



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGIA RESTAURADORA
ÁREA DE CARIOLOGÍA**

“Modelo in situ de caries dental: Estudio piloto”

Fernanda Carolina Muñoz Sepúlveda

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Gonzalo Rodríguez Martínez

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Rodrigo Cabello Ibacache

**Adscrito a Proyecto FIOUCH 17/015
Santiago – Chile
2019**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA RESTAURADORA
ÁREA DE CARIOLÓGÍA**

“Modelo in situ de caries dental: Estudio piloto”

Fernanda Carolina Muñoz Sepúlveda

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Gonzalo Rodríguez Martínez

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Rodrigo Cabello Ibacache

**Adscrito a Proyecto FIOUCH 17/015
Santiago - Chile
2019**

Agradecimientos

En primer lugar a mi tutor, Dr. Gonzalo Rodríguez por su buena disposición, simpatía, compromiso, cariño y entrega para guiarme durante este proceso, pero especialmente por haber creído y confiado en mí parte de su proyecto. Al Dr. Rodrigo Cabello por su motivación, franqueza e inspiración.

A mis padres y hermana Javiera por ser incondicionales, por el profundo amor que me han entregado, por acompañarme, apoyarme y guiarme en esta vida. A mi familia, abuelos, tíos y primos por su preocupación, comprensión y la plena confianza que me han entregado y demostrado a lo largo de este camino. Ustedes son mi felicidad.

A mis amigos, quienes me acompañaron durante este recorrido tanto dentro como fuera de la universidad, por su apoyo, por la alegría y por su generosidad.

A cada uno de los voluntarios que participaron en esta investigación, por creer en el proyecto, por su compromiso desinteresado y responsabilidad. Sin ellos esto no habría sido posible.

A los pacientes por su confianza, compromiso y por creer en mis capacidades.

A mi compañero de aventuras, por tu amor y apoyo sin condiciones y por todas las vidas en las que hemos estado juntos y las que vendrán.

A mis angelitos por protegerme, acompañarme e interceder por mí siempre que lo he necesitado.

¡A todos ustedes infinitas gracias, los tendré por siempre presentes en mi corazón!

ÍNDICE

I. RESUMEN	7
II. MARCO TEÓRICO	9
INTRODUCCIÓN	9
CARIES DENTAL	10
ESMALTE DENTAL, COMPOSICIÓN E HISTOLOGÍA.	11
PROCESO DE DESMINERALIZACIÓN- REMINERALIZACIÓN	12
MODELOS DE CARIES	13
MODELOS <i>IN VITRO</i>	14
MODELOS <i>IN VIVO</i>	15
MODELOS <i>IN SITU</i>	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
III. HIPÓTESIS.	26
IV. OBJETIVO GENERAL.	26
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	26
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	27
1) PARTICIPANTES	27
2) PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DENTARIAS	29
3) DISEÑO Y CONFECCIÓN DE DISPOSITIVO INTRAORAL	29
4) DISEÑO EXPERIMENTAL	31
5) INSTRUCCIONES PARTICIPANTES	32
6) EVALUACIÓN DE COMPROMISO Y CUMPLIMIENTO DE PARTICIPANTES	32
7) MEDIDAS DE DESENLACE Y PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS	33
I. MEDICIÓN DENSIDAD MINERAL- MICRO- CT	33

II. MEDICIÓN DE DUREZA SUPERFICIAL	36
III. EVALUACIÓN ESTRUCTURAL	37
IV. COMPARACIÓN DE VARIABLES CUALITATIVAS	38
V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	38
VII. RESULTADOS	40
1. MEDICIÓN DENSIDAD MINERAL- MICRO- CT	40
EVALUACIÓN CUALITATIVA	40
EVALUACIÓN CUANTITATIVA	43
2. MEDICIONES DE DUREZA	43
3. EVALUACIÓN ESTRUCTURAL	44
VIII. DISCUSIÓN	46
IX. CONCLUSIONES	53
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
XI. ANEXOS	67
ANEXO 1. ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN (COMITÉ ÉTICO- CIENTÍFICO)	67
ANEXO 2. FICHA CLÍNICA	70
ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARTICIPANTES	73
ANEXO 4. CONSENTIMIENTO DONACIÓN DE TERCEROS MOLARES	77
ANEXO 5. INFORMACIÓN DE ESTUDIO PARA PARTICIPANTES	79
ANEXO 6. EVALUACIÓN DE CUMPLIMIENTO	82
ANEXO 7. EVALUACIÓN DE COMPROMISO Y CUMPLIMIENTO FINAL	83

I. RESUMEN

Introducción: La caries dental corresponde a la enfermedad crónica no transmisible más prevalente a nivel mundial. Se manifiesta como un proceso continuo, en el que los estadios de la enfermedad se suceden aumentando el grado de severidad y destrucción, estos van desde cambios subclínicos a la pérdida franca de la estructura dentaria. La complejidad del entorno oral y los problemas éticos asociados a su estudio en personas han encauzado la búsqueda y desarrollo de modelos que simulen el microcosmos oral humano.

El propósito de este estudio piloto, es desarrollar un modelo de caries *in situ* con un protocolo estandarizado, en el que se establezcan diferencias en la densidad mineral, microdureza superficial y cambios estructurales de bloques de esmalte humano insertos sometidos a la acción tópica de sacarosa al 20%.

Materiales y métodos: Voluntarios de edades entre 24 y 29 años participaron en el estudio piloto de un modelo experimental *in situ*. Los voluntarios utilizaron durante 14 días un aparato palatino removible con 5 bloques de esmalte humano. Cada dispositivo intraoral se dividió en dos grupos, uno expuesto a la acción tópica de sacarosa al 20% aplicada cada 2 horas, logrando 8 aplicaciones al día y un grupo control. La desmineralización de los bloques fue analizada mediante micro-CT, microdureza de Vickers y microscopía electrónica de barrido. Los valores obtenidos fueron comparados mediante test de Student y considerados significativos cuando $p < 0,05$.

Resultados: Los bloques de esmalte expuestos a la acción tópica de sacarosa presentaron una disminución de la densidad mineral tanto de forma cualitativa como cuantitativa ($p < 0,001$). La pérdida de la dureza superficial fue de 48%, revelando una microdureza significativamente menor al grupo control ($p < 0,001$). Se evidenciaron cambios estructurales entre los grupos.

Conclusiones: Existen diferencias en la densidad mineral, microdureza superficial y cambios estructurales de bloques de esmalte dental insertos en un modelo de caries *in situ* expuesto a la acción tóxica de sacarosa al 20% versus esmalte dental no expuesto. El modelo estudiado posee la capacidad de replicar el proceso biológico de la caries dental y puede ser utilizado como plataforma para futuras investigaciones.

II. MARCO TEÓRICO

Introducción

Desde sus inicios el ser humano siempre ha querido explicar los diversos fenómenos que ocurren en su vida diaria, atribuyéndole en un principio significado divino, para luego avanzar hacia un conocimiento derivado de la ciencia. Es así como el estudio de las enfermedades ha evolucionado en el tiempo desde una etapa observacional a una etapa experimental (Ismail y *co/s.*, 2001).

En este contexto el estudio de la caries dental no ha sido la excepción. En la antigüedad su etiología fue atribuida a un “gusano” que se introducía en el diente y generaba dolor (Weinberger, 1948). Actualmente se reconoce como una enfermedad compleja, multifactorial y dinámica, en la que se produce un desequilibrio entre hospedero, microorganismos y tejidos duros (Kidd y Fejerskov 2004; Featherstone, 2008)

La caries dental se puede manifestar en cualquier etapa de la vida y se encuentra presente en todos los grupos etarios de la población. Su inicio es en los primeros años de vida y su prevalencia y severidad va en aumento con la edad. Estudios epidemiológicos en nuestro país indican que la prevalencia de caries en niños a los 2 años es de 16,8%, a los 4 años aumenta a 49,6% y alcanza un 70,4% a los 6 años (MINSAL, 2010). Su expresión en la población adulto mayor alcanza casi un 100% (Gamonal, 1996; Arteaga y *co/s.*, 2009) y es la principal causa de pérdida dentaria en nuestro país (Arteaga y *co/s.*, 2009.).

Históricamente su tratamiento ha sido remover el tejido desmineralizado afectado por la enfermedad y luego poner en su lugar un material sintético para devolver anatomía, función y estética; pero este enfoque restaurador no ha demostrado ser capaz de realizar un control real de la enfermedad. De hecho, el más reciente informe Global Burden of Disease (Murray y *co/s.*, 2012), reveló que las lesiones de

caries no tratadas en los dientes permanentes es la enfermedad humana más prevalente en todo el mundo, mientras que las lesiones de caries no tratadas en los dientes primarios ocupan el décimo lugar.

La complejidad del entorno oral y los problemas éticos asociados con el estudio de enfermedades bucales en los seres humanos han encauzado la búsqueda y desarrollo de modelos que simulen el microcosmos oral humano. El desarrollo de modelos de caries ha tenido un importante rol en el estudio de esta patología, ayudando a establecer su etiología multifactorial, comprender los complejos procesos que se desarrollan y los factores que la afectan tanto en su inicio como en su progresión.

Caries Dental

La caries dental ha sido descrita como una enfermedad no transmisible, crónica, de avance lento, en la mayoría de los individuos, prevenible, pero que rara vez es auto limitada (Selwitz y cols., 2007; Tweetman, 2018). Esta se manifiesta como un proceso continuo, en el que los estadios de la enfermedad se caracterizan por una severidad y destrucción dentaria creciente, que van desde cambios subclínicos a lesiones de caries donde la dentina está francamente involucrada, ya sea en presencia de una superficie intacta o de una cavitada (Featherstone 2004; Kidd y Fejerskov 2004). Si bien los signos de la desmineralización se observan en los tejidos duros dentarios, el inicio de esta afección se genera mucho antes dentro del biofilm (Selwitz y cols., 2007).

El concepto moderno de caries la clasifica como una enfermedad compleja, en la que es necesario considerar la forma en la que están involucrados componentes conductuales, sociales y psicológicos, así como también elementos biológicos (Pitts y cols., 2017). Esta surge de la acción concertada de diferentes factores tales como: interacciones y tipo de polimicrobios presentes en el biofilm; características propias del hospedero como cantidad y capacidad buffer de la saliva, factores genéticos y sistema inmune; comportamientos individuales que confieren riesgo, vinculados a

dieta y hábitos de higiene, así como también influencias ambientales relacionadas con nivel socioeconómico, educación, acceso a salud, entre otros. (Selwitz y cols., 2007; Philip y cols., 2018).

Las lesiones de caries son producto de la desmineralización progresiva y localizada de los tejidos duros del diente, debido a la baja del pH provocada por la metabolización de azúcares fermentables que tiene lugar en el biofilm activo presente en la zona afectada. Se desarrollan en sitios relativamente protegidos de la influencia mecánica de lengua, mejillas, alimentos abrasivos y, no menos importante, el cepillado, lo que permite que la biopelícula se acumule por periodos prolongados y que su composición madure con el tiempo. (Fejerskov y Kidd, 2008).

En sus estadios iniciales se presentan signos a nivel ultra estructural de desmineralización directa de la superficie externa del esmalte, que se observan como un aumento en el tamaño de los espacios intercristalinos por la disolución parcial de la periferia de los cristales de hidroxiapatita. Esta disolución y cambios ultra estructurales con el tiempo avanza hacia el esmalte subsuperficial y se hace visible clínicamente como una lesión de mancha blanca (Kidd y Fejerskov, 2004; Pitts y cols., 2017).

Esmalte dental, composición e histología.

La hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, es el principal constituyente del esmalte, representa un 96% de su peso total, ésta posee una naturaleza estructural y química que permite sustituciones iónicas en su red cristalina. Las principales modificaciones son la sustitución de iones de calcio por magnesio y sodio, reemplazo de sitios de hidroxilo con fluoruro y cloruro, y la sustitución de sitios de fosfato e hidroxilo con carbonato (Abou Neel y cols., 2016). Estas modificaciones generan variaciones en las propiedades de la hidroxiapatita, por ejemplo la incorporación de carbonato (CO_3^{2-}) altera la estructura cristalina aumentando su solubilidad (Legeros y cols., 1967).

Histológicamente, el esmalte se compone de prismas o varillas, los cuales se forman durante la amelogénesis, en la que los ameloblastos depositan una matriz orgánica que luego se rellena con mineral inorgánico (Ten Cate y Featherstone, 1991). Estos prismas recorren el esmalte en todo su espesor desde el límite amelodentinario a la superficie externa o libre en contacto con el medio bucal (Nanci y Ten Cate, 2008).

Los prismas están separados entre ellos por una delgada capa de prisma orgánico y por esmalte interprismático (Cuy y cols., 2002). La matriz orgánica comprende aproximadamente el 1% del peso del esmalte y el restante 3% es aportado por agua (Williams y cols., 1989). Esta zona interprismática forma las vías de difusión de ácidos, componentes minerales y de iones de fluoruro (Ten Cate y Featherstone, 1991).

La solubilidad del esmalte está influenciada por distintos factores entre ellos las modificaciones en la composición de la hidroxiapatita, presencia de flúor, contenido de la sustancia interprismática y el nivel del pH ambiental. (Skucha-Nowak y cols., 2015).

Proceso de desmineralización- remineralización

En la superficie dentaria constantemente está ocurriendo un proceso dinámico, que involucra ciclos de pérdida (desmineralización) y ganancia mineral (remineralización), estas fases pueden ocurrir de forma simultánea o alternativa en diferentes zonas de un mismo diente. El equilibrio entre estos procesos está determinado por diversos factores protectores y patológicos, cuando la balanza se inclina hacia mayor desmineralización es cuando la lesión de caries se desarrolla (Pitts y cols., 2017).

La fase de desmineralización comienza con la formación de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, como producto final del metabolismo del azúcar por parte del biofilm oral (Featherstone, 2004). A medida que el ácido se acumula en la biopelícula, el pH disminuye alcanzando un pH crítico en el que la hidroxiapatita

comienza a disolverse. Estos ácidos se difunden en el diente a través del agua entre los cristales, alcanzando sitios susceptibles en la superficie del cristal, lo que provoca la disolución de calcio y fosfato en la fase acuosa circundante entre los cristales (Featherstone, 2008).

A medida que avanza el proceso de desmineralización el grado de saturación mineral de la fase acuosa intercrystalina aumenta, alcanzando la sobresaturación, lo que detiene el proceso de desmineralización y favorece la reprecipitación de los minerales.

La superficie del esmalte es la más beneficiada durante la remineralización, pues recibe las concentraciones de calcio y fosfato que se acumulan en la biopelícula, los minerales que se difunden desde el esmalte subsuperficial y desde la saliva (Ten Cate y Featherstone, 1991).

Modelos de Caries

Los ensayos clínicos poseen una gran relevancia clínica; sin embargo también tienen desventajas como las limitaciones éticas, un gran consumo de tiempo y recursos para su desarrollo y que el investigador tiene escaso control de las variables (Clasen y Ogaard ,1999). Debido a esto se han desarrollado modelos que facilitan la investigación, recreando el entorno oral y el proceso en que se produce la enfermedad de caries.

Un modelo necesita capturar los elementos esenciales del fenómeno que se quiere estudiar, debe ser robusto, reproducible y confiable al compararlo con el sistema para el cual está diseñado (Ten Cate, 2015). Estos nos ayudan a predecir con precisión, de forma controlada y simplificada, un resultado clínico que puede llevarnos a acciones preventivas para una enfermedad (Featherstone, 1996).

