



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE  
ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

**Efecto remineralizante de un agente a base de flúor y grafeno, sobre bloques de dentina desmineralizada, con un modelo de biopelícula de *Streptococcus mutans*.**

**José Tomás Ahumada Saavedra**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dra. Patricia Palma Fluxá**

**TUTOR ASOCIADO**

**Dr. Mario Diaz-Dosque**

**Dr. Rodrigo Cabello Ibacache**

**Adscrito a Proyecto de Open Beaucheff "Remineralizador cariostático basado en flúor y grafeno"  
Santiago - Chile  
2017**





**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE  
ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

**Efecto remineralizante de un agente a base de flúor y grafeno, sobre bloques de dentina desmineralizada, con un modelo de biopelícula de *Streptococcus mutans*.**

**José Tomás Ahumada Saavedra**

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

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dra. Patricia Palma Fluxá**

**TUTOR ASOCIADO**

**Dr. Mario Diaz-Dosque**

**Dr. Rodrigo Cabello Ibacache**

**Adscrito a Proyecto de Open Beaucheff "Remineralizador cariostático basado en flúor y grafeno"  
Santiago - Chile  
2017**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar a mi tutor, Dra. Patricia Palma, por su entrega, paciencia y dedicación constante durante el proceso de este trabajo de investigación.

A mis docentes Dr. Mario Diaz-Dosque y Dr. Rodrigo Cabello por confiar en mi y hacerme parte de este gran proyecto.

A la comisión evaluadora: Dra. Susanne Kramer, Dra. Ximena Toledo y Profesora Leyla Gómez, por sus sugerencias y correcciones durante el desarrollo de este trabajo.

Al laboratorio de Microbiología por recibirme como uno más del equipo y entregarme los conocimientos necesarios para el desarrollo de este trabajo.

A mi familia por su apoyo incondicional y ser pilar fundamental en el transcurso de la carrera.

Por último a mis compañeros que estuvieron presentes desde el primer día de universidad.

*Merci beaucoup*

## ÍNDICE

RESUMEN.....	7
MARCO TEORICO.....	9
Introducción.....	9
1. Caries dental.....	9
1.1 Lesión de caries no cavitada.....	9
2. Biopelícula.....	10
3. <i>Streptococcus mutans</i> .....	11
4. Dentina composición e histología.....	11
5. Hidroxiapatita.....	12
6. Remineralizadores y cariostaticos.....	12
7. Flúor.....	13
7.1 Fluoruros.....	13
8. Fluoruro diamino de plata .....	14
9. Medición de microdureza.....	14
10. Grafeno.....	15
11. Modelos bacterianos para el estudio de caries.....	16
12. Declaración del problema.....	16
HIPOTESIS.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	18
METODOLOGÍA.....	19
1. Obtención de las muestras.....	19
2. Medición dureza inicial.....	20
3. Montaje de los bloques de dentina.....	21
4. Recolección de saliva e hidratación de los bloques de dentina.....	22
5. Formación de la biopelícula bacteriana y proceso de desmineralización.....	23
6. Acidogenicidad de la biopelícula.....	26
7. Recolección de las muestras.....	26

8. Medición de dureza después de la exposición a biopelícula mono especie de <i>S. mutans</i> .....	26
9. Tratamiento remineralizador.....	27
10. Medición de dureza después de la aplicación del nuevo agente remineralizador.....	29
11. Análisis estadístico.....	30

## RESULTADOS

1. Resultado ausencia de bacterias en saliva filtrada.....	31
2. Resultados de formación de biopelícula sobre bloques de dentina.....	31
3. Resultados control de pureza modelo microbiológico.....	32
4. Resultados imágenes de microscopía electrónica presencia de <i>S. mutans</i> .....	33
5. Resultados mediciones de dureza inicial, después de exposición a biopelícula mono especie y después de tratamiento con nuevo agente remineralizador.....	34
6. Resultados imágenes de microscopía electrónica.....	37
7. Resultados de medición de pH.....	38

DISCUSIÓN.....	39
----------------	----

CONCLUSIONES.....	43
-------------------	----

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
---------------------------------	----

ANEXOS.....	50
-------------	----

## RESUMEN

**Introducción:** La caries dental constituye una de las enfermedades más prevalentes a nivel mundial, es por eso que se han realizado múltiples estudios en la búsqueda de combatir esta enfermedad a través de la prevención y de nuevos agentes cariostáticos. El utilizar modelos microbiológicos para generar una lesión de caries in vitro ha sido de gran ayuda en el proceso de entender como se forma una lesión de caries y de cómo combatirla ya que nos entrega un ambiente óptimo para llevar a cabo pruebas de nuevos compuestos cariostáticos.

**Objetivos:** Establecer diferencias en la dureza superficial de bloques de dentina desmineralizados en un modelo de caries microbiológico monoespecie de *Streptococcus mutans* y después de haberlos sometidos a un protocolo de remineralización con un agente a base flúor y grafeno (BlueRemin®).

**Metodología:** Se llevó a cabo un modelo desmineralizador de biopelícula monoespecie de *S. mutans* ATCC 25125 con exposición a sacarosa 10% 4 veces al día por 5 minutos durante 5 días para la simulación de un ambiente cariogénico, generando una zona de desmineralización, la que fue expuesta a un agente remineralizador experimental a base flúor y grafeno. Se obtuvieron 24 bloques de dentina de terceros molares naturales y fueron evaluados por pruebas de dureza Vickers antes de la exposición al modelo, después de la desmineralización y una vez aplicado los agentes remineralizadores BlueRemin®, fluoruro diamino de plata y flúor silano.

**Resultados:** La diferencia de valores de microdureza de Vickers entre las medidas después de la exposición al modelo microbiológico de desmineralización y las medidas iniciales fueron estadísticamente significativas con un  $p < 0.05$ , siendo menores las medidas de la zona desmineralizada. Los diferencia de valores de microdureza de Vickers después de la aplicación del nuevo agente remineralizador BlueRemin® y las obtenidas en la superficie desmineralizada sin

tratamiento, fueron estadísticamente significativas con un  $p < 0.0001$ , siendo mayores las medidas de las zonas expuestas al agente remineralizador.

Las diferencias entre las medidas de las zonas expuestas a BlueRemin® y la zonas expuestas a Fluoruro Diamino de Plata y Flúor Silano, no fueron estadísticamente significativas con un  $p < 0.9999$  entre BlueRemin® y Flúor Silano, y un  $p < 0.20$  entre BlueRemin® y Fluoruro Diamino de Plata.

**Conclusiones:** El modelo *in vitro* de biopelícula mono especie de *S. mutans* generó una disminución en la microdureza superficial de los bloques de dentina. El nuevo agente remineralizante a base de flúor y grafeno aplicado una sola vez por 2 minutos y luego incubado por 16 horas con saliva artificial a 37°C, aumentó los valores de microdureza superficial de los bloques de dentina. No hubo diferencia en la capacidad remineralizadora de BlueRemin® en comparación a Fluor Silano y Fluoruro Diamino de Plata.



## MARCO TEÓRICO

La caries dental constituye una de las enfermedades más prevalentes en la población mundial, entre un 50-60% en niños y casi un 100% en adultos, por lo que representa un importante desafío para la Salud Pública (OMS, 2012).

La realidad en Chile no es diferente, los últimos estudios sobre la prevalencia de caries realizados por el Ministerio de Salud, muestran los siguientes índices en población infantil entre los niños (as) de 6 y 12 años: 70,3% y 62,5%, respectivamente (MINSAL, 2007; Soto, 2007). Y en adultos de casi un 100% (Arteaga y cols. 2009). Por lo tanto es necesaria la búsqueda de nuevos métodos preventivos que ayuden a combatir esta enfermedad.

### 1. Caries Dental

La caries dental se define como una destrucción del tejido dental duro susceptible localizada, a causa de los subproductos ácidos que provienen de la fermentación bacteriana de los hidratos de carbono presentes en los alimentos (Selwitz y cols. 2007). Es un proceso dinámico y multifactorial, el que generalmente se encuentra en un estado crónico y en un lugar específico, que resulta del desequilibrio químico y fisiológico entre el mineral del diente y el fluido de la placa; es decir, cuando la reducción del pH provoca la pérdida neta del mineral con el tiempo. Sin embargo, este proceso de la enfermedad puede detenerse o activarse en cualquier momento (Fontana y cols. 2010).

#### 1.1. Lesión de caries no cavitada

La lesión de caries no-cavitada es una lesión cuya superficie parece intacta macroscópicamente (Selwitz y cols. 2007), es decir no se observa evidencia visual de la cavidad. Esta lesión aún puede ser revertida y/o detenida por medios químicos, mediante la remineralización o el equilibrio entre los procesos de remineralización y desmineralización (Fontana y cols. 2010). También la podemos encontrar con el término de lesión de caries oculta y se utiliza para describir lesiones en la dentina que pasan desapercibidas en un examen visual, pero son lo

suficientemente grandes y están lo suficientemente desmineralizadas como para ser detectadas mediante radiografía (Weerheijm KL. 1992; Fejerskov O. 2008).

## 2. Biopelícula

Se define como un consorcio microbiano organizado, inmerso en una matriz de exopolisacáridos de origen mixto, adherido a una superficie dura viva o inerte. (Marsh,1995).

Para la formación de la biopelícula se dan tres pasos fundamentales, el primer paso es la formación de la película adquirida (PA) la que corresponde a una delgada membrana biológica que se deposita en la superficie de los componentes dentales, como resultado de la adsorción de proteínas y glucoproteínas contenidas en la saliva y el líquido crevicular, así como también otras provenientes de productos microbianos y celulares. La adsorción de dichas biomoléculas no ocurre exclusivamente sobre el tejido del esmalte, sino que existe PA en todas las superficies bucales. Hay que tener en cuenta que la retención de biomoléculas por parte del esmalte dentario es un fenómeno muy rápido de naturaleza selectiva (Melchora y cols, 2005).

