



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

Efecto remineralizante de un agente a base de flúor y grafeno sobre bloques de esmalte desmineralizados con un modelo de biopelícula de *Streptococcus mutans*.

Maximiliano Felipe Jara Contreras

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Mario Diaz-Dosque

TUTORES ASOCIADOS

Dr. Rodrigo Cabello Ibacache

Dra. Patricia Palma Fluxá

Adscrito a Proyecto Open Beaucheff “Remineralizador cariostático basado en flúor y grafeno”

Santiago – Chile

2017



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

Efecto remineralizante de un agente a base de flúor y grafeno sobre bloques de esmalte desmineralizados con un modelo de biopelícula de *Streptococcus mutans*.

Maximiliano Felipe Jara Contreras

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Mario Diaz-Dosque

TUTORES ASOCIADOS

Dr. Rodrigo Cabello Ibacache

Dra. Patricia Palma Fluxá

Adscrito a Proyecto Open Beaucheff “Remineralizador cariostático basado en flúor y grafeno”

Santiago – Chile

2017

I. RESUMEN.....	6
II. MARCO TEÓRICO.....	8
2.1 Introducción.....	8
2.2 Enfermedad de caries.....	8
2.3 Esmalte dental	9
2.4. Biopelícula.....	9
2.5 <i>Streptococcus mutans</i>	11
2.6 Química de la caries dental.....	11
2.7 Lesión de caries.....	12
2.8 Control de la enfermedad de caries.....	13
2.9 Remineralizantes.....	13
2.10 Flúor.....	14
2.11 Fluoruro Diamino de Plata	15
2.12 Óxido de grafeno.....	15
2.13 Modelos bacterianos para el estudio de caries.....	16
2.14 Medición de dureza.....	16
2.15 Planteamiento del problema.....	18
III. HIPÓTESIS.....	19
IV. OBJETIVO GENERAL.....	19
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
6.1 Obtención y almacenamiento de las muestras.....	20
6.1.1 Corte de las muestras.....	20
6.1.2 Medición de dureza inicial.....	22
6.1.3 Montaje de las muestras.....	23
6.2 Recolección de saliva e hidratación de los bloques de esmalte.....	25
6.3 Obtención de cultivo de <i>Streptococcus mutans</i>	26
6.4 Formación de biopelícula	26
6.5 Tratamiento de desmineralización.....	28
6.6 Acidogenicidad de la biopelícula.....	30
6.7 Recolección de las muestras.....	30
6.8 Medición de dureza después de la exposición	31

6.9 Tratamiento remineralizador.....	31
6.10 Evaluación de remineralización.....	32
6.11 Evaluación de cambios estructurales.....	33
6.12 Análisis estadístico.....	33
VII. RESULTADOS.....	34
7.1 Generación de un modelo experimental de caries microbiológico monoespecie.....	34
7.1.1 Formación de biopelícula.....	34
7.1.2 Controles de viabilidad y pureza de <i>Streptococcus mutans</i>	35
7.2 Medición de pH.....	36
7.3 Mediciones de dureza.....	37
7.4 Cambios estructurales de las muestras de esmalte.....	40
VIII. DISCUSIÓN.....	41
IX. CONCLUSIONES.....	46
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXO 1: Acta de aprobación de protocolo de investigación.....	56
ANEXO 2: Consentimiento informado.....	58
ANEXO 3: Tabla de mediciones de dureza.....	62

I.RESUMEN

Introducción: La caries es una de las enfermedades más prevalentes a nivel mundial. Se caracteriza por la pérdida de minerales a causa de subproductos ácidos liberados por bacterias presentes en la biopelícula adherida a las superficies de los dientes. Esta produce lesiones que pueden culminar en la pérdida de la estructura dentaria, junto con todas las repercusiones que esto genera en la calidad de vida y salud de las personas. Los agentes remineralizantes a base de flúor son productos utilizados para revertir la pérdida de minerales en las etapas iniciales de esta enfermedad. La finalidad de esta investigación radicó en evaluar la capacidad remineralizante de BlueRemin®, un nuevo agente remineralizante a base de flúor y grafeno, con el objetivo de iniciar una línea de investigación que permita evaluar sus propiedades y futuras aplicaciones clínicas.

Objetivos: Establecer diferencias en la dureza superficial en especímenes de esmalte desmineralizados mediante un modelo de caries microbiológico y luego de ser sometidos a un protocolo de remineralización con BlueRemin®.

Metodología: Se utilizó el modelo de caries descrito por Ccahuana y Cury (2010), que consiste en la simulación de un ambiente cariogénico mediante la exposición de bloques de esmalte a sacarosa, previa formación de una biopelícula monoespecie de *Streptococcus mutans*, lo cual permitió obtener una zona de desmineralización compatible con una lesión de caries no cavitada que luego fue remineralizada con el agente remineralizador experimental BlueRemin®. Los bloques de esmalte fueron evaluados por microdureza de Vickers antes de la exposición a sacarosa, después de la desmineralización y una vez aplicado el agente remineralizador.

Resultados: Las microdurezas de los especímenes de esmalte expuestos al modelo de caries experimentaron un aumento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) luego de ser tratados con el agente remineralizador BlueRemin®.

Conclusiones: Debido a que la aplicación de BlueRemin® generó un aumento de la dureza superficial estadísticamente significativo ($p < 0.05$) de todas las muestras de esmalte, se sugiere que posee capacidad remineralizante.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Introducción

Las enfermedades bucodentales, como caries dental, periodontitis y cáncer de boca y faringe son un problema de salud de alcance mundial (OMS 2012). Dentro de estas enfermedades, la caries dental representa el mayor problema de salud oral que afecta a los países industrializados y, cada vez con mayor frecuencia, a los países en desarrollo, en especial a las comunidades más pobres. La Federación Dental Internacional (FDI) en su atlas de salud oral del 2012 informa que la caries dental es el mayor problema de salud pública a nivel mundial (FDI 2012). Estudios epidemiológicos revelan que entre un 60-90% de los escolares y casi un 100% de los adultos tiene caries dental en el mundo (OMS 2012). En Chile, la realidad no es diferente, los últimos estudios de prevalencia de caries realizados por el Ministerio de Salud indican que la prevalencia en la población chilena es del 70.3% a los 6 años, del 62.5 % a los 12 años (MINSAL 2007, Soto y Tapia 2007) y en adultos llega casi a un 100% (Arteaga y cols. 2009).

2.2 Enfermedad de caries

La enfermedad de caries es un proceso patológico crónico que está caracterizado por la pérdida neta de minerales a causa de subproductos ácidos provenientes de la actividad metabólica de bacterias presentes en la biopelícula adherida a las superficies del diente (Selwitz y cols. 2007). En presencia de carbohidratos fermentables provenientes de los alimentos, estos microorganismos son capaces de producir ácidos orgánicos que difunden a la superficie dentaria, lo cual genera la desmineralización parcial de la estructura. En un periodo de tiempo, si la tasa de desmineralización es mayor que la tasa de remineralización existe una pérdida neta de minerales que produce cambios en la superficie del diente, definida como lesión de caries (Aoba 2004, König 2004). Las lesiones de caries pueden manifestarse desde pequeñas pérdidas de mineral en la subsuperficie del esmalte que producen solo cambios ópticos en el tejido (Selwitz y cols. 2007). Es decir, no existe evidencia visual de una cavidad, hasta la destrucción total del esmalte, la dentina o el

cemento, situación que repercute en la calidad de vida y salud de las personas (Filho y Lima 2008).

2.3 Esmalte dental

El esmalte es uno de los tejidos dentales sobre el cual se desarrolla la enfermedad de caries. Está compuesto por un 96% de matriz inorgánica, 3% de agua y 1% de materia orgánica (Simmer y Finchman 1995). Gracias a su alto contenido mineral, es el tejido más duro de nuestro organismo. Al ser un tejido acelular y avascular no posee la capacidad de remodelarse o repararse (Mihu y cols. 2008).

Estructuralmente está constituido por unidades repetitivas básicas y altamente mineralizadas que lo recorren en todo su espesor, desde el límite amelodentinario a la superficie externa o libre en contacto con el medio bucal (Nanci 2003). Estas estructuras reciben el nombre de Prismas o Varillas del esmalte, y corresponden a agrupaciones en haces de hasta mil cristales de hidroxiapatita (HAp). La HAp es un fosfato de calcio cristalino que representa el principal componente inorgánico del esmalte (Elliott y cols. 1985). Está compuesta principalmente por iones calcio, fosfato e hidroxilos en una relación estequiométrica 10:6:2 (Robinson y cols. 1989). Estos iones permanecen unidos dentro la estructura del cristal mediante enlaces iónicos (Castellanos y cols. 2013). Entre los Prismas o Varillas del esmalte se encuentra el espacio interprismático, zona con gran contenido de agua que permite el flujo constante de iones desde el medio al cristal o viceversa, generando sustituciones iónicas que modifican las propiedades de la HAp (Eanes 1979).

2.4 Biopelícula

La 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. La organización de los microorganismos en biopelículas le otorga a la comunidad bacteriana características únicas que no son observables en cultivos líquidos ni en el microorganismo por sí solo. Algunos estudios han revelado que

ciertas biopelículas pueden ser hasta 1000 veces más tolerantes a agentes antimicrobianos que las mismas células en crecimiento planctónico, así como también la asociación de comunidades de diferentes especies pueden otorgar mayor patogenicidad a la biopelícula, que cultivos puros de microorganismos (Marsh 1995).

Para la formación de la biopelícula sobre las estructuras dentales se deben dar tres pasos fundamentales. El primer paso es la formación de la película adquirida (PA) sobre las superficies de los dientes. Esta corresponde a una delgada capa de proteínas y glucoproteínas contenidas en la saliva y el líquido crevicular gingival, así como también en 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 (Melchora y cols. 2007). La formación de la PA es un fenómeno muy rápido que se produce por un mecanismo de adsorción selectiva de iones (Bennick y Cannon 1978). Dado que los cristales de HAp poseen carga negativa superficial por la presencia de grupos fosfatos en su estructura, para su neutralización son atraídas cantidades equivalentes de calcio iónico provenientes de la saliva, formando una capa de iones denominada capa de hidratación o de Stern. Ésta actúa de puente para la unión de las glicoproteínas a la superficie del esmalte (Poyato y cols. 2001). Por su parte, las proteínas catiónicas interactúan directamente con los grupos fosfato de la HAp a través de enlaces iónicos (Zhan y cols. 1999). Si bien esta película proteica desempeña importantes funciones protectoras, como regular el contacto de la superficie dental con ácidos de los alimentos y del metabolismo de las bacterias presentes en boca (Lissera y cols. 1998, Hanning y Balz 2001), también otorga sitios para la adhesión de microorganismos, que corresponde al segundo estadio en la formación de la biopelícula. El segundo paso entonces corresponde a la colonización de la PA por diferentes especies bacterianas. Las primeras bacterias que logran retenerse lo hacen mediante interacciones fisicoquímicas no específicas entre moléculas cargadas provenientes de la célula bacteriana y la superficie de la PA (Busscher y Van der Mei 1997, Davey y O'toole 2000). Posteriormente, se establecen interacciones intermoleculares específicas entre las adhesinas bacterianas y los

receptores complementarios de la PA, dando como resultado una adherencia irreversible (Whittaker y cols. 1996, Jenkinson y cols. 1997). En las primeras uniones encontramos principalmente *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis* y *Actinomyces spp*, que reciben el nombre de colonizadores primarios. El tercer paso corresponde a la agregación de microorganismos diferentes a los colonizadores primarios a través de relaciones célula célula en un fenómeno que recibe el nombre de cohesión. Aquí podemos encontrar *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (Kolenbrander 1993, Busscher y Van der Mei 1997). Con el paso del tiempo la biopelícula se va organizando y estructurando hasta alcanzar su estado de maduración (Bradshaw y Marsh 1999, Forssten y cols. 2010).