Los modelos de caries han tenido un rol importante en la investigación de diversos factores que afectan su inicio y progresión, junto a esto, a partir de ellos se han

desarrollado medidas y productos que ayudan a reducir su incidencia y favorecen su prevención. En el estudio de caries los modelos se dividen en tres categorías: modelos *in vitro*, modelos *in situ* y modelos *in vivo* (Marsh, 1995).

Una revisión realizada en 2017 acerca de los modelos de desmineralización-rem mineralización más utilizados en cariología indexados en la Web of Science entre el 2014 y 2016, encontró que la mayoría de los estudios fueron *in vitro* (84%), seguidos por estudios *in situ* (15%) y en último lugar se encontraron los estudios *in vivo* (1%)(Yu y cols., 2017).

No existe un modelo ideal que estudie y represente la compleja naturaleza de la caries dental, cada modelo posee sus ventajas y desventajas. En vista de esto, al utilizar un modelo de caries, es importante considerar la pregunta de investigación para evaluar cuidadosamente qué tipo de modelo se debe usar para que los resultados se interpreten correctamente.

Modelos *in vitro*

Los modelos *in vitro* son útiles para llevar a cabo experimentos de una sola variable bajo condiciones altamente controladas, demostrando gran sensibilidad y precisión. Estos se clasifican en modelos expuestos a desafíos químicos o biológicos.

Los modelos experimentales químicos se dividen en aquellos que realizan la inmersión de discos de hidroxiapatita en agentes demineralizantes y el llamado pH cíclico, protocolo creado por Ten Cate y Duijsters (Ten Cate y Duijsters, 1982), que consiste en numerosos periodos de exposición a soluciones de bajo pH y luego exposición a soluciones remineralizantes, lo que replica las etapas de desmineralización y remineralización que ocurren en la boca. Si bien replican las fases alternas del proceso de desmineralización, carecen de un factor relevante en el desarrollo de la caries dental, los microorganismos.

Otro proceso de formación de las lesiones cariosas involucran modelos bacterianos en los cuales bacterias planctónicas o microorganismos organizados pueden ser usados, estos pueden ser biopelículas de una sola especie, multiespecies o derivados de saliva.

Para simular lesiones de caries en esmalte, se han implementado diferentes modelos *in vitro* a modo de probar diferentes alimentos, sustratos y antimicrobianos, y evaluar su relación en la prevención y/o progresión de la enfermedad (Seemann y cols., 2005, Steiner-Oliveira y cols., 2007, Ccahuana y Cury 2010, Giacaman y cols., 2012, Hernandez de Campos y cols., 2015, Lippert, 2017).

Sin embargo es importante reiterar que la mayoría de estos modelos son disímiles respecto a la complejidad del entorno oral y solo pueden reproducir un pequeño número de eventos posibles, de los que podrían ocurrir *in vivo*. Es así como diversos estudios recalcan que los modelos *in vitro* son incapaces de simular procesos biológicos complejos (Shellis y cols. , 1994; Marquezan y cols., 2009), así como también han demostrado diferencias en las características físicas y mecánicas del sustrato desmineralizado, tales como las características de distribución mineral (Arends y cols., 1987; McIntyre y cols., 2000), composición química (Lynch y cols. , 2006) y dureza superficial (Magalhães y cols., 2009; Marquezan y cols., 2009).

Modelos *in vivo*

Los modelos en animales poseen una larga historia de uso exitoso en la investigación de caries. Son invaluable herramientas para simular la progresión natural de caries en condiciones biológicas verdaderas y han contribuido en el desarrollo de pastas dentales clínicamente efectivas y productos preventivos (Briner, 1981).

Se han utilizado diversas especies para realizar estos estudios, entre ellos destacan, los primates, ratas, hámster y ratones. La investigación ha evolucionado, incorporando animales que han sido modificados, desde la extirpación quirúrgica de las glándulas salivales (Cheyne, 1940) a la incorporación de animales

genéticamente alterados, que no producen saliva o incluso libres de microorganismos.

Han sido fundamentales en el estudio del papel que cumple la dieta (Mc Collum y cols. , 1922) y los microorganismos (Orland y cols., 1955) en la etiología de la caries dental y el rol protector de la saliva y del flúor en su aplicación tópica (Cheyne, 1940) en la salud oral.

A pesar de sus grandes hallazgos y utilidades, estas son investigaciones demandantes y difíciles de conducir que requieren de altos estándares para la experimentación animal. Frecuentemente ocurren errores que pueden afectar el resultado y la interpretación de los datos (Bowen, 2013), junto a esto, poseen limitaciones por las diferencias en la morfología dentaria, en la composición de la microflora endógena, composición salival y hábitos alimenticios. (Zero, 1995). Igualmente se han encontrado dificultades en la inoculación y establecimiento de cepas bacterianas humanas en animales, junto a diferencias en el patrón de caries entre roedores y humanos (Xuelian y cols., 2016).

Modelos *In situ*

Los modelos de caries *in situ* implican el uso de aparatos u otros dispositivos intraorales que crean condiciones definidas que simulan el proceso de caries dental. Son considerados el modelo de estudio intermedio, entre la situación clínica natural no controlada (estudios clínicos) y la situación de laboratorio altamente controlada (*in vitro*), al tener un diseño experimental más flexible que incluye los aspectos multifactoriales de la naturaleza de la caries, como son el substrato dentario, biopelícula, desafío cariogénico y tiempo. (Zero, 1995). Sin embargo también poseen desventajas, como que el tamaño de la muestra es limitado, por lo que puede ser poco representativo y que requiere de un gran compromiso de los sujetos de estudio.

Los pioneros en el uso de este tipo de modelos fueron Koulourides y Volker en 1964; y a partir de este se han realizado diversos estudios que han sido útiles para estudiar el mecanismo de acción de fluoruros (Koulourides y cols., 1974), evaluar diferentes fórmulas y dosis de pastas dentales, obtener biofilm directamente desde la cavidad oral, así como también para evaluar el efecto de diferentes alimentos sobre la caries dental (Ribeiro y cols., 2005; Giacaman y cols., 2013 y 2016) y la acción de diversos agentes preventivos (Cochrane y cols., 2012 a; Schlafer y cols., 2017), y todo esto sin causar caries en la dentición natural.

En 2012 en la Universidad de Talca se desarrolló un modelo de caries *in situ* palatino con bloques de esmalte bovino con el que se realizó un estudio clínico aleatorizado doble ciego para evaluar si los ácidos grasos libres son anti cariogénicos, llegando a la conclusión de que los ácidos grasos reducen la cariogenicidad de la biopelícula (Valenzuela y Giacaman, 2012). Posteriormente, en 2013, volvieron a utilizar el modelo *in situ*, esta vez investigaron el efecto modulador de la proteína ovoalbúmina sobre la cariogenicidad de la sacarosa, concluyendo que la ovoalbúmina parece reducir la formación de caries en el esmalte (Jara y cols., 2013).

Para el desarrollo de un modelo de caries *in situ* se deben examinar cuidadosamente los objetivos de la investigación y requiere de un entendimiento claro del proceso de caries. Se deben tener en consideración el mayor número de condiciones naturales para lograr un valor predictivo y relevancia clínica, sin embargo el investigador debe mantener el control de las variables para poder detectar resultados científicamente válidos en un limitado número de participantes (Zero, 1995). Todo esto manteniendo altos estándares éticos.

Se han realizado varias conferencias dedicadas a modelos *in situ*, dos conferencias en 1990, otra en 1994 en Estados Unidos y otra en Europa en 1994 (Curzon y Hefferren, 2001) y diversas revisiones (Ten Cate, 1994; Fejerskov y cols., 1994; Zero, 1995) que resaltan la importancia de varios parámetros del modelo que deben ser establecidos por el investigador para lograr un adecuado control de las variables. Estos se resumen en cinco puntos: diseño físico, participantes, tejido a utilizar, diseño del estudio y método de evaluación.

- **Diseño físico:** El modelo *in situ* varía según diseño físico, el cual puede ser fijo o removible. Otra variación de su diseño se relaciona con la ubicación de las muestras. Estas variables influyen en las condiciones ambientales de la formación y cariogenicidad de la biopelícula, alterando su composición y espesor, así como también en el acceso y retención de un sustrato dietético, saliva y/o agentes remineralizantes.
- **Características de los participantes:** La selección de los participantes debe ser encaminada según los objetivos de investigación del estudio (Ten Cate, 1992), ya que este corresponde a uno de los factores que puede influenciar en el resultado del modelo *in situ*. Si el objetivo es la determinación de un parámetro fisiológico general se deberá hacer una selección de participantes que sea representativa de la población, mientras que si el objetivo es analizar un fenómeno que ocurre en un grupo específico se deberán seleccionar sujetos que pertenezcan a ese conjunto.

En algunas investigaciones será necesario realizar una estandarización de la población de estudio, en estos casos la selección será realizada bajo criterios específicos de inclusión y exclusión. Una muestra bien caracterizada permite una adecuada interpretación de la información generada (Zero, 1995).

El protocolo debe detallar las características de los participantes como,

- Edad, género
- Estado de salud general y consumo de fármacos
- Hábitos: Actividades diarias, hábitos alimenticios, tabaquismo, consumo de drogas, disposición. Son condiciones a evaluar, pues los participantes deben ser capaces de seguir las instrucciones.
- Estado de salud oral: Salud periodontal, índice COPD (Damato y Stephen, 1994), actividad de caries, número de dientes en boca, acceso a fluoruros, riesgo cariogénico individual (Johnson, 2004).
- Factores salivales: Flujo salival, capacidad buffer, pH, concentraciones de calcio y fosfato.
- Factores microbiológicos: Presencia de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* en el biofilm endógeno.

Otro elemento a considerar son los reparos éticos, es necesario que los miembros de la población de estudio sean capaces de entregar su consentimiento informado antes de participar en el estudio.

- Tipo de tejido duro a utilizar: El estudio debe detallar su origen (humano o bovino), tipo de dentición y diente involucrado, el tejido a estudiar (esmalte, dentina o cemento), el estado del tejido (sano o con lesiones preformadas), si su superficie será tratada o no y el procedimiento de esterilización (óxido de etileno, radiación gamma, esterilización en autoclave).

Los dientes de origen bovino se utilizan a menudo en investigación cuando el suministro de dientes humanos es difícil de obtener, por motivos éticos o por dificultad en su recolección. El tejido bovino tiene muchas ventajas, por ejemplo, una mayor área de superficie y un grosor de esmalte más uniforme, no obstante, posee diferencias microestructurales puesto que el esmalte es más poroso y difiere en su composición química, ya que contiene más

carbonato (Featherstone y Mellberg, 1981) y menos fluoruro (Mellberg y Loertscher, 1974) que el esmalte humano.

Lippert y Lynch (2014), realizaron un estudio *in vitro* en el que se comparaba la microdureza superficial, Vickers y Knoop, y la pérdida mineral, Microradiografía transversa, entre bloques de esmalte humano y bovino expuestos a diferentes periodos de desmineralización (8, 16, 24, 32, 40 y 48 horas). Al igual que en estudios previos (Featherstone y Mellberg, 1981), los resultados obtenidos indicaron que el esmalte bovino se desmineraliza más rápido que el humano, con una razón en la velocidad de desmineralización (ΔZ /tiempo de desmineralización) de 1.4: 1, respectivamente. Este estudio concluyó que, si bien ambos tejidos poseen un patrón de disolución lineal y se comportan de manera similar, no son necesariamente reemplazos parecidos.

- Diseño del estudio: Debe especificar la cantidad de participantes, duración, tipo de desafío cariogénico (dieta del participante, comidas estandarizadas o soluciones de sacarosa), método y frecuencia de aplicación de sustrato a estudiar estandarizados e indicadores de cumplimiento. Todos los estudios clínicos requieren aprobación ética y deben seguir las pautas de la guía para la buena práctica clínica (OMS, 1995).
- Método de evaluación del estado mineral: El diseño debe definir el método en el que se cuantificará la cantidad neta de desmineralización o remineralización que se ha producido durante el periodo experimental. La distribución de la concentración mineral o densidad mineral en tejidos duros dentales se pueden medir mediante análisis directo (análisis químico de una muestra) o indirecto (Fluorescencia láser). Existe una diversa gama de métodos, por ejemplo la luz polarizada, permeabilidad del yoduro, métodos ópticos, Fluorescencia láser (QLF), Microradiografía transversa (TMR), Microdureza superficial (SMH) y Micro- CT.

- **Microradiografía transversa (TMR):** Esta es la técnica gold estándar para cuantificar cambios en la cantidad y distribución mineral (Ten Bosch y Angmar-Mansson 1991), sin embargo es una técnica destructiva que requiere la preparación de las muestras en secciones muy finas y una fuente de rayos X, por lo que no es necesariamente la primera opción para cuantificar cambios minerales.
- **Microdureza Superficial (SMH):** La dureza se define como la resistencia superficial de un cuerpo a sufrir deformaciones permanentes; o bien como la resistencia de un material de ser penetrado en su superficie por un objeto duro. Propiedad que depende del grado de cohesión entre las moléculas que componen el material.

Para medir la dureza de un cuerpo existen diferentes pruebas, las cuales se dividen en pruebas de macro y microdureza (Donald y cols., 2011). Estas utilizan un penetrador o indentador diamantado con una carga y tiempo establecido.

Las pruebas de microdureza son las más adecuadas para medir la dureza de la estructura dental, ya que permiten evaluar la dureza de materiales finos y regiones pequeñas. Esta prueba no mide el contenido mineral, sino las propiedades mecánicas y la integridad estructural de la superficie dentaria (Lippert y Lynch, 2014); siendo las más comunes las técnicas de Knoop y de Vickers que utilizan cargas menores a 2 Newtons, ideales para muestras pequeñas y resilientes como el esmalte.

La prueba de dureza Vickers utiliza un penetrador diamantado con forma de pirámide de base cuadrada, el cual es aplicado perpendicularmente a la superficie cuya dureza se desea medir. 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

mantenida de 1.961 Newton durante un tiempo de 10 segundos. Al medir las diagonales de la microindentación, se obtiene la lectura de microdureza Vickers, que es calculada automáticamente por el microdurómetro a través, de la siguiente fórmula:

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

Donde:

K= Constante de la máquina (en 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).

Se ha establecido que el valor medio de microdureza para el esmalte humano sano está en el rango de 250-360 VHN (Majithia y cols., 2016). Diversos estudios han cuantificado el cambio en la microdureza superficial del esmalte dental con una lesión de caries incipiente, un estudio in vitro con protocolo pH-cíclico lo ha cuantificado entre 72 y 176 VHN, según la cantidad de horas de exposición (Lippert, 2017) y en un modelo de biopelícula de *Streptococcus mutans* se encontró una dureza superficial entre 102,6 y 178,9 VHN (Jara y cols., 2017).

- Microscopía electrónica de barrido: La microscopía electrónica de barrido es una técnica avanzada que permite, entre otras cosas, realizar observaciones de muestras biológicas. Es útil para examinar la morfología de los tejidos porque permite el mapeo tridimensional de las superficies con gran aumento.

El microscopio funciona haciendo incidir un haz de electrones sobre la superficie de la muestra, esta interacción crea señales eléctricas que son detectadas hacia un sistema que las capta y traduce en imagen tridimensional.