Si bien esta membrana proteica desempeña importantes funciones protectoras, como regular el contacto de la superficie dental con ácidos de los alimentos y los resultantes del metabolismo de las bacterias presentes (Lissera y cols. 1998; Hanning y Balz, 2001), también otorga sitios para la adhesión de microorganismos, permitiendo la unión inicial en los eventos de formación de la biopelícula (Busscher y Van der Mei, 1997). Esto a través de varias interacciones específicas de célula-superficie con las bacterias presentes (Davey y O'toole, 2000). En las primeras uniones encontramos principalmente *Streptococcus sanguinis* y *Actinomyces viscosus*, que serán colonizadores primarios. Esto corresponde al segundo estadio en la formación de la biopelícula (Forssten y cols. 2010).

El tercer paso corresponde a la agregación de diferentes microorganismos a los colonizadores primarios a través de relaciones célula a célula. Es aquí donde puede interactuar *Streptococcus mutans*, entre otros, organizándose y madurando de esta manera la biopelícula (Forssten y cols. 2010).

### **3. *Streptococcus mutans***

*Streptococcus mutans* (*S. mutans*) es una especie bacteriana cocácea Gram positivo del género *Streptococcus*, frecuentemente se encuentra asociado en parejas o en cadenas largas o cortas dependiendo de la disponibilidad de nutrientes en el medio en que se encuentren, se puede encontrar en cavidad oral, faringe e intestino (Forssten y cols. 2010; Krzysciak y cols. 2014). Son anaerobios facultativos por lo que su crecimiento se ve favorecido por una concentración de CO<sub>2</sub>, entre 5 al 10% (Lemos, 2013).

*S. mutans* presenta múltiples factores de virulencia como: capacidad de adhesión a superficies dentales y a otras bacterias, capacidad de generar reservas de glicógeno y habilidad de sintetizar polisacáridos extracelulares en presencia de sacarosa, fructosa y glucosa. Sin embargo, la producción de metabolitos ácidos hace que sea una de las principales bacterias que se encuentran asociadas a la etiología de la enfermedad de caries dental (Forssten y cols. 2010; Krzysciak y cols. 2014).

### **4. Dentina, composición e histología**

La dentina madura se compone en un 70% de minerales (cristales de hidroxiapatita ricos en carbonatos y pobres en calcio), 20% de matriz orgánica (donde la mayor parte corresponde a colágeno tipo 1) y 10% de agua en peso (LeGeros, 1990; Teruel y cols. 2015).

En su microestructura se observa la presencia de túbulos dentinarios, que se extienden desde la unión amelodentinaria hasta la cámara pulpar, estos se encuentran rodeados por dentina peritubular, la que presenta un mayor contenido mineral, y una matriz orgánica donde predomina el colágeno tipo I. La cantidad de túbulos dentinarios se encuentra entre 18.000 y 21.000 por milímetro cuadrado, y su diámetro varía entre 2 y 4 micrometros y aumenta progresivamente a medida que se aproximan a la cámara pulpar. Dentro de estos túbulos se encuentran las prolongaciones de los odontoblastos (LeGeros, 1990; Schilke, 2000).

## **5. Hidroxiapatita (HAP)**

La hidroxiapatita es una sal formada por átomos de calcio, fósforo e hidrógeno ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), es el componente inorgánico principal de los huesos, dentina y esmalte dental. Este pertenece a la familia de las apatitas y presenta una estructura hexagonal. (García-Garduño y cols. 2006). En tejidos orgánicos la HAP se encuentra asociada a colágeno con el cual se correlaciona de forma directa para la formación de nuevos cristales. (Landis y cols. 1996).

Los cristales apatíticos están constituidos por la agregación de unidades básicas de asociación iónica y corresponden a las celdillas unitarias las cuales poseen una configuración química y cristalográfica hexagonal, en sus vértices existen iones calcio y en el centro se encuentra un ión  $\text{OH}^-$ , los iones fosfato se localizan entre los iones de calcio que ocupan los vértices del hexágono externo. (Londoño y cols. 2006).

## **6. Remineralizadores y Cariostáticos**

Los remineralizadores son los agentes que apuntan a reforzar el estado del hospedero, aumentando su resistencia a los componentes ácidos producidos por la placa bacteriana. Dentro de estos encontramos los agentes remineralizantes como el fosfopéptido caseína fosfato cálcico amorfo (Recaldent®), Fosfato de

calcio amorfo (ACP®), fosfosilicato de calcio y sodio (NovaMin®) y Beta fosfato tricalcico (Clinpro®). (Cochrane y cols. 2010)

Por otro lado los agentes cariostáticos son los que cumplen la función de inhibir y detener el avance de la enfermedad de caries, a través de la estimulación de la remineralización de los tejidos duros del diente (esmalte y dentina) los cuales corresponden a los agentes a base de flúor. (Mamani y cols. 2012).

Dentro de los agentes en base a flúor, encontramos barnices y geles de flúor como Fluor Silano 0.1% con 7000ppm de flúor y el fluoruro de sodio al 5% con 22.600 ppm de flúor (Duraphat®) su mecanismo de acción es atribuido a la reactividad de los fluoruros presentes en el agente con la dentina y el esmalte, formando enlaces, fluoruro de calcio ( $\text{CaF}_2$ ), los que actúan sobre las zonas desmineralizadas dependiendo de las concentraciones del medio (Marinho y cols. 2002; Tenuta y cols. 2008).

## **7. Flúor**

El flúor es un elemento químico con una alta electronegatividad y reactividad, por esto es difícil encontrarlo de forma libre, la forma común de encontrarlo es como ión fluoruro ( $\text{F}^-$ ) en forma de sal, fluoruro de calcio ( $\text{CaF}_2$ ) y fluorapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ). El fluoruro de calcio es el más utilizado para la obtención de sales solubles para uso odontológico donde se obtiene fluoruro de sodio (NaF) (Moncada y Urzúa, 2008).

### **7.1 Fluoruros**

Dentro de los mecanismos de acción de los fluoruros encontramos la reducción de los ácidos producidos por los microorganismos, la inhibición de enzimas extracelulares e intracelulares, y el reemplazo de los iones hidroxilos en la hidroxiapatita con iones fluoruros (Ten Cate, 1990), transformando así la hidroxiapatita en fluoroapatita, dándole una mayor resistencia química, así el pH necesario para generar un desequilibrio químico e inestabilidad de la molécula debe ser menor a 4,5 (Whelton y cols. 2004).

Sin embargo, los fluoruros y el flúor en sí, pueden generar efectos indeseables como fluorosis en altas dosis sistémicas y toxicidad (Roberson y cols. 2006).

## **8. Fluoruro Diamino de Plata**

Corresponde a un agente cariostático a base de flúor y plata, el cual tiene una acción antibacteriana y además estimula la remineralización de los tejidos duros del diente.

El mecanismo de acción antibacteriano corresponde a la interacción de la plata con los grupos sulfhidrilos de las proteínas y el ADN, alterando los enlaces de hidrogeno inhibiendo así los procesos de respiración, síntesis de pared y división celular bacteriana. A un nivel macro estas interacciones eliminan las bacterias e inhiben la formación de biofilm.

Su relación mas común con los tejidos duros del diente corresponde a una interacción entre el fluoruro de sodio (NaF) y la hidroxiapatita para formar fluoroapatita e hidroxido de sodio generando un ambiente basico. Pero también encontramos la interacción del nitrato de plata con hidroxiapatita formando nitrato de calcio, fosfato de plata y oxido de plata, este último compuesto es el que genera una tinción oscura sobre la superficie tratada. (Rosenblatt y cols. 2009).

## **9. Medición de microdureza**

La prueba de dureza mide la resistencia a la penetración de la superficie de un material por un objeto duro. La dureza dependiendo del contexto representa la resistencia a los rayones o a la indentación y una medida cualitativa de la resistencia del material. Depende del grado de cohesión entre las moléculas que componen el material.

Existe una gran variedad de pruebas de dureza, y se dividen en pruebas para macrodureza y microdureza, las mas utilizadas para medir macrodureza corresponden a las pruebas de Rockwell y la prueba de Brinell que utilizan esferas de acero donde se mide el diametro de la indentación, por otro lado para

microdureza las mas comunmente utilizadas corresponden a la prueba de dureza Knoop y la prueba de dureza Vickers que utilizan cargas menores a 2 newtons y son ideales para muestras pequeñas y resilientes como la dentina (Donald R. y cols. 2011, Tsukuma K. y cols. 1985).

La prueba de dureza Vickers utiliza un penetrador de diamante con forma de piramide y es necesario un microscopio para observar y medir la indentación, que en este caso corresponde a una microindentación. El microdurometro calcula automáticamente la microdureza a traves de la siguiente formula:

$$HV = K \cdot F / d^2$$

Donde K= Contante de la máquina (en este caso K=0.1891), F= Carga aplicada (para este caso F= 1.961) y d= Longitud promedio de las diagonales de indentación (Majithia U. y cols 2016).

## 10. Grafeno

El grafeno se forma a partir del carbono, son monocapas de átomos de carbono unidos en 2 dimensiones y celdas hexagonales. Es renovable, fácil de obtener y más barato que los metales y óxidos metálicos.

En los últimos estudios se ha evidenciado que sus derivados y compuestos tienen un efecto citotóxico en bacterias, hongos y fitopatógenos que tienen poca resistencia. La acción antibacteriana del grafeno envuelve tanto efectos físicos como químicos, el daño físico es inducido por el contacto directo de los bordes afilados de las láminas de grafeno con las membranas de las bacterias y la extracción destructiva de moléculas lipídicas. Por otro lado, el daño químico es principalmente causado por el estrés oxidativo creado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) o la transferencia de cargas (Haiwei Ji, 2015).

Se ha visto que nanopartículas de grafeno al estar en contacto con bacterias orales como *S. mutans*, *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* presenta una actividad bactericida (Jianliang H. 2015).

## **11. Modelos bacterianos para el estudio de caries**

Por razones éticas y por la ventaja de tener un mejor control de las variables experimentales, ha sido necesario implementar diferentes modelos *in vitro* para simular lesiones de caries, probar diferentes materiales y técnicas restauradoras.

Seemann R. y cols. en el 2005 en un estudio de la formación de lesiones de caries, realizaron un modelo bacteriano monoespecie de *S. mutans* ATCC 25175 sobre premolares con una continua exposición a sacarosa al 10%, donde obtuvieron resultados positivos con respecto a la formación de un biofilm y logrando lesiones similares a las de caries.

