



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA Y MEDICINA ORAL
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA**

**EFFECTO REMINERALIZANTE DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE UN
AGENTE A BASE DE FLÚOR Y GRAFENO EN BLOQUES DE ESMALTE
DESMINERALIZADO**

María Montserrat Padilla Ruiz

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Patricia Palma Fluxá

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Rodrigo Cabello Ibacache

Prof. Mario Diaz-Dosque

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

Santiago – Chile

2018



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA Y MEDICINA ORAL
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA**

**EFFECTO REMINERALIZANTE DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE UN
AGENTE A BASE DE FLÚOR Y GRAFENO EN BLOQUES DE ESMALTE
DESMINERALIZADO**

María Montserrat Padilla Ruiz

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Patricia Palma Fluxá

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Rodrigo Cabello Ibacache

Prof. Mario Diaz-Dosque

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

Santiago – Chile

2018

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores tutores que me guiaron en esta última etapa de formación de pregrado, Dra. Patricia Palma, Dr. Rodrigo Cabello y Dr. Mario Diaz-Dosque, por su dedicación, entrega de conocimientos y confianza.

A cada persona que compone el Laboratorio de Microbiología, por su acogida y buena disposición, especialmente a Daniela Salinas y Darna Venegas por sus enseñanzas y paciencia que fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo de investigación.

A la Plataforma Experimental Bio-CT, perteneciente a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (FONDEQUIP EQM150010), por facilitar las herramientas para visualizar y analizar las imágenes obtenidas. Agradecimientos a Daniela Poblete por su asistencia en la comprensión del software de visualización y análisis de imágenes cuyo apoyo fue importante para la realización este trabajo.

Especialmente a mi familia por el amor y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida y a mis amigos por su compañía y complicidad. A cada docente que fue parte de mi formación profesional por su vocación de transmitir y crear conocimiento y a los funcionarios que forman parte de esta facultad por la calidez, ayuda y el saludo alegre que me entregaron día a día.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	
II.	MARCO TEÓRICO	1
2.1	Introducción	1
2.2	Caries	1
2.3	Esmalte	2
2.4	Hidroxiapatita	3
2.5	Biopelícula	3
2.6	<i>Streptococcus mutans</i>	5
2.7	Flúor	6
2.8	Grafeno	7
2.9	Remineralizantes y Cariostáticos	8
2.10	BlueRemin®	8
2.11	Modelos bacterianos para el estudio de caries	9
2.12	Medición de dureza	9
2.13	Microtomografía Computada	11
2.14	Planteamiento del problema	12
III.	HIPÓTESIS	13
IV.	OBJETIVO GENERAL	13
V.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	14
6.1	Obtención y almacenamiento de las muestras	14
6.2	Preparación de las muestras	14
6.3	Medición de dureza inicial	16
6.4	Montaje de las muestras	17
6.5	Recolección y filtrado de saliva	18

6.6	Formación de la biopelícula bacteriana	20
6.7	Proceso de desmineralización	22
6.8	Acidogenicidad de la biopelícula	24
6.9	Remoción de la biopelícula desde los bloques de esmalte	24
6.10	Medición de dureza después del tratamiento desmineralizador	25
6.11	Tratamiento remineralizador	25
6.12	Evaluación de remineralización	27
6.13	Mediciones densidad mineral	28
6.14	Análisis estadístico de valores de dureza y densidad mineral	29
VII.	RESULTADOS	30
7.1	Formación de biopelícula sobre los bloques de esmalte	30
7.2	Controles de viabilidad y pureza de <i>S. mutans</i>	31
7.3	Medición de pH	34
7.4	Resultados de pruebas de dureza	35
7.5	Imágenes obtenidas a partir del Micro-CT	40
7.6	Resultados de mediciones de densidad mineral	42
VIII.	DISCUSIÓN	48
IX.	CONCLUSIONES	52
X.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
XI.	ANEXO 1: Consentimiento Informado	65
XII.	ANEXO 2: Acta de aprobación de protocolo de investigación	69

I. RESUMEN

Introducción: La elevada prevalencia de la enfermedad de caries, el daño acumulado en la salud y en la calidad de vida de las personas, genera la necesidad de desarrollar medidas de control de la enfermedad y de prevención de la aparición de lesiones. El desequilibrio en el proceso de remineralización y desmineralización en la superficie dentaria provocado por una actividad acidogénica de la biopelícula dental provoca la pérdida de estructura dentaria y la consiguiente aparición de lesiones de caries. Los agentes remineralizantes a base de flúor actúan en las etapas iniciales de la enfermedad, previniendo y deteniendo la progresión de lesiones de caries incipientes. El propósito de este estudio fue evaluar la capacidad remineralizante de distintas concentraciones de BlueRemin®, un nuevo agente remineralizador a base de flúor y grafeno, con el fin de estudiar sus propiedades y futuras aplicaciones clínicas.

