroiwa M (1992). Correlation between microhardness and mineral content in sound human enamel (short communication). *Caries Res.* 26(2): 139-41.

Koo H, Hayacibara M, Schobel B, Cury J. (2003). Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(5): 782-9.

Lamont R, Demuth D, Davis C, Malamud D, Rosan B (1991). Salivary-agglutinin-mediated adherence of *Streptococcus mutans* to early plaque bacteria. *Infect Immun.* 59 (10): 3446 - 50.

Lemos J, Quivey R, Koo H, Abranches J (2013). *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? *Microbiology*, 159(3), 436–445.

Marinho V, Higgins J, Logan S, Sheinham A (2003). Fluoride toothpaste for preventing dental caries in child and adolescents. *Cochrane Database Syst. Rev.* 1CD002278 Marsh P.D. 2005. Dental plaque biological significance of a biofilm and community life style. *J. Clin. Periodontol.* 32: 7–15.

Marsh P, A. Moter A, Devine D (2011). Dental plaque biofilms: communities, conflict and control. *Periodontol.* 55: 16–35.

Marthaler T (2004). Changes in dental caries 1953–2003. *Caries Res.* 38: 173–181.

Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V (2015). Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *J Dent Res*, 94(2): 241-51.

Mc Ghee J, Michalek S (1982) *Dental Microbiology*. Edt Haerper and Row. 778-780.

MINSAL (2010). Analisis de situación de salud bucal en Chile. Chile 2010.

Novoselov K, Morozov S, Mohinddin T, Ponomarenko L, Elias D, Yang R, Barbolina I, Blake P, Booth T, Geim A (2007), Propiedades electrónicas del grafeno. *Phys. Stat. Sol. (B)*, 244: 4106 - 4111.

Núñez D, García L (2010). Bioquímica de la caries dental. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 9(2):156-166.

OMS: Salud Bucodental, nota informativa n 318 Abril 2012.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/> (2016).

Petersen P (2008): Oral Health. In: Heggenhougen, K. and Quah, S. eds. *International Encyclopedia of Public Health* 4, 677-685.

Rajendra A, Veitz-Keenan A, Oliveira BH, Ruff RR, Wong MCM, Innes NPT, Radford J, Seifo N, Niederman R (2017). Topical silver diamine fluoride for managing dental caries in children and adults (Protocol). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 7. Art. No.: CD012718.

Rosenblatt A, Stamford T, Niederman R. (2009). Silver Diamine Fluoride: A Caries “Silver-Fluoride Bullet”. *J Dent Res*, 88 (2): 116 – 25.

Seemann R, Bizhang M, Klück I, Loth J, Roulet J (2005). A Novel *in vitro* Microbial-Based Model for Studying Caries Formation – Development and Initial Testing. *Caries Research*, 39(3) 185–190.

Sleibi A, Tappuni A, Mills S, Davis GR, Baysan A (2018). Comparison of the Efficacy of Different Fluoride Varnishes on Dentin Remineralization During a Critical pH Exposure Using Quantitative X-Ray Microtomography. *Operative Dentistry*: 43(6): E308-E316.

Steiner C, Rodrigues L (2007). An *in vitro* microbial model for producing caries-like lesions on enamel *Braz J Oral Sci.* 6(22):1392-1396.

Swain J (2009). State of the art of Micro-CT applications in dental research *International Journal of Oral Sciences*, 1: 177-188.

Tanner A, Kressirer C, Faller L (2016). Understanding Caries from the Oral Microbiome Perspective. *J Calif Dent Assoc.* 44(7): 437-46.

Tyas M, Anusavice K, Frencken J, Mount G (2000). Minimal Intervention Dentistry - A Review. Proyecto de la Comisión de la FDI 1-97. *Int Dent J*: 50: 1-12.

Whelton H, Ketley C, McSweeney F, O'Mullane D (2004), A review of fluorosis in the European Union: prevalence, risk factors and aesthetic issues. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 32: 9–18.

Wenbing Hu, Cheng Peng, Weijie Luo, Min Lv, Xiaoming Li, Di Li, Qing Huang, and Chunhai Fan (2010). Graphene-Based Antibacterial Paper. *ACS Nano*, 4(7): 4317-4323.