En 2010 Ccahuana-Vásquez y Cury, implementaron un modelo muy similar con resultados positivos que permitieron evaluar el efecto de sustancias antimicrobianas sobre la formación de biopelículas y la desmineralización del esmalte. Ambos trabajos lograron comprobar y validar que con un modelo monoespecie de *S. mutans* es posible generar una biopelícula *in vitro*, generar lesiones de caries sobre superficies dentales, y que se puede utilizar para probar el efecto de diferentes agentes antimicrobianos sobre el crecimiento de biopelículas.

## **12. Declaración del problema**

La pérdida de minerales por parte de los dientes representa un problema principal en el desarrollo de patologías bucales lo cual está relacionado con el deterioro estructural de los dientes por microorganismos. Entre estas patologías resaltan por su alta tasa de incidencia, la caries dental y la sensibilidad alterada. En el tratamiento y prevención de estas patologías se utilizan técnicas de inhibición de la desmineralización del tejido dentario, de control de los microorganismos y de remineralización de los tejidos afectados. Así, productos con estas características terapéuticas representan una necesidad clínica en la práctica de la odontología para resolver estos problemas de salud.



El desarrollo de BlueRemin®, realizado por un equipo multidisciplinario de la Universidad de Chile, basado en fluoruros y grafeno, se plantea en un nuevo producto con características de inhibición de la desmineralización, eliminación de bacterias y capacidad remineralizante.

Para lograr el desarrollo completo de BlueRemin®, con el fin de ser utilizado en la práctica clínica profesional, aún son necesarias diferentes actividades que logren cumplir objetivos técnicos y clínicos.

En este contexto, nos hemos propuesto resolver la siguiente pregunta:

¿BlueRemin® tiene una acción remineralizante *in vitro* sobre zonas desmineralizadas de dentina obtenidas en un modelo microbiológico experimental de caries?

## **HIPÓTESIS**

BlueRemin® tiene una acción remineralizante *in vitro* sobre zonas desmineralizadas de dentina obtenidas en un modelo experimental de caries.

## **OBJETIVO GENERAL**

Establecer diferencias en la dureza superficial en bloques de dentina desmineralizados con un modelo de caries microbiológico y luego sometidos a un protocolo de remineralización con BlueRemin®.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la dureza superficial de bloques de dentina desmineralizados en un modelo experimental de caries monoespecie.
2. Determinar la dureza superficial de bloques de dentina remineralizados a través de un protocolo de remineralización con BlueRemin®.
3. Comparar la dureza entre los bloques de dentina desmineralizados y remineralizados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este es un estudio experimental *in vitro* en el que se utilizó el modelo de caries descrito por Ccahuana-Vásquez y Cury en 2010, en el que se llevó a cabo la simulación de un ambiente cariogénico mediante la exposición de bloques de dentina a sacarosa, previa formación de una biopelícula monoespecie de *S. mutans* para obtener una zona de desmineralización, que fue expuesta a un agente remineralizador experimental. Los bloques de dentina se obtuvieron de terceros molares naturales y fueron evaluados por pruebas de dureza de Vickers antes de la exposición, después de la desmineralización y una vez aplicado el agente remineralizador.

### 1. Obtención de la muestras

Las muestras se obtuvieron de 12 terceros molares humanos incluidos (sin contacto con el medio oral) proporcionados voluntariamente por 5 pacientes que fueron sometidos a exodoncias por indicación de ortodoncia. Los pacientes firmaron un consentimiento informado aprobado por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile,

Los terceros molares donados fueron almacenados en agua destilada para su conservación hasta el día de su utilización.

Se llevaron a cabo cortes con un disco de diamante sinterizado de 0.20mm de grosor marca Horico (Alemania) con el fin de obtener 24 bloques de dentina, con un promedio de 5mm x 8mm x 3mm. La superficie escogida para el ensayo fue dividida en 3 zonas iguales, las cuales se denominaron A, B y C.

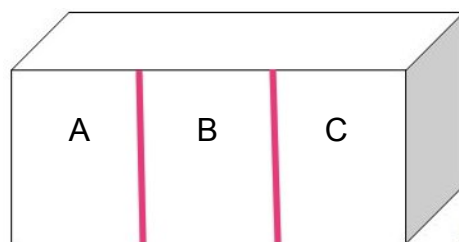
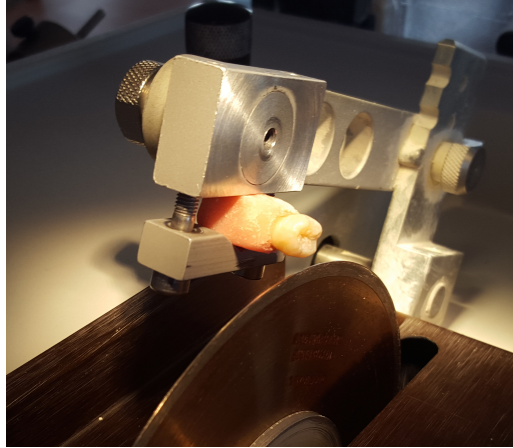


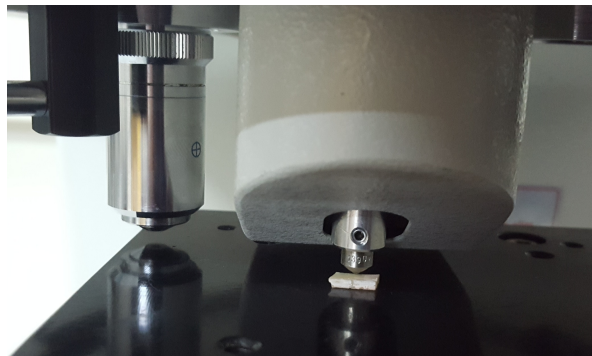
Fig. 1 Esquema bloque de dentina dividido en zonas A, B y C.



**Fig. 2** Imagen de cortadora con disco de diamante.

## **2. Medición dureza inicial**

En la zona A, la que corresponde a la zona de control, se realizó la medición de la dureza superficial mediante 6 indentaciones con el microindentador de Vickers Struers Duramin (USA) del Laboratorio de Ciencias de los Materiales de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Chile distribuidas de manera aleatoria sobre la superficie con una carga de 1.961 Newton (N) por 10 segundos. Se calculó el promedio de las 6 mediciones y se denominó dureza inicial (DS1).



**fig. 3** Imagen microdurómetro realizando medición de microdureza.



**fig. 4 Microindentación en dentina sana**

### **3. Montaje de los bloques**

La zona A, en la que se realizarón las indentaciones es cubierta con barniz de uñas colorama rosa cristal. Dejando así delimitada una zona blanco para desmineralización compuesta por las zonas B y C.

En forma paralela se confeccionó un armazón metálico para cada bloque de dentina, con el objetivo de mantenerlos suspendidos sobre los pocillos de una placa de cultivo celular de 24 pocillos de polietileno marca Trueline (USA). Cada uno de los bloques fue adherido a un armazón mediante resina *flow* por la superficie opuesta a la escogida para el ensayo, no se realizó un grabado ácido sobre la superficie. Los 24 bloques con su armazón fueron distribuidos sobre placas de petri y fueron sometidos a esterilización utilizando una campana de flujo laminar para exponerlos a 30 minutos por lado a Luz UV.



**fig. 5 Armazón metálico para cada bloque.**

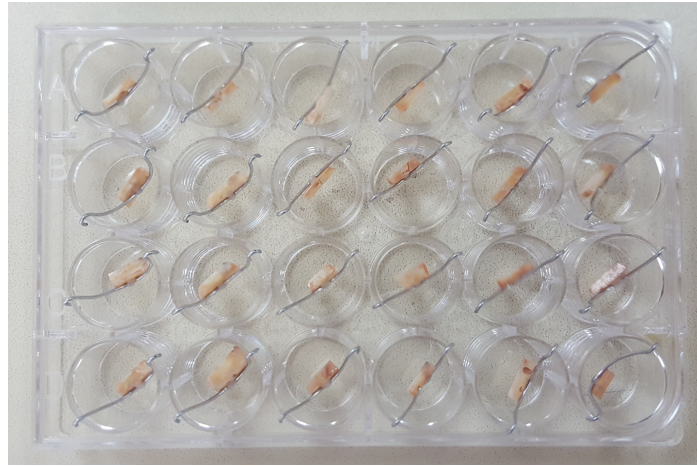


fig. 6 Placa de cultivo con las muestras dispuestas en cada pocillo.

#### 4. Recolección de saliva e hidratación de los bloques de dentina.

Se recolectó 50 mL de saliva de un individuo sano en 2 tubos centrifuga estériles. Luego la saliva fue traspasada a jeringas de 20 mL, la cual fue conectada a un filtro de marca Biofil tipo *Syringe Filter* de 0.22  $\mu\text{m}$ , éste fue dispuesto sobre un nuevo tubo centrifuga estéril donde se llevó a cabo la filtración de manera manual aplicando una leve presión sobre la jeringa.



fig.7 Materiales para realizar filtración de saliva.



fig. 8 Proceso filtración de saliva.

Para comprobar la ausencia de bacterias, se sembraron 20  $\mu$ L de saliva filtrada en agar sangre, incubando en estufa por 48 horas a 37°C en condiciones de capnofilia y anaerobiosis.

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

Tras una hidratación por 30 minutos en agua destilada estéril, cada bloque de dentina fue dispuesto con su armazón de sostén sobre los pocillos con 2 mL de saliva filtrada utilizando una pinza estéril.

La placa de cultivo celular con los bloques de dentina y saliva filtrada fue cerrada y puesta sobre un *Tape shake*® por 30 minutos dentro de la estufa a 37°C para que la saliva pudiera bañar la superficie de los bloques e inducir la formación de la película salival adherida sobre ellos.

## **5. Formación de la biopelícula bacteriana y proceso de desmineralización**

Para la formación de la biopelícula se utilizó la cepa de referencia de *S. mutans* ATCC 25125 proporcionada por el departamento de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Los medios de cultivo TYCS y BHI fueron preparados según protocolo y especificaciones del fabricante.