Objetivo: Evaluar las diferencias de dureza superficial y densidad mineral en especímenes de esmalte desmineralizado en un modelo de caries microbiológico y sometidos a un protocolo de remineralización con BlueRemin® a distintas concentraciones.

Metodología: Se simuló un ambiente cariogénico sobre bloques de esmalte humano en un modelo de biopelícula monoespecie de *Streptococcus mutans in vitro*. Se obtuvo zonas de desmineralización superficial compatibles con lesiones de caries no cavitadas que luego fueron sometidas a un protocolo de remineralización con BlueRemin® a distintas concentraciones. El contenido mineral de los bloques fue evaluado por microdureza de Vickers (Hv) y microtomografía computada previo, posterior a la formación de la biopelícula y después de la aplicación de BlueRemin®. Se utilizaron los porcentajes de recuperación de dureza superficial (%RDS) y de densidad mineral (%RDM) como indicadores de remineralización.

Resultados: Considerando los resultados de dureza superficial y densidad mineral, se registró una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de los bloques remineralizados con respecto a los desmineralizados para todas las concentraciones de BlueRemin® aplicadas ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de recuperación de dureza superficial y de densidad mineral obtenidos con las concentraciones utilizadas.

Conclusiones: BlueRemin® tiene capacidad remineralizante. Se evidenció una tendencia hacia una relación dosis dependiente de los porcentajes de remineralización obtenidos al aplicar BlueRemin®.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Introducción

A nivel mundial, entre el 60-90% de los niños en edad escolar y casi el 100% de los adultos tienen caries dental. La caries y las enfermedades periodontales son las principales patologías causantes de la pérdida de dientes (OMS, 2012). En Chile, la prevalencia de niños sin historia de caries a los 2 años de edad es de un 83%, luego disminuye a un 51,98% a los 4 años y alcanza un 29,64 % en escolares de 6 años de edad (MINSAL, 2007). La prevalencia de escolares de 12 años libres de caries es de un 37,5% (Soto y cols. 2007) y de un 0% en la población adulta mayor de 65 años (Gamonal, 1996).

La caries es una enfermedad que puede presentarse en cualquier etapa de la vida, y, si no es tratada a tiempo, puede causar intenso dolor y la pérdida de los dientes afectados, lo que a su vez repercute en la función masticatoria, fonética o estética (Mendoza, 2007). La caries dental compromete la calidad de vida de las personas que la padecen (Luoto y cols. 2009). Dada la alta prevalencia de la enfermedad, la baja cobertura del cuidado de la salud bucal en los sistemas de salud, el alto costo de los tratamientos restauradores y el daño acumulado en la población (Yee y Sheiman, 2002), las medidas preventivas han adquirido un rol fundamental como estrategias para enfrentar el problema (Mendoza, 2007). La exposición a largo plazo a niveles óptimos de fluoruros reduce el número de caries tanto en los niños como en adultos (OMS, 2012). Existen variadas maneras de aplicar flúor en las poblaciones, por ejemplo, a través de la fluoración del agua potable, el uso de pastas dentales fluoradas y la aplicación profesional de flúor. El principal objetivo es lograr controlar la progresión de la lesión de caries con la mejor relación costo-efectiva posible (Fejerskov, 2004).

2.2 Caries

En condiciones fisiológicas, los fluidos orales (saliva, fluido de la biopelícula) tienen calcio y fosfato en concentraciones mayores con respecto a la composición mineral del esmalte y, como resultado, los minerales son depositados

continuamente en la superficie del esmalte o reposicionados en áreas donde fueron perdidos. Esto puede ser considerado como un mecanismo de defensa natural promovido por la saliva para preservar la estructura mineral del esmalte dentario (ten Cate, 2008). Es por esto que la remineralización puede ser definida como una reposición de los minerales perdidos en la superficie del esmalte, y este término ha sido utilizado como sinónimo de reparación o endurecimiento del esmalte (Cury, 2009).