- Micro CT: El Micro-CT es un sistema que permite realizar un análisis indirecto no destructivo de la densidad mineral de huesos y dientes con una precisión superior al 1% y una resolución entre 5 y 30 μm (Wong y cols., 2004). Es una técnica sensible in vitro capaz de caracterizar y cuantificar las lesiones de caries (Wong y cols., 2004).

La determinación de la densidad mineral mediante evaluación cuantitativa es de particular utilidad cuando se estudian lesiones cariosas incipientes. Estudios han caracterizado la densidad mineral de esmalte sano en un rango de 2.65 y 2.89 g/cm^3 (Wong y cols., 2004; Clementino-Luedemann y Kunzelmann, 2006; Huang y cols., 2007) y de mancha blanca, donde la capa superficial intacta aparente de la lesión y el nivel más bajo de la lesión fue de 2.23–2.58 y 1.48–2.03 g/cm^3 , respectivamente (Huang y cols., 2007).

Planteamiento del problema

Las enfermedades orales generan una gran carga económica a nivel global que ascendió a \$ 544,41 billones de dólares en 2015, de los cuales, \$ 356,8 billones fueron atribuidos a gastos de tratamiento y \$ 187, 61 billones a pérdidas en la productividad (Righolt y cols., 2018). Según la Organización Mundial de la Salud, la caries dental corresponde a la enfermedad crónica cuyo tratamiento es el más caro (Petersen 2003), representando una importante carga biológica, social y financiera para las personas y el sistema de salud. El enfoque restaurador tradicional, no ha demostrado ser capaz de realizar un control real de la enfermedad, por lo que se hace necesario encontrar métodos de prevención y tratamiento temprano.

Antiguamente, muchos de los tratamientos para las patologías orales no se basaban en principios biológicos ni científicos; sino más bien en la experimentación sin validación; práctica que durante los últimos 50 años fue, en menor medida, común. (Ismail y cols., 2001).

El diseño de modelos *in situ* optimizados es un paso exigente para los investigadores, ya que en la literatura existen numerosos protocolos que involucran diversos parámetros experimentales que difieren entre sí, junto a esto, existe incertidumbre sobre cómo correlacionar diferentes resultados que se produjeron a partir de diferentes condiciones experimentales (Sung, 2014).

El propósito de este estudio piloto, es desarrollar un modelo de caries *in situ* con un protocolo estandarizado en el que se obtengan mediciones confiables de los cambios minerales producidos; como una forma de cuantificar los efectos de diversas intervenciones en el proceso de caries, a fin de lograr su futura aplicación en el estudio de mecanismos de detección temprana y/o tratamientos que ayuden a prevenir su inicio y progresión

La pregunta de investigación que se plantea es ¿Se generan cambios en la mineralización, dureza o en la estructura de bloques de esmalte dental humano insertos en un modelo de caries *in situ* expuesto a la acción tópica de sacarosa versus esmalte dental inserto en el mismo modelo de caries *in situ* no expuesto?

III. HIPÓTESIS.

Existen diferencias en la densidad mineral, microdureza superficial y cambios estructurales de esmalte dental inserto en un modelo de caries *in situ* expuesto a la acción tópica de sacarosa al 20% aplicada cada 2 horas, 8 veces al día, durante 14 días, versus esmalte dental inserto en el mismo modelo de caries *in situ* no expuesto.

IV. OBJETIVO GENERAL.

Establecer diferencias en la densidad mineral, microdureza superficial y cambios estructurales de bloques de esmalte insertos en modelo de caries *in situ* sometidos a la acción tópica de sacarosa.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Evaluar densidad mineral, microdureza superficial y cambios estructurales de esmalte insertos en un modelo *in situ* luego de la administración de sacarosa en modalidad tópica.
2. Evaluar densidad mineral, microdureza superficial y cambios estructurales de grupo control en un modelo *in situ* de bloques de esmalte.
3. Comparar la mineralización, microdureza superficial y estructura del esmalte entre el grupo expuesto a sacarosa en modalidad tópica y el grupo control en un modelo *in situ* de caries.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un estudio piloto de un modelo experimental *in situ* en el que se pretendía estandarizar su protocolo y validar su utilidad para posteriores investigaciones.

El modelo de desarrollo de caries *in situ* consistió en sujetos voluntarios que utilizaron durante 14 días un aparato removible que sirvió de plataforma para 5 bloques de esmalte humano preparados y montados en el dispositivo. El protocolo del estudio fue aprobado por el comité de bioética de la facultad de odontología de la Universidad de Chile (Anexo 1).

1) Participantes

Se reclutaron 6 voluntarios que cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión, estos debían estar sistémicamente sanos, tener entre 18 y 30 años, contar con buena salud oral general, más de 22 piezas dentarias naturales en boca, libres de enfermedad periodontal y gingival, índice COPD <8, libres de caries activas (C=0), tasa de flujo salival normal y contar con la disposición y capacidad para utilizar el dispositivo removible 24 horas al día durante el periodo experimental (14 días).

No existe información acerca del índice COPD promedio país del grupo etario estudiado. El estudio más cercano al grupo investigado fue realizado en la comuna de Tortel el año 2015, el cual reflejó que el 64,29% de la población de 15 a 29 años poseía una historia de caries menor o igual a 10 (Ehremberg y cols., 2015). Debido a esto el valor COPD máximo para el estudio fue calculado a partir de una proyección lineal entre los grupos etarios de 12 años con un COPD promedio de 1,9 (Soto y cols., 2007) y el grupo de 35 a 44 años con un COPD promedio de 15,06 (Urzúa y cols., 2012).

Los criterios de exclusión correspondían a individuos fumadores, voluntarios que no quisieran firmar el consentimiento informado, exposición a tratamientos antibióticos

o antisépticos bucales en un plazo de seis meses previos a la fecha de ingreso al estudio, individuos portadores de prótesis removible superior o portadores de aparatos de ortodoncia, presencia de lesiones erosivas, ulcerativas o inflamatorias en la mucosa del paladar duro y/o blando, alteraciones en el flujo salival, consumo de fármacos, y/o con intolerancia a los materiales de estudio (acrílico) .

Inicialmente fueron reclutados 6 voluntarios, de los que finalmente solo 5 fueron los sujetos incluidos, estos eran estudiantes de la facultad de odontología de la Universidad Andrés Bello de Viña del Mar, 3 mujeres y 2 hombres, con edades que varían entre 24 y 29 años. Todos los voluntarios fueron clínicamente evaluados a través de un detallado examen intraoral de tejidos blandos y duros realizado por distintos examinadores con experiencia y previamente calibrados. Los examinadores aplicaron una ficha clínica (Anexo 2), que detallaba antecedentes mórbidos, hábitos y examen dentario, el cual fue realizado siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud y sus criterios del índice COPD (OMS, 1997) y la evaluación de salud periodontal fue realizada a través de Examen Periodontal Básico (British Society of Periodontology, 2016).

Antes de participar en la investigación a los voluntarios se les proporcionó información acerca de los objetivos del estudio, su protocolo y posibles riesgos. Se les entregó un consentimiento informado escrito que detallaba el propósito del estudio, su duración, procedimientos requeridos, posibles riesgos y el contacto del equipo investigador (Anexo 3).

2) Preparación de las muestras dentarias

Se utilizaron terceros molares incluidos sin contacto con el medio oral donados por participantes con indicación de extracción que consintieran voluntariamente (Anexo 4). Estos se mantuvieron en solución de Timol al 0,2%, pH 7, por un mes, como máximo.

Los terceros molares fueron montados en acrílico, cortados con una sierra de diamante de baja velocidad (SYJ-150, MTI) y su forma final fue dada con un disco de acero diamantado de 0.20 mm de grosor marca Horico (Alemania) montado en pieza de mano (Figura 1). De los bloques de esmalte obtenidos se seleccionaron 25, 20 unidades de 3x3x3 mm y 5 de 6x3x3 mm, los cuales posteriormente fueron sometidos a autoclave a vapor por 20 min a 120°C, para asegurar su esterilidad.

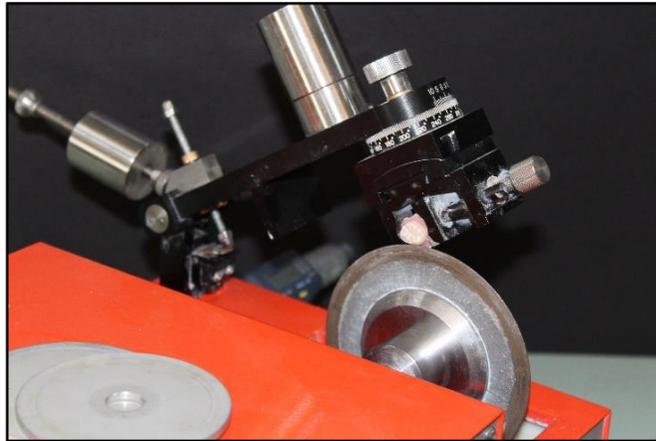


Figura 1. Recortadora con disco de acero diamantado SYJ.150 (MTI Corporation, China).

3) Diseño y confección de dispositivo intraoral

El diseño corresponde a un dispositivo intraoral removible maxilar confeccionado en acrílico de termopolimerización que poseía 2 plataformas ubicadas en la zona

vestibular de los molares superiores y una superficie en la región anterior del paladar (Figura 2).

El modelo para su fabricación fue realizado a partir de una impresión maxilar de alginato con cubeta de stock, cuyo vaciado fue realizado en yeso piedra inmediatamente posterior al retiro de boca.

La confección fue realizada en un laboratorio con instrucciones específicas. El dispositivo contó con 4 ranuras de 4x4x4 mm ubicadas en la zona vestibular de molares y una ranura de 7x4x4 mm en la zona palatina.

Los bloques de esmalte fueron montados individualmente de forma aleatoria en cada ranura utilizando cera adhesiva de alta fusión y dejando un espacio protegido por acrílico de 1 mm para la acumulación de placa o biopelícula (Cury y cols., 1997). Este modelo, por su diseño, permite realizar análisis de biofilm oral, sin embargo, en este estudio este aspecto no fue analizado.

Los bloques fueron numerados del 1 al 5, desde la zona más posterior derecha a la zona más posterior izquierda, siendo nominada la muestra palatina como la número 3. (Figura 3).

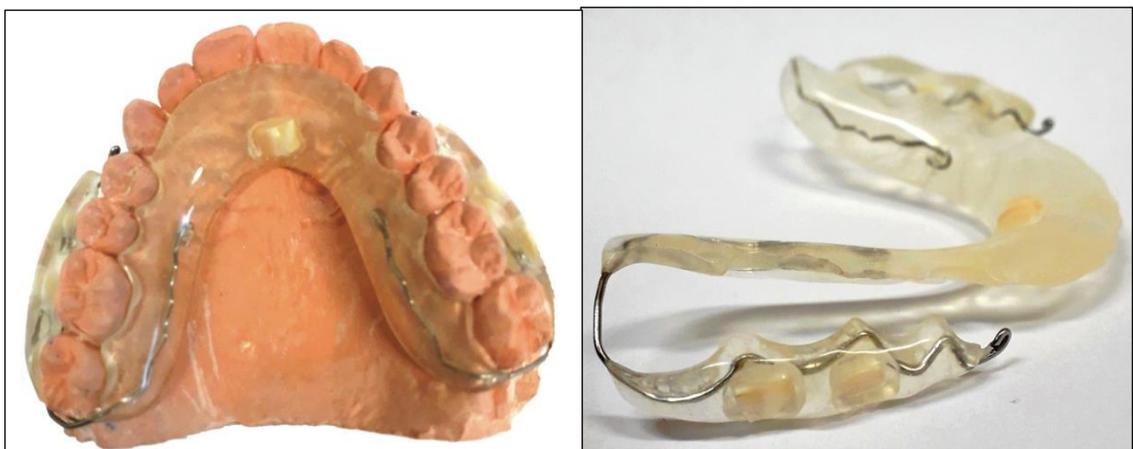


Figura 2. Aparato removible con los bloques de esmalte humano.

4) Diseño experimental

El diseño corresponde a un estudio piloto de una fase, con 14 días de duración, en el que participaron 5 voluntarios. Cada voluntario utilizó un dispositivo intraoral, el cual se dividió en 2 grupos, un grupo expuesto a sacarosa y uno control (Figura 3).

- Grupo expuesto a sacarosa (Amarillo)
A cada una de las 25 muestras se les aplicó una gota de Sacarosa al 20% (Aires y cols., 2006), como desafío cariogénico, cada 2 horas hasta lograr 8 aplicaciones diarias (Cury y cols., 1997, Cury y cols., 2001). La aplicación fue realizada mediante un gotario fuera de boca, tras lo cual se debía esperar 5 minutos para volver a introducir el dispositivo.
- Grupo control (Rosado)
Los bloques palatinos fueron divididos en 2 zonas, la mitad derecha fue cubierta con esmalte de uña, obteniéndose 5 muestras para ser utilizadas como control.

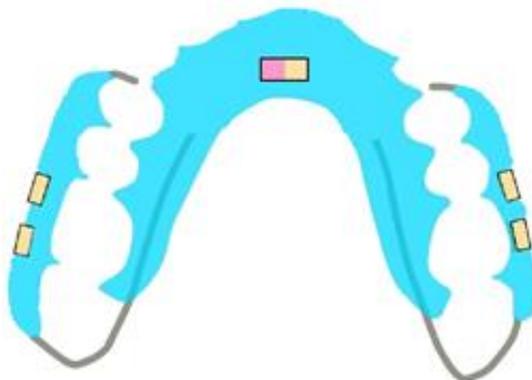


Figura 3. Esquema de aparato removible con los diferentes grupos de estudio

5) Instrucciones participantes

El dispositivo intraoral fue utilizado día y noche, durante 14 días continuos, solo fue retirado durante los momentos de higiene oral y alimentación, además de la aplicación del tratamiento tópico indicado. Las instrucciones de uso del dispositivo y la forma de aplicación de los tratamientos fueron entregadas de forma oral y escrita con un diagrama para mayor claridad. (Anexo 5)

Los participantes mantuvieron un régimen normal de dieta. El dispositivo podía permanecer fuera de boca, conservándolo húmedo dentro de un contenedor entregado, por un tiempo máximo de 30 minutos.

Se les entregó a los participantes un cepillo de dientes y una pasta dental fluorada de 1450 ppm, con los que realizaron su higiene oral 3 veces al día, 15 minutos después de alimentarse. Posterior al cepillado debían enjuagarse con abundante agua para remover residuos de pasta dental que pudiese quedar en la boca. El dispositivo intraoral no debía ser lavado (Anexo 5).

Por otro lado, durante el periodo experimental no se podía utilizar antibióticos, antiácidos ni enjuague bucal.

6) Evaluación de compromiso y cumplimiento de participantes

La evaluación del compromiso y cumplimiento por parte de los voluntarios se realizó mediante la aplicación de una pauta entregada por escrito en la que ellos, a conciencia, escribieron la aplicación de los tratamientos por hora (Anexo 6) y una encuesta realizada posterior a la etapa experimental la cual evaluó el cumplimiento y las desventajas que pudiera tener el modelo estudiado en cuanto a uso y comodidad (Anexo 7).