La preparación de las placas de cultivo agar TYCS fue bajo campana de flujo laminar, con el objetivo de reducir el riesgo de contaminación. Para corroborar esterilidad se incubaron a 37°C por 24h, luego fueron almacenadas a 4°C para su posterior utilización.

Luego se realizó la siembra de 100 $\mu$ L de las cepas ATCC 25125 de *S. mutans*. Esto se llevó a cabo en torno a un mechero a gas para mantener estéril la zona de

trabajo. Las placas fueron incubadas en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 48 horas.

Una vez obtenidas las colonias de *S. mutans*, se realizó un análisis micro y macromorfológico para luego realizar la resiembra en caldo BHI suplementado con glucosa 0.1mM. Estos caldos fueron incubados en condiciones de anaerobiosis a 37°C durante 18 horas esperando su reproducción. Este caldo corresponde al inóculo bacteriano.

Posteriormente, se rotularon 2 tubos centrífuga, en el tubo n°1 se preparó el caldo inicial, este se compone de 40 ml de caldo BHI más 4 ml de Sacarosa al 10% (en proporción 1:10) más 2 ml del inóculo anteriormente preparado ajustado a 0.5 McFarland. En el tubo centrífuga n°2 se preparó un caldo inicial sin inóculo bacteriano el cual corresponde al grupo control.

Los 2 tubos centrífuga se sometieron a agitación en vortex. Luego en una nueva placa de crecimiento celular se transfirieron 2 ml del tubo n°1 a 22 pocillos y 2ml del tubo n°2 a 2 pocillos (pocillos A5 y A6)

Bajo campana de bioseguridad nivel II A y con una pinza estéril cada uno de los bloques que se encontraban en la placa de cultivo con saliva filtrada fueron traspasados a esta nueva placa con el caldo inicial. Se dejó por 12 horas a 37°C en condiciones de anaerobiosis.

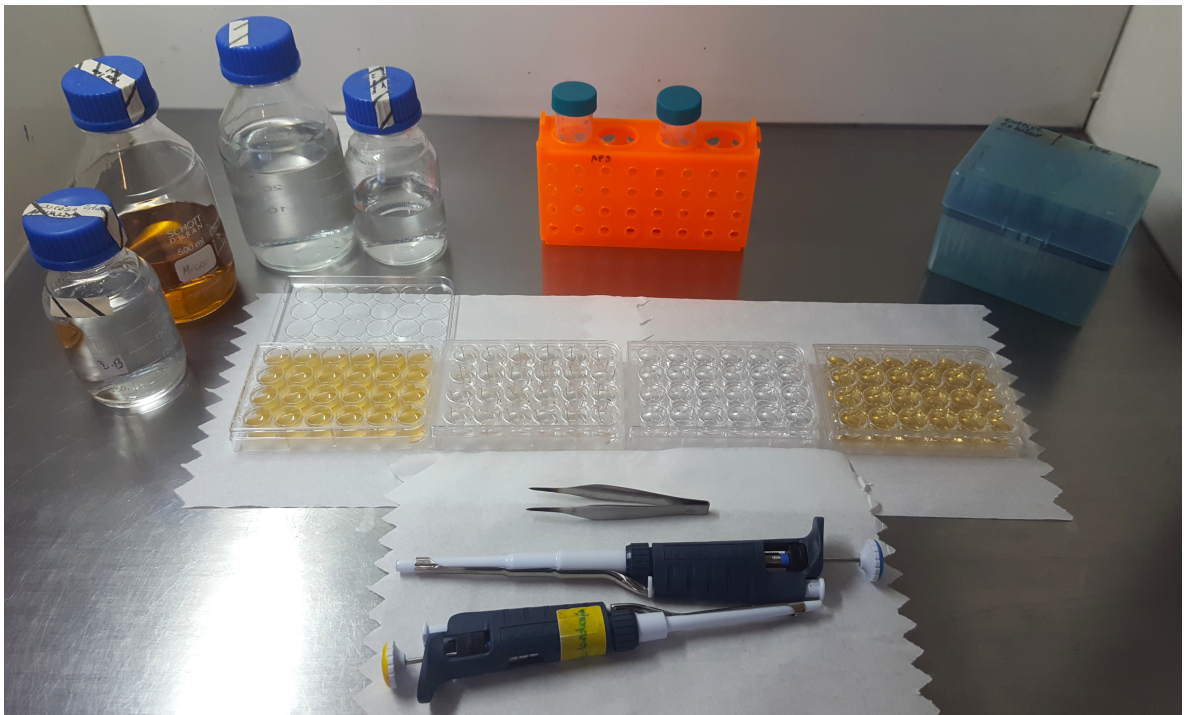
Pasadas las 12 horas cada uno de los bloques fue sumergido en los pocillos de una nueva placa de crecimiento celular, la cual contenía 2 ml de NaCl 0.9% para luego volver a ubicarlos en la placa de crecimiento celular con las mismas condiciones anteriores. Este procedimiento de inmersión en NaCl 0.9% se repitió cada 12 horas por un período total de 36 horas.

Se rotuló un nuevo tubo centrífuga, pero ahora su contenido correspondía a 45 ml de caldo BHI, más 5 ml de glucosa 0.1mM. En una nueva placa de crecimiento celular se depositaron 2ml de esta nueva solución.



Los bloques fueron traspasados a esta nueva placa y al pasar una hora, utilizando una pinza estéril y bajo campana de bioseguridad cada bloque fue 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 su pocillo con caldo y glucosa. Este procedimiento de exposición a sacarosa al 10% y posterior lavado con NaCl 0.9% se repitió 4 veces al día en los siguientes horarios: 7.30 - 10.30 – 13.30- 16.30 durante 5 días seguidos. Cada mañana antes de la primera exposición a sacarosa el caldo de cultivo de cada pocillo es renovado por uno fresco (BHI + Glucosa) y vuelve a ser renovado al final del día luego de la última exposición a sacarosa con el fin de mantener las cepas bacterianas fisiológicamente activas.

El caldo removido cada mañana es sembrado en agar TYCS y agar sangre para descartar la contaminación de los pocillos.



**fig. 9 Proceso de exposición a sacarosa 10%.**

## 6. 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 un papel indicador de pH directamente en el medio. Las mediciones se realizaron 2 veces al día antes de cada renovación de medio de cultivo.

## 7. 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 nuvea 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.

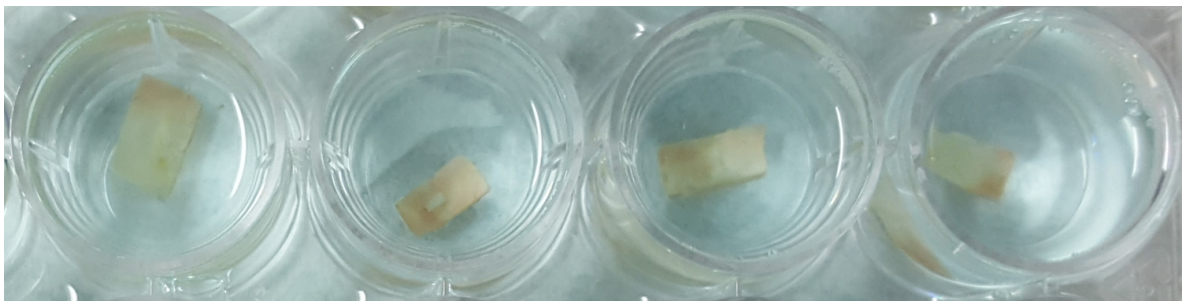


fig. 10 Muestras en placa con clorhexidina.

## 8. Medición de dureza después de la exposición a biopelícula monoespecie de *S. mutans*

Posteriormente se procedió a medir la dureza superficial de la zona desmineralizada que nos entregará el valor denominado dureza superficial número 2 (DS2), esto mediante 6 indentaciones con microdurómetro Vickers, solo en la Zona B.

## **9. Tratamiento remineralizador**

Tras obtener la zona de dentina desmineralizada y realizadas las mediciones en la zona B, se limpiaron las muestras con una motita de algodón estéril, con el objetivo de evitar interferencias de la humedad y el producto.

Luego se llevó a cabo la aplicación del nuevo agente remineralizante experimental a base de flúor y grafeno (BlueRemin®), con un microbrush dejando actuar sobre la zona C durante 2 minutos, posteriormente se retiró el agente remineralizador con agua destilada. Luego de esto se dejó en saliva artificial por 16 horas a 37° C para simular las condiciones del medio oral.

Como control positivo de la remineralización se aplicaron dos productos disponibles en el mercado sobre dos muestras elegidas al azar. Una de las muestras fue expuesta a Fluoruro Diamino de Plata (FAGamin®, Tedequim S.R.L., Córdoba - Argentina), para su aplicación la muestra se limpió con una motita de algodón estéril, con el objetivo de evitar interferencias de la humedad y el producto. Luego se aplicó Fluoruro Diamino de Plata con microbrush, dejando actuar sobre la zona C durante 2 minutos, se retiró el agente remineralizador con agua destilada y se dejó en saliva artificial por 16 horas a 37° C para simular las condiciones del medio oral. La segunda muestra escogida fue expuesta a un Barniz de fluor silano 0.1% con 7000 ppm de flúor (Fluor Protector Barniz, Ivoclar Vivadent A.G., Madrid - España), para su aplicación la muestra se limpió con una motita de algodón estéril, con el objetivo de evitar interferencias de la humedad y el producto, luego se aplicó una fina capa con un microbrush, se secó suavemente con jeringa triple, se esperó 1 minuto y se depositó en saliva artificial por 16 horas a 37° C para simular las condiciones del medio oral.