La desmineralización y remineralización es un proceso fisicoquímico dinámico que ocurre cuando bacterias orales forman una biopelícula sobre el esmalte dental y ésta es expuesta a carbohidratos fermentables de la dieta. Entonces, cada vez que el azúcar se encuentra disponible en una biopelícula con características cariogénicas, es fermentada, disminuyendo el pH y la concentración de minerales en el fluido de la biopelícula con respecto a la superficie del diente ocurriendo la desmineralización (Paes Leme, 2004).

Si la exposición constante a azúcares y desarrollo de la biopelícula no son controlados, la pérdida de mineral no puede ser detenida. La repetición de episodios de desmineralización eventualmente superará la capacidad reparadora de los fluidos orales y se manifestarán los primeros signos clínicos de la enfermedad, un cambio desde un aspecto liso y brillante hacia una superficie tizosa y rugosa que caracteriza a las manchas blancas (Fejerskov, 2004; Cury 2009).

2.3 Esmalte

El esmalte es el tejido más mineralizado del cuerpo humano, un 96% de su composición corresponde a matriz inorgánica y alrededor de un 4% a matriz orgánica y agua. (ten Cate, 2008). El contenido inorgánico está constituido por cristales de hidroxiapatita, compuestos principalmente por fosfato y calcio, sin embargo, otros iones pueden ser incorporados a los cristales durante la formación del esmalte como carbonato, magnesio, sodio y fluoruro (LeGeros, 1991). La densidad mineral del esmalte es de un promedio de $2,95 \text{ g/cm}^3$ (Fejerskov y Kidd, 2008).

La unidad estructural básica son los prismas del esmalte, compuestos por un conjunto de cristales de hidroxiapatita (HA) con una orientación determinada y densamente empaquetados (Braly, 2007). Estos prismas se dirigen desde la unión amelodentinaria hasta la superficie del esmalte en contacto con el medio oral y están rodeados periféricamente por el material orgánico de naturaleza proteica (Gómez, 1999).

La permeabilidad del esmalte es escasa, sin embargo, permite el flujo de agua y iones presentes en el medio oral. Posee la propiedad de una captación continua de ciertos iones presentes en la saliva, de esta manera algunos elementos presentes en la saliva se pueden incorporar al esmalte (Gómez, 1999).

2.4 Hidroxiapatita (HA)

La hidroxiapatita es esencialmente una sal de fosfato de calcio representada por la fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y constituye el componente inorgánico de tejidos mineralizados como el hueso, esmalte, cemento y dentina (Avery, 2007). Esta fórmula hace alusión al contenido atómico de una celda unitaria de HA, lo que corresponde al menor número de calcio, fosfato y iones hidroxilos necesarios para establecer la relación iónica entre los elementos. Esta celda unitaria tiene forma de un prisma hexagonal, que al empaquetarse con otros cristales forman el entramado para componer prismas de HA de diferentes tamaños (García, 2006; tenCate, 2008).

2.4 Biopelícula (*Biofilm*)

En la naturaleza los microorganismos se pueden encontrar organizados en comunidades y éstas se presentan adheridas a sustratos vivos o inertes como biopelículas (Wright, 2013). La estructura típica de una biopelícula comprende una asociación de células microbianas adheridas a una superficie e inmersas en una matriz compuesta por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Flemming y Wingender, 2010), de origen microbiano y/o del hospedero.

La biopelícula dental es una comunidad microbiana compleja, dinámica y estructurada que se conforma por la adhesión de bacterias a la superficie del diente y la coagregación de microorganismos y producción y maduración de matriz

extracelular (Shao y Demuth, 2010). La organización de microorganismos orales en una biopelícula tiene un rol esencial en su sobrevivencia en la cavidad oral. La organización de las bacterias en biopelícula es muy importante dado que en esta condición exponen propiedades que no son expresadas en estados planctónicos (Moncada y Urzúa, 2008). Las bacterias agrupadas en comunidad son más resistentes que aquellas en estado planctónico. Las biopelículas otorgan protección a las bacterias que la conforman; a la desecación, a la remoción física, a la acción de agentes antimicrobianos y a la acción del sistema inmune (Marsh, 2006; Jakubovics, 2010).