7) Medidas de Desenlace y plan de análisis de datos

i. Medición densidad mineral- Micro- CT

Se utilizó el sistema de Micro-CT Sky Scan 1278 versión de software 1.0.5 (Bruker Corporation, Estados Unidos), para evaluar los cambios en la densidad mineral (g/cm^3) de 9 muestras posterior a su exposición en el modelo de caries *in situ*, 6 ejemplares pertenecientes al grupo expuesto a tratamiento tópico con sacarosa y 3 del grupo control. Cada espécimen fue montado individualmente y en la misma posición utilizando un procedimiento estándar, procurando que el haz de rayos X incidiera perpendicularmente a la superficie. El escaneo fue realizado por un operador experto en técnicas de imagen de micro-Ct de la Plataforma experimental Bio-CT, perteneciente a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (FONDEQUIP EQM150010).

Las secciones de imágenes digitales fueron obtenidas con las siguientes condiciones de irradiación: 65 kV; 692 μA ; 1 mm de filtro de Aluminio; 51.489000 μm de tamaño de píxel, 360° de rotación al paso 0,25; tiempo de exposición de 36 ms con una cámara de 7,5 megapíxeles. La duración del escaneo total fue de 44 min promedio por muestra.

Las imágenes obtenidas de los cortes dentales fueron reconstruidas a través del software NRecon versión 1.7.4.2 de Sky Scan y fueron evaluadas de manera cualitativa por un examinador utilizando los softwares SkyScan Data Viewer y CTvox. La evaluación cuantitativa de la densidad mineral fue realizada usando el programa CTan (version 1.13.5.1, SkyScan; Bruker), en el que se separó de manera tridimensional la superficie externa del esmalte (Figura 4) del aire en la superficie exterior y otros tejidos a través de la función de región de interés (Figura 5a y 5b) y la aplicación de una lista de tareas (Figura 5c). Cada muestra fue evaluada en tres oportunidades, realizando diferentes regiones de interés en cada medición,

obteniendo un número de muestras de n: 18 para cada uno de los grupos. A partir de esto se evaluó la densidad total del esmalte externo.

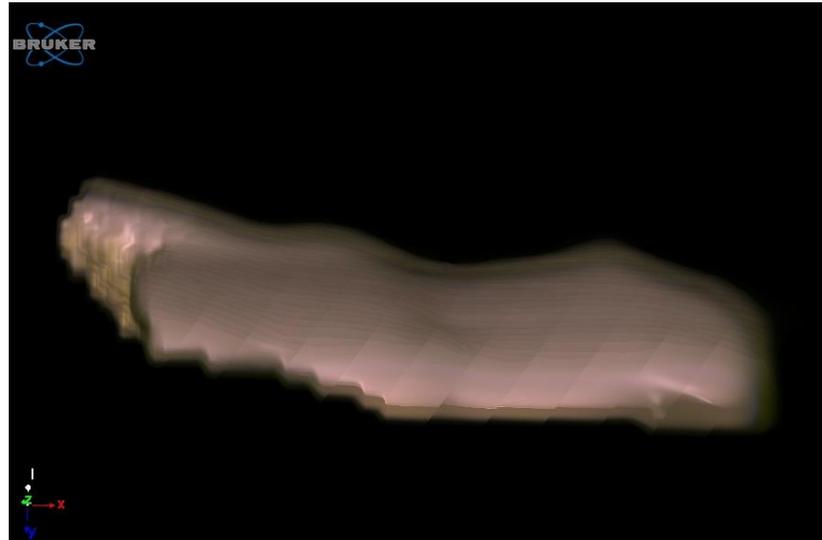


Figura 4. Reconstrucción tridimensional de superficie del esmalte externo realizada a partir de zona de interés con programa Ctvox

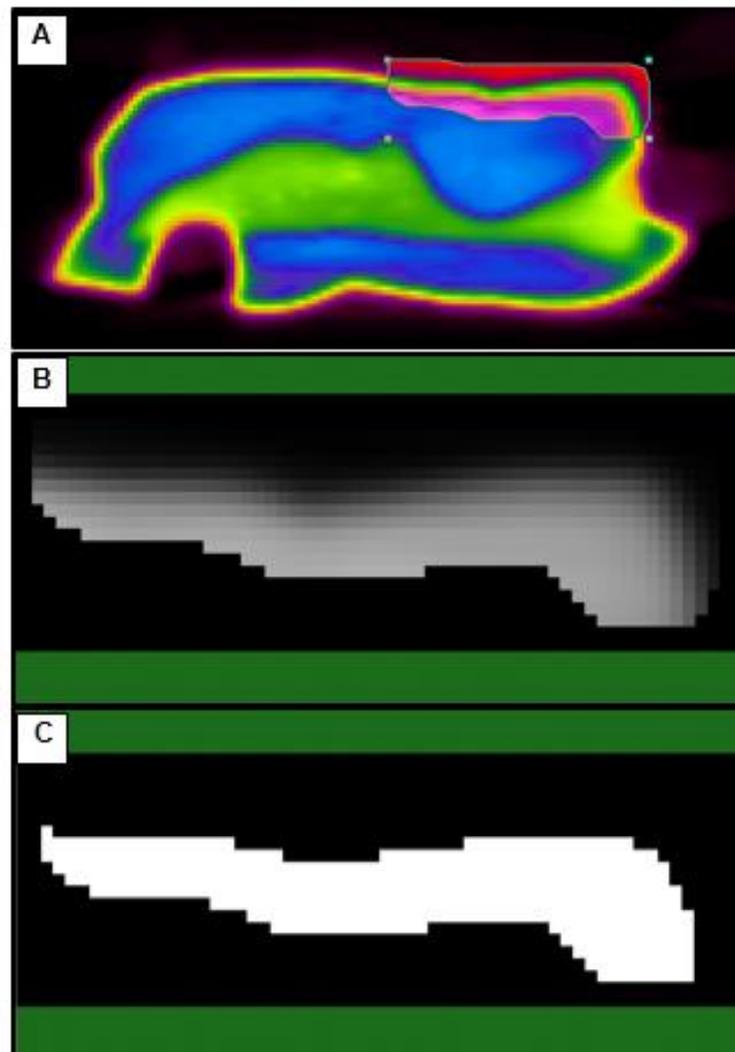


Figura 5. Función para la selección de esmalte externo en Software Ctan. A. Selección de zona.de interés B. Selección de zona que incluye defectos como aire. C. Área de interés con lista de tareas aplicada, libre de defectos.

ii. Medición de dureza superficial

Posterior al periodo experimental se realizó la medición de dureza superficial a 18 muestras de esmalte, mediante 5 indentaciones por ejemplar, obteniendo un tamaño muestral N: 90 para el grupo sacarosa y N: 30 para el grupo control. Este procedimiento se llevó a cabo con el microindentador de Vickers Struers Duramin (Struers, Estados Unidos) proporcionado por el Laboratorio de Ciencias de los Materiales de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Chile (Figura 6). 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 5 mediciones obtenidas.

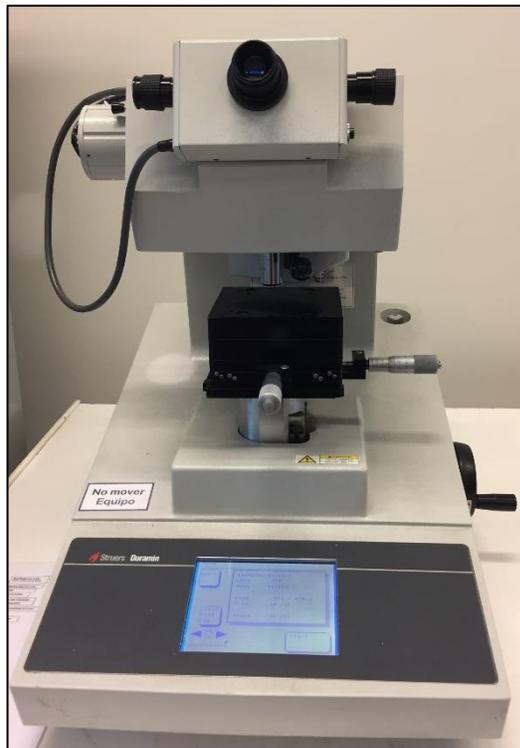


Figura 6. Microindentador de Vickers Struers Duramin (USA).

En los bloques palatinos se obtuvieron los promedios de las indentaciones y se les aplicó una fórmula (Figura 7) para obtener el porcentaje de pérdida de dureza superficial (%PDS), el cual se utiliza como indicador de la desmineralización ocurrida (Zero y cols., 1990; Cury y cols., 2001).

$$\left[\frac{\text{Promedio de dureza zona control} - \text{Promedio dureza zona expuesta}}{\text{Dureza zona control}} \right] \times 100$$

Figura 7. Fórmula de porcentaje de pérdida de la dureza superficial (%PDS)

iii. Evaluación Estructural

Se realizó la evaluación estructural de 10 muestras posterior a la exposición del modelo *in situ*, que incluían al grupo control y al experimental, mediante imágenes obtenidas a través de microscopía electrónica de barrido (SEM) por parte de un operador experto. El protocolo para esto consistió en:

- a) Periodo de fijación: Fijación de las muestras en Glutaraldehído al 2,5% en búfer Cacodilato de sodio 0.1 M por 2 horas. Lavado en agua bidestilada 3 veces por 5 minutos. Lavado final en búfer cacodilato de sodio 0.1 M durante 5 minutos, 3 veces.
- b) Deshidratación. En alcoholes ascendentes 50°, 70°, 95°, 100° I y 100° II por 5 minutos cada uno.
- c) Secado punto crítico: Se colocan las muestras en el Secador de punto crítico AUTOSAMDRI-815, SERIES A OVERVIEW por 30 minutos aproximadamente. Estas son secadas para remover todas las moléculas de agua a través de CO₂.
- d) Metalizado con oro: Una vez secas las muestras son montadas en porta muestras de aluminio y posteriormente se metaliza con oro en metalizador Denton Vacuum Desk V.

- e) Visualización al microscopio electrónico de barrido: Las imágenes fueron visualizadas en el microscopio electrónico de barrido Jeol Modelo JSM IT300LV, a 20 kV , en modo High Vac, en aumentos de 30x, 250x,600x, 1500x y 2000x

iv. Comparación de variables cualitativas

Se realizó la evaluación de las diferencias entre las imágenes obtenidas a través de microscopía electrónica de barrido y de Micro-CT de los grupos control y experimental.

v. Análisis Estadístico de datos

Para el análisis estadístico cada muestra fue considerada como unidad experimental independiente. Los datos de las variables del estudio fueron comparados mediante el test de Student. Las diferencias fueron consideradas significativas si el valor $p < 0,05$.



Figura 8. Diagrama esquemático de protocolo de estudio.

VII. RESULTADOS

1. Medición densidad mineral- Micro- CT

Evaluación Cualitativa

En las muestras palatinas, compuestas por la zona control y la zona expuesta, se expone de manera cualitativa las diferencias en la densidad mineral entre los tejidos, a través de diferencias en la gama de colores, siendo los colores azules y celestes las áreas más mineralizadas del esmalte, el azul oscuro y violeta corresponden a regiones desmineralizadas del esmalte y el sector verde-amarillo corresponde a dentina. (Figura 9 y 10). Se pueden observar colores azules más oscuros en la región derecha de las muestras, superficies expuestas a sacarosa, lo que es congruente con la formación de una lesión de caries incipiente (Figura 9).

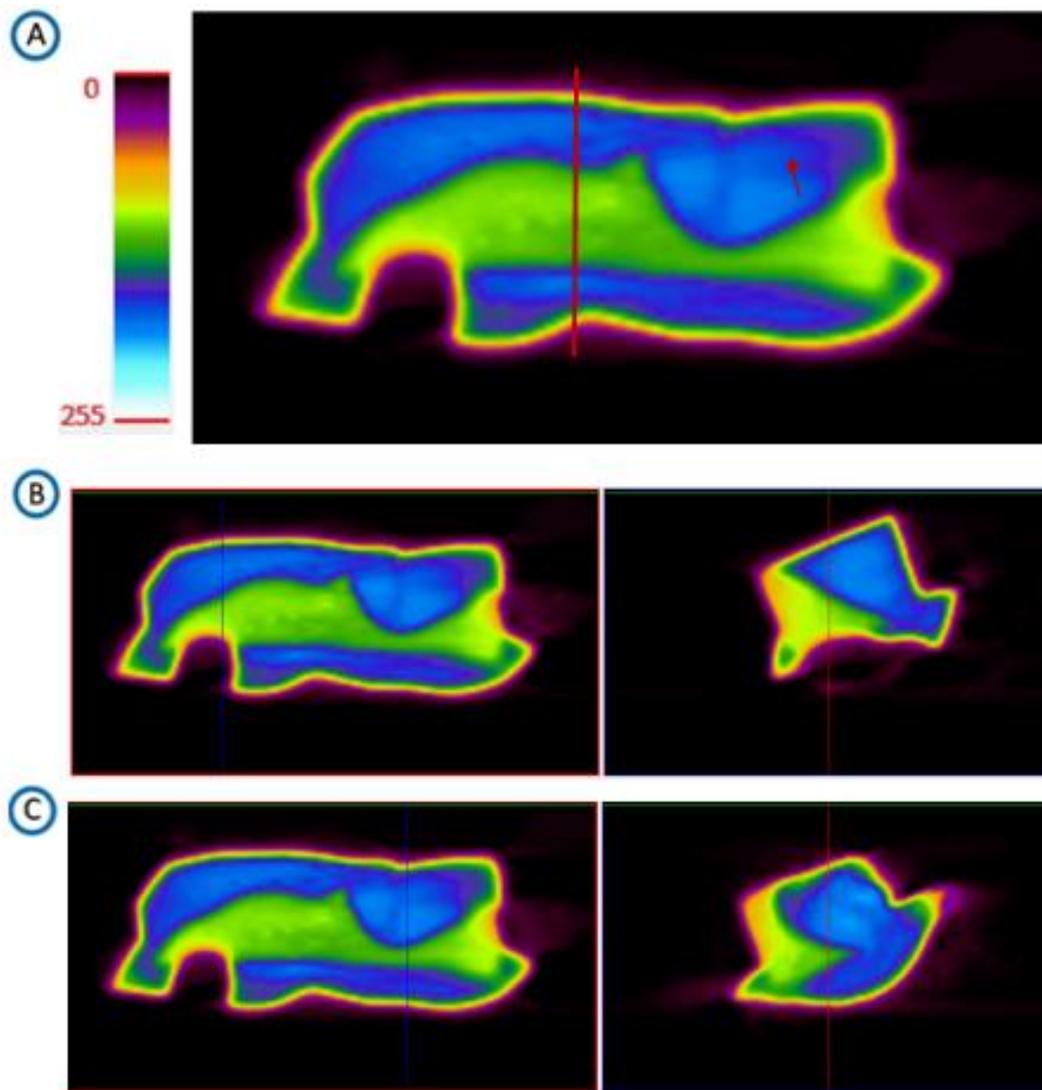


Figura 9. Muestra de Esmalte Palatina (14-3) bajo Micro-Ct. A: Corte Coronal se ve zona desmineralizada (derecha) y zona control (izquierda). B: Corte Axial de zona desmineralizada. C: Corte Axial de zona control.