2.5 *Streptococcus mutans*

S. mutans es una bacteria cocácea Gram positivo que frecuentemente se encuentra asociada en cadenas largas o cortas dependiendo de la disponibilidad de nutrientes (Forssten y cols. 2010). Son anaerobias facultativas por lo que su crecimiento se ve favorecido por una concentración de CO₂ cercana al 10% (Lemos 2013). Se puede encontrar en la cavidad oral, faringe e intestino. Su capacidad de adhesión a superficies dentales y a otras bacterias, así como la producción de metabolitos ácidos, su capacidad de generar reservas de glicógeno y su habilidad de sintetizar polisacáridos extracelulares en presencia de sacarosa, fructosa y glucosa hace que sea una de las principales especies bacterianas que se encuentran en la etiología de la caries dental (Forssten y cols. 2010).

2.6 Química de la de caries dental

El metabolismo de las bacterias presentes en la biopelícula adherida a las superficies del esmalte produce ácidos orgánicos capaces de liberar iones hidrógeno, provocado una disminución del pH de la cavidad oral (Marsh y Nyvad 2008). En exceso de Hidrógeno, los iones fosfato e hidroxilos del medio reaccionan con estos para formar ácido fosfórico y agua respectivamente (Castellanos y cols. 2013). Esto provoca una disminución abrupta de la concentración de iones fosfato

e hidroxilos, generando condiciones de subsaturación del medio, que favorece la salida de iones desde el complejo cristalino de la HAp del esmalte. A su vez, el calcio liberado del esmalte es capturado por las proteínas de la placa y saliva. Esto contribuye a la disminución total de todos los iones que hacen parte de la hidroxiapatita, manteniendo las condiciones de subsaturación y desmineralización del esmalte. Si esta condición se mantiene por un período de tiempo, confluye en la formación de una lesión de caries (Fejerskov 1997).

Cuando el pH de la cavidad oral es superior a 5.5, se produce remineralización de manera natural, ya que la saliva se encuentra sobresaturada de iones calcio, fosfato y flúor respecto al cristal (Buzalaf y cols. 2011). Este se denomina pH crítico, ya que a valores menores el medio deja de estar sobresaturado respecto al cristal, y pasa a una solución subsaturada que determina la pérdida de iones desde los cristales de HAp.

2.7 Lesiones de caries

Una vez establecido el proceso de pérdida de minerales, los primeros cambios estructurales sobre el esmalte comprenden el aumento del tamaño de los espacios intercristalinos. Esto contribuye al aumento de la porosidad de la superficie del esmalte, junto con la disminución de su dureza superficial (Balda y cols. 1999). Estos cambios en sus primeras etapas están a un nivel subclínico, es decir, las alteraciones son clínicamente invisibles. Conforme la lesión avanza, se comienzan a evidenciar las primeras manifestaciones clínicas de una lesión de caries. Estas corresponden a la aparición de una superficie opaca, de aspecto tizado y sin brillo denominada lesión inicial de caries o mancha blanca (Thylstryk y Fejerskov 1988). En un comienzo, estas lesiones solo se hacen visibles después de un secado prolijo de la superficie. Cuando ya somos capaces de ver lesiones de mancha blanca sin desecar, quiere decir que la desmineralización está más avanzada y ha comprometido todo el espesor del esmalte, alcanzando el límite amelodentinario, pudiendo incluso, afectar la dentina (Forssten y cols. 2010). Este fenómeno se produce por el índice de refracción del esmalte, su capacidad de dispersar la luz, el aumento de la porosidad de los cristales y la incorporación de agua y aire al interior

de su estructura. El esmalte dental tiene un índice de refracción de 1.66. Un aumento de su porosidad permite un aumento en su contenido de agua, que posee un índice de refracción 1.33. Estas diferencias en los índices de refracción afectan la dispersión de luz, lo que permite observar cambios en la opacidad del tejido afectado respecto al normal. Cuando el clínico seca la superficie del diente examinado, el aire, con un índice de refracción 1, reemplaza al agua. Como estas diferencias de refracción son mayores, se genera una lesión mucho más obvia a la inspección visual, permitiendo realizar una detección más temprana de la caries dental (Kidd y Fejerskov 2004).

Si la pérdida de minerales de los tejidos dentarios continua, el esmalte colapsa y se fractura, generando la formación de una cavidad (Elderton 1990). Este proceso culmina con la destrucción total del esmalte, la dentina o el cemento, provocando la pérdida total de la estructura dentaria, con todas las repercusiones que esta situación genera en la salud y vida de las personas (Filho y Lima 2008).

2.8 Control de la enfermedad de caries

Es importante tener en cuenta que en el ser humano la biopelícula siempre se encuentra en formación, siempre está presente y metabólicamente activa, por lo que el proceso de caries es considerado actualmente un fenómeno natural, siempre presente que no puede ser prevenido sino más bien controlado de modo que una lesión de caries clínicamente visible nunca se desarrolle (Kidd y Fejerskov 2004). Los niveles sobre los cuales se puede actuar para controlar la caries como enfermedad son la evaluación de los factores de riesgo, instruir a una correcta técnica higiene dental y protección del hospedero susceptible. Dentro de las formas de brindar protección al hospedero susceptible encontramos, entre otros, la aplicación de diferentes tipos de agentes remineralizantes (Urzúa y Moncada 2008).

2.9 Remineralizantes

Los remineralizantes son agentes que apuntan a reforzar el estado del hospedero promoviendo la remineralización del tejido dental (Lynch y Smith 2012). La saliva

es el agente remineralizante por excelencia, ya que aporta iones bicarbonato y fosfato capaces de capturar el exceso de hidrógeno evitando la caída del pH de la cavidad oral. La disminución de la concentración de hidrógeno permite que iones fosfato e hidroxilo estén en mayor disponibilidad para depositarse en el esmalte y generar remineralización. Además, la saliva es considerada un vehículo clave para fomentar la remineralización del esmalte a través de otros agentes remineralizantes (Bardow y cols. 2008). Entre otros agentes remineralizantes del esmalte, la evidencia es amplia en mostrar la efectividad del flúor (Marinho y cols. 2003, Walsh y cols. 2010), el cual podemos encontrar en barnices y geles como el Flúor Silano 0.1% con 7000ppm de flúor y el fluoruro de sodio al 5% con 22500 ppm de flúor (Duraphat®).

2.10 Flúor

El principal mecanismo de acción del flúor en la prevención y control de caries es local o posteruptivo, disminuyendo la desmineralización y aumentando la remineralización (Hellwing y Lennon 2004, Ten Cate 2004, Fejerskov y Kidd 2005, Adair 2006). Esto, gracias a las características de micro porosidad del esmalte y su intensa cinética de intercambio de iones con el medio, que permiten a la HAp remplazar sus iones hidroxilo por iones flúor (Buzalaf y cols. 2011, Lussi y cols. 2012). Es así como el flúor, por su condición de sobresaturación con respecto al esmalte favorecerá su flujo hacia los cristales, remplazando los iones hidroxilos y acelerando el proceso de remineralización (Catellano y cols. 2013). La sustitución de iones hidroxilos por iones fluoruros generara la formación de cristales de fluorhidroxiapatita o fluorapatita. Estos cristales tienen una mayor fuerza de atracción entre sus iones, lo que disminuyen el tamaño de su celda unitaria y el valor del producto de solubilidad (K_{ps}), tornándola menos soluble y más resistente al ataque ácido (Whelton y cols. 2004). De esta forma, el pH necesario para producir un desequilibrio químico e inestabilidad de la molécula debe ser menor a 4.5 (Ten Cate 1990, Whelton y cols. 2004, Zamora y cols. 2006). Además, la presencia de flúor favorece la formación de moléculas de fluoruro de calcio en el medio ambiente oral. Estos son verdaderos reservorios de iones de flúor y calcio pH dependientes.

Esta molécula, estable a pH neutro, se disocia y se convierte en el más importante surtidor de iones para el esmalte en momentos que el pH desciende y se produce desmineralización (Beltrán y Goldstein 2000, Zamora y cols. 2006, Buzalaf y cols. 2011). Los fluoruros también tienen efectos sobre el ciclo glicolítico de las bacterias orales, interfiriendo en la regulación enzimática del metabolismo de carbohidratos, reduciendo así la producción de ácidos por parte de los microorganismos (Ten Cate 2004).

2.11 Fluoruro Diamino de Plata

El Fluoruro Diamino de Plata (FDP) es un agente remineralizante de acción cariostática, que además de estimular la remineralización de los tejidos duros del diente, presenta una actividad antibacteriana (Rosenblatt y cols. 2009). Su acción antibacteriana ocurre mediante la interacción de la plata con los grupos sulfhídricos de las proteínas y el ADN de las bacterias, alterando los enlaces hidrógenos e inhibiendo así los procesos de respiración, síntesis de pared y división celular (García y cols. 2013). A un nivel macro estas interacciones eliminan las bacterias e inhiben la formación de la biopelícula. A pesar de su efectividad clínica este agente presenta dos grandes problemas: La aparición de una mancha negra sobre las zonas tratadas y una elevada toxicidad sobre algunas células orales debido la presencia de plata en su composición (Yamamoto 1998).

2.12 Óxido de Grafeno

El avance y la búsqueda de nuevos desafíos en el ámbito científico han impulsado el desarrollo y descubrimiento de nuevos materiales. Uno de estos es el grafeno, un material derivado del grafito, una de las formas alotrópicas del carbono, que posee gran cantidad de propiedades y potenciales usos. El grafeno corresponde a nanoláminas de carbono unidas mediante enlaces covalentes constituidas por un solo átomo de espesor que posee una estructura hexagonal plana que asemeja a un panel de abejas (Geim y Novoselov 2007). Su derivado, el óxido de grafeno, modificado por el número de oxígenos presentes en su estructura (Zhu y cols. 2010),

presenta propiedades muy beneficiosas para el ámbito odontológico. Se ha demostrado que el óxido de grafeno es muy eficaz en la inhibición del crecimiento de bacterias relacionadas con enfermedades orales tales como *S. mutans*, *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* (Jianliang 2015). A través de microscopía electrónica de transmisión, se evidenció que al entrar en contacto con estas bacterias presenta actividad bactericida, ya que afecta la integridad de la pared y membrana celular de dichos microorganismos.

2.13 Modelos bacterianos para el estudio de caries

Para simular lesiones de caries, se han implementado diferentes modelos *in vitro* a modo de probar diferentes materiales y técnicas restauradoras (Deng y Ten Cate 2004, Seemann y cols. 2005, Steiner y cols. 2007, Ccahuana y Cury 2010, Giacaman 2012). Estos permiten tener un mejor control de las variables experimentales (Shu y cols. 2000). En 2005, Seeman y cols. generaron un modelo bacteriano monoespecie de *S. mutans* sobre premolares, con una continua exposición a sacarosa al 10%, donde obtuvieron formación de una biopelícula, logrando lesiones similares a lesiones de caries.

En 2010 Ccahuana y Cury, implementaron un modelo similar que les permitieron evaluar el efecto de sustancias antimicrobianas sobre esmalte desmineralizado mediante la formación de una biopelícula. Ambos trabajos concluyeron que el modelo monoespecie de *S. mutans* genera una biopelícula *in vitro* y permite la formación de lesiones de caries sobre superficies dentales.

2.14 Medición de dureza

La medición de dureza superficial es un procedimiento bastante utilizado para determinar los efectos remineralizantes del flúor sobre estructuras dentales en estudios *in vitro* (Salehzadeh 2015). En 1992, Kodaka y cols. informaron que existía una estrecha relación entre el contenido mineral y la microdureza del esmalte. Posteriormente, numerosos estudios han evaluado la dureza superficial después de tratar superficies con fluoruros en forma tópica. Esto ha permitido evidenciar que

materiales experimentales aumentan la microdureza superficial de lesiones iniciales de caries (Byeon y cols. 2016).