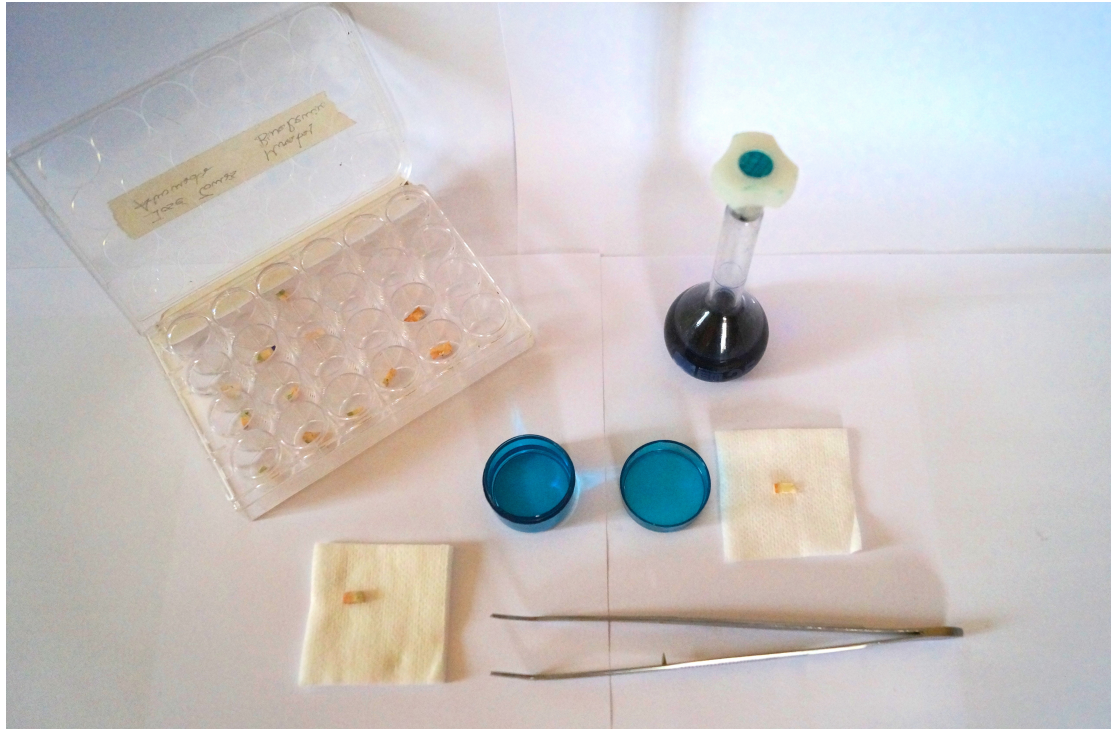


fig.11 Materiales y muestras para realizar aplicación del agente remineralizante.



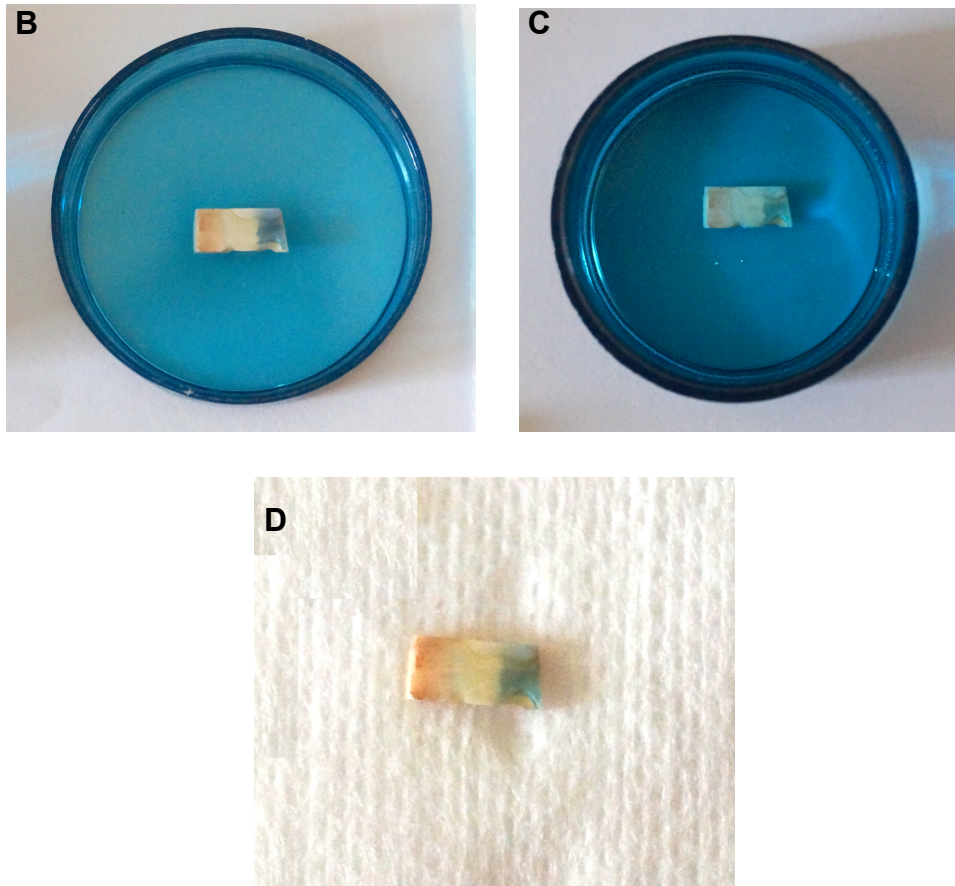


fig. 12 a) Colocación de la muestra en placa donde se llevara aplicación. b) muestra con BlueRemin®. c) Muestra en agua destilada, lavado de agente. d) Muestra en gasa para secado y eliminar residuos

### **10. Medición de dureza después de la aplicación del nuevo agente remineralizador.**

Se volvió a medir microdureza, pero esta vez sobre las superficies correspondientes a la zona C, lugar en el que actuó el agente remineralizador, siguiendo el mismo protocolo de las dos mediciones de dureza anteriores. El promedio de estas medidas corresponde a la medida denominada dureza superficial número 3 (DS3).

## **11. Análisis estadístico**

Para el análisis de las durezas se realizó la evaluación de la distribución de los datos mediante el test Shapiro-wilk en el programa STATA.

Para comparación de medias entre DS1/DS2, DS2/DS3 se utilizó el Test T de student.

Para la comparación de las medias entre agentes remineralizantes se utilizó el Test de ANOVA de comparaciones múltiples Bonferroni.

## RESULTADOS

### 1.Resultado ausencia de bacterias en saliva filtrada

Al inspeccionar las placas de agar sangre se comprobó la ausencia de bacterias, como se puede observar en la figura 13. En cada una de ellas habían sido sembrados 20  $\mu$ L de saliva filtrada e incubadas en estufa por 48 horas a 37°C en condiciones de capnofilia y aerobiosis.

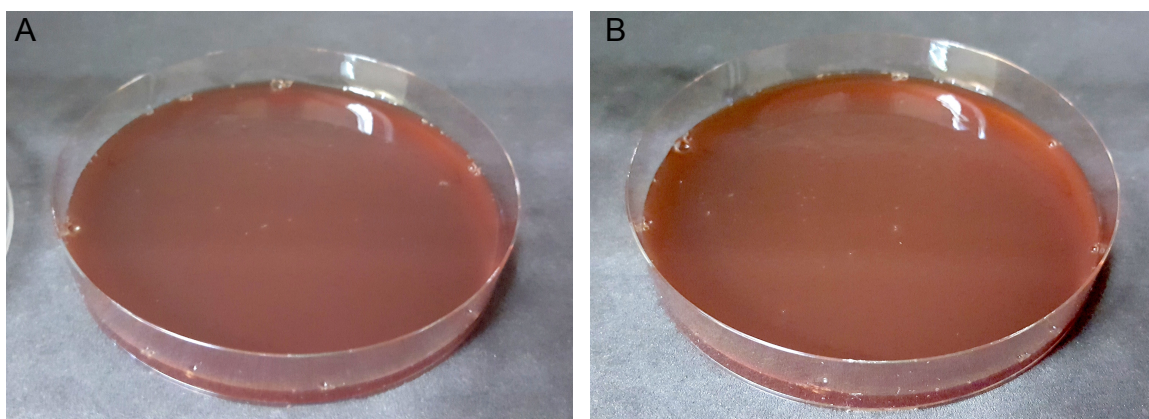


Fig. 13 a) Placa de agar sangre incubada en capnofilia se observa ausencia de colonias bacterianas. b) Placa de agar sangre incubada en aerobiosis, se observa ausencia de colonias bacterianas.

### 2. Resultados de formación de biopelícula sobre bloques de dentina

Mediante inspección visual se evidenció la presencia de una capa blanca sobre la superficie de los bloques al tercer día de exposición a sacarosa 10%, tal como lo muestra la figura 14.

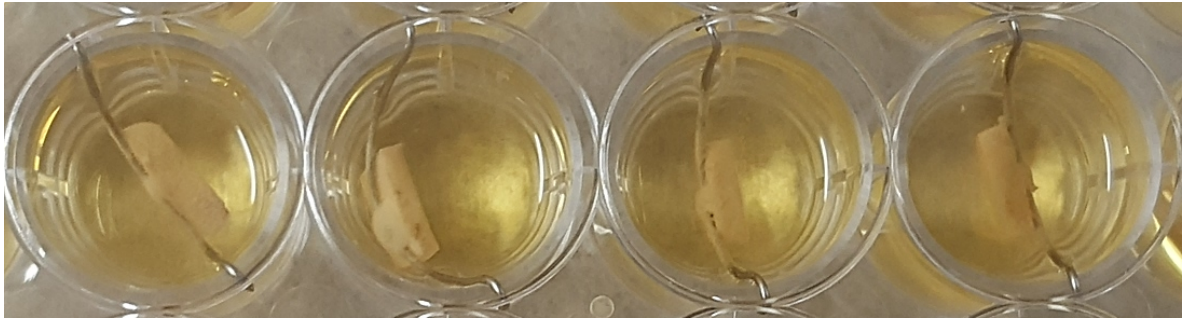


fig. 14 Imagen de bloques de dentina en el tercer día de exposición a sacarosa, se puede apreciar capa color blanco de aspecto rugoso sobre la superficie de los bloques de dentina.

### 3. Resultados control de pureza de *S. mutans*

Para los controles de pureza se sembraron 10  $\mu$ L de cada pocillo sobre un agar TYCS dividido en 24 zonas, una para cada pocillo, tal como lo muestra la figura 15.