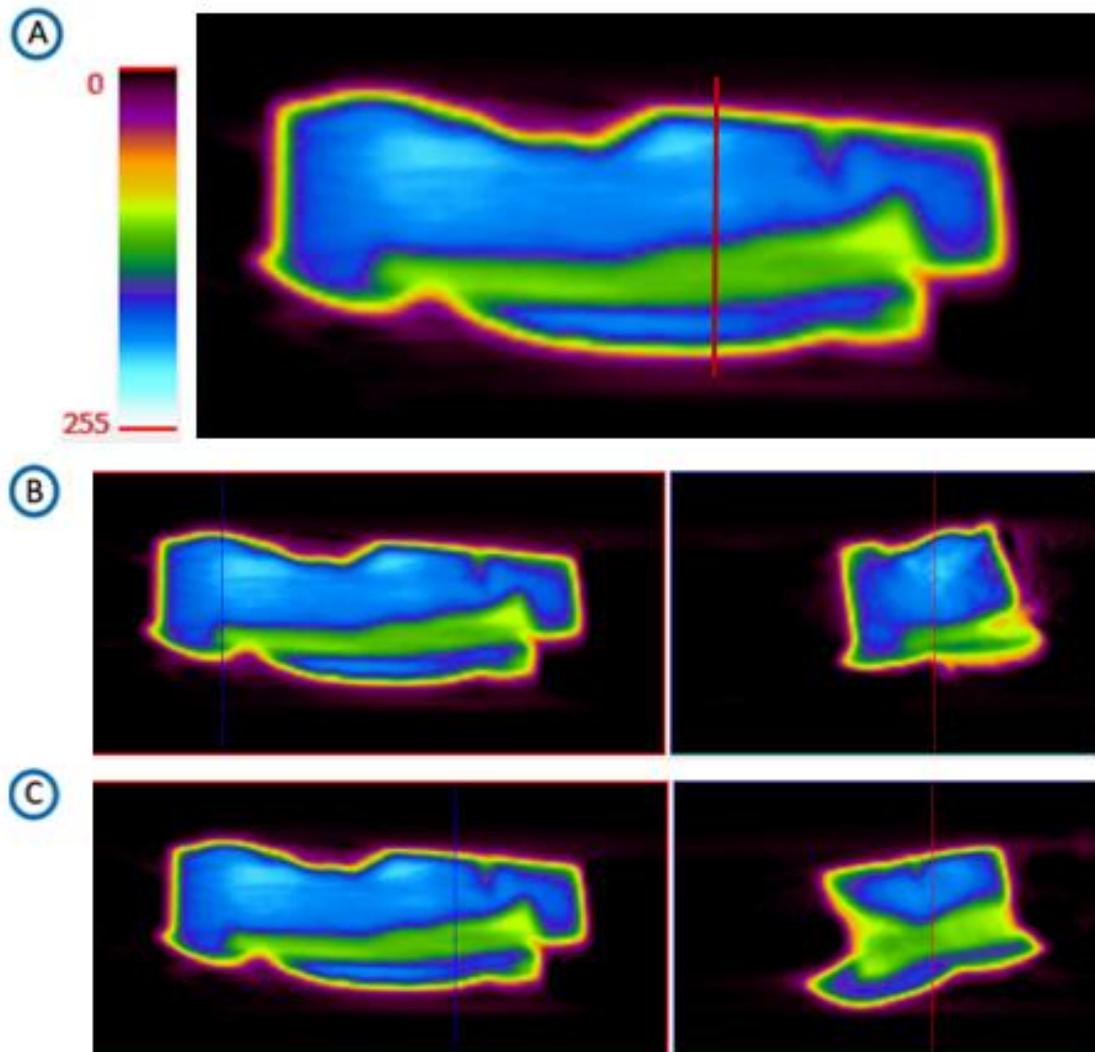


Figura 10. Muestra de Esmalte Palatina (13-3) bajo Micro-Ct. A: Corte Coronal se ve zona desmineralizada (derecha) y zona control (izquierda). B: Corte Axial de zona desmineralizada. C: Corte Axial de zona control.

Evaluación Cuantitativa

La densidad mineral fue evaluada de forma cuantitativa en la zona externa del esmalte (Tabla 1), obteniéndose diferencias significativas entre el grupo control y el grupo expuesto a sacarosa ($p < 0,001$). La pérdida de densidad mineral fue de 20,7% en la zona del bloque palatino expuesto a sacarosa.

Tabla 1. Densidad mineral esmalte externo

Densidad Mineral Esmalte Externo (g/cm³)			
	Promedio \pm Desviación Estándar	Rango	Intervalo de confianza (95%)
Control	2,48 \pm 0,07	2,37- 2,58	2,44-2,51
Sacarosa	1,94 \pm 0,1	1,77-2,08	1,89-1,99

* $p < 0,001$

2. Mediciones de dureza

Las mediciones de dureza superficial entre los valores promedio del grupo control y el grupo expuesto a sacarosa son estadísticamente significativos ($p < 0,001$) (Tabla 2).

Tabla 2. Microdureza superficial de Vickers

Microdureza Superficial de Vickers (HV)		
	Promedio \pm Desviación Estándar	Intervalo de confianza (95%)
Control	296,1 \pm 38,7	281,66-310,54
Sacarosa	156,4 \pm 42,8	147,43- 165,37

* $p < 0,001$

Al comparar los valores obtenidos en las muestras palatinas, se encontró una disminución de la dureza superficial estadísticamente significativa ($p < 0,001$), con una pérdida de dureza superficial de 48% y con un promedio de $143,8 \pm 28,9$ HV (Tabla 3)

Tabla 3. Pérdida de dureza superficial

Pérdida de Dureza Superficial (%PDS)			
	Dureza (VH)	Intervalo de confianza (95%)	%PDS
Control	299,4	286,26- 312,54	48%
Sacarosa	155,6	145,48- 165,72	
Diferencia	143,8	127,81-159,79	

* $p < 0,001$

3. Evaluación Estructural

La microscopía electrónica de barrido demostró cambios estructurales entre las superficies de los bloques de esmalte sano y el expuesto a sacarosa. En la figura 11, se evidencia el aumento en la porosidad del esmalte posterior al tratamiento con sacarosa. En aumentos bajos la apariencia de la superficie del esmalte expuesto, debido a la disolución de los extremos del prisma, es parecida a las escamas de un pez, en ella se pueden ver zonas con pequeñas depresiones y algunos agujeros focales que se alternan con superficies más lisas y con depresiones poco marcadas o incluso ausentes (Figura 3B). A mayores aumentos podemos ver depresiones en forma de cuña (Figura 3F).

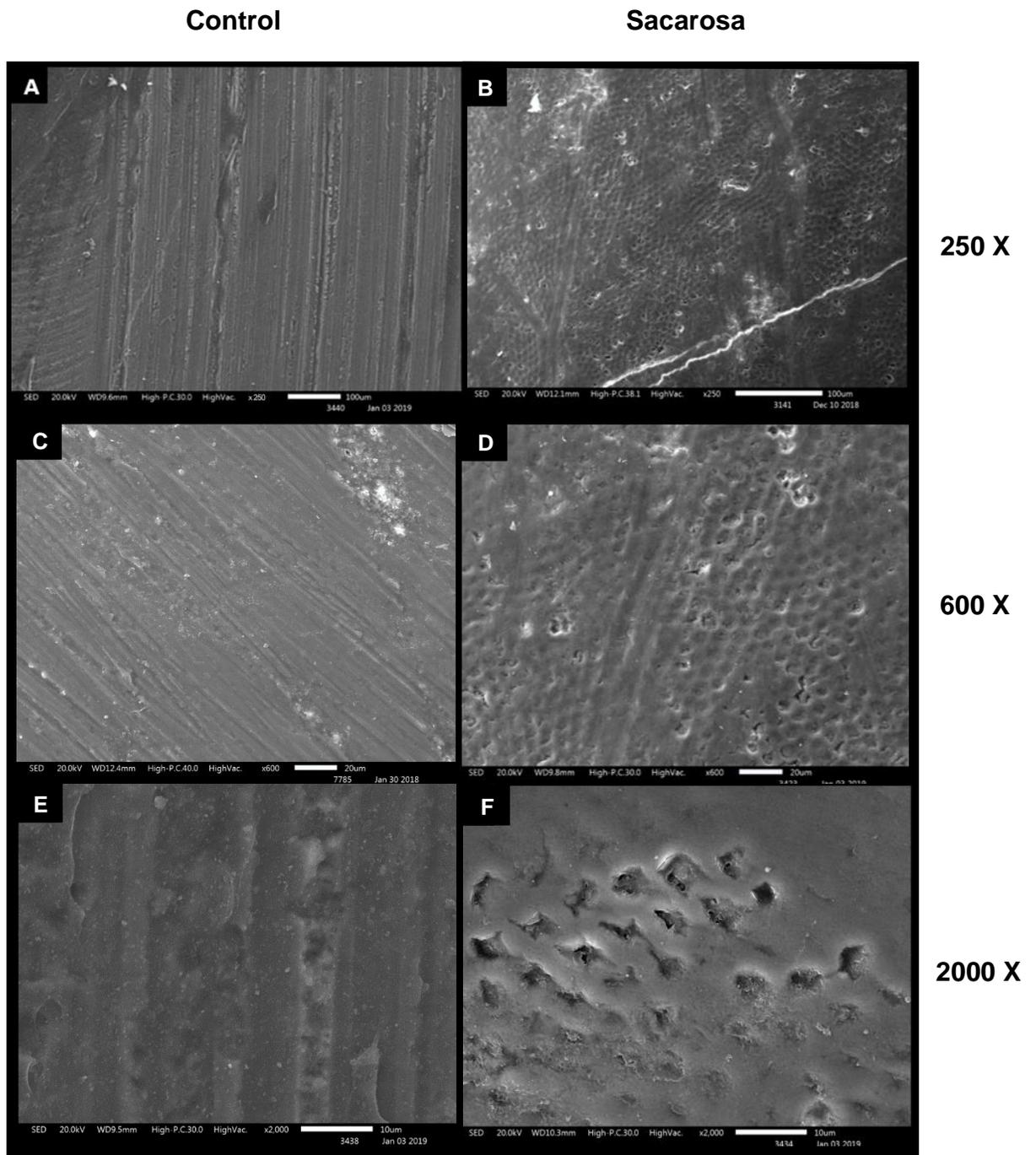


Figura 11. Especimen de esmalte bajo microscopía electrónica de barrido.

Aumento de 250x grupo control (A) y sacarosa (B); 600x grupo control (C) y sacarosa (D); 2000x grupo control (E) y sacarosa (F).

VIII. DISCUSIÓN

La formación de una lesión de caries corresponde a un proceso complejo multifactorial, cuyo estudio ha sido realizado a partir de diversos modelos que tratan de replicar la realidad de la cavidad oral. El presente estudio buscó evaluar los cambios estructurales, de densidad mineral y microdureza superficial de bloques de esmalte expuesto a sacarosa al 20% en un modelo in situ de caries de elaboración propia, persiguiendo de esta manera, reproducir en la boca humana el proceso de formación de lesiones de caries incipientes de manera verosímil, incorporando variables clínicas relevantes en el modelaje de caries como son la saliva y la biopelícula oral (Zero, 1995).

La creación de lesiones de caries incipientes in vivo de tamaño estándar es dificultoso (Kucuk y cols, 2016). En el modelo estudiado se logró la formación de lesiones tipo caries en distintas etapas, desde una etapa subclínica de desmineralización superficial del esmalte hasta la formación de mancha blanca en una de las muestras. Se ha descrito que la formación de lesiones depende de diferentes factores individuales, por ejemplo, el flujo salival, la concentración mineral de la saliva, la capacidad buffer y el comportamiento nutricional (Philip y cols., 2018), es así como bajo ciertas condiciones la desmineralización se puede estancar o incluso retroceder e iniciar un proceso de remineralización (Pitts y cols., 2017). Debido a esto las diferencias entre las lesiones formadas se podrían asociar a variaciones individuales entre los participantes del estudio, ya que la muestra con mayor severidad se encontraba en el sujeto con mayor historia de caries pasada y con el mayor nivel de cumplimiento del protocolo.

En la presente investigación se evidenció que luego de la exposición de bloques de esmalte en el modelo in situ por 14 días a un desafío cariogénico de sacarosa al 20%, 8 veces al día, los valores de dureza superficial de todas las muestras disminuyeron de forma significativa respecto al control negativo de desmineralización. Estos resultados se condicen con los obtenidos por Cury y cols. (2001), Valenzuela y Giacaman, (2012) y Jara y cols., (2013) en sus diseños

experimentales in situ. Siendo los valores obtenidos congruentes con los descritos por la literatura para esmalte dental sano y lesión de caries incipiente.

Al igual que la microdureza, el contenido mineral de las muestras también disminuyó en comparación con el esmalte sano. En este estudio la densidad mineral del esmalte sano fue de 2,37 - 2,58 g/cm³, valores ligeramente menores a los reportados por otros autores, los cuales iban en el rango de 2,57- 3,1 g/cm³ (Angmar y cols., 1963; Dowker y cols., 2003, 2006; Clementino-Luedemann y Kunzelmann, 2006; Huang y cols., 2007; Cochrane y cols., 2012 b). Sin embargo, son consistentes con los resultados reportados por Kuck y cols. (2016), quienes evaluaron 11 premolares sanos con el mismo sistema de Micro-CT y software que en esta investigación, situando la densidad mineral entre 2,32-2,37 g/cm³.

El contenido mineral promedio del grupo expuesto se localizó entre 1,77 y 2,08 g/cm³, valores congruentes con los reportados por Dowker y cols. (2006), quienes examinaron el promedio del contenido mineral de una lesión incipiente de fisura y lo establecieron entre 1,5- 2,6 g/ cm³

No se encontraron estudios in situ que evaluaran la densidad mineral de lesiones incipientes de manera cuantitativa, por lo que los estudios previamente descritos corresponden a estudios de lesiones incipientes naturales. Las pequeñas diferencias establecidas entre nuestros resultados y otros pueden deberse a diferentes métodos de calibración y cálculo, y a las diferencias entre los sistemas utilizados.

Es importante resaltar que además de los cambios cuantitativos en las muestras, previamente descritos, también fue posible evidenciar variaciones en la coloración y textura de estas. De superficies brillantes, suaves y duras se transformaron, en diferente medida, a zonas blanquecinas opacas, y rugosas, todas características compatibles con una lesión inicial de caries, tal como fue descrito por Balda y cols. (1999) y Kidd y Fejerskov (2004). Estas variaciones también se plasmaron en la

evaluación cualitativa de la densidad mineral realizada a partir de las imágenes obtenidas del micro-CT, en las que se visualizaban diferencias claras de la gama de colores en las zonas desmineralizadas. Junto a esto, mediante microscopía electrónica de barrido se apreciaron cambios estructurales en la superficie del esmalte, evidenciando un aumento en su porosidad, propio de una lesión inicial de caries, similar a lo obtenido por Balda y cols. (1999) y Ratthapong (2015).

Estos resultados demuestran que el modelo in situ de caries propuesto es capaz de materializar un proceso biológico complejo en él, como es la formación de lesiones tipo caries incipiente sobre bloques de esmalte.

Para lograr relevancia clínica los estudios in situ requieren simular condiciones intraorales no controladas asociadas a parámetros experimentales altamente controlados (Zero, 1995), debido a la incorporación de múltiples combinaciones de variables naturales y experimentales su diseño resulta complejo. En las publicaciones existen numerosos protocolos que involucran diversos parámetros, lo que obstaculiza el realizar una comparación entre los resultados de los diferentes estudios (Sung y cols., 2014). A partir de esto, una de las fortalezas que tiene el presente modelo es que buscó replicar los parámetros más utilizados en la literatura, a fin de formular un protocolo lo más estandarizado posible basado en esos parámetros principales.