La colonización de las superficies orales por los microorganismos ocurre en una secuencia característica de etapas. Inicialmente se forma la película salival adquirida, una fina capa que se deposita en la superficie dental apenas ésta se expone a la cavidad oral. Está compuesta predominantemente de proteínas salivales, proteínas provenientes del fluido crevicular gingival, restos de células epiteliales orales y productos de microorganismos (Hannig y Joiner, 2006; Siqueira, 2012). La formación de la película salival adquirida es un proceso dinámico y selectivo, se inicia inmediatamente cuando el tejido dental tiene contacto con la saliva y se caracteriza por un incremento en el grosor de la película de 10 a 20 nm en unos pocos minutos (Lendenmann y cols., 2000), conformándose inicialmente de proteínas salivales con alta afinidad por la hidroxiapatita, como proteínas ricas en prolina, estaterinas, e histatinas (Jensen, 1992; Lamkin, 1996). También se describe la presencia de mucinas, cistatinas, lisozima y lactoferrina (Vacca Smith y Bowen, 2000; Hannig y Joiner, 2006). Luego de este primer incremento, se atribuye un rápido aumento en el espesor de la película adquirida a la adsorción de agregados proteicos desde la saliva mediante interacciones proteicas. El espesor de la película alcanza una meseta entre 30 y 90 minutos, con un grosor de 100 a 1.000 nm (Hannig, 1999).

El siguiente paso corresponde a la adhesión de microorganismos que están en suspensión en la cavidad oral, éstos son denominados colonizadores primarios. Se ha demostrado que los *Streptococcus* orales son los principales colonizadores primarios de las superficies de esmalte. Éstos son cruciales para la subsecuente

cohesión de otros microorganismos ya que expresan proteínas y lipoproteínas en la superficie celular para la interacción célula-célula mediante el mecanismo adhesina-receptor con otras bacterias y permiten que se vaya estructurando la biopelícula. La coagregación de diferentes microorganismos permite el desarrollo de una comunidad compuesta por múltiples especies. El crecimiento y posterior coagregación de bacterias desde la saliva aumentan la densidad celular local y conducen al desarrollo de microambientes en la biopelícula. Dentro de estas comunidades microbianas, nutrientes, productos metabólicos y moléculas de señalización que producen las células, circulan por una red de canales en la matriz que modulan las condiciones medioambientales e influyen en las bacterias vecinas y en el tipo de bacterias que se establece en la biopelícula. (Jakubovics, 2010; Wright, 2013).

2.5 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans, perteneciente al grupo Mutans Streptococci del género *Streptococcus* es considerada uno de los principales agentes etiológicos ligados a la enfermedad de caries (Wright, 1998; Avilés-Reyes, 2018). Las cepas de *S. mutans* son generalmente α -hemolíticas o γ -hemolíticas en agar sangre (Wright, 1998), en agar TYCS las colonias se observan de superficie granular con aspecto similar al vidrio esmerilado (Saravia, 2011), son adherentes y difíciles de disgregar. Al microscopio electrónico se observan como cocáceas Gram positivo agrupadas en diplos o cadenas (Forssten, 2010). Son microorganismos anaerobios facultativos por lo que su crecimiento se ve favorecido en presencia de 5-10% de dióxido de carbono y la temperatura óptima de crecimiento es entre 35-37°C (Lemos, 2013; Jakubovics, 2010).

S. mutans tiene un gran potencial cariogénico y se han descrito los principales factores de virulencia (Forssten, 2010). Son acidogénicos ya que metabolizan hidratos de carbono dando origen a diversos ácidos orgánicos como ácido láctico, acético y fórmico provocando un descenso local del pH que, a su vez, favorece su sobrevivencia y crecimiento (Marsh, 2003, 2006). Tienen la capacidad de sintetizar polisacáridos extracelulares (PEC) a partir de sacarosa, polímeros que permiten la adhesión bacteriana y la acumulación de microorganismos en la superficie

dentaria. Además, éstos generan cambios en las propiedades físicas y bioquímicas de la biopelícula, proporcionan integridad estructural y volumen al conglomerado bacteriano y aumentan la porosidad de éste, favoreciendo la difusión de ácidos a través de la biopelícula y el descenso del pH en las cercanías de la superficie dentaria, aumentando finalmente la acidogenicidad de la matriz de la biopelícula y la desmineralización del tejido (Cury 2000, Leme 2006). Por otra parte, cuando *S. mutans* crece en ambientes con elevada disponibilidad de azúcares, almacena el exceso de hidratos de carbono en forma de polisacáridos intracelulares (PIC), los cuales representan una reserva de fuente energética para los periodos de ayuno (Busuioc, 2009).