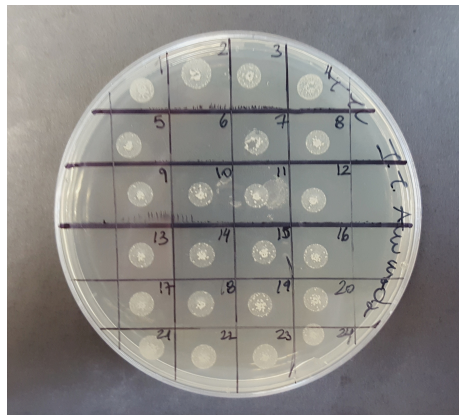
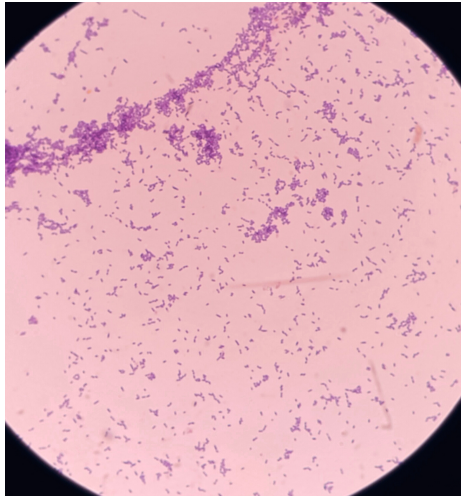


fig. 15 Imagen placa de cultivo de control de pureza.

Luego se tomó una muestra de cada una de las 24 zonas del agar TYCS y se preparo un frotis que se tiño con Gram observando al microscopio solamente la presencia de cocáceas Gram positivo agrupados en cadenas, como se muestra en la figura 16.

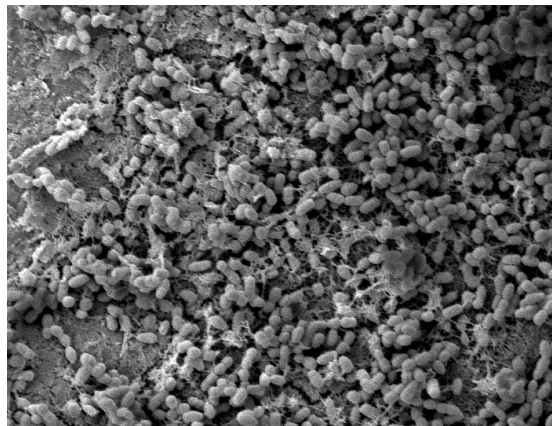




**fig. 16 Imagen de microscopio óptico con tinción Gram.**

#### **4. Resultado imágenes de microscopía electrónica**

Al tercer día de exposición a sacarosa 10% se tomó un bloque de dentina (correspondiente a la muestra C3 con sospecha de contaminación y fue observado al microscopio electrónico, para comprobar cepa bacteriana de *S. mutans* y formación de una biopelícula. Los resultados se observan en la figura 17.



**fig. 17 Imagen de microscopía electrónica, de superficie de bloque de dentina con biopelícula de *S. mutans*.**

## 5. Resultados mediciones de dureza inicial, después de exposición a biopelícula monoespecie y después de tratamiento con nuevo agente remineralizador.

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

Muestra	DS1 Hv	DS2 Hv	DS3 Hv
A1	87,8	22,1	36,58
A2	107	21,91	36,71
A3	91	15,86	38,04
A4	51,6	11,32	24,58
A5 (Ac. O.)	71,83	27,21	No Remin.
A6 (sin tto.)	95,83	79,65	No Remin.
B1	81,31	14,96	17,15
B2	86,83	20,28	33,14
B3	70,6	11,11	23,43
B4	77,5	11,86	23,53

B5	69,83	6,68	13,96
B6	89,16	23,3	32,69
C1	64,16	30,66	43,15
C2	59	22,63	26,3
C3	101	Descartada por contaminación	
C4	65,33	11,51	19,29
C5	79,66	14,05	32,95
C6 (FDP)	75,33	10,67	17,68
D1	62,16	10,81	19,9
D2	61,66	6,57	18,52
D3	75,83	7,69	23,35
D4	67,5	12,10	26,85
D5	61	6,85	22,66
D6 (FS)	66,4	23,35	36,39

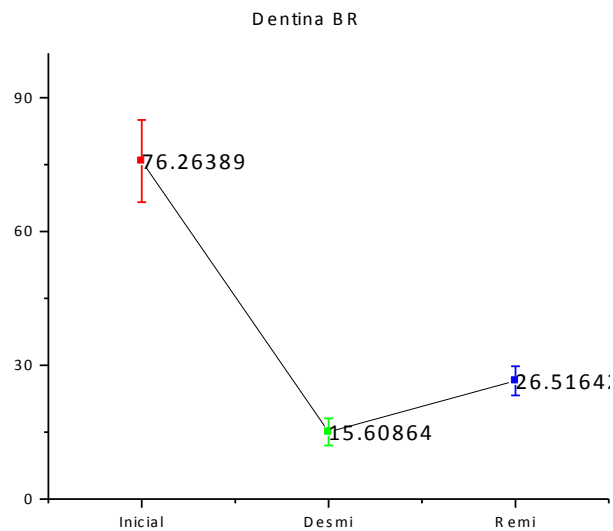
---

**Tabla 1 Promedios por bloques de dentina, dureza inicial (DS1), dureza desmineralizada (DS2) y dureza con agente remineralizante (DS3). -Muestra A5: desmineralizada con Ac. Ortofosfórico sin tto. con agente remineralizante, control positivo desmineralización. Muestra A6: Sin desmineralización ni tto. remineralizador control negativo desmineralización. Muestra C3: Descartada por contaminación. Muestra C6: tratada con Fluoruro diamino de plata. Muestra D6: tratada con barniz de flúor silano.**

El análisis estadístico demuestra que entre la dureza inicial y la dureza después de la exposición a la biopelícula de *S. mutans* cepa ATCC 25175, la diferencia es estadísticamente significativa con un  $p < 0,05$ . La diferencia entre los valores de dureza de los bloques de dentina 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 datos conseguidos, se obtuvo el promedio de los valores de dureza inicial de todos los bloques de dentina el cual fue 75.82 Hv con un intervalo de confianza del 95% entre 73.02 Hv y 78.63 Hv. El promedio de durezas después de

la exposición al modelo microbiológico monoespecie de *S. mutans* fue de 18.40 Hv con un intervalo de confianza del 95% entre 15.84 Hv y 20.95 Hv. La diferencia entre dureza inicial y dureza luego de la exposición al modelo microbiológico corresponde a 57.42 Hv, lo que es estadísticamente significativo con un 95% de confianza y  $p < 0.05$ . Luego de tratar los bloques de dentina con el nuevo agente remineralizante el promedio de los valores de dureza fue de 26.99 Hv con un intervalo de confianza del 95% entre 25.45 Hv y 28.53 Hv. 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 8.59 Hv con un 95% de confianza y un intervalo de confianza entre 11.63 Hv y 5.55 Hv, esta diferencia es estadísticamente significativa con  $p < 0.0001$ .



**Fig. 18 Gráfico con promedios de durezas superficial de los bloques de dentina, inicial, después de exposición a desmineralización y luego de aplicado el agente remineralizador BlueRemin®**

El análisis estadístico de Bonferroni, demuestra que las diferencias de remineralización entre BlueRemin® y las muestras del grupo control tratadas con Fluoruro Diamino de Plata y Fluor Silano son iguales y no son estadísticamente

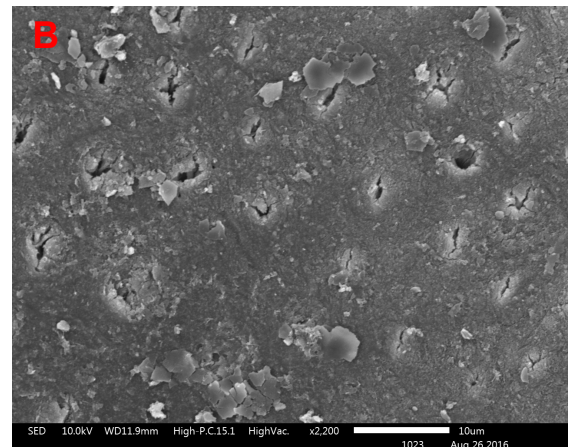
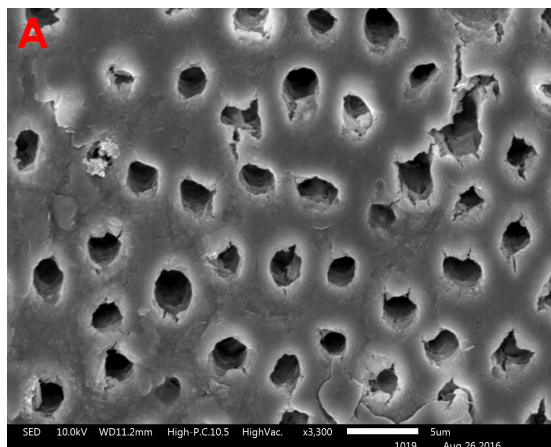
significativas con  $p < 0.9999$  entre BlueRemin® y Fluor Silano, y  $p < 0.20$  entre BlueRemin® y Fluoruro Diamino de Plata.