El advenimiento de la tecnología nos permitió utilizar el sistema de micro-CT para evaluar los cambios en la densidad mineral de los bloques de esmalte. Este sistema tiene algunas ventajas en comparación con métodos más antiguos, ya que no requiere preparación previa de la muestra, facilita la realización de exploraciones repetidas, es un sistema no destructivo puesto que la superficie dentaria no es dañada durante el proceso, sus resultados son sensibles y permite evaluar el área de la lesión de manera tridimensional (Swain y cols., 2009). Dentro de las desventajas advertidas se encuentran el largo tiempo necesario para formar un modelo 3D de cada muestra, el alto costo del proceso (Kuck y cols., 2016), el escaso

conocimiento acerca de su uso en nuestra facultad y las dificultades en el proceso de calibración.

Junto a esto, el diseño del modelo propuesto permite la acumulación de biopelícula lo que corresponde a una gran ventaja, ya que en futuras investigaciones puede ser utilizado y contribuir a una mayor comprensión de las interacciones entre el medio ambiente y el microbioma oral. A medida que el entendimiento de las diferentes relaciones aumente, será posible identificar nuevas estrategias para combatir esta enfermedad, así como también encontrar medidas para la promoción activa de la microbiota natural y mecanismos para la reducción del impacto de aquellos factores que conducen a la disbiosis. (Marsh, 2018).

Uno de los obstáculos presentados en esta investigación fue la captación de voluntarios que quisieran participar durante el periodo experimental. La selección del panel de sujetos posee una gran relevancia en la respuesta de un modelo in situ (Zero, 1995). En nuestro caso estuvo integrado por estudiantes de odontología, hecho que facilitó levemente su reclutamiento, así como también su desempeño en el estudio, ya que estos poseían un mayor nivel de comprensión en cuanto a lo que estaba ocurriendo en su boca, así como también facilidades en el acceso para aliviar incomodidades que tuviera el dispositivo. No obstante a lo anterior, el hecho de que estos se encontraran en Viña del Mar generó algunos entorpecimientos para la instalación y retiro de los dispositivos.

En cuanto al perfil del panel de sujetos, si bien ha sido descrito que la incorporación de participantes con antecedentes asociados o con capacitación en odontología tiene la posibilidad de introducir un sesgo experimental (Zero, 1995), en la presente investigación no fue el caso, puesto que los voluntarios seleccionados poseían diferentes rangos de experiencias de caries pasadas, lo que le otorga mayor representatividad a la muestra, otorgándole relevancia al estudio.

Al incluir un limitado número de participantes se decidió utilizar diferentes superficies de los bloques de esmalte como observaciones independientes para así aumentar

el tamaño muestral. Este análisis, si bien no es el recomendado (Stookey y cols., 1992), no afectó el desenlace, ya que los resultados advirtieron escasa variabilidad entre ellos, hecho que se ve reflejado en los reducidos rangos presentes en los intervalos de confianza de cada grupo. Si bien en la presente investigación no reflejó alteraciones, se recomienda a futuro incluir un mayor número de participantes o disminuir el periodo experimental y que los sujetos utilicen el dispositivo en 2 etapas.

Como bien se ha expresado previamente, dentro de los conocimientos necesarios para realizar un estudio in situ, es necesario tener la noción de las limitaciones de trabajar con personas voluntarias y de las dificultades que se pueden presentar en cuanto al compromiso y cumplimiento de los sujetos con los protocolos de investigación. Es así, como es probable que estudios que plantean exigencias poco realistas, tengan problemas de cumplimiento y un alta tasa de deserción (Zero, 1995). Es por esto que se hace indispensable lograr un diseño y protocolo adecuado que permita lograr un equilibrio entre el nivel de exigencia y los requerimientos experimentales, puesto que un bajo nivel de cumplimiento puede tener un efecto importante en los resultados. En el presente estudio se utilizaron múltiples recursos para motivar a los voluntarios a lograr el cumplimiento de los protocolos, inicialmente con medidas para recordar la aplicación del tratamiento con sacarosa, como alarmas y una hoja donde anotar las aplicaciones, así como también una evaluación personal final realizada en el documento de evaluación de compromiso y cumplimiento final (Anexo 7). A partir de este documento se obtuvo un promedio de cumplimiento de 4,6, en una escala de 1 a 7, lo cual nos indica un nivel de desempeño aceptable para un modelo piloto. Puesto que el nivel de cumplimiento individual es una medida subjetiva, se quiso analizar si los valores obtenidos por los participantes alteraron de alguna manera los resultados experimentales, no encontrando diferencias significativas entre los resultados de dureza y/o densidad mineral entre los sujetos a partir de su nivel de cumplimiento.

En relación a la tasa de deserción, esta se considera baja, ya que sólo se retiró del estudio un participante previo a la instalación del dispositivo por motivos horarios.

En cuanto a las complicaciones reportadas durante el periodo experimental, los participantes relataron incomodidad (80%), que fue aliviada posterior a un par de controles del dispositivo y dificultades horarias para la aplicación del tratamiento (100%). A partir de esto, se hace necesario considerar para futuros estudios incentivos para los participantes, para de esta manera facilitar su captación, así como también poder lograr un mayor compromiso con el estudio.

Otra de las limitaciones presentadas fue la recolección de terceros molares incluidos indemnes, esto debido a las consideraciones éticas, ya que estos son considerados desechos biológicos, así como también a las restricciones en su selección, puesto que la mayoría de estos dientes requieren de odontosección para su extracción. Si bien los dientes de origen humano son la fuente más apropiada para ser el sustrato de estudios in situ desde la perspectiva de relevancia clínica (Zero, 1995), podrían utilizarse para futuras investigaciones bloques de esmalte bovino altamente estandarizado, teniendo en consideración las diferencias entre tejidos previamente descritas.

Los modelos de caries in situ han sido utilizados para evaluar la cariogenicidad de los alimentos desde que fueron descritos en 1974 por Koulourides y cols., a partir de entonces este método ha sido utilizado por distintos grupos de estudio alrededor del mundo y ha sido discutido en diversos congresos y publicaciones (Duggal y cols., 2001). A pesar de ser un modelo antiguo, estos siguen estando completamente vigentes, representando un 15% de los estudios de investigación en cariología sobre desmineralización y remineralización entre los años 2014 y 2016 (Yu y cols., 2017), cuya utilidad ya no solamente radica en el estudio de caries, como demuestra una revisión sistemática realizada entre 2003 y 2012, la que reflejó que entre esos años se realizaron 191 publicaciones en modelos de caries in situ. En ella los artículos fueron categorizados según tópico en publicaciones relacionadas con desmineralización, remineralización, erosión y otros. Concluyendo que los temas que adquirieron mayor interés durante la última década corresponden a estudios relacionados con remineralización y erosión (Sung y cols, 2014).

El propósito del modelo in situ descrito anteriormente es la medición confiable de cambios estructurales, minerales y de dureza superficial como una forma de cuantificar los efectos de la sacarosa al 20% en el proceso de caries. Los modelos in situ, aunque experimentales, no son medidas sustitutas, sino medidas reales de intervenciones que afectan al proceso de la caries dental (Highman y cols., 2005). Por lo tanto, se puede confiar en los hallazgos de los estudios que emplean estos modelos como información válida sobre desarrollo de caries secundarias (Hollanders y cols., 2018), eficacia de productos como dentífricos (Creeth y cols., 2018; Zero y cols., 2018) o sus constituyentes (Parkinson y cols., 2018), enjuagues y/o barnices de flúor (Kucuk y cols., 2016) en la remineralización del esmalte; acerca de la desmineralización resultante de alimentos cariogénicos o la protección que brindan la ovoalbúmina (Jara y cols., 2013), ácidos grasos libres (Valenzuela y Giacaman, 2012), chicle (Cai y cols., 2009; Cochrane y cols., 2012 a), probióticos (Lodi y cols., 2010 y 2015), entre otros. Por lo tanto, la relevancia de esta investigación radica en la creación de un modelo de caries in situ realizado en nuestra universidad a través de un protocolo establecido que podrá ser utilizado como plataforma para futuras investigaciones.

IX. CONCLUSIONES

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

- 1) Existen diferencias en la densidad mineral, microdureza superficial y cambios estructurales de bloques de esmalte dental inserto en un modelo de caries *in situ* expuesto a la acción tópica de sacarosa al 20% aplicada cada 2 horas, 8 veces al día, durante 14 días, versus esmalte dental inserto en el mismo modelo de caries *in situ* no expuesto.
- 2) Este modelo posee la capacidad de replicar el proceso biológico de la caries dental y puede ser utilizado como plataforma para futuras investigaciones.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou Neel E, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young A, Bozec L, Mudera V. (2016). Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *International Journal of Nanomedicine*. 11: 4743—4763.

Aires CP, Tabchoury CP, Del Bel Cury A, Koo H, Cury JA. (2006) Effect of sucrose concentration on dental biofilm formed in situ and on enamel demineralization. *Caries Res*. 40(1):28-32.

Angmar B, Carlstrom D, Glas JE (1963). Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. *J Ultrastruct Res*. 8:12-23.

Arends J, Dijkman T, Christoffersen J. (1987). Average mineral loss in dental enamel during demineralization. *Caries Res*. 21:249–254.

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.

Bowen, W.H. (2013). Rodent model in caries research. *Odontology*, 101, 9–14

Briner WW. (1981). Rodent model systems in dental caries research: rats, mice, and gerbils. In: Proceedings of “Symposium on animal models in cariology”, Sp. Pupp. *Microbiology Abstracts*, 111–9.

British Society of Periodontology. (2016). Revised Basic Periodontal Exam Guidelines. [http://www.bsperio.org.uk/publications/downloads/94_154250_bpe-2016-po-v5-final-002.pdf]

Cai F, Shen P, Walker GD, Reynolds C, Yuan Y, Reynolds EC. (2009). Remineralization of enamel subsurface lesions by chewing gum with added calcium. *J Dent.* 37(10):763-8.

Ccahuana-Vásquez RA, Cury JA. (2010). *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Braz Oral Res.* 24(2):135-41.

Cheyne VD. (1940). Inhibition of experimental dental caries by fluorine in the absence of saliva. *Proc Soc Exp Biol Med.* 43:58–61.

Clasen AB, Ogaard B. (1999). Experimental intra-oral caries models in fluoride research. *Acta Odontol Scand.* 57(6):334–41.

Clementino-Luedemann TN, Kunzelmann KH. (2006). Mineral concentration of natural human teeth by a commercial micro-CT. *Dent Mater J.* 25(1):113-9.

Cochrane NJ, Shen P, Byrne SJ, Walker GD, Adams GG, Yuan Y, y cols. (2012 a). Remineralisation by chewing sugar-free gums in a randomised, controlled in situ trial including dietary intake and gauze to promote plaque formation. *Caries Res.* 46 (2):147-55.

Cochrane N.J., Anderson P., Davis GR., Adams GG., Stacey M.A., Reynolds EC. (2012 b). An X-ray Microtomographic Study of Natural White-spot Enamel Lesions. *Journal of Dental Research.* 91(2): 185–191.

Creeth JE, Karwal R, Hara AT, Zero DT. (2018). A Randomized in situ Clinical Study of Fluoride Dentifrices on Enamel Remineralization and Resistance to Demineralization: Effects of Zinc. *Caries Res.* 52:129-138.

Cury JA, Rebello MA, (1997). In situ relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. *Caries Res.* 31(5):356-60.)

Cury J, Francisco S, Del Bel Cury A, Tabchoury C. (2001). In Situ Study of Sucrose Exposure, Mutans Streptococci in Dental Plaque and Dental Caries. *Braz Dent J.* 12(2): 101-104.

Curzon MEJ , Hefferren JJ. (2001). Nutrition: Modern methods for assessing the cariogenic and erosive potential of foods. *British Dental Journal.* 191: 41–46.

Cuy JL, Mann AB, Livi KJ, Teaford MF, .Weihs TP. (2002). Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. *Archives of Oral Biology.* 47 (4): 281-291.

Damato FA, Stephen KW. (1994). Demonstration of a fluoride dose response with an In situ single-section dental caries model. *Caries Rzeroes.* 28: 277-283

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

Dowker SE, Elliott JC, Davis GR, Wassif HS (2003). Longitudinal study of the three-dimensional development of subsurface enamel lesions during in vitro demineralisation. *Caries Res.* 37:237-245.

Dowker SE, Elliott JC, Davis GR, Wilson RM, Cloetens P (2006). Three dimensional study of human dental fissure enamel by synchrotron x-ray microtomography. *Eur J Oral Sci.* 114(Suppl 1):353-359.

Duggal MS., Toumba K.J., Amaechi BT., Kowash MB., Higham S.M. (2001). Enamel Demineralization in situ with Various Frequencies of Carbohydrate Consumption with and without Fluoride Toothpaste. *Journal of Dental Research*. 80(8): 1721–1724.

Ehremberg N, Morales D, Hempel MC, Salgado C, Faleiros S, Rodríguez G, Cabello R. (2015). Asociación entre las variables del Cariograma e historia de caries en la población de 15 a 64 años de la comuna de Tortel, provincia del Capitán Prat de la XI Región de Aysén, Chile: análisis multivariable. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*. 8(1): 7-16.

Featherstone JD. (1996) Modeling the caries-inhibitory effects of dental materials. *Dent Mater*, 12: 194–7

Featherstone JD. (2004). The continuum of dental caries--evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res*.83 Spec No C: C39-42.

Featherstone JD. (2008). Dental caries: a dynamic disease process. *Aust Dent J*. 53(3):286-91.

Featherstone JD, Mellberg JR. (1981). Relative rates of progress of artificial carious lesions in bovine, ovine and human enamel. *Caries Res*. 15(1):109–14.

Fejerskov O, Nyvad B, Larsen M J. (1994). Human experimental caries models: intra-oral environmental variability. *Adv Dent Res*. 8: 134–143.

Fejerskov O, Kidd EAM (2008). *Dental caries: the disease and its clinical management*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Munksgaard.

Gamonal J. (1996). Prevalencia de enfermedades periodontales y de caries dental en la población de 35-44 y de 65 a 74 años de nivel socioeconómico bajo y medio-bajo de la provincia de Santiago, Región Metropolitana, y determinación de los

recursos humanos necesarios para su tratamiento. Región Metropolitana. Tesis para optar al grado de Magíster en Periodontología. Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Giacaman RA, Muñoz MJ, Ccahuana- Vasquez RA, Muñoz-Sandoval C, Cury JA (2012). Effect of fluoridated milk on enamel and root dentin demineralization evaluated by a biofilm caries model. *Caries Res.* 46(5):460-466.

Giacaman RA, Valenzuela-Ramos R, Muñoz-Sandoval C. (2013). Free fatty acids modulate sucrose cariogenicity on the oral biofilm formed on enamel in situ. 60th ORCA Congress. July 3-6, Liverpool, UK. Publishes in *Caries Research*.

Giacaman RA, Valenzuela-Ramos R, Muñoz-Sandoval C. (2016). In situ anticariogenic activity of free fatty acids after sucrose exposure to oral biofilms formed on enamel. *Am J Dent.* 29 (2):81-6.