La prueba de dureza mide la resistencia de la superficie de un material a la penetración de un objeto duro. La dureza, dependiendo del contexto, representa la resistencia a los rayones o a la indentación, y es una medida cualitativa de la resistencia de un material. Esta depende del grado de cohesión entre las partículas que componen una determinada sustancia (Bouschlicher y cols. 2004). Existen varios tipos de pruebas para determinar dureza. Estas se dividen en pruebas de macro y microdureza (Tsukuma y cols. 1985, Donald y cols. 2011). Las pruebas de microdureza son las más adecuadas para medir la dureza de la estructura del diente, ya que permiten medir la dureza de materiales finos y regiones pequeñas. Dentro de las pruebas de microdureza en esmalte, las más utilizadas son la de Knoop y de Vickers. Estas utilizan cargas menores a 2 Newton, ideales para muestras pequeñas y resilientes como el esmalte

En un ensayo de Dureza Vickers, el procedimiento consiste en ubicar la muestra sobre una plataforma y ajustar el lente del microdurómetro hasta que la superficie se observe nítidamente. Posteriormente, se aplica una carga de 1.961 Newton (N) durante un tiempo de 15 segundos. El indentador posee una punta de diamante, la cual deja una huella sobre la muestra con forma de rombo. Al medir las diagonales de la huella, se obtiene la lectura de microdureza Vickers, que es calculada automáticamente por el microdurómetro a través 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
(Majithia y cols 2016).

2.13 Planteamiento del problema

Entre las patologías orales, la enfermedad de caries resalta por su alta tasa de incidencia. Esta enfermedad, que se caracteriza por la pérdida de minerales por parte los dientes, afecta funciones vitales básicas como la alimentación y la nutrición, y altera otras más complejas que influyen en la vida de relación de las personas. Es decir, tanto la calidad de vida como la salud integral de las personas se ven comprometidas. Es por eso, que resulta fundamental el desarrollo de nuevas alternativas de tratamiento que nos permitan combatir esta enfermedad.

Actualmente, en el tratamiento y prevención de esta patología, se utilizan técnicas de inhibición de la desmineralización de los tejidos dentarios, así como de control de los microorganismos y de remineralización de los tejidos afectados. Productos que reúnan estas propiedades representan una necesidad en la práctica clínica de la odontología.

Un equipo multidisciplinario de nuestra Universidad, en búsqueda de una nueva alternativa de tratamiento para esta enfermedad, ha desarrollado BlueRemin®. Un producto a base de flúor y óxido de grafeno que busca ofrecer la posibilidad de inhibir el proceso de desmineralización, al mismo tiempo, generar eliminación de bacterias y otorgar una capacidad remineralizante sin toxicidad y aparición de una mancha negra en las zonas tratadas.

Para lograr un completo desarrollo de BlueRemin®, con el fin de ser utilizado en la práctica clínica, aún son necesarios los estudios que nos permitan corroborar cada una de las características clínicas que se esperan de este producto.

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

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

III. HIPÓTESIS

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

IV. OBJETIVO GENERAL

Establecer diferencias en la dureza superficial en especímenes de esmalte desmineralizados mediante un modelo de caries microbiológico y luego de ser sometidos a un protocolo de remineralización con BlueRemin®.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la dureza superficial de especímenes de esmalte antes y después de ser sometidos a un modelo experimental de caries microbiológico monoespecie.
2. Determinar la dureza superficial de especímenes de esmalte remineralizados a través de un protocolo de remineralización con BlueRemin®, Fluoruro Diamino de Plata y Flúor Silano.
3. Comparar las durezas entre especímenes de esmalte remineralizados con BlueRemin®, Fluoruro Diamino de Plata y Flúor Silano.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó el modelo de caries descrito por Ccahuana y Cury (2010), que permitió simular un ambiente cariogénico mediante la exposición de bloques de esmalte a sacarosa, previa formación de una biopelícula monoespecie de *S. mutans*. Esto generó una zona de desmineralización compatible con una lesión de caries no cavitada que luego fue remineralizada con el agente remineralizador experimental BlueRemin®. Los bloques de esmalte fueron evaluados por microdureza de Vickers antes de la exposición a sacarosa, después de la desmineralización y una vez aplicado el agente remineralizador.

6.1 Obtención y almacenamiento de las muestras

Las muestras se obtuvieron del corte en bloque 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 (Anexo 2) donando el material biológico para uso exclusivo de este estudio. Los dientes fueron almacenados en agua destilada para su conservación hasta el día de su utilización.

6.1.1 Corte de las muestras

Se cortaron los terceros molares con un disco de acero diamantado de 0.20 mm de grosor marca Horico (Alemania) (Figura 1). De los bloques de esmalte obtenidos se seleccionaron 24 muestras de un promedio de 5 mm x 8 mm x 3 mm cada una. La superficie escogida para el ensayo fue dividida en 3 zonas iguales, las cuales se denominaron A, B y C (Figura 2a).

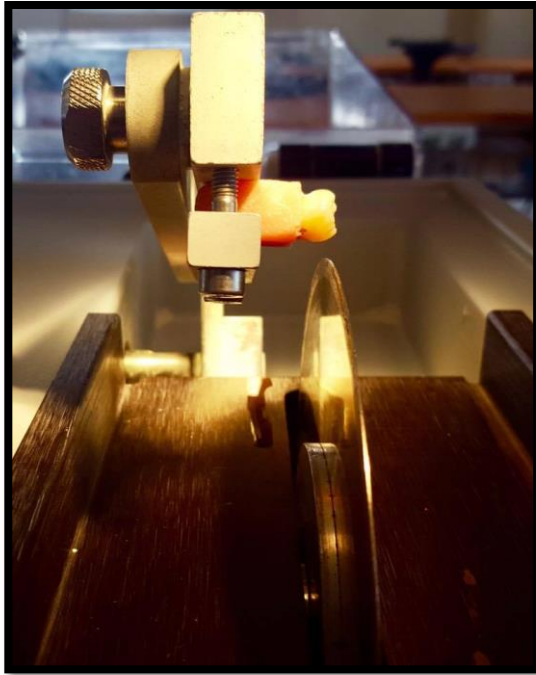


Figura 1. Recortadora con disco de acero diamantado. Este instrumento se utilizó para recortar los terceros molares y obtener las 24 muestras (bloques esmalte) sobre las cuales se desarrollará una biopelícula de *S. mutans*.

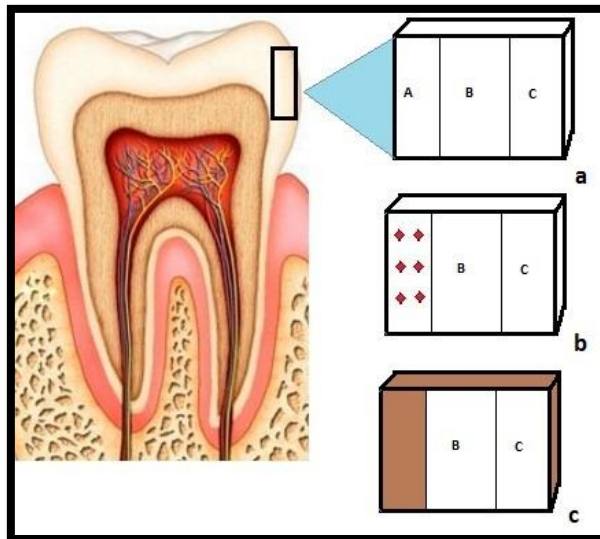


Figura 2. Esquema de muestras de esmalte. a) Muestra la superficie escogida para el ensayo dividida en tres zonas iguales denominadas A, B y C. b) Se observa ubicación de las indentaciones en la zona A. c) Bloque de esmalte pintado con esmalte de uñas a excepción de las zonas B y C.

6.1.2 Medición dureza inicial

A los 24 bloques de esmalte se les realizó la medición de dureza superficial inicial mediante 6 indentaciones en la zona A, correspondiente al grupo control, obteniendo un tamaño muestral N:144 (Figura 2b). Este procedimiento se llevó a cabo con el microindentador de Vickers Struers Duramin (USA) proporcionado por el Laboratorio de Ciencias de los Materiales de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Chile (Figura 3). Las indentaciones se distribuyeron de manera aleatoria. Se utilizó una carga de 1.961 Newton durante 10 segundos. Posteriormente, a cada uno de los bloques, se le calculó el promedio de las 6 mediciones obtenidas y se le denominó DS1.



Figura 3. Imagen del microindentador de Vickers Struers Duramin (USA). Instrumento utilizado para la medición de dureza superficial de las muestras de esmalte.

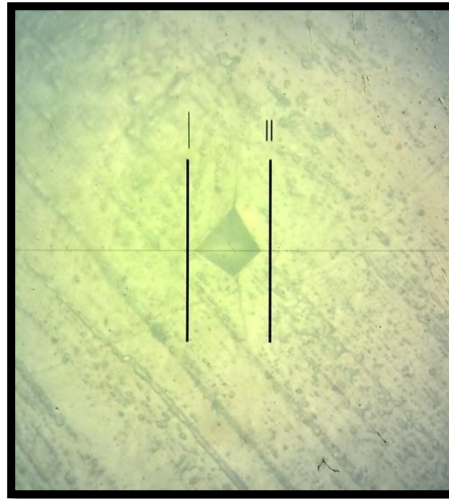


Figura 4. Imagen de una microindentación realizada en la zona A de una las muestras de esmalte. El rombo corresponde a la microindentación realizada por el microindentador de Vickers sobre la muestra de esmalte. Las líneas I y II determinan la medida de una de las diagonales del rombo, y permiten calcular el valor de dureza superficial tal como se describió en el Marco Teórico.

6.1.3 Montaje de las muestras

Los bloques, posteriormente fueron pintados con barniz de uñas en todas las superficies a excepción de las zonas B y C, seleccionadas como áreas blanco para la desmineralización (Figura 2c).

En forma paralela se confeccionó una estructura metálica de alambre de ortodoncia de 0.8 mm para cada muestra de esmalte (Figura 5a). La adhesión del bloque de esmalte a la estructura metálica se realizó con resina *flow* en la superficie opuesta a la escogida para el ensayo (Figura 5b). No se realizó grabado ácido sobre la superficie.

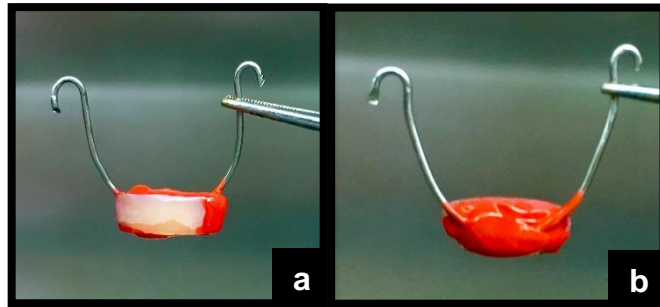


Figura 5. Muestra de esmalte con armazón metálico. a) Vista frontal a) Vista trasera, donde fue adherida la escruta metálica a la muestra de esmalte.

Los 24 bloques, junto con su armazón fueron distribuidos sobre placas de Petri y esterilizados durante 30 minutos por lado con luz ultravioleta en una campana de flujo laminar.

Luego, con una pinza estéril, se montaron las 24 muestras sobre una placa de cultivo celular de polietileno estéril de 24 pocillos marca Trueline (USA). Estas placas presentan una distribución de los pocillos en filas (A, B, C y D) y columnas (1 al 6), lo que permitió asignarle un nombre a cada una de las muestras para su posterior identificación (Figura 6).