Wong P, Anderson H, Fan H, Davis G (2004). X-ray microtomographic study of mineral concentration distribution in deciduous enamel. *Archives of Oral Biology*, 49: 937-944.

ANEXOS

Edición del CI 01/08/2016



Consentimiento Informado Para Participación en Proyecto de Investigación **Dirigido a Adultos**

Título del Protocolo: “Efecto remineralizante de un agente a base de flúor y grafeno, sobre bloques de dentina desmineralizada”.

Investigador Principal: Dr. Mario Díaz Dosque

Instituto de investigaciones en ciencias odontológicas

Fono: +56 9 98249695 E-mail: mrdiaz@uchile.cl

Sede de Estudio: Facultad de Odontología, Universidad de Chile – Sergio Livingstone 943 – Independencia, Santiago.

Nombre del Participante:

Este documento de Consentimiento Informado se aplicará a pacientes candidatos a exodoncia de terceros molares incluidos, y consta de dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted).
- Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar). Ud. recibirá una copia completa del Documento de Consentimiento Informado.

Mi nombre es Mario Díaz Dosque y soy académico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación cuyo objetivo es comprobar el efecto remineralizante de un agente a base de flúor y grafeno, sobre bloques de dentina desmineralizada.

Le proporcionaré información y lo(s) invitaré a ser parte de este proyecto. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. Antes de tomar su decisión puede hablar acerca de la investigación con cualquier

persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude aclarar sus dudas al respecto.

Una vez aclarada todas sus consultas y después que haya comprendido los objetivos de la Investigación y si usted desea participar, se le solicitará que firme este formulario.



Edición del CI 01/08/2016

Información

La pérdida de minerales por parte de los dientes representa un problema principal en el desarrollo de patologías bucales. En el tratamiento y prevención de estas enfermedades se utilizan productos que tienen la capacidad de inhibir la desmineralización del tejido dentario, de controlar la proliferación bacteriana y remineralizar los dientes. Así, productos con estas características representan una gran necesidad clínica en la práctica de la odontología.

El desarrollo de BlueRemin®, realizado por un equipo de profesionales de la Universidad de Chile se enfoca en un nuevo producto para el manejo de la caries dental y otras enfermedades que afectan a los dientes.

Para lograr el desarrollo completo de BlueRemin® aún son necesarias diferentes actividades de laboratorio que logren cumplir objetivos técnicos y clínicos que nos permitan tener seguridad respecto del funcionamiento de este producto.

La presente investigación tiene por objetivo resolver la siguiente pregunta: ¿Tiene BlueRemin® una acción remineralizante *en superficies dentarias*, de dientes extraídos?

Al participar en este estudio, no existe ningún tipo de beneficio inmediato por la participación en el estudio ya que los dientes a utilizar son normalmente desechados. Sin embargo, como consecuencia de esta donación y de la investigación a realizar, usted ayudará a aportar información no disponible sobre la utilización de este nuevo producto.

Si usted decide participar, se le solicitará la donación de sus dientes extraídos, los cuales serán cortados en bloques, desmineralizados y luego se les aplicará BlueRemin®. Los dientes donados se utilizarán sólo con el fin recién expuesto. Ningún otro tipo de estudio se realizará con los dientes. Una vez observados y descritos los resultados, los dientes serán destruidos y eliminados siguiendo los protocolos de bioseguridad.

Usted no correrá ningún riesgo derivado del procedimiento de la investigación, debido a que este se realizará en dientes que ya han sido extraídos en las dependencias de la FOUCH. Tampoco implica costos adicionales para usted, pero el financiamiento del proceso quirúrgico de extracción será su



responsabilidad.

Edición del CI 01/08/2016

Los criterios de inclusión son: pacientes con indicación de exodoncia de terceros molares incluidos, esto significa dientes que están al interior del hueso.

Los criterios de exclusión son: pacientes con terceros molares semierupcionados o pacientes con terceros molares erupcionados (que estén presentes en boca) que hayan tenido contacto con la saliva.

La información obtenida de la investigación, respecto de la identificación de participantes, será mantenida con estricta confidencialidad por el investigador. El nombre y datos personales de usted no serán registrados. Los resultados emanados de este estudio podrán ser publicados en revistas científicas.