Hernandez de Campos P, Sanabe ME, Almeida J, Duarte DA, Botti MT, Oliveira R, y cols. (2015). Different bacterial models for in vitro induction of non-cavitated enamel caries-like lesions: Microhardness and polarized light microscopy analyses. *Microscopy Research and Technique* 78(6)

Higham SM, Pretty IA, Edgar WM, Smith PW. (2005). The use of in situ models and QLF for the study of coronal caries. *J Dent.* 33: 235-241.

Hollanders AC, Kuper NK, Maske TT, Huysmans M. (2018). Secondary Caries in situ Models: A Systematic Review. *Caries Res.* 52:454-462.

Huang, TT, Jones, AS, He, LH, Darendeliler, MA, Swain, MV (2007). Characterization of enamel white spot lesions using x-ray micro-tomography. *J Dent.* 35:737-743.

Ismail AI, Hasson H, Sohn W. (2001). Dental caries in the second millennium. *J Dent Educ.* (10):953-9.

Jara CJ., Giacaman R, Valenzuela R. (2013). Ensayo clínico controlado aleatorizado del efecto modulador de la ovoalbúmina sobre la cariogenicidad de la sacarosa, in-situ. (Tesis de pregrado). Universidad de Talca. Talca, Chile.

Jara M, Díaz-Dosque M, Cabello R, Palma P. (2017). Efecto remineralizante de un agente a base de flúor y grafeno sobre bloques de esmalte desmineralizados con un modelo de biopelícula de *Streptococcus mutans*. (Tesis de pregrado). Universidad de Chile. Santiago, Chile.

Johnson MF. (2004). The Role of Risk Factors in the Identification of Appropriate Subjects for Caries Clinical Trials: Design Considerations. *J Dent Res* 83(Spec Iss C):C116-C118, 2004

Kidd EA, Fejerskov O. (2004). What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilm. *J Dent Res.* 83: C35-38

Koulourides T, Phantumvanit P, Munksgaard EC, Housch T (1974). An intraoral model used for studies of fluoride incorporation in enamel. *J Oral Pathol* 3:185-196.

Kucuk E, Malkoc S, Demir A. (2016). Microcomputed tomography evaluation of white spot lesion remineralization with various procedures. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics.* 150 (3):483 – 490.

Legeros RZ, Trautz OR, Legeros JP, Klein E, Shirra WP.(1967). Apatite crystallites: effects of carbonate on morphology. *Science.*155(3768):1409-11.

Lippert. F. (2017). Effect of Enamel Caries Lesion Baseline Severity on Fluoride Dose-Response. *International Journal of Dentistry*. Volume 2017, Article ID 4321925, 6 pages.

Lippert. F, Lynch RJM. (2014). Comparison of Knoop and Vickers surface microhardness and transverse microradiography for the study of early caries lesion formation in human and bovine enamel. *Archives of oral biology*. 59: 704-710.

Lodi CS, Manarelli MM, Sasaki KT, Fraiz FC, Delbem AC, Martinhon CC. (2010). Evaluation of fermented milk containing probiotic on dental enamel and biofilm: in situ study. *Arch Oral Biol*. 55(1):29-33.

Lodi C, Oliveira S, Brighenti L, Delbem F, ELBEM, Martinhon ACB, Rodrigues CC. (2015). Effects of probiotic fermented milk on biofilms, oral microbiota, and enamel. *Brazilian Oral Research*. 29(1): 01-7.

Lynch RJ, Momy U, ten Cate JM. (2006). The effect of fluoride at plaque fluid concentration on enamel de- and remineralisation at low pH. *Caries Res*. 40:522–529.

Magalhães AC, Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Buzalaf MA. (2009). Comparison of cross-sectional hardness and transversal microradiography of artificial carious 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.

Marquezan M, Correa FN, Sanabe ME, Rodrigues LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC, y cols. (2009). Artificial methods of dentine caries induction: a hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol.* 54:1111–1117.

Marsh PD. (1995). The role of microbiology in models of dental caries. *Adv Dent Res.* 9(3): 244-54.

Marsh P.D. (2018). In *Sickness and in Health—What Does the Oral Microbiome Mean to Us? An Ecological Perspective.* *Advances in Dental Research.* 29(1):60–65.

McCollum EV, Simmonds N, Kinney EM, Grieves CJ. (1922). The relation of nutrition to tooth development and tooth preservation I: A preliminary study of gross maxillary and dental defects in 220 rats on defective and deficient diets. *Johns Hopkins Hosp Bull-* 33:202.

McIntyre JM, Featherstone JD, Fu J. (2000). Studies of dental root surface caries. 1. Comparison of natural and artificial root caries lesions. *Aust Dent J.* 45:24–30.

Mellberg JR, Loertscher KL. (1974). Comparison of in vitro fluoride uptake by human and bovine enamel from acidulated phosphate-fluoride solutions. *J Dent Res.* 53(1):64–7.

MINSAL. (2010). *Análisis de la Situación de Salud Bucal.* Ministerio de Salud. Gobierno de Chile.

Murray CJL, Ezzati M, Flaxman AD, Lim S, Lozano R, Michaud C, y cols. (2012). Comprehensive Systematic Analysis of Global Epidemiology: Definitions, Methods, Simplification of DALYs, and Comparative Results from the Global Burden of Disease Study. Supplement to: 2010 GBD 2010: design, definitions, and metrics. *The Lancet.* 380: 2063–66.

Nanci A, Ten Cate. A. R. (2008), Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function. Maryland Heights, MO: Mosby.

Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Ervin RF, y cols. (1955). Experimental caries in germfree rats inoculated with enterococci. J Am Dent Assoc. 50(3):259–72.

Parkinson C, Burnett G, Creeth J, Lynch R, Budhawant C, Lippert F, Hara A., Zero DT. (2018). Effect of phytate and zinc ions on fluoride toothpaste efficacy using an *in situ* caries model. Journal of Dentistry. 73: 24-31.

Petersen PE. (2003). The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community dentistry and oral epidemiology* 31 Suppl. 1: 3-23.

Philip N, Suneja B, Walsh L (2018). Beyond Streptococcus mutans: clinical implications of the evolving dental caries aetiological paradigms and its associated microbiome. Br Dent J. 224 (4):219-225

Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, Tagami J, Twetman S, Tsakos G, Ismail A. (2017). Dental caries. Nature Reviews Disease Primers. 3, [17030].

Ratthapong Worawongvasu (2015). A Scanning Electron Microscopic Study of Enamel Surfaces of Incipient Caries. Ultrastructural Pathology. 39(6): 408-412

Ribeiro CC, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Rosalen PL, Cury JA. (2005). Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. Br J Nutr. 94(1): 44-50.

Righolt A.J., Jevdjevic M, Marcenes W, Listl S. (2018). Global-, Regional-, and Country-Level Economic Impacts of Dental Diseases in 2015. *J Dent Res.* 97(5): 501-507.

Schlafer S, Ibsen CJ, Birkedal H, Nyvad B. (2017). Calcium-Phosphate-Osteopontin Particles Reduce Biofilm Formation and pH Drops in in situ Grown Dental Biofilms. *Caries Res.* 51:26-33

Seemann R, Bizhang M, Kluck I, Loth J, Roulet JF. (2005). A novel in vitro microbial-based model for studying caries formation-development and initial testing. *Caries Res.* 39(3):185-90.

Selwitz R., Ismail A., Pitts N. (2007) Dental caries. *Lancet* 369: 51-9.

Shellis RP: Effects of a supersaturated pulpal fluid on the formation of caries-like lesions on the root of human teeth. (1994). *Caries Research.* 28:14–20.

Skucha-Nowak M, Gibas M, Tanasiewicz M, Twardawa H, Szklarski T. (2015). Natural and Controlled Demineralization for Study Purposes in Minimally Invasive Dentistry. *Adv Clin Exp Med.* 5:891-898.

Soto L, Tapia R, Jara G, Rodríguez G, Urbina T. (2007). Diagnóstico Nacional de Salud Bucal del Adolescente de 12 años y Evaluación del Grado de Cumplimiento de los 4 Objetivos Sanitarios de Salud Bucal 2000-2010. Santiago, Chile: Universidad Mayor.

Steiner-Oliveira C., Maciel F., Rodriguez L., Napimoga MH, Freire LA., Höfling JF., y cols. (2007). An *in vitro* microbial model of producing caries like lesions on enamel. *Braz. J. Oral Sci;* 6(22): 1392-1396.

Stookey GK, Katz BP, Beiswanger BB, Dunipace AJ. (1992). Sample Size Considerations in Designing Studies with Intra-oral Models. *Journal of Dental Research*, 71(3_suppl), 819–821

Sung YH, Kim HY, Son HH, Chang J. (2014). How to design in situ studies: an evaluation of experimental protocols. *Restor Dent Endod*. 39(3):164-71.

Swain MV, Xue J. (2009). State of the art of Micro-CT applications in dental research. *International Journal of Oral Sciences*, 1(4): 177-188.

Ten Bosch JJ, Angmar-Mansson B. (1991). A review of quantitative methods for studies of mineral content on intra-oral caries lesions. *J Dent Res*. 70: 2-14.

Ten Cate JM (1992). Patient selection and appliance design in intra-oral models. *J Dent Res* 71 (Spec Iss):908-910

Ten Cate JM. (1994). *In situ* models, physico-chemical aspects. *Adv Dent Res*. 8: 125–133.

Ten Cate JM. (2015). Models and Role Models. *Caries Res*. 49(suppl 1):3-10

Ten Cate JM, Duijsters PPE. (1982). Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res*. 16(3):201–10.

Ten Cate JM, Featherstone JD. (1991). Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2(3):283-96.

Twetman S. (2018), Prevention of dental caries as a non-communicable disease. *Eur J Oral*. 126(Suppl. 1): 19–25.

Urzua I, Mendoza C, Arteaga O, Rodríguez G, Cabello R, Faleiros S, Carvajal, P, Muñoz, A., Espinoza, I., Aranda, W, Gamonal, J. (2012). Dental caries prevalence

and tooth loss in Chilean adult population: first national dental examination survey. *Int J Dent*. 2012:810170.

Valenzuela R, Giacaman R. (2012). Ensayo clínico controlado aleatorizado del efecto modulador de los ácidos grasos sobre la cariogenicidad de la Sacarosa, in-situ. (Tesis de pregrado). Universidad de Talca. Talca, Chile

Weinberger BW. (1948). *An introduction to the history of dentistry v.1*. St. Louis .C.V. Mosby Co.

Williams, P.L., Warwick, R., Dyson, M., Bannister, L.H. (1989). *Splanchnology: The teeth*. In: *Gray's Anatomy*, Churchill Livingstone, New York. 1308–1309.

Wong FS, Anderson P, Fan H, Davis GR. (2004). X-ray microtomographic study of mineral concentration distribution in deciduous enamel. *Arch Oral Biol*, 49(11): 937–944.

World Health Organization (WHO). (1995). *Guidelines for good clinical practice (GCP) for trials on pharmaceutical products*. WHO Technical Report Series. N° 850, Annex 3.

World Health Organization (WHO). (1997). *Encuestas de Salud Bucodental: Métodos básicos*. 4ed. Ginebra

Xuelian H, Qiang G, Biao R, Yuqing L, Xuedong Z. (2016). Models in caries research. In: *Dental Caries: Principles and Management*. Xuedong Z (Ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp: 157-171.

Yu OY, Zhao IS, Mei ML, Lo EC, Chu CH. (2017). A Review of the Common Models Used in Mechanistic Studies on Demineralization-Remineralization for Cariology Research. *Dent J (Basel)*.18; 5(2)

Zero D, T, Rahbek I, Fu J, Proskin H, M, Featherstone J, D, B. (1990). Comparison of the Iodide Permeability Test, the Surface Microhardness Test, and Mineral Dissolution of Bovine Enamel following Acid Challenge. *Caries Res.* 24:181-188.

Zero DT. (1995). In situ caries models. *Adv Dent Res.* 9(3):214–30.

Zero DT, Lippert F, Hara AT, Creeth JE, Newby EE, Butler A, Constantin P, Bosma ML (2018). In situ anticaries efficacy of dentifrices with different formulations - A pooled analysis of results from three randomized clinical trials. *J Dent.* 77:93-105

XI. ANEXOS

Anexo. 1. Acta de aprobación de protocolo de investigación (Comité Ético- Científico)



FACULTAD DE
ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE CHILE

Ed-24 Agosto 2017

COMITÉ ÉTICO
CIENTÍFICO

INFORME N°-2016/30

Acta de Aprobación de Proyecto FIOUCH titulado "Efecto del consumo de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formatos sistémico y tópico en la morfología, diversidad y composición del biofilm bucal. Modelo *in situ* de caries." Versión 11/2016.

1. 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	Dr. Marco Cornejo Vicepresidente CEC	Dra. Weronika Well Miembro Permanente CEC
Sra. Paulina Navarrete Miembro Permanente CEC	Sr. Roberto La Rosa Miembro Permanente CEC	Dr. Rodrigo Cabello Miembro Permanente CEC
Dr. Alfredo Molina Miembro Permanente CEC	Dra. Paola Llanos Miembro Permanente CEC	Dr. Juan Estay Miembro Permanente CEC
Sra. Rebeca Galarce Representante de la Comunidad	Dra. Viviana Toro Miembro Alterno CEC	

Eli-24 Agosto 2017

2. Fecha de Aprobación: 03/05/2017

Título completo del proyecto: "Efecto del consumo de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formatos sistémico y tópico en la morfología, diversidad y composición del biofilm bucal. Modelo *in situ* de caries." Versión 11/2016.

3. Investigador responsable: Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez**4. Institución Patrocinante: Facultad de Odontología – Universidad de Chile****5. Documentación Revisada:**

- Proyecto
- Consentimiento Informado (CI)
- Carta de presentación o solicitud de revisión/evaluación.
- Carta de Intención de la Investigador
- Carta de Compromiso de la Investigador
- Carta de Autorización del Uso de Sillón
- Carta del Director de Departamento de Odontología Restauradora

6. Fundamentación de la aprobación

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

RESPECTO A ASPECTOS METODOLÓGICOS:

- En el formulario de consentimiento informado, en la sección objetivo de la Investigación, adaptarlo al formato sugerido por el CEC, publicado en la página web. Incluyendo nombres del IP e Institución patrocinante.

RESPECTO A ASPECTOS JURIDICOS:

- Enviar una declaración de conflicto de intereses.
- Declarar explícitamente que este proyecto no se aplicará en poblaciones vulnerables sujetas a tutorías o evaluaciones directas como los son alumnos de FOUCH.

Ed-24 Agosto 2017

RESPECTO A ASPECTOS ÉTICOS:

Realizar las siguientes modificaciones al C.I.:

- Modificaciones en su lenguaje, especialmente en las secciones de "Procedimiento", que faciliten la comprensión por parte de los sujetos voluntarios. Se requiere incluir a los demás coinvestigadores que pudieran tomar el consentimiento informado.
- Incluir los criterios de exclusión e inclusión dentro del CI.
- Explicar la obtención de los bloques de dientes humanos utilizados en las placas en esta investigación. Presentar documentación que avale la obtención.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, ha aprobado el Protocolo del estudio titulado "Efecto del consumo de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formatos sistémico y tópico en la morfología, diversidad y composición del biofilm bucal. Modelo *in situ* de caries." Versión 11/2016.