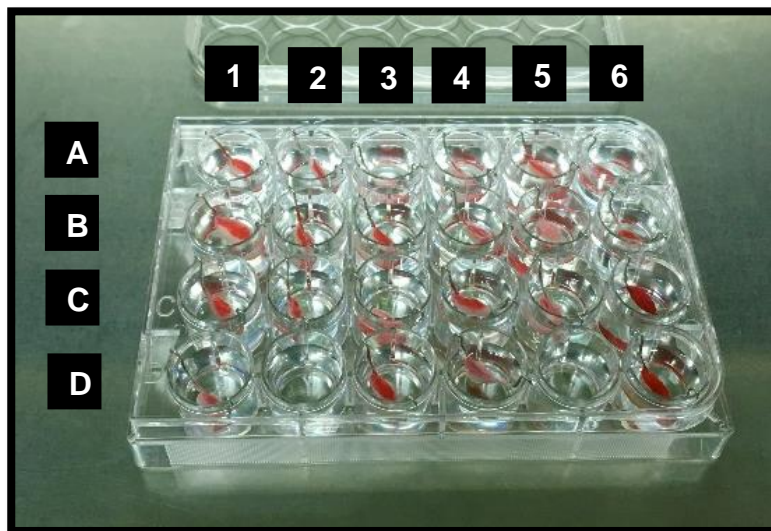


Figura 6. Placa de cultivo celular de polietileno con las muestras de esmalte suspendidas en los pocillos.

6.2 Recolección de saliva e hidratación de los bloques de esmalte

Se recolectaron 50 mL de saliva humana de un individuo libre de enfermedades virales, bacterianas y sistémicas en 2 tubos centrifuga estériles (25 mL en cada tubo centrifuga). Luego, la saliva fue traspasada a jeringas de 20 mL conectada a un filtro marca Biofil tipo *Syringe Filter* de 0.22 μm , dispuesto sobre un tubo centrifuga estéril. La filtración se llevó a cabo de manera manual aplicando una leve presión digital sobre la jeringa (Figura 7a y 7b). Esto permitió la eliminación de microorganismos de la suspensión de saliva recolectada.

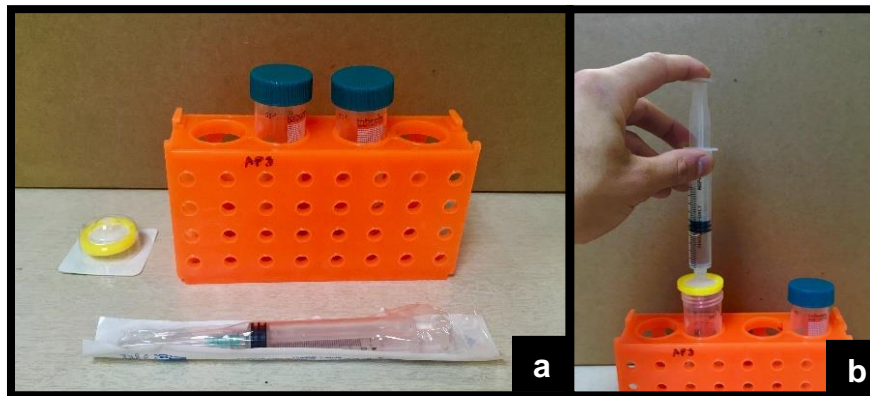


Figura 7. Recolección de saliva. a) Materiales utilizados para filtrar saliva: Filtro Biofil, Jeringa de 20 mL y Tubos centrifuga. b) Proceso de filtración de saliva.

Para corroborar que la saliva estaba estéril, se sembraron 20 μL de saliva filtrada en una placa agar Triptona extracto de levadura cisteína (TYCS) y agar sangre, que luego fueron incubadas en condiciones de microaerofilia a 37°C durante 48 horas.

Una vez obtenida saliva estéril, se depositaron 2 mL en cada uno de los 24 pocillos conteniendo las muestras de esmalte, previa hidratación con agua destilada estéril por 30 minutos. Luego, la placa fue agitada con un *Tape shake*® durante 30 minutos a 37°C. Esto le permitió a la saliva bañar todas las superficies de esmalte e inducir la formación de PA. Una vez transcurrido el tiempo, bajo campana de bioseguridad nivel II A y pinza estéril, las muestras de esmalte fueron trasladadas a una nueva placa de cultivo estéril.

6.3 Obtención de cultivo de *Streptococcus mutans*

Se utilizó *S. mutans* ATCC 33668 proporcionada por el área de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Se utilizaron medios de cultivo agar TYCS y caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI). Cada medio de cultivo se preparó según protocolo y especificaciones del fabricante. La preparación de las placas de cultivo se realizó bajo campana de flujo laminar, con el objetivo de reducir el riesgo de contaminación. Se incubaron durante 12 horas a 37°C como control de calidad y posteriormente se almacenaron a 4°C hasta el día de su utilización.

Luego de corroborar que los medios de cultivo estuviesen estériles, se procedió a inocular 100 µL de un cultivo líquido de *S. mutans* ATCC 33668. Esto se llevó a cabo en ambiente estéril, mediante la utilización de un mechero a gas. Las placas se incubaron en condiciones de microaerofilia a 37°C durante 48 horas.

Una vez obtenidas colonias de *S. mutans*, se realizó un análisis micro y macromorfológico para corroborar la pureza del cultivo y luego se resembraron en caldo BHI suplementado con glucosa 0.1 mM, y se incubaron en condiciones previamente descritas.

6.4 Formación de biopelícula

Posteriormente, sobre 22 de los 24 pocillos, se depositaron 2 mL de una suspensión de *S. mutans* crecida en caldo BHI, ajustada a una turbidez de McFarland 0.5, con sacarosa estéril al 10%. Esto permitió la formación de biopelícula sobre las muestras de esmalte. La suspensión bacteriana fue preparada en un tubo centrifuga estéril en las siguientes proporciones:

- 41.2 mL de caldo BHI
- 4.6 mL de sacarosa al 10%
- 2.2 mL de caldo bacteriano ajustado a 0.5 McFarland

En los 2 pocillos restantes (C6 y D6) se depositó 2 mL de una solución de caldo BHI estéril y sacarosa al 10% estéril, con el objetivo de obtener dos muestras sin formación de biopelícula. Estas dos muestras sin desmineralizar fueron utilizadas como controles negativos de desmineralización. La solución se preparó en un tubo centrifuga estéril en las siguientes proporciones:

- 43.2 mL de caldo BHI
- 5.8 mL de sacarosa al 10%

Luego, la placa fue incubada en condiciones de microaerofilia a 37°C durante 36 horas.

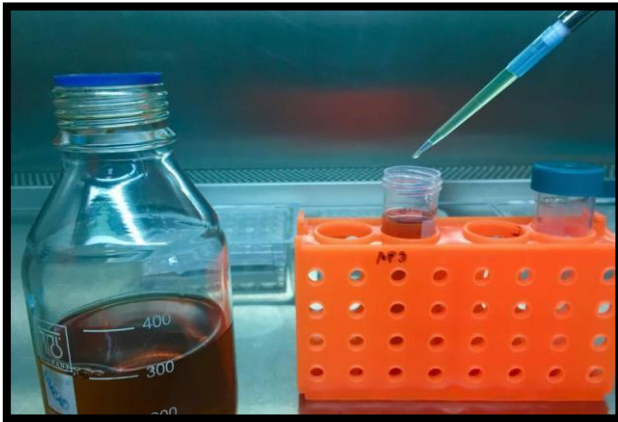


Figura 8. Preparación de suspensión bacteriana para la formación de biopelícula sobre las muestras de esmalte.



Figura 9. Muestras de esmalte suspendidas en suspensión bacteria y solución estéril (pocillos C6 y D6).

6.5 Tratamiento de desmineralización

Luego de formada la biopelícula, las muestras fueron introducidas en una solución de sacarosa estéril al 10% durante 5 minutos, 4 veces al día por 5 días con el objetivo de lograr una zona de desmineralización compatible con una lesión de caries dental no cavitada, como indica el protocolo de Ccahuana y Cury (2010).

Para esto, al inicio de cada jornada, se prepararon 3 placas de cultivo celular con distintas soluciones (Figura 10). La primera placa (P1), contenía en sus 24 pocillos 2 mL de una solución de caldo BHI y glucosa 0.1 mM. Esta solución fue preparada en un tubo centrifuga estéril en las siguientes proporciones:

- 43.2 mL de caldo BHI
- 5.8 mL de glucosa 0.1 mM

La segunda placa (P2) contenía 2 mL de sacarosa estéril al 10% en todos sus pocillos, y la tercera placa (P3), suero fisiológico estéril. Esto, para poder realizar los pasos descritos a continuación.



Figura 10. De izquierda a derecha: Placa P1 con solución de BHI y glucosa 0.1 mM, Placa P2 con sacarosa estéril al 10%, Placa P3 con suero fisiológico estéril.

Cada 24 horas los bloques de esmalte fueron traspasados con pinza estéril y bajo campana de bioseguridad a una placa P1 con caldo BHI y glucosa fresca, con el objetivo de mantener cepas bacterianas fisiológicamente activas.

El tratamiento desmineralizador consistió en llevar los bloques de esmalte a sacarosa estéril al 10% durante 5 minutos. Cada muestra, antes de ser colocada nuevamente en su cultivo bacteriano fue lavada con suero fisiológico estéril para eliminar residuos de sacarosa. El procedimiento se repitió 4 veces al día, a intervalos de 3 horas, durante 5 días seguidos.

Durante el desarrollo del experimento se incluyeron los siguientes controles:

- Control de viabilidad y pureza: para corroborar viabilidad y pureza de los inóculos de cada pocillo, se sembró 20 µL del cultivo en una placa de agar TYCS rotulada y dividida en 24 secciones (una para cada pocillo). Luego de 24 horas de incubación en condiciones microaerofilia a 37°C, se confirmó la existencia de colonias en la placa agar de morfología compatible con la descrita para *S. mutans*. Posteriormente las células obtenidas fueron teñidas con tinción Gram y observadas al microscopio óptico. Además, una de las muestras (D2) fue retirada al tercer día de formación de biopelícula y observada al microscopio electrónico de barrido.

- Control negativo de desmineralización: correspondió a las muestras sin desmineralizar (C6 y D6) 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, de la superficie C de una de las muestras sin desmineralizar (C6).

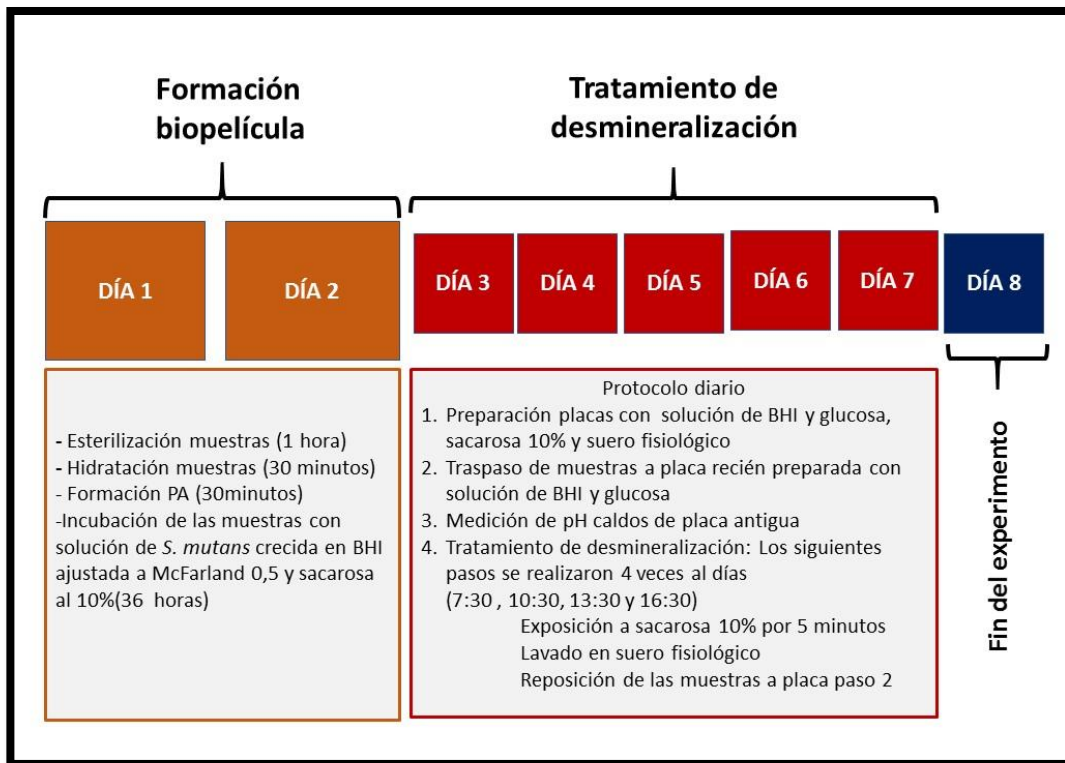


Figura 11. Esquema resumen de protocolo experimental para la formación de biopelícula y desmineralización de las muestras.