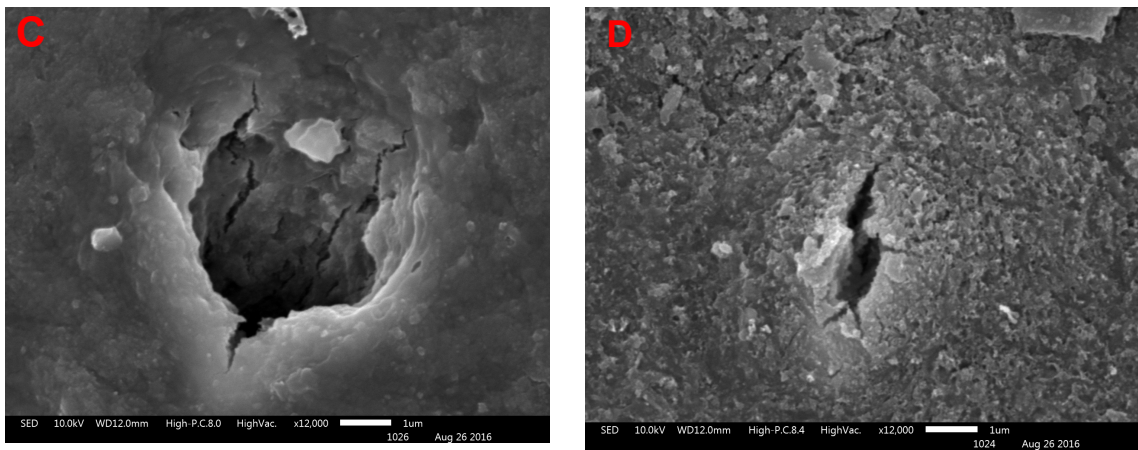
	Barniz de flúor	FDP
FDP	- 6.03	
BlueRemin®	- 0.91	5.12

**Tabla 2. Diferencia de la dureza superficial luego del tratamiento con BlueRemin®, Barniz de Flúor y Fluoruro diamino de plata.**

## 6. Resultado imágenes de microscopía electrónica

Se examinaron bajo microscopía electrónica las superficies de los bloques de dentina después de la exposición al modelo microbiológico y después de la aplicación del nuevo agente remineralizante. Para evidenciar en forma visual sus cambios.





**fig. 19 a) y c) Imagen bloque de dentina despues del proceso de desmineralización. b) y d) Imagen bloque de dentina luego de exposición al nuevo agente remineralizador**

## **7. Resultados de medición de pH**

Se midió el pH de los caldos de cultivo BHI antes de cada cambio de medio de cultivo en cada uno de los 24 pocillos (2 veces al día por 5 días) desde el inicio del protocolo de desmineralización con exposiciones a sacarosa 10%.

El pH promedio de los 5 días para los pocillos con la cepa de *S. mutans* fue de 4,4

El pH promedio de los 5 días para los 2 pocillos control fue de 6.4

<b>Día</b>	<b>pH cepa <i>S. Mutans</i></b>	<b>pH Grupo Control</b>
<b>1</b>	5	7
<b>2</b>	4	6
<b>3</b>	4	6
<b>4</b>	5	6
<b>5</b>	4	7
	<b>4.4</b>	<b>6.4</b>

**Tabla 3. Promedios por día de mediciones de pH con papel indicador de pH**

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio han demostrado la capacidad del modelo bacteriano monoespecie de *S. mutans* de formar una biopelícula *in vitro* sobre superficies dentales, tanto dentina como esmalte, esto concuerda con varios estudios previos, como el realizado por Seemann y cols. en el 2005 donde se utilizó un modelo microbiológico monoespecie de *S. mutans* ATCC 25175 para producir lesiones de caries sobre esmalte. Del mismo modo también concuerda con los resultados obtenidos por Giacaman y cols. en el 2015, donde utilizaron un modelo microbiológico con diferentes cepas de *S. mutans* con exposiciones de sacarosa al 10%.

La ventaja de utilizar un modelo bacteriano, en comparación a la exposición de superficies dentales a ácidos orgánicos libres, es la inclusión de uno de los tantos factores del hospedero que envuelven el proceso natural de la formación de una lesión de caries, la presencia de bacterias cariogénicas. Utilizar un modelo *in vitro* nos permite además controlar los factores experimentales, tales como la contaminación y el manejo estéril de las muestras. Dentro de las desventajas encontramos que en el modelo *in vitro* se encuentra la imposibilidad de representar en su totalidad las interacciones ambientales que se llevan a cabo en la cavidad oral, como lo es la presencia continua de saliva y de otros microorganismos (Steiner y cols. 2007; Seeman y cols. 2005).

Un buen modelo *in vitro* debe tener las siguientes condiciones: la biopelícula bajo estudio debe ser representativa de la diversidad de la microbiota oral y característica de la placa dental (Reynolds y cols. 2016). Que *S. mutans* sea considerado una de las principales bacterias presentes en el proceso de formación de lesiones de caries (Forssten y cols. 2010; Krzysciak y cols. 2014) es la cualidad por la cual ha sido escogida en este estudio como la única especie bacteriana para llevar a cabo el modelo microbiológico monoespecie. Además, corresponde a un modelo que ha tenido resultados favorables en lo que respecta a la formación

de una biopelícula y la pérdida de minerales por parte de las superficies dentales, como se pudo observar en los estudios previos de Deng y ten Cate en el 2004, Ccahuana-Vásquez y Cury en el 2010 y Steiner en el 2007.

Con esto se puede establecer que el modelo utilizado es considerado como una herramienta ventajosa para realizar estudios de mecanismos de desmineralización y remineralización por productos naturales o farmacéuticos.

Luego de la exposición de los bloques de dentina a una biopelícula de *S. mutans*, se pudo visualizar un cambio de coloración y textura de la superficie expuesta en comparación a la no expuesta, si bien no se cuantificó la cantidad de minerales perdidos en la superficie de estudio, fue posible apreciar este cambio en la coloración de un color amarillo palido a un color amarillo oscuro y un acabado superficial más rugoso. Los valores de dureza superficial de Vickers luego de la exposición al biopeícula bacteriana indicaron una disminución significativa de la dureza superficial de los bloques de dentina en comparación a la muestra perteneciente al grupo control (muestra A6) y concordante con la muestra A5 desmineralizada con Ac. Ortofosfórico al 37%. Este resultado es concordante con los estudios de Giacaman y cols. en 2012 y Ccahuana-Vásquez y Cury en 2010, los cuales realizaron diseños experimentales de biopelícula y desmineralización sobre esmalte, obteniendo resultados sobre la dureza superficial similares. Así el modelo llevado a cabo en este estudio muestra un cambio significativo ( $p < 0.05$ ) en la dureza superficial de las muestras.

Las investigaciones en el último tiempo se han enfocado en el desarrollo de agentes químicos que permitan la prevención y/o el tratamiento mínimamente invasivo de las lesiones de caries, la mayoría de estos agentes químicos buscan favorecer el proceso de remineralización, el cual ocurre normalmente en la cavidad oral en contraposición con el proceso de desmineralización y además fortalecer la pieza dentaria incorporando minerales de mayor resistencia a su estructura química, disminuyendo así la susceptibilidad ante el ataque ácido bacteriano y la pérdida de tejido dentario.



Muchos estudios han demostrado que los tratamientos con agentes a base de fluor son eficientes y logran remineralizar las lesiones incipientes en esmalte. Benson y cols. en 2005 concluyeron que era posible conseguir una reducción significativa de las lesiones de mancha blanca durante el tratamiento de ortodoncia a través del uso de diferentes agentes a base de fluor. En 2004 Marinho y cols. concluyeron que el uso de fluoruros tópicos en forma de pastas dentales, enjuagues bucales, barnices y geles son efectivos en la prevención de las lesiones de caries, concluyendo también que el uso combinado de estos agentes es efectivo en la prevención y tratamiento de lesiones de caries.

Rodríguez y cols. en 2005 realizaron un estudio donde evaluaron las diferencias de microdureza superficial del esmalte, en un modelo *in vitro* de desmineralización, en éste hubo una disminución de las medidas de microdurezas luego de la exposición al modelo, y pudieron observar un aumento de ésta luego de la exposición a diferentes dentífricos con diferentes concentraciones de fluor. Esto es concordante con los resultados obtenidos en la muestra tratada con barniz de fluor como control positivo de remineralización.

En 1997 Reynolds en un estudio para comprobar la eficacia de CPP-ACP (Fosfopéptidos de Caseína y Fosfato de Calcio Amorfo), generó lesiones de caries a través de la inmersión de bloques de esmalte en ácido láctico por 4 días, luego cada uno de esos bloques fue suspendido en soluciones con diferentes concentraciones de CPP-ACP por 10 días, concluyendo que el producto es capaz de generar una remineralización de la superficie de esmalte *in vitro*, esto lo comprueba a través de medidas de densitometría, microradiografía y microfotometría.

En las continuas investigaciones sobre agentes cariostáticos Rosenblatt y cols. en 2009 en una revisión sistemática concluyen que el fluoruro diamino de plata es un agente eficiente tanto en la prevención y remineralización de lesiones de caries, esto se compara con los datos obtenidos en este estudio en la muestra tratada con fluoruro diamino de plata como control positivo de remineralización.

En la presente investigación luego de la aplicación del nuevo agente remineralizante BlueRemin® los bloques experimentaron un aumento en las medidas de su dureza superficial, aunque no lograron alcanzar los valores iniciales, sí fueron mayores y estadísticamente significativas ( $p < 0.0001$ ) a las medidas de la dureza luego de expuestas al modelo de desmineralización. Por otro lado no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la capacidad remineralizadora de BlueRemin® en comparación a Fluor Silano y Fluoruro Diamino de Plata ( $p < 0.9999$  entre BlueRemin® y Fluor Silano, y  $p < 0.20$  entre BlueRemin® y FDP).

La finalidad de esta investigación radica en evaluar la dureza superficial de bloques de dentina sometidos a desmineralización mediante un modelo de biopelícula monoespecie de *S. mutans*, y su diferencia, posterior a una única aplicación de un nuevo agente remineralizante (BlueRemin®), con esto se busca iniciar una línea de investigación sobre el producto que permita evaluar sus propiedades y aplicaciones futuras.