2.6 Flúor

El flúor (F) es un elemento químico perteneciente al grupo de los halógenos, de bajo peso atómico y de gran electronegatividad. El Flúor elemental tiene una gran capacidad de reacción, por lo que es muy raro encontrarlo como tal en la naturaleza, estando mayoritariamente combinado como sales de fluoruros, siendo las más importantes el fluoruro de calcio o fluorita (CaF_2), el fluoruro de sodio o criolita (Na_3AlF_6) y el fluoruro de sodio o fluoruro de sodio o fluoruro de sodio o fluoruro de sodio (Na_2FPO_3) (Gómez, 2010).

El uso de fluoruro cumple un rol clave en la prevención y control de la caries dental (Fejerskov, 2004). El principal modo de acción del flúor en la prevención y control de caries es local o posteruptivo, aumentando la remineralización y disminuyendo la desmineralización en etapas tempranas de la enfermedad. La remineralización involucra el depósito de fosfatos de calcio en la superficie de esmalte para reconstruir cristales de hidroxiapatita parcialmente disueltos (Fejerskov y Kidd 2004; Hellwing y Lennon 2004; Moncada y Urzúa, 2008; ten Cate 2013). También, al utilizar fluoruros tópicos en alta concentración, éste reacciona con el calcio de la saliva y del esmalte, formándose fluoruro de calcio. A partir de este precipitado de fluoruro de calcio superficial, el fluoruro es incorporado a la estructura de la

hidroxiapatita, donde los hidroxilos son reemplazados por el ion fluoruro, formándose la fluorhidroxiapatita. Como resultado, estos cristales recién formados o parcialmente regenerados son menos solubles y más resistentes a futuros episodios de bajas de pH. Por otra parte, los fluoruros inhiben la actividad metabólica de las bacterias de la biopelícula dental, reduciendo la producción de ácidos de los microorganismos, principalmente el ácido láctico (Gómez, 2010; Ten Cate, 2013). Los efectos del fluoruro sobre los tejidos dentales son dependientes de su concentración, se ha demostrado que el efecto de pastas dentales con diferentes concentraciones de fluoruro en la prevención de caries aumenta cuando éste está presente en una mayor concentración. Existe un mayor beneficio en cuanto a la prevención de aparición de lesiones de caries y mayor eficacia en el tratamiento de éstas al utilizar pastas dentales con concentraciones de fluoruro iguales o superiores a 1000 ppm con respecto al uso de placebo. Contrariamente, al comparar los efectos del uso de placebo con el uso de pastas dentales de 250/500/550 ppm no se identifican diferencias estadísticamente significativas (Marinho, 2003; Twetman 2003; Walsh, 2010; Santos, 2013).

2.7 Grafeno

El grafeno es un compuesto químico que constituye la estructura elemental del grafito. Está constituido por átomos de carbono dispuestos en una red bidimensional, similar a la estructura de un panal de abeja, compuesta por celdas de seis átomos de carbono cada una (Li, 2008; Chen, 2009).

Los materiales basados en grafeno tienen propiedades antibacterianas y se ha demostrado que éstas son el resultado de efectos tanto físicos como químicos sobre las bacterias. El daño físico producido por el contacto directo de los bordes afilados de las láminas de grafeno con la pared y membrana celular de las bacterias, por otra parte, reducen la actividad metabólica y el crecimiento bacteriano. El daño químico es principalmente causado por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo (Akhavan, 2010; Hu, 2010; Vecitis, 2010; Liu, 2011; He, 2015; Pham, 2015).