6.6 Acidogenicidad de la biopelícula

Para determinar la producción de ácidos por parte de la biopelícula, se midió el pH de los medios de cultivo de cada pocillo con un papel indicador pH. Las mediciones se realizaron una vez al día, al iniciar la jornada, en la placa P1 desechada.

6.7 Recolección de las muestras

Luego de ser sometidas al proceso de desmineralización durante 5 días, las muestras se lavaron con suero fisiológico estéril y cepillo suave, para eliminar residuos de biopelícula (Figura 12a). Una vez limpias se procedió a retirar el esmalte de uñas de las muestras (Figura 12b).

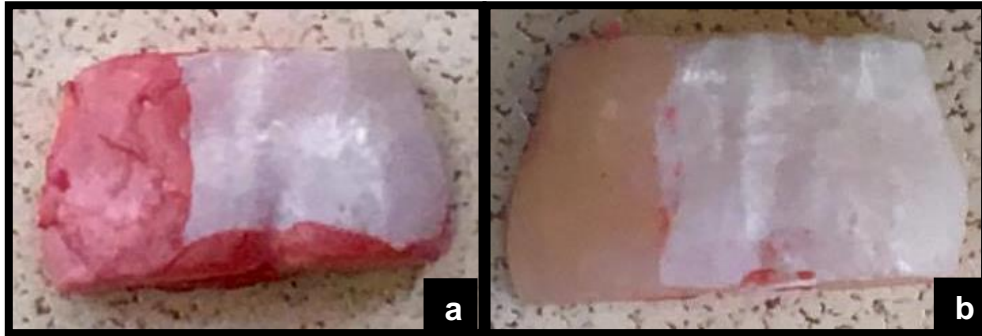


Figura 12. Recolección de muestras de esmalte. a) Muestra de esmalte desmineralizado sin biopelícula. b) Muestra de esmalte desmineralizado una vez removido esmalte de uñas.

6.8 Medición de dureza después de la exposición

Posteriormente, se procedió a medir la dureza superficial desmineralizada en la zona B mediante 6 indentaciones con microdurómetro, realizando el mismo procedimiento aplicado para la obtención de los datos de DS1, obteniendo un tamaño muestral de N: 144. Se calculó el promedio de las 6 indentaciones y se denominó DS2.

6.9 Tratamiento remineralizador

Tras obtener los bloques de esmalte desmineralizados, las muestras se secaron con una motita de algodón estéril, con el objetivo de evitar interferencias entre la humedad y el producto. Se les aplicó BlueRemin® sobre la zona C dejando actuar durante 2 minutos, luego se retiró el agente remineralizante con agua destilada estéril. Las muestras se dejaron en saliva artificial por 16 horas a 37°C, con el objetivo de simular las condiciones del medio oral y permitir la incorporación de minerales al interior del esmalte, gracias al rol de vehículo que ejerce la saliva en el proceso de remineralización (Figura 13).

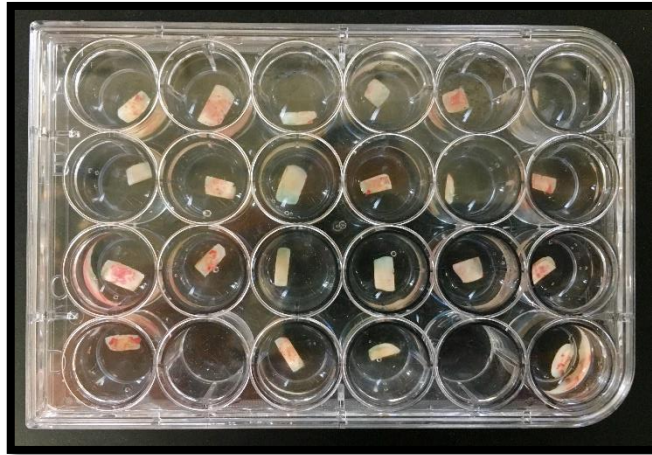


Figura 13. Muestras de esmalte conservadas en saliva artificial luego de la aplicación del agente remineralizante BlueRemin®.

Se incluyeron los siguientes controles:

-Control positivo de remineralización: se aplicó, sobre dos muestras desmineralizadas elegidas al azar (A6 y B6), Fluoruro Diamino de Plata (FAGamin®, Tedequim S.R.L., Córdoba – Argentina) y Barniz de Flúor (Flúor protector Barniz Ivoclar Vivadent A.G., Madrid – España), siguiendo el mismo protocolo utilizado para la aplicación de BlueRemin®.

-Control negativo de remineralización: se utilizó la zona C de la otra muestra sin desmineralizar (D6). A esta muestra no se le realizó ningún tratamiento, a la espera de que mantuviera sus niveles de dureza.

6.10 Evaluación de remineralización

Para evaluar el grado de remineralización se volvió a medir microdureza de las 24 muestras, esta vez sobre la zona C en donde actuó el agente remineralizador, siguiendo el mismo protocolo de las dos mediciones de dureza anteriores. Se volvió a calcular el promedio de las 6 indentaciones y se denominó DS3. Tamaño muestral N: 144.

6.11 Evaluación de cambios estructurales

Para evaluar los cambios sufridos en la estructura del esmalte, una vez finalizado el experimento, se observaron en microscopio electrónico de barrido, las tres zonas de trabajo: zona A control, zona B desmineralizada y zona C remineralizada con BlueRemin®.

6.12 Análisis estadístico

Mediante el análisis estadístico se determinaron las diferencias existentes entre las durezas de especímenes de esmalte desmineralizados y remineralizados con BlueRemin®. Para eso se utilizaron los siguientes test estadísticos:

- Test de Shapiro-wilk: se utilizó para de determinar el tipo de distribución de las medidas de cada grupo (normal o no normal).

- Test de Student: tras obtener medidas con distribución normal, se utilizó este test para comparar los promedios de DS1/DS2 y DS2/DS3 para establecer si existía diferencias significativas entre ellos.

- Test de Bonferroni: se utilizó para comparar los promedios de datos entre los diferentes tratamientos remineralizantes (BlueRemin®, Fluoruro Diamino de Plata y Barniz de Flúor) y establecer si existían diferencias significativas entre ellos.

VII.RESULTADOS

7.1 Generación de un modelo experimental de caries microbiológico monoespecie.

7.1.1 Formación de biopelícula

Mediante inspección visual se evidenció la formación de una biopelícula blanquecina sobre las superficies de las 22 muestras de esmalte expuestas a una suspensión de *S. mutans* crecida en caldo BHI, ajustada a McFarland 0.5 con sacarosa estéril al 10% (Figura 14a y 14b). Las muestras incubadas sin una suspensión bacterias (C6 y D6) mantuvieron sus superficies limpias sin formación de biopelícula, como se observa en la Figura 14c y 14d.

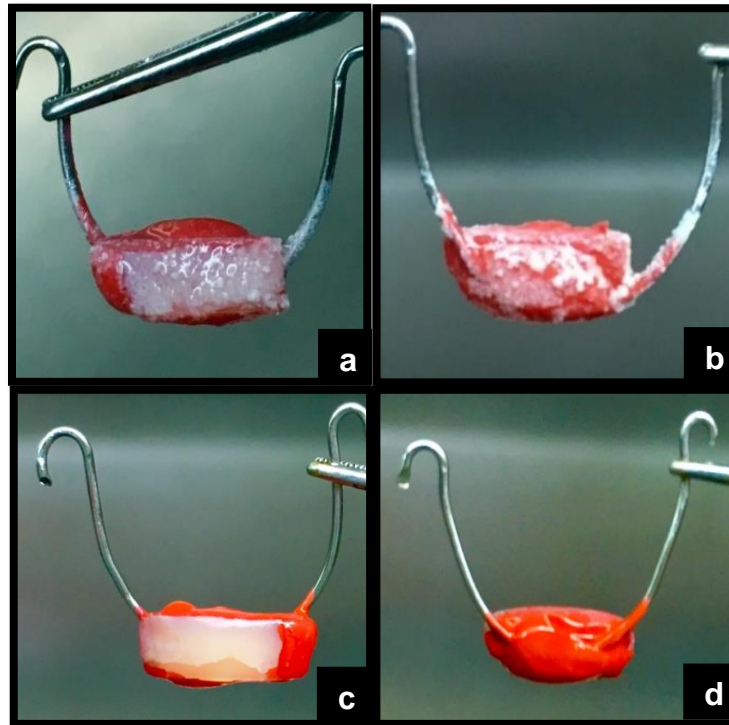


Figura 14. Imagen de bloques de esmalte al quinto día de exposición a sacarosa. a) Vista frontal de una muestra de esmalte con formación de biopelícula. b) Vista posterior de una muestra de esmalte con formación de biopelícula. c) Vista frontal de una muestra de esmalte sin formación de biopelícula. d) Vista posterior de una muestra de esmalte sin formación de biopelícula.

7.1.2 Controles de viabilidad y pureza de *S. mutans*

Las pruebas de viabilidad y pureza fueron positivas para todas las muestras de esmalte con inóculo de *S. mutans*. Como se observa en la Figura 15, se confirmó la existencia de colonias bacterianas en la placa de agar TYCS con morfología compatible con la descrita para *S. mutans* en todas las muestras en donde hubo formación de biopelícula.

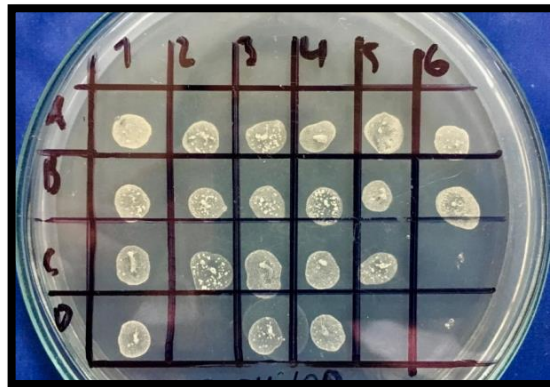


Figura 15. Imagen placa de agar TYCS usada para el control de viabilidad de *S. mutans* al quinto día de exposición a sacarosa.

Las muestras D2 fue retirada al tercer día de exposición a sacarosa para ser analizada al microscopio electrónico de barrido. La muestra D5 fue eliminada del experimento por contacto con superficie contaminada. Por esa razón no se observa crecimiento bacteriano en el control al quinto día de exposición (Figura 15).

Mediante microscopía electrónica de barrido, se evidencio la presencia de bacterias *S. mutans* inmersas en una matriz de exopolisacáridos (Figura 16).

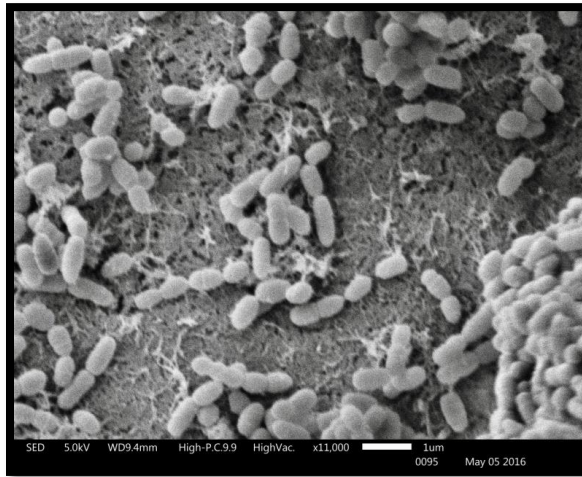


Figura 16. Imagen de microscopía electrónica de barrido de la superficie de un bloque de esmalte (D2) con bacterias de *S.mutans* (x11000).