Aclaraciones

- La participación es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la participación.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable: Dr. Mario Díaz Dosque, Fono: +56 9 98249695, e-mail: mrdez@uchile.cl
- Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, puede si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa al documento.



Edición del CI 01/08/2016

Carta de Consentimiento Informado

A través de la presente, declaro y manifiesto, libre y espontáneamente, y, en consecuencia, acepto que:

1. He leído y comprendido la información anteriormente entregada y que mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. He sido informado(a) y comprendo la necesidad y fines de ser atendido.
3. Tengo conocimiento del procedimiento a realizar.
4. Conozco los beneficios de participar en la Investigación
5. El procedimiento no tiene riesgo alguno para mi salud.
6. Además de esta información que he recibido, seré informado(a) en cada momento y al requerimiento de la evolución de mi proceso, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria y al criterio del investigador.
7. Autorizo a usar mi caso para investigación y para ser usado como material audiovisual en clases, protegiendo mi identidad.
8. En caso de cualquier duda puede acudir Facultad de Odontología, Universidad de Chile – Sergio Livingstone 943 – Independencia, Santiago. Los días lunes, miércoles y viernes desde las 8:00 hasta las 17:00 horas.
9. Si Ud. desea consultar sobre sus derechos como sujeto de investigación o piensa que estos han sido vulnerados se puede dirigir al representante del Comité Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile: Dr. Eduardo Fernández G. al teléfono (02) 29781703, en horario de oficina o al mail cec.fouch@odontologia.uchile.cl.

Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento diagnóstico pertinente, PUESTO QUE SE QUE ES POR MI PROPIO INTERÉS.

Nombre del Paciente: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Sección a llenar por el Investigador Principal

He explicado al Sr(a) _____ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

Nombre del Investigador Principal: _____

Firma: _____

Fecha: _____



Nombre del Director del establecimiento donde realiza la investigación o de su representante:

Firma: _____

Fecha: _____

Ed-19 de octubre 2016



FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE CHILE

COMITÉ ÉTICO
CIENTIFICO

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

INFORME 2016/15

1. **Acta de Aprobación de Proyecto adscrito a Open Beauchef "Efecto remineralizante de un agente a base de flúor y grafeno, sobre bloques de dentina desmineralizada " Halley 2015, visado por la Dirección de Investigación de la Facultad de Odontología (DIFO).**
2. **Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:**

Dr. Eduardo Fernández Presidente CEC	Srta. Paulina Navarrete Secretaria CEC	Dr. Marco Cornejo Vice Pdte. CEC
Dra. Weronika Weil Miembro permanente CEC	Dr. Mauricio Baeza Miembro permanente CEC	Sr. Roberto La Rosa Miembro permanente CEC
Dr. Alfredo Molina Miembro Alterno CEC		

3. **Fecha de Aprobación: 24-10-2016**
4. **Título completo del proyecto: "Efecto remineralizante de un agente a base de flúor y grafeno, sobre bloques de dentina desmineralizada " Halley 2015.**
5. **Investigador responsable:** Dr. Mario Díaz Dosque.
6. **Institución Patrocinante:** Proyecto de Innovación Open Beauchef categoría Halley 2015.
7. **Documentación Revisada:**
Consentimiento Informado (CI) aprobado por CEC, con timbre y fecha de edición correspondiente, debidamente fechado y firmado por todos los involucrados.

8. Fundamentación de la aprobación

Este proyecto es aprobado luego que se realizarán las modificaciones en relación a los siguientes aspectos éticos:

Ed-19 de octubre 2016

- En el CI se explica mejor en qué consiste el proyecto, incorpora el contacto CEC y adapta la redacción a un lenguaje más comprensible para los sujetos de investigación.
- Se entrega autorización de Dirección Clínica FOUCH, que da cuenta de su conocimiento respecto de las actividades del proyecto en las dependencias correspondientes.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, ha aprobado el Protocolo del estudio titulado “Efecto remineralizante de un agente a base de flúor y grafeno, sobre bloques de dentina desmineralizada” Halley 2015.



Dr. Eduardo Fernández G.

Presidente CEC



C/c.: Investigador Principal y Secretaría C.E.C.