## CONCLUSIÓN

Tomando en cuenta las limitaciones de los estudios in vitro, podemos concluir que:

1. El modelo bacteriano monoespecie de *S. mutans* es eficiente en el proceso de desmineralización superficial sobre bloques de dentina.
2. El nuevo agente remineralizador BlueRemin® basado en flúor y grafeno aumentó la dureza superficial de todos los bloques de dentina expuestos al agente, lo que sugiere que posee actividad remineralizante.
3. La capacidad remineralizante de BlueRemin® comparado con la eficacia de FDP y Barniz de Fluor, no son estadísticamente significativas, por lo tanto no se encuentran diferencias en su capacidad remineralizante, lo que determina que BlueRemin® de acuerdo a los datos analizados podría ser equivalente en la capacidad remineralizante.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ana María Rodríguez, Alfonso Maldonado, Ana María Acevedo. Estudio in vitro del efecto de dentífricos fluorados comercialmente disponibles en Venezuela en el proceso de remineralización de lesiones iniciales de caries dental. *Acta Odontologica Venezolana* 2005;44(3): 10-30.
2. Arteaga O, Urzúa I, Espinoza I, Muñoz A, Mendoza C. Prevalencia de Caries y Pérdida de Dientes en Población de 65 a 74 Años de Santiago, Chile. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabíl. Oral* 2009;2(3): 161-166.
3. Benson PE, Shah AA, Millett DT, Dyer F, Parkin N, Vine RS. *Fluorides, orthodontics and demineralization: a systematic review*. *J Orthod* 2005; 32(2):102-114.
4. Busscher H, Van der Mei H. Physicochemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res* 1997;11: 24-32.
5. Ccahuana-Vásquez R, Cury J. Streptococcus mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Braz Oral Res.* 2010;24(2): 135-41.
6. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. *J Dent Res.* 2010;89(11): 1187-97.
7. Davey M.E., O'toole G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000;64: 847–867.
8. Deng DM, ten Cate JM: Demineralization of dentin by *Streptococcus mutans* biofilm grown in the constant depth film fermentor. *Caries Res* 2004;38:54–61.
9. Donald R., Pradeep P., Wendelin J.. *Ciencia e ingeniería de materiales*, Sexta edición. México, D.F.: Cengage Learning. 2011. Cap. 6, pag.221-223
10. Eric C Reynolds. Remineralization of enamel subsurface lesion by casein

phosphopeptide-stabilized calcium Phosphate Solutions. *Journal of dental research* 1997;76: 60-87.

11. Eric C. Reynolds, Stuart G. Dahsper, Christina P.C. Sim. Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents. *Journal of Dentistry*, 2016;50: 1-11.

12. Fejerskov O, Kidd EAM, Nyvad B, et al. Defining the disease: an introduction. In: Fejerskov O, Kidd E, editors. *Dental caries: the disease and its clinical management*. 2nd edition. Oxford (UK): Blackwell Munksgaard; 2008;2: 4–6.

13. Francia Catalina Melchora, Lissera Rosa Guadalupe, Battellino Luis José. PELÍCULA ADQUIRIDA SALIVAL: REVISIÓN DE LA LITERATURA. *acta odontologica Venezolana*, 2005;45 n°3: art. 28.

14. Forssten S, Björklund M, Ouwehand *Streptococcus mutans*, Caries and Simulation Models *Nutrients* 2010; 2: 290-298.

15. García-Garduño, Margarita V., Reyes-Gasga, J. La Hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación biomédica. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 2006;9(2): 90-95.

16. Giacaman R, Contzen M. Anticaries effect of an antioxidant-rich apple concentrate on enamel in an experimental biofilm-demineralization model, *J Appl Microbiol*. 2014;117(3):846-53.

17. Giacaman R, Jobet-Vila P, Muñoz-Sandoval C. Fatty acid effect on sucrose-induced enamel demineralization and cariogenicity of an experimental biofilm-caries model. *Odontology*, 2015;103(2): 169-176.

18. Giacaman R, Muñoz M. Effect of Fluoridated Milk on Enamel and Root Dentin Demineralization Evaluated by a Biofilm Caries Model. *Caries Res*. 2012; 46(5):460-6.

19. Haiwei Ji a,b, Hanjun Sun a,b, Xiaogang Qu.. Antibacterial applications of graphene-based nanomaterials: Recent 2 achievements and challenges. Elsevier,

Advanced Drug Delivery Reviews, 2015;100: 0-14.

20. Hanning M, Balz M. Protective properties of salivary pellicles from two different intraoral sites on enamel erosion. *Caries Res* 2001;35: 142-148.

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

22. Juan de Dios Teruel, Alberto Alcolea, Ana Hernandez, Antonio José Ortiz Ruiz. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Archives of oral biology*, 2015;60, 768-775.

23. Landis, W.J., et al. (1996). Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces evidence for conventional and high voltage Electron Microscopy and three dimensional imaging. *J. Structural Biology* 1996;117, 24-35.

24. LeGeros. Chemical and crystallographic events in the caries process. *J Dent Res* 1990; 69: 567-74.

25. Lemos, Robert G. Quivey, Jr, Hyun Koo and Abranches. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? *Microbiology* 2013;159: 436–445.

26. Lissera RG , Yankilevich ERLM de, Battellino LJ. Velocidad de erosión y factores que afectan la desmineralización de dientes humanos in vitro. *Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoamer* 1998;48: 73-82.

27. Londoño M., Echavarría A., De La Calle F. (2006). Características cristal químicas de la Hidroxiapatita sintética tratada a diferentes temperaturas. *Revista EIA*, 5, 109-118.

28. Longbottom C, Huysmans MC, Pitts N, et al. Glossary of key terms. *Monogr Oral Sci* 2009;21: 209–16.

29. Mamani Quisbert, Cinthia y Zeballos Lopez, Lourdes. Cariostaticos. *Rev. Act. Clin. Med* 2012;23: 1103-1109 .

30. Majithia U, Venkataraghavan K, Choudhary P, Trivedi K, Shah S, Virda M. Comparative evaluation of application of different fluoride varnishes on artificial early enamel lesion: An *in vitro* study. *Indian J Dent Res* 2016;27:521-7
31. Margherita Fontana, Douglas A. Young, Mark S. Wolff, Nigel B. Pitts. (Dent Clin N Am 2010). Defining Dental Caries for 2010 and Beyond. *Current Concepts in Cariology*, 2010;54: 469-78.
32. Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* 2002;3: 0-279.
33. Marinho VC, Higgins JPT, Sheiham A, Logan S. Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2004;1: 0-278.
34. Marsh P., Martin M., *Oral Microbiology* quinta edición 2009; Cap 5: pag. 75.
35. Marsh PD. Dental plaque as biofilm. *J Industrial Microbiology* 1995;15:169-75.
36. Moncada, Urzúa I. (2008). *Cariología Clínica bases preventivas y restauradoras* primera edición Editores Prof. Dr. Gustavo Moncada C, Prof. Dr. Iván Urzúa. 2008;3: 58-59
37. Organización Mundial de la Salud: Salud Bucodental, nota informativa nº318 Abril 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>. Fecha de acceso: 22/04/2016.
38. Roberson Roberson, Theodore M. *Sturdevant's Art and Science of Operative Dentistry*, 5th ed. St Louis: Mosby; 2006;5: 112.
39. Rodríguez-Montelongo L, De la Cruz-Rodríguez L, Farías RN, Mass EM. Membrane-associated redox cycling of copper mediates hydroperoxide toxicity in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1993;1144: 77-84.

40. Rosenblatt A., TCM Stamford, R. Niederman. Silver diamine fluoride: A caries "silver-fluoride bullet". *J Dent Res*, 2009;88(2): 116-125.
41. Schilke R, Lisson JA, Bauss O, Geurtsen W. Comparison of the number and diameter of dentinal tubules in human and bovine dentine by scanning electron microscopic investigation. *Arch Oral Biol*. 2000;45: 355–361.
42. Seemann R., Bizhang M., Klück I., Loth J., Roulet J.. A Novel in vitro Microbial-Based Model for Studying Caries Formation – Development and Initial Testing. *Caries Research*, 2005;39: (3) 185–190.
43. Selwitz Robert H; Amid I Ismail; Nigel B Pitts.. Dental Caries. *The Lancet*, 2007;369: 0-59.
44. Soto L, Tapia R, et al: Diagnóstico nacional de salud bucal de los niños de 6 años. Chile, 2007.  
[http://www.redsalud.gov.cl/archivos/salud\\_bucal/perfilepidemiologico.pdf](http://www.redsalud.gov.cl/archivos/salud_bucal/perfilepidemiologico.pdf). Fecha de Acceso: 20/04/2016.
45. Steiner C, Rodrigues L. An in vitro microbial model for producing caries-like lesions on enamel *Braz J Oral Sci*. 2007;6(22):1392-1396
46. Takagi Y, Sasaki S. Histological distribution of phosphophoryn in normal and pathological human dentins. *J Oral Pathol*. 1986;15:463–467.
47. Ten Cate JM In vitro studies on the effects of fluoride on de- and remineralization. *J Dent Res*. 1990; 69: 614-9; discussion 634-6.
48. Tenuta LM, Cerezetti RV, Del Bel Cury AA, Tabchoury CP, Cury JA. Fluoride release from CaF<sub>2</sub> and enamel demineralization. *J Dent Res* 2008;87:1032-1036.
49. Tsukuma K, Shimada M. Strength, fracture toughness and Vickers hardness of CeO<sub>2</sub>-stabilized tetragonal ZrO<sub>2</sub> polycrystals (Ce-TZP). *J Mater Sci* 1985;20:1178-84.
50. W. Krzysciak, A.Jurczak, D Koscielniak, B. Bystrowska, A. Skalniak. The



virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form *biofilms*. eur J clin microbiol infect dis, 2014;33, 499-515.

51. Weerheijm KL, Gruythuysen RJ, Van Amerongen WE. Prevalence of hidden caries. ASDC J Dent Child 1992;59: 409–12.

52. Whelton H. et al. Cronin M. Dental caries and enamel fluorosis among the fluoridated and non-fluoridated populations in the Republic of Ireland in 2002. Community Dentistry Health. 2004;21(1):37-44..

## ANEXOS



Santiago, noviembre 27 de 2015  
**DIFO N°** 0162/2015  
**Mat.:** Inscripción Proyecto Halley 2015

Señor  
**Dr. Mario Díaz Dosque**  
Investigador Responsable  
Proyecto Halley 2015  
Presente

De mi consideración:

En relación a su solicitud de inscribir el proyecto Halley 2015 titulado "REMINERALIZADOR ANTICARIES BASADO EN FLÚOR Y GRAFENO", dentro de las líneas de investigación de esta Dirección, me permito informar que una vez revisado dicho proyecto, es factible su incorporación dentro de la línea de Cariología y Biología Pulpar y así poder adscribir tesis.

Sin otro particular, saluda atentamente a usted,

  
**Dra. DENISSE BRAVO RODRÍGUEZ**  
Directora de Investigación



DBR-cmg

**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 Beaucheff 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:

- 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.**

**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.



## 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.



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: mrdiaz@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.



### 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: \_\_\_\_\_