7.2 Medición de pH

El pH promedio durante los 5 días de tratamiento desmineralizador para los caldos con formación de biopelícula fue de 4.4 y para los grupos control negativo de desmineralización (D6 y C6), 6.2 (Tabla 1).

Tabla 1. Promedios con desviación estándar de pH en medios con formación de biopelícula y grupos control.

Día	pH biopelícula	pH grupos control
1	5	6
2	5	6
3	4	6
4	4	7
5	4	6
Promedio	4.4 ± 0.5	6.2 ± 0.4

7.3 Mediciones de dureza

Las mediciones de dureza superficial en DS1, DS2 y DS3 de cada muestra de esmalte se encuentra en la Tabla 2 adjunta al Anexo 3.

Al comparar los valores de DS1 y DS2 de todas las muestras sometidas a tratamiento desmineralizador con formación de biopelícula (Figura 17), se encontró una disminución de la dureza superficial estadísticamente significativa ($p < 0.05$), con un promedio de 198.7 HV (95% IC: 174.6 – 182.5 $p = 0.02$). En cambio, las muestras C6 y D6, utilizadas como controles negativos de desmineralización en DS2 (sin formación de biopelícula), no presentaron variaciones entre sus valores de DS1 y DS2 (Figura 18).

La muestra C6, utilizada como control positivo de desmineralización en DS3, fue desmineralizada con ácido ortofosfórico al 37%, por eso se apreció una disminución en sus valores de dureza superficial entre DS2 y DS3 (Figura 18).

Al comparar los valores de DS2 y DS3 de las muestras tratadas con BlueRemin®, se observa un aumento en la dureza superficial estadísticamente significativo ($p < 0.05$) de todas las muestras una vez aplicado el agente remineralizador (Figura 17).

Las muestras A6 y B6 correspondientes al grupo control positivo de remineralización, tratadas con Flúor Silano y Fluoruro Diamino de Plata respectivamente, también presentaron un aumento en sus valores de dureza superficial estadísticamente significativo ($p < 0.05$) entre DS2 y DS3 (Figura 17).

Por último, la muestra D6, control negativo de remineralización (sin tratamiento remineralizador), almacenada en salivada artificial al igual que las otras muestras, no presento diferencias entre sus valores de D2 y DS3 (Figura 18).

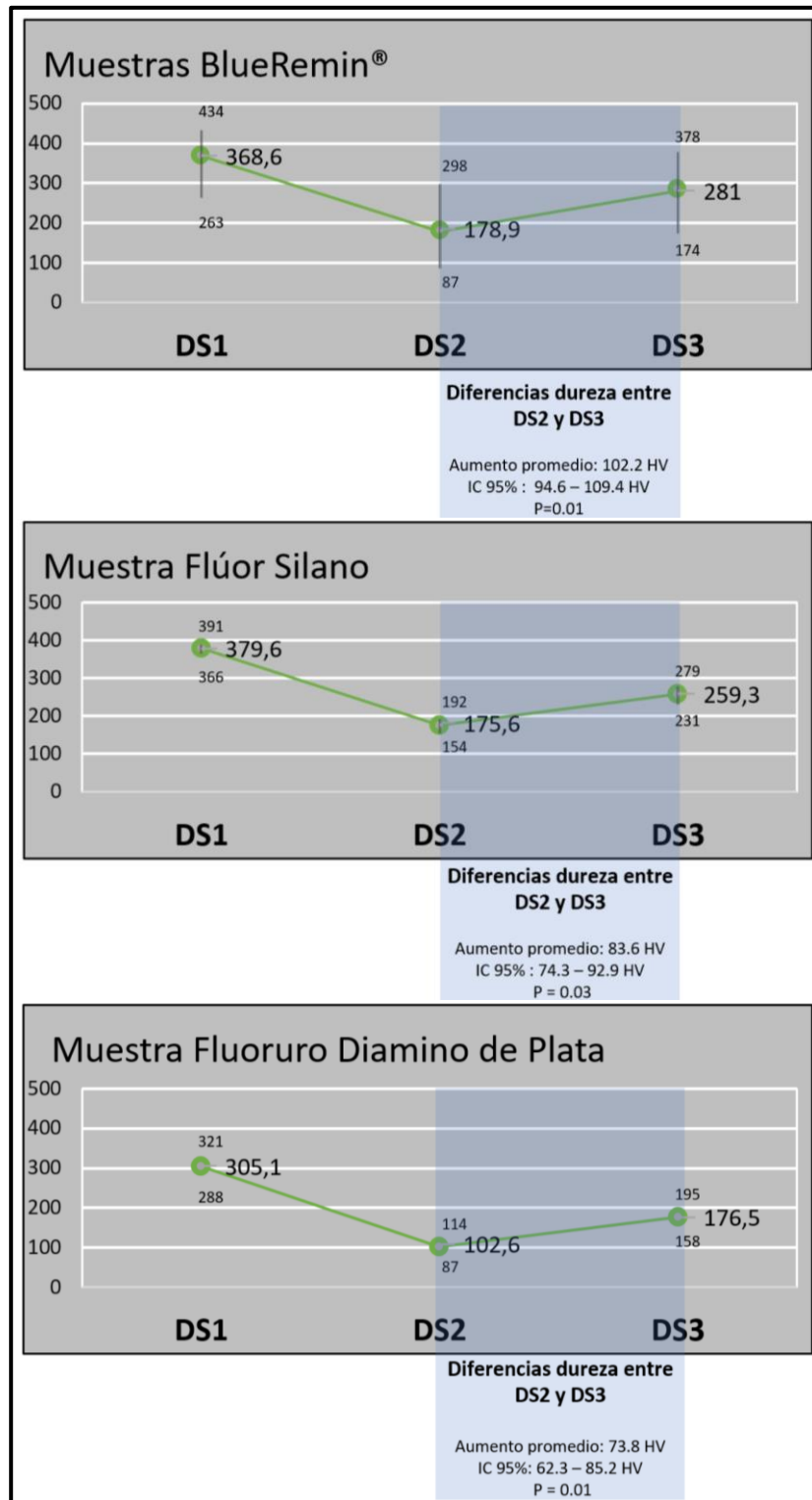


Figura 17. Gráficos con valores mínimos, máximos y promedios de dureza superficial en DS1, DS2 y DS3 para los especímenes de esmalte con formación de biopelícula y tratamiento remineralizador. Al pie de cada grafico se encuentra el promedio, intervalo de confianza (IC) y valor p (p) de las diferencias de durezas obtenidas entre DS2 y DS3 luego de la aplicación del agente remineralizante.

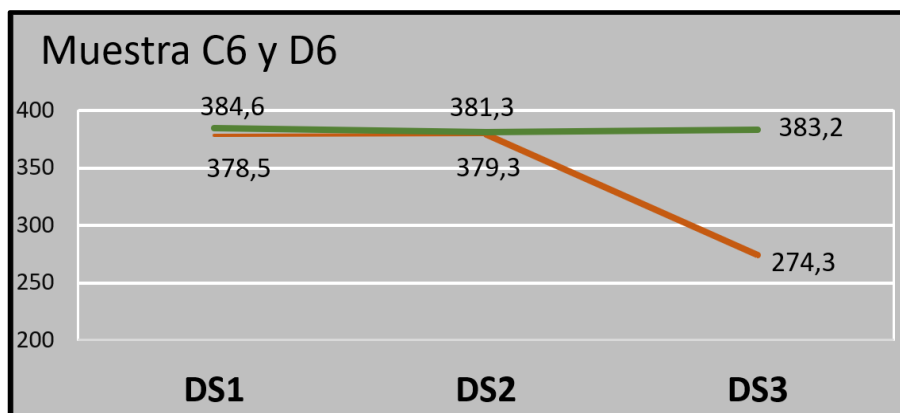


Figura 18. Gráficos con promedios de dureza superficial en DS1, DS2 y DS3 para las muestras sin formación de biopelícula. Ambas muestras fueron utilizadas como control negativo de desmineralización en DS2. En DS3 C6 (naranja) fue utilizada como control positivo de desmineralización y se desmineralizó con ácido ortofosfórico al 37%, en cambio, D6 (verde) se utilizó como control negativo de remineralización, por lo que no se le realizó tratamiento remineralizador.

Al comparar los aumentos de dureza superficial obtenidos por los especímenes de esmalte entre DS2 y DS3 con los distintos agentes remineralizantes, se observó que BlueRemin® fue el producto que logró un mayor aumento de dureza superficial (Figura 17), aun así, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis estadístico de Bonferroni. En la tabla se observan las diferencias entre promedios de aumentos de dureza de los distintos agentes remineralizantes y su correspondiente valor p.

Agentes remineralizantes	Diferencias de aumento de dureza
BlueRemin® vs Barniz de Flúor	18.3 HV $p = 1.00$
BlueRemin® vs FDP	28.2 HV $p = 0.64$
Barniz de Flúor vs FDP	9.8 HV $p = 1.00$

7.4 Cambios estructurales de las muestras de esmalte

La microscopía electrónica de barrido evidenció cambios estructurales evidentes entre las superficies de los bloques de esmalte sano, después de la exposición al modelo microbiológico y una vez aplicado el nuevo agente remineralizante BlueRemin®. Como se observa en la Figura 19, las muestras presentaron un aumento de la porosidad luego del tratamiento desmineralizador y una disminución de la porosidad después de la aplicación del agente remineralizante.

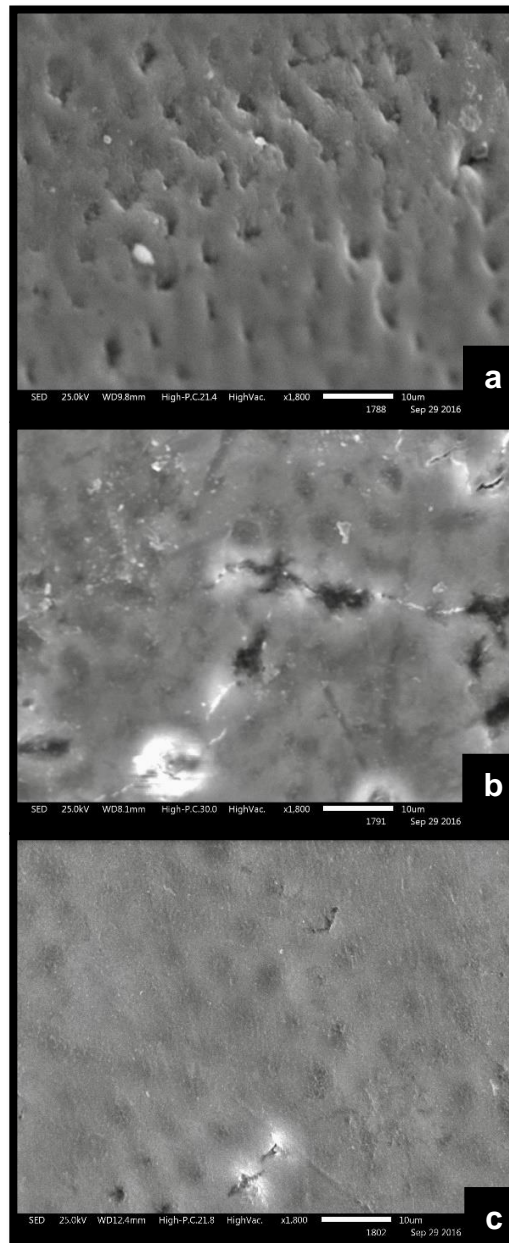


Figura 19. Espécimen de esmalte bajo microscopía electrónica de barrido (x1800). a) Inicial. b) Desmineralizado. c) Remineralizado con BlueRemin®.

VIII. DISCUSIÓN

La inducción química de lesiones de caries por medio de ácidos orgánicos es uno de los principales métodos utilizados para estudiar y aclarar los mecanismos implicados en la desmineralización y remineralización del esmalte. Un análisis mediante exposición directa a ácidos, que no incluye presencia bacteriana, no considera las interacciones que modulan el proceso cariogénico *in vivo*. Es por eso, que un modelo *in vitro*, que utiliza bacterias, es más representativo que sistemas químicos, de acuerdo con los modelos desarrollados por Shu y cols. (2000) y Steiner y cols. (2007).