Dr. Eduardo Fernández G.
Presidente CEC



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

Anexo 2. Ficha Clínica



Evaluación de voluntarios para participación en trabajo de investigación dirigido a adultos

Nombre				Rut	
Fecha de Nacimiento		Edad		Teléfono	

Posibilidad de utilizar dispositivo durante periodo experimental: (1) Si (2) No

Anamnesis

1. Antecedentes mórbidos:
2. Antecedentes quirúrgicos (Fecha, diagnóstico, procedimiento, complicaciones)
3. Alergias:
4. Medicamentos (Nombre, dosis, fecha inicio)
5. Hábitos
 - Tabaco:
 - Alcohol:
 - Drogas:
 - Controles odontológicos (frecuencia, fecha último control y causa)
6. Alimentación:
 - Frecuencia:
 - Ocasión:
 - N° ingestas HC:

- Calidad:
- Consistencia:
- Valor potencial cariogénico:

7. Higiene Oral

- Frecuencia cepillado:
- Ocasión:
- Tipo de cepillo, pasta, enjuague

8. Antecedentes Familiares:

Examen Físico

1. Examen Físico General:

2. Examen Intraoral:

Alteraciones Salivales: (1) Si (2) No

Portador de prótesis removible u ortodoncia: (1) Si (2) No

3. Examen Periodontal Básico

4. Estado de Dentición y Tratamiento necesario

Anexo 3. Consentimiento informado participantes



Edición del CI 25/08/2017

Consentimiento Informado Para Participación en Proyecto de Investigación Dirigido a Adultos

Título del Protocolo: Efecto del consumo de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formatos sistémico y tópico en la morfología, diversidad y composición del biofilm bucal. Modelo *in situ* de caries

Investigador Principal: Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

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 Adultos 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.

Este Proyecto está conformado por un equipo investigador y académico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Como Investigador Principal esta Gonzalo Rodríguez Martínez y como Co investigadores, Patricia Palma y Begoña Moreno. Estamos realizando una investigación cuyo objetivo es determinar el efecto que el consumo de probióticos en la composición de la placa dental dependiendo si se toman o se aplican directamente en los dientes. Para ello, se invitarán a participar voluntarios de entre 18 y 30 años de edad.

Le proporcionaremos información y lo invitamos 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.



Justificación de la Investigación

La caries dental es una enfermedad crónica, multifactorial y de alta prevalencia a nivel mundial. El tratamiento convencional de la caries dental ha sido históricamente la remoción quirúrgica del tejido afectado por caries, sin embargo se ha demostrado que el enfoque restaurador basado en la operatoria clásica por sí solo, no logra controlar la enfermedad. Existen diversas estrategias preventivas para el manejo de la caries dental, entre las que se describen algunos mecanismos para modificar la biopelícula o placa dental. Dentro de este último grupo se encuentran los probióticos, que han sido históricamente utilizados en el tratamiento y prevención de una amplia gama de condiciones y patologías del ser humano. Estudios clínicos avalan el uso de probióticos como agentes beneficiosos sobre la salud oral, y en particular un estudio clínico llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, demuestra su efecto en la disminución de la incidencia de lesiones de caries en párvulos, sin tener claro cuál es el mecanismo de acción que tiene estas bacterias probióticas.

Objetivo de la Investigación

La presente investigación tiene por objetivo determinar el efecto que el consumo de probióticos en la composición de la placa dental dependiendo si se toman o se aplican directamente en los dientes. Para ello, se invitarán a participar voluntarios de entre 18 y 30 años de edad.

Beneficio de la Investigación.

Usted podrá conocer su estado de salud oral y aportará con información relevante sobre el efecto de los probióticos en salud oral.

Tipo de Intervención y Procedimiento.

Si usted decide participar será examinado para evaluar su situación de salud oral y luego se le invitará a utilizar una placa acrílica en el paladar. Las placas contendrán bloques de dientes humanos estériles. Se le solicitará aplicar azúcar en gotas con un gotario que se le entregará sobre los bloques de diente 8 veces al día y en 2, 3 o 4 de ellas.

Dependiendo del grupo al que haya sido asignado, se le solicitará hacer 1 de las siguientes acciones:

- a) Ingerir 100 ml de agua en la que se ha suspendido una dosis liofilizada de probiótico. Esta acción se realiza con el aparato fuera de la boca
- b) Aplicar 5 gotas de 100 ml de agua en la que se ha suspendido una dosis liofilizada de probiótico. Esta acción se realiza sobre los bloques de esmalte en el aparato removible.
- c) Ingerir 100 ml de agua en la que se ha suspendido una dosis liofilizada de probiótico. Esta acción se realiza con el aparato dentro de la boca

Aparte de cada vez que se aplique el probiótico ya sea tópico o sistémico, las placas sólo se removerán para comer y para lavarse los dientes. Las placas serán utilizadas 14 días cada una. El probiótico utilizado es un lactobacilo con probadas propiedades benéficas para el organismo humano.

Al cabo de cada fase experimental, las placas serán devueltas a los investigadores los que analizarán las bacterias formadas y la desmineralización provocada.

Riesgo de la Investigación.

Usted no correrá ningún riesgo mediante y posterior al procedimiento de la investigación debido a que este protocolo es mínimamente invasivo, la utilización del aparato es inocuo para su salud y la toma de muestras no produce ningún daño. Además, su participación en este estudio no tiene ningún costo económico para usted. En caso de presentar algún tipo de molestia o incomodidad póngase en contacto con los investigadores de este proyecto.

Criterios para selección de los participantes en el estudio

Los criterios de inclusión serán: individuos de ambos sexos, de entre 18 y 30 años de edad, sin enfermedades sistémicas, no fumadores, libres de gingivitis y enfermedad periodontal, con al menos 20 dientes naturales y sin lesiones de caries cavitadas.

Los criterios de exclusión serán: individuos que estén o hayan estado con tratamiento antibiótico o antiséptico los últimos 6 meses previos a participar del estudio e individuos que presenten alteraciones del flujo salival.

Confidencialidad y difusión de datos.

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 serán codificados para el uso en este estudio y no serán identificados públicamente. 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 intervención y/o participación.
- Si usted decide puede retirarse cuando lo desee.
- 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.
- La información obtenida de la investigación, respecto de la identificación de pacientes, será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores.
- 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 a Sergio Livingstone Pohlhammer 943, Independencia, de lunes a viernes en el horario comprendido entre las 8:00 y 17:00 hrs. En el periodo comprendido en la investigación y hasta 6 meses después de concluida esta.
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 Ético de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile: Prof. Dr. Eduardo Fernández, al teléfono (02) 29781742, 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 4. Consentimiento donación de terceros molares



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE DIENTES PARA EL ESTUDIO DE MECANISMO DE ACCIÓN DE PROBIÓTICOS

Título del Protocolo: "Efecto del consumo de probiótico *Lactobacillus rhamnosus* en formatos sistémico y tópico en la morfología, diversidad y composición del biofilm bucal. Modelo *in situ* de caries"

Investigador Principal: Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

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

Nombre del Donante

Este documento de Consentimiento Informado se aplicará a pacientes con indicación de extracción de terceros molares, 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 Gonzalo Rodríguez Martínez y soy académico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación de la cual le proporcionaré información y a la que lo invitaré a participar. 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 desea participar, se le solicitará que firme este formulario.

Justificación de la Investigación

Existe evidencia que el consumo de probióticos es útil en la prevención de caries dental, pero se desconoce su mecanismo de acción.

Objetivo

El objetivo del estudio es determinar el efecto que el consumo de probióticos en la composición de la placa dental dependiendo si se toman o se aplican directamente en los dientes. Para ello se montarán en un dispositivo acrílico trozos de dientes humanos estériles.

Beneficios

No existe ningún tipo 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 se espera contribuir a aplicaciones futuras en el ámbito de la odontología.

Tipo de Intervención y Procedimiento

Si usted decide participar los dientes que le serán extraídos serán almacenados para ser posteriormente utilizados en el presente estudio.

Riesgos

Los dientes donados se utilizarán sólo con el fin expuesto y no se guardará ningún registro de su relación con usted como donante. Ningún otro tipo de estudio se realizará con los dientes. Una vez observados y descritos, los dientes serán destruidos y eliminados siguiendo los protocolos de bioseguridad.

La donación en sí no presenta riesgos, ni costos adicionales para usted, y el financiamiento del proceso quirúrgico de extracción será su responsabilidad.

Criterios para selección de los participantes en el estudio

Los criterios de inclusión serán: pacientes con indicación de extracción de terceros molares, cuyos terceros molares estén incluidos.

Confidencialidad y difusión de datos.

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 serán codificados para el uso en este estudio y no serán identificados públicamente. Los resultados emanados de este estudio podrán ser publicados en revistas científicas.

Aclaraciones

- La donación del o los dientes es completamente voluntaria
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted en caso de no aceptar la invitación.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su donación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable.
- La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de pacientes, será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores.
- 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 mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. Tengo conocimiento del procedimiento a realizar.
3. Conozco los beneficios de participar en la Investigación.
4. El procedimiento no tiene riesgo alguno para mi salud.
5. 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.
6. En caso de cualquier duda puede acudir a Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez, Sergio Livingstone 943 los días lunes y miércoles de 8:00 – 17:00 o vía telefónica al 29781742 o también se puede dirigir al representante del Comité Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile: Prof. Dr. Eduardo Fernández, al teléfono 229781742, 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 pertinente, PUESTO QUE SE QUE ES POR MI PROPIO INTERÉS.

	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 la realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez (Investigador Principal)

	Firma	Fecha
--	-------	-------

Anexo 5. Información de estudio para participantes



Información para voluntarios

Estimado Participante,

Bienvenido al estudio titulado “**Análisis de modelo in situ de caries dental: Estudio piloto**”. Agradecemos profundamente su generosa disposición para ser parte de este proyecto de investigación. A continuación explicaremos paso a paso las maniobras que deberá realizar durante el periodo de experimentación.

Al comienzo del periodo, se le entregará de parte del equipo investigador un bolso que contiene los siguientes elementos:

- Dispositivo Intraoral: Esta es una estructura acrílica removible que tiene incorporadas 5 muestras dentarias: 2 muestras en la zona vestibular derecha, 2 en la zona vestibular izquierda y 1 en la zona palatina.
- 1 frasco de 30 ml con sacarosa
- 1 gotario
- 1 Recipiente para guardar el dispositivo durante la comida

El siguiente esquema representa la posición de las muestras en cada uno de los grupos de intervención que considera el estudio:



El inicio del periodo de experimentación le será indicado por el equipo de investigadores, Ud. deberá utilizar el dispositivo intraoral durante un periodo continuo de 14 días, 24 horas al día. El dispositivo **sólo** podrá ser removido desde el interior de la boca para higienizarse los dientes (cepillado), beber líquidos y/o comer. Esto significa que deberá dormir con el dispositivo por el tiempo que dure el estudio. El dispositivo podrá estar fuera de la boca por un tiempo máximo de 30 minutos manteniéndolo húmedo en el recipiente entregado.

Alimentación

Ha de mantener régimen normal de dieta, que deberá ser consignada en un registro de dieta. El dispositivo podrá permanecer fuera de boca dentro del recipiente entregado por un tiempo máximo de 30 minutos.

Higiene Oral y manejo de dispositivo

Respecto a la higiene oral, ésta debe ser realizada con cepillo de dientes y pasta dental fluorada de 1450 ppm entregada por el equipo investigador, 3 veces al día, 15 minutos después de alimentarse. Posterior al cepillado deberá enjuagarse con abundante agua para remover residuos de pasta dental que pueda quedar en la boca. El dispositivo intraoral NO debe ser lavado.

Por otro lado, durante el periodo de experimentación, se debe evitar el uso de los siguientes elementos:

- ❖ Enjuague bucal
- ❖ Antiácidos
- ❖ Medicamentos (por ejemplo antibióticos o antisépticos)

En caso de necesitar utilizar alguno de los elementos anteriormente descritos, debe comunicarse inmediatamente con el equipo de investigadores para determinar la conducta a seguir.

Todos los elementos entregados para el estudio se deben guardar en el bolso original y al finalizar el estudio se deben entregar de la misma forma al equipo investigador.

Modo de Aplicación de la Solución

Durante el periodo de experimentación, deberá retirar el dispositivo desde el interior de la boca para aplicar la solución que considera el estudio en todas las muestras.

Se recomienda mantener el dispositivo de forma horizontal durante la aplicación de la solución para que no escurra.

Paso 1: Al levantarse por la mañana debe realizar la **primera aplicación** de sacarosa que se encuentra contenida en el frasco. Una vez retirado el dispositivo de la boca, **debe aplicar 1 gota de Sacarosa en cada una de las muestras.**

Cómo se mencionó anteriormente, debe tener mucho cuidado de evitar que la solución de Sacarosa escurra hacia las muestras del lado izquierdo. Se recomienda mantener el dispositivo de forma horizontal para que el líquido no escurra. Luego de aplicar la gota de sacarosa debe esperar 5 minutos antes de volver a colocar el dispositivo dentro de la boca.



Paso 2: Debe continuar aplicando 1 gota de sacarosa en cada una de las muestras, con el dispositivo fuera de la boca, **cada 2 horas**, hasta **completar un total de 8 aplicaciones** de sacarosa durante todo el día. Una vez aplicada la gota de sacarosa debe esperar 5 minutos antes de volver a colocarse el dispositivo en el interior de la boca.

Debe recordar aplicar la solución cada 2 horas. Procure que los horarios sean lo más similares posible dentro del periodo experimental, para esto puede poner alarmas. Se le entregará una tabla donde deberá anotar los horarios de aplicación. En el caso de olvidar alguna aplicación deberá realizarla lo más pronto posible y esperar 2 horas para una nueva aplicación.

Si tiene alguna pregunta, molestia o heridas generadas por el aparato intraoral durante el periodo experimental contáctese con el equipo investigador para resolver sus dudas y/o aliviar el dispositivo.

Anexo 7. Evaluación de compromiso y cumplimiento final

Estimado participante,

Mediante el siguiente cuestionario evaluaremos el periodo experimental al que fue sometido. Se solicita responder a conciencia y con la mayor honestidad posible las siguientes preguntas. El cuestionario es anónimo.

1. Cumplió con todas las aplicaciones: Si ____ No____
2. Si su respuesta es no ¿cuántas aplicaciones no realizó? :
3. Las aplicaciones de sacarosa fueron cada 2 horas: Si ____ No____
4. Evalúe en la siguiente escala su cumplimiento, marque con una x el número de la escala que siente que más lo representa.

Escala	Significado	
1	No cumplí con ninguna de las aplicaciones ni horarios	
2	Omití más de 5 aplicaciones durante el periodo experimental	
3	Omití 2 a 5 aplicaciones durante el periodo experimental	
4	Omití 1 aplicación durante todo el período experimental	
5	Cumplí con todas las aplicaciones con diferencias en los horarios de aplicación de 30 min a 1 hora	
6	Cumplí con todas las aplicaciones con diferencias en los horarios de aplicación de 15 a 20 min aproximadamente	
7	Cumplí con todas las aplicaciones en los horarios establecidos	

5. Marque con una x las siguientes frases si representaron su experiencia

	Si	No
Retiré el dispositivo para alimentarme y lavarme los dientes		
Dormí con el dispositivo		
Omití algún día del periodo experimental		
Usé el dispositivo según las instrucciones día y noche		

6. En el siguiente espacio anote, con letra clara, observaciones y/o dificultades que tuvo durante el periodo experimental.