A pesar de que aún nos encontramos con la imposibilidad de representar la totalidad de las interacciones ambientales que se llevan a cabo en la cavidad oral y que influyen en el desarrollo del proceso carioso, como son la presencia continua de saliva, la ausencia de periodos de remineralización y las interacciones entre distintos tipos de microorganismos, la utilización de un modelo bacteriano *in vitro* nos permite incluir uno de los factores relevantes en el proceso de formación de caries: Bacterias. Además, estos modelos permiten controlar y modificar factores experimentales en el estudio del desarrollo de la lesión de caries (Shu y cols. 2000, Seeman y cols. 2005, Steiner y cols. 2007).

Hernández y Sanabe (2015), compararon un modelo bacteriano monoespecie de *S. mutans* con uno multiespecie compuesto por *S. mutans* y *Lactobacillus acidophilus*. Ellos concluyeron que un modelo multiespecie genera mayor desmineralización que uno monoespecie. Esto se condice con la teoría de placa no específica postulada por Theilade (1986), en la que se refiere a la caries dental como el resultado de la actividad global de la microbiota total presente en la biopelícula. No obstante, modelos bacterianos monoespecie, como el utilizado en el presente trabajo, favorecen el estudio controlado de las propiedades de las especies bacterianas de forma individual (Marsh 1995).

La selección de *S. mutans* en este estudio, a pesar de no ser la especie bacteriana más abundante y metabólicamente activa en el proceso de formación de caries (Simón y cols. 2014), radica en que es la especie bacteriana con mayor número de resultados favorables respecto a la formación de biopelícula y desmineralización de esmalte en trabajos con modelos bacterianos similares, tales como los descritos por Deng y Ten Cate (2004), Seemann y cols. (2005), Steiner y cols. (2007), Ccahuana y Cury (2010) y Giacaman (2012).

En el presente estudio se evidenció que luego de la exposición de bloques de esmalte al modelo microbiológico monoespecie de *S. mutans*, los valores de dureza superficial de todas las muestras con formación de biopelícula disminuyeron de forma significativa y de manera concordante con el control positivo de desmineralización. Estos resultados se condicen con los obtenidos por Seemann y cols. (2005), Steiner y cols. (2007), Ccahuana y Cury (2010) y Giacaman (2012) en sus diseños experimentales de biopelícula de *S. mutans*, desmineralización y efectos en la dureza superficial del esmalte. La microdureza y contenido mineral de las muestras también disminuyó en comparación con la de un esmalte sano.

Es importante resaltar que además de la disminución en la dureza superficial de las muestras, fue posible evidenciar cambios de coloración y textura. De superficies brillantes, suaves y duras pasaron a superficies blanquecinas opacas, rugosas y blandas, todas características compatibles con una lesión inicial de caries, tal y como fue descrito por Thylstrup y Fejerskiv (1988), Balda y cols. (1999) y Kidd y Fejerskov (2004). Además, mediante microscopia electrónica de barrido, se apreció un aumento en la porosidad de la estructura del esmalte, también característica de una lesión inicial de caries, similar a lo obtenido por Balda y cols. (1999). En cambio, las muestras del grupo control negativo de desmineralización no presentaron formación de biopelícula ni cambios en la coloración y textura al ojo desnudo, y mantuvieron sus superficies sin variaciones de dureza superficial. Estos resultados validan el modelo bacteriano monoespecie de *S. mutans in vitro* en la formación de biopelícula y lesiones de caries sobre especímenes de esmalte.

En cuanto a las investigaciones para el tratamiento de la enfermedad de caries, estas se han enfocado en el desarrollo de agentes químicos que permitan la prevención y/o el tratamiento no invasivo de las lesiones. La mayoría de estos agentes buscan favorecer el proceso de remineralización y fortalecer la estructura del diente, disminuyendo así la susceptibilidad al ataque ácido y consecuente pérdida de tejido dentario.

Varios estudios han demostrado que los tratamientos con agentes a base de flúor son eficientes y logran remineralizar las lesiones iniciales de caries: Geiger y cols. (1992) concluyeron que se podía conseguir una reducción significativa de las lesiones iniciales de caries durante el tratamiento de ortodoncia a través del uso de colutorios a base de flúor. Gómez y cols. (1993) observaron que cuando hay flúor en saliva, la dureza superficial de lesiones incipientes aumentaba entre un 48-59%, en comparación al 17% alcanzado en su ausencia. Marinho y cols. (2002) determinaron que el uso combinado de fluoruros tópicos en forma de pastas dentales, colutorios, barnices y geles, son efectivos en la prevención y tratamiento de las lesiones de caries.

Así mismo, Benson y cols. (2005) demostraron que era posible conseguir una reducción significativa de lesiones de mancha blanca en tratamientos de ortodoncia a través del uso de diferentes agentes a base de flúor. A su vez, Rodríguez y cols. (2005) observaron un aumento de la dureza superficial del esmalte sometido a un modelo *in vitro* de desmineralización luego de la exposición a diferentes dentífricos a base de flúor en distintas concentraciones. Posteriormente, Rosenblatt y cols. (2009), en una revisión sistemática, concluyen que el Fluoruro Diamino de Plata es un agente eficiente en la prevención y remineralización de lesiones de caries.

Más recientemente, Chaudhary (2013) al evaluar los cambios de microdureza superficial en esmalte desmineralizado tratado mediante dentífricos con y sin flúor, observaron que el mayor grado de recuperación de microdureza superficial se logró mediante el tratamiento con fluoruro de estaño. Finalmente, Byeon y Lee (2016) evaluaron el efecto de la aplicación unitaria y combinada de agentes a base flúor,

concluyendo que aplicaciones combinadas tienen mejores efectos en la remineralización y fortalecimiento de las superficies del esmalte.

Todos estos resultados son concordantes con los obtenidos en el presente estudio, en donde, luego de la aplicación del agente remineralizante BlueRemin®, todos los especímenes de esmalte desmineralizados experimentaron un aumento significativo en los valores de dureza superficial, al igual que los controles positivos de remineralización tratados con Flúor Silano y Fluoruro Diamino de Plata. El control negativo de remineralización, donde no se aplicó ningún agente remineralizante, pero que fue incubado en saliva artificial al igual que el resto de las muestras, no experimentó variaciones de dureza superficial. Esto sugiere que el aumento de dureza de las muestras se puede atribuir a la acción de los agentes remineralizantes y no a los iones presentes en la saliva artificial.

La observación de las superficies de esmalte mediante microscopio electrónico de barrido nos permitió evidenciar una disminución de la porosidad del esmalte desmineralizado mediante el modelo bacteriano monoespecie de *S. mutans*, luego de la aplicación de BlueRemin®.

En cuanto a la eficacia de los distintos agentes remineralizantes utilizados en este experimento, BlueRemin® alcanzó un mayor aumento de la dureza superficial del esmalte desmineralizado, en comparación con Flúor Silano y Fluoruro Diamino de Plata. Aun así, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Por lo tanto, no se evidenció diferencias en la capacidad remineralizante de estos tres agentes.

Cabe mencionar que en el presente estudio no se analizó en forma cuantitativa la ganancia de minerales de las muestras de esmalte luego de la aplicación de los agentes remineralizantes. No obstante, existe una relación directa entre microdureza y remineralización (Kodaka y cols. 1992, Salehzadeh 2015). Para abordar este problema, se sugiere la medición cuantitativa de la remineralización de

las muestras a través de un análisis mediante microradiografía transversa (Magalhaes y cols. 2009).

Finalmente, esta investigación se centró en evaluar la capacidad remineralizante de BlueRemin® sobre especímenes de esmalte sometidos a un tratamiento de desmineralización mediante un modelo bacteriano monoespecie de *S. mutans in vitro*. Los resultados favorables obtenidos de este trabajo, en el cual se demuestra la capacidad remineralizante de BlueRemin®, permiten el inicio de una línea de investigación para evaluar las propiedades y futuras aplicaciones clínicas de este agente. Esto con el objetivo a futuro de poner a disposición del clínico una nueva alternativa para el tratamiento no invasivo de la enfermedad de caries dental.

XI. CONCLUSIONES

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

1. El modelo bacteriano monoespecie de *S.mutans* es eficiente en el proceso de desmineralización superficial del esmalte.
2. Debido a que la aplicación de BlueRemin® generó un aumento de la dureza estadísticamente significativo ($p < 0.05$), y una disminución de la porosidad en todas las muestras de esmalte, se sugiere que posee capacidad remineralizante.
3. BlueRemin® podría tener una capacidad remineralizante equivalente a Barniz de Flúor y Fluoruro Diamino de Plata.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adair S. (2006). Evidence-based use of fluoride in contemporary pediatric dental practice. *Pediatric Dentistry*; 28(2): 133-141.

Aoba T. (2004). Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries. *Oral Dis.*; 10(5): 249-257.

Arteaga O., Urzúa I., Espinoza I., Muñoz A., Mendoza C. (2009). Prevalencia de Caries y Pérdida de Dientes en Población de 65 a 74 Años de Santiago, Chile. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabíl. Oral*; 2(3): 161-166.

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: 284-287.

Bardow A., Lagerlöf F., Nauntofte B., Tenovuo J. (2008). The role of saliva. *Dental caries*; 25: 156-167.

Beltrán E., Goldstein J. (2000). Fluoride varnishes: A review of their clinical use, cariostatic mechanism, efficacy and safety. *Jada*; 131: 23-35.

Bennick A., Cannon M. (1978). Quantitative Study of the Interaction of Salivary Acidic Proline-Rich Proteins with Hydroxyapatite. *Caries Res.*; 12: 159-169.

Bouschlicher M., Rueggeberg F., Wilson B. (2004). Correlation of bottom-to-top surface microhardness and conversion ratios for a variety of resin composite compositions. *Oper. Dent.*; 29(6): 698-704.

Bradshaw D., Marsh P. (1999). Use of continuous flow techniques in modeling dental plaque biofilms. *Methods Enzymol.* 310; 279-296.

Busscher H., Van der Mei H. (1997). Physicochemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv. Dent Res.*; 11: 24-32.

Buzalaf M., Pessan J., Honório H., Ten Cate J. (2011). Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr. Oral Sci*; 22: 97-114.

Byeon S., Lee M., Bae T. (2016). The effect of different fluoride application methods on the remineralization of initial carious lesions. *Restor. Dent. Endod.*; 41(2): 121-129.

Castellanos J., Marín L., Úsuga M., Castiblanco G., Martignon S. (2013). Enamel Remineralization under the Current Caries Understanding. *Univ. Odontolo.*; 32(69): 49-59.

Ccahuana R., Cury J. (2010). *Streptococcus mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Braz. Oral Res.*; 24: 135-141.

Cochrane N., Cai F., Huq N., Burrow M., Reynolds E. (2010). New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J. Dent Res.*; 89(11): 1187-1197.

Davey M., O'toole G. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol, Mol. Biol. Rev.*; 64: 847-867.

Deng D., Ten Cate (2004). Demineralization of dentin by *Streptococcus mutans* biofilm grown in the constant depth fil fermentor. *Caries Res.*; 38: 54-61.

Donald R., Pradeep P., Wendelin J. (2011). *Ciencia e ingeniería de materiales*; Cengage Learning; 6(6): 221-223.

Elderton R. (1990). Clinical studies concerning re-restoration of teeth. *Adv. Dent. Res.*; 4: 4-9.

Elliot J., Holcomb D., Young R. (1985). Infrared determination of degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel. *Calcified Tissue International*; 37: 372-375.

Eanes E. (1979). Enamel apatite: Chemistry, structure and properties. *J Dent Res.*; 58(2): 829-836.

Fejerskov O., Kidd E. (2005). *Dental caries: the disease and its clinical Management*. Oxford (UK): Blakswell Munksgaard; 2: 4-6.

Filho C., Lima K. (2008). Effectiveness of the use of topical fluoride and of toothbrushing in the control of caries produced “*in vivo*”: Systematic review. *Avances en odontoestomatología*; 24(4): 277-288.

Fontana M., Douglas A., Young X., Mark S., Nigel B., Pitts M. (2010). Defining Dental Caries for 2010 and Beyond. *Current Concepts in Cariology*; 54: 469-478.

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

Garcia R., Scougall J., Contreras R., Sakagami H., Baeza J., Flores R. y cols. (2013). Cytotoxic impact of silver and silver diamine fluoride in six oral cells culture. *Revista ADM*; 70(3): 134-139.

Geiger A., Gorelick L., Gwinnett A., Benson B. (1992). Reducing white spot lesions in orthodontic populations whit fluoride rising. *Am. J. Orthd. Dentofacial*; 101(5): 403-407.

Geim A., Novoselov K. (2007). The rise of graphene. *Nature Materials*; 6: 183-191.

Giacaman R. (2012). Anticaries effect of an antioxidant rich apple concentrate on enamel in an experimental biofilm demineralization model. *J Appl. Microbiol.*; 117(3): 846-853.

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

Hellwig E., Lennon A. (2004). Systemic versus topical fluoride. *Caries Research*; 38: 258-262.

Hernandez P., Sanabe M. (2015). Different bacterial model for *in vitro* induction of non cavitated enamel caries like lesions: Microhardness and polarized light microscopy analyses research and technique. *Micros. Res. Tech*; 1: 2-7.

Jenkinson H., Lamont R. (1997). *Streptococcal* adhesion and colonization. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*; 8: 175-200.

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

Kidd E., Fejerskov O. (2004). What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J. Dent Res.*; 83: 35-38.

Kodaka T., Debari K., Yamada M., Kuroiwa M. (1992). Correlation between microhardness and mineral content in sound human enamel. *Caries Res.*; 26(2): 139-141.

Kolenbrander P., London J. (1993). Adhere today, here tomorrow: Oral bacteria adherent. *J. Bacteriol.*; 174: 3247-3252.

Konig K. (2004). Clinical manifestation and treatment of caries from 1953 to global changes in the 20 centuries. *Caries Rex*; 38: 168-174.

Krzysciak W., Jurczak A., Koscielniak D., Bystrowska B., Skalniak A. (2014). The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *J. clin. microbiol infect dis*; 33: 499-515.

Lemos A., Robert G., Quivey C., Hyun K. (2013). *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm?. *Microbiology*; 159: 436-445.

Lissera R., Yankilevich E., Battellino L. (1998). Velocidad de erosión y factores que afectan la desmineralización de dientes humanos *in vitro*. *Acta hysiol Pharmacol Ther Latinoamer*; 48: 73-82.

Lussi A., Hellwig E., Klimek J. (2011). Fluorides - mode of action and recommendations for use. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*; 11: 1030-1042.

Lynch R., Smith S. (2012). Remineralization Agents: New and Effective or Just Marketing Hype?. *Adv Dent Res*; 24(2): 63-7.

Magalhães A., Moron B., Comar L., Wiegand A., Buchalla W. y cols. (2009). Comparison of Cross-Sectional Hardness and Transverse Microradiography of Artificial Carious Enamel Lesions Induced by Different Demineralizing Solutions and Gels. *Caries Res*; 43: 474-483.

Majithia U., Venkataraghavan K., Choudhary P., Trivedi K., Shah S y cols. (2016). Comparative evaluation of application of different fluoride varnishes on artificial early enamel lesion: An *in vitro* study. *Indian J. Dent. Res*; 27: 521-527.

Marinho V., Higgins J., Logan S., Sheiham A. (2002). Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane database syst. Rev*; 3: 14-279.

- Marsh P. (1995). Dental plaque as biofilm. *J. Industrial Microbiology*; 15: 169-175.
- Marsh P., Nyvad B. (2008). The oral microflora and biofilms on teeth. *Dental caries*: 45; 163-85.
- Melchorra F., Guadalupe L., Battellino J. (2007). Película adquirida salival: Revisión de la literatura. *Acta odontológica venezolana*; 45(3): 479-486.
- Mihu C., Ducea D., Melincovici C., Bocs B. (2008). Tooth enamel, the result of the relationship between matrix proteins and hydroxyapatite crystals. *Appl. Med. Inform.*; 23(3): 68-72.
- Minsal (2007): Diagnóstico de situación de salud bucal. Chile.
web.minsal.cl/portal/url/item/7dc33df0bb34ec58e04001011e011c36.pdf. Fecha de acceso: 22/06/2017.
- Nanci A. (2003). Enamel: Composition, formation and structure. *Cate's Oral Histology: Development, structure, and function*; 6: 145-191.
- Organización Mundial de la Salud (OMS): Salud Bucodental, nota informativa n°318 Abril 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>. Fecha de acceso: 22/03/2017.
- Poyato M., Segura J., Rios V., Bullón P. (2011). La placa bacteriana: Conceptos básicos para el higienista bucodental. *Periodoncia*; 11(5): 149-164.
- Robinson C., Kirkham D., Stonehouse N., Shore R. (1989). Control of crystal growth during enamel maturation. *Connect Tissue Res.*; 22(4): 139-145.
- Rosenblatt A., Stamford T., Niederman R. (2009). Silver diamine fluoride: a caries "silver-fluoride bullet". *J Dent Res.*; 88: 116-125.

Salehzadeh E., Mazaheri R., Pischevar L. (2015). Effects of treatment whit various remineralizing agents on the microhardness of demineralized enamel Surface. J. Dental Res.; 9(4): 239-245.

Selwitz R., Amid I., Nigel P. (2007). Dental Caries. The Lancet; 369: 8-59.

Seeman 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. Carie Res.; 39(3): 185-190.

Shu M., Wong L., Sissons C. (2000). Development of multi-species consortia biofilms of oral bacteria as an enamel and root caries model system. Arch. Oral. Biol.; 45(1): 27-40.

Simón A., Miriam G., Mira A. (2014). Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. Journal of Oral Microbiology; 6: 24-29.

Simmer J., Fincham A. (1995). Molecular mechanisms of dental enamel formation. Crit. Rev. Oral Biol. Med.; 6(2): 84-108.

Soto L., Tapia R. (2007). Diagnóstico nacional de salud bucal de adolescentes de 12 años y evaluación del grado de cumplimiento de los objetivos sanitarios de salud bucal 2000-2010. ISBN; 978: 8-13.

Steiner C., Maciel F., Lidiey K., Rodriguez L. (2007). An *in vitro* microbial model of producing caries like lesions on enamel. Braz. J. Oral Sci; 6(22): 1392-1396.

Ten Cate J. (1990). *In vitro* studies on the effects of fluoride on de- and remineralization. J. Dent Res.; 69: 614-619.

Ten Cate J. (2004). Fluorides in caries prevention and control: Empiricism or science. *Caries Res.*; 38: 254-257.

Thylstrup A., Fejerskov O. (1998). *Caries*. Edit. Doyma; 1: 338-356.

Tsukuma K., Shimada M. (1985). Strength, fracture toughness and Vickers hardness of CeO₂-stabilized tetragonal ZrO₂ polycrystals. *J. Mater Sci*; 20: 1178-1184.

Urzua I., Moncada G. (2008). *Cariología clínica. Bases preventivas y restauradoras*. ISBN.; 1: 125-139.

Walsh T., Worthington H., Glenny A., Appelbe P., Marinho V. y cols. (2010). Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.*; 7: 11-23.

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 Dent Oral Epidemiol*; 32(1): 9-18.

Whittaker C., Klier C., Kolenbrabder P. (1996). Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev. Microbiol.*; 50: 513-552.

Yamamoto A., Honma R., Sumita M. (1998). Cytotoxicity evaluation of 43 metal salt using murine fibroblast and osteoblastic cells. *J. Biomed. Mater Res.*; 39(1): 331-340.

Zamora S., Borda C., De la Cruz R., Menacho S., Ramos G. y cols. (2006). The fluoride in the prevention of decay in the temporary teething. Fluorated varnishes. *Odontol. Sanmarquina*; 9(1): 31-35.

Zhan L., Liu T., Fu M. (1999). A study on the conjugation of *Streptococcus mutans* adhesins and its salivary receptors. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*; 34:19-21.

Zhu Y., Murali S., Cai W., Li X., Won Suk J., Potts J. y cols. (2010) Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. *Advanced Materials*; 22: 3906-3924.

ANEXO 1: Acta de aprobación de protocolo de investigación



Ed-19 de octubre 2016

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 esmalte desmineralizado " 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

Sra. Paulina Navarrete
Secretaria CEC

Dr. Marco Cornejo
Vice Pdte. CEC

Dra. Weronika Well
Miembro permanente CEC

Dr. Mauricio Baeza
Miembro permanente CEC

Sr. Roberto La Rosa
Miembro permanente CEC

Dr. Alfredo Molina
Miembro Alterno CEC

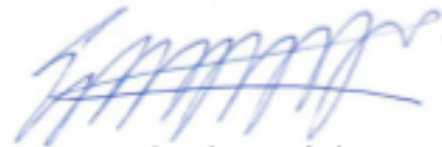
3. Fecha de Aprobación: 24-10-2016
4. Título completo del proyecto: "Efecto remineralizante de un agente a base de flúor y grafeno, sobre bloques de esmalte desmineralizado " Halley 2015.
5. Investigador responsable: Dr. Mario Díaz Dosque.
6. Institución Patrocinante: Proyecto de Innovación Open Beauchef 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:

- 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 esmalte desmineralizado" Halley 2015.



Dr. Eduardo Fernández G.
Presidente CEC



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

ANEXO 2: Consentimiento informado.



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 esmalte desmineralizado"

Investigador Principal: Dr. Mario Díaz Dosque
Instituto de investigaciones en ciencias odontológicas
Fono: +56 9 86249695 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 esmalte desmineralizado.

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: _____



ANEXO 3

Tabla 2. Valores de dureza superficial de Vickers de los bloques de esmaltes en zona control (DS1), luego de ser desmineralizados mediante un modelo bacteriano mono especie de *S.mutans* (DS2) y luego de la aplicación de los agentes remineralizantes (DS3). Las muestras A6 y C6 fueron utilizadas como control negativo de desmineralización en DS2. En DS3 C6 fue utilizada como control positivo de desmineralización y se desmineralizó con ácido ortofosfórico al 37%, en cambio, D6 se utilizó como control negativo de remineralización, por lo que no se le realizó tratamiento remineralizador.

Medición de dureza superficial de Vickers				
Muestra	Control (DS1)	Desmineralizado (DS2)	Remineralizado (DS3)	Tratamiento
A1	368,17	154,5	278,5	BlueRemin®
A2	401,83	218,5	337,67	BlueRemin®
A3	312,16	115,33	211,33	BlueRemin®
A4	288,83	109,17	197,17	BlueRemin®
A5	408,83	208,67	304,83	BlueRemin®
A6	305,17	102,67	176,5	Flúor Silano
B1	413,17	214,33	337,67	BlueRemin®
B2	301,17	106,17	301,17	BlueRemin®
B3	346	169,17	285,17	BlueRemin®
B4	380,67	183,17	260,83	BlueRemin®
B5	384,17	211,17	319,5	BlueRemin®
B6	379,67	175,67	259,33	Fluoruro Diamino de Plata
C1	415,5	226,67	344,67	BlueRemin®
C2	395,67	238,33	341,83	BlueRemin®
C3	348,83	121,67	206,33	BlueRemin®
C4	348,5	124,83	199,33	BlueRemin®
C5	382	164,67	255,33	BlueRemin®
C6	378,5	379,33	274,33	Ácido ortofosfórico 37%
D1	416	212,33	339	BlueRemin®
D2	386,33	Retirada para microscopía electrónica		
D3	404,67	286,17	355,17	BlueRemin®
D4	318,67	157	183,17	BlueRemin®
D5	359,5	Contaminada		
D6	384,67	381,33	383,26	Sin tratamiento