2.8 Remineralizantes y Cariostáticos

A pesar de que el uso de fluoruros ha tenido éxito en control de la caries dental, persiste la necesidad de desarrollar y evaluar nuevos enfoques y productos para la prevención de caries. Los protocolos de prevención de caries deben abarcar agentes que afecten el equilibrio de desmineralización y remineralización y posean efecto antimicrobiano (ten Cate, 2012).

El fosfato β -tricálcico funcionalizado (β -TCP) aumenta la remineralización cuando se usa junto con el fluoruro (Karlinsky y Pfarrer, 2012), el fosfopéptido de caseína - fosfato de calcio amorfo (CPP-ACP) actúa manteniendo altos niveles de iones de calcio y fósforo en la proximidad del esmalte (Abdullah, 2015). El flúor diamino de plata que es un compuesto utilizado para prevenir y detener las lesiones de caries (Contreras, 2017), aumenta el pH de la biopelícula, reduce la desmineralización de la dentina y tiene acción antibacteriana (Chu, 2012).

2.9 BlueRemin[®]

BlueRemin[®], es un nuevo agente remineralizante con propiedades antibacterianas a base de flúor y grafeno realizado por un equipo multidisciplinario de la Universidad de Chile. Permite detener el progreso de la lesión de caries y, por lo tanto, previene etapas avanzadas de la enfermedad representadas por la cavitación de los tejidos dentarios. BlueRemin[®] es un producto que al ser aplicado de forma tópica y, a diferencia de otros presentes en el mercado, mantiene la coloración natural del diente.

Con el fin de que BlueRemin[®] pueda ser utilizado en la práctica clínica, se han realizado una serie de estudios. Se demostró que, al utilizar el agente en una concentración de 6,4 g/100 mL de BlueRemin[®], éste tiene acción remineralizante sobre zonas desmineralizadas en discos de hidroxiapatita expuestos a un modelo de caries monoespecie de *S. mutans*, al aumentar los valores de la microdureza superficial. Además, otro en otro trabajo de investigación, se evidenció que tiene acción remineralizante *in vitro* sobre zonas de dentina desmineralizadas obtenidas en un modelo experimental de caries al aumentar la dureza superficial de todos los bloques de dentina expuestos al agente. Los resultados de otro estudio mostraron

que, al utilizar la misma concentración del agente remineralizante BlueRemin[®], hay un aumento en los valores de dureza superficial del esmalte desmineralizado expuesto a un modelo de caries microbiológico.

2.10 Modelos bacterianos para el estudio de caries

La biopelícula se forma y desarrolla en las superficies dentales en condiciones dinámicas, en las cuales la exposición a los carbohidratos provenientes de la dieta ocurre de manera intermitente (Marsh, 2003). Durante el día, la biopelícula está expuesta a periodos cortos en los que hay una gran cantidad de carbohidratos disponibles, seguidos de periodos de privación de nutrientes entre las comidas y durante la noche. Estos episodios son determinantes para el metabolismo bacteriano y el crecimiento de la biopelícula (Carlsson 1997, Bowden 1998, Marsh 2006, Ccahuana-Vásquez y Cury 2010).

Los modelos de biopelícula *in vitro* para el estudio de caries han sido desarrollados debido a las dificultades de realizar *in vivo* estudios en ambientes cariogénicos controlados (Sissons, 1997). En éstos se ha reproducido la acumulación bacteriana sobre sustratos dentales y la exposición a un ambiente cariogénico de forma de simular el proceso de caries (Ccahuana-Vásquez y Cury, 2010, Diaz-Garrido 2012, Fernández 2016). Se han implementado para estudiar la desmineralización en tejidos dentales, evaluar el potencial cariogénico de alimentos, probar determinados productos con acción remineralizante y materiales restauradores (Seemann 2005, Giacaman 2012. Giacaman 2013, Fernández 2015, Kuper 2015).

2.11 Medición de dureza

El ensayo de dureza mide la resistencia de la superficie de un material a la penetración por un objeto duro (Askeland, 1998). A lo largo de los años se han desarrollado técnicas cuantitativas de dureza que se basan en un pequeño penetrador que es forzado sobre la superficie de un material a ensayar en condiciones controladas de carga y velocidad de aplicación de la carga. En estos ensayos se mide la profundidad o tamaño de la huella resultante, lo cual se

relaciona con un número de dureza; cuanto más blando es el material, mayor y más profunda es la huella, y menor es el número de dureza (Callister, 1995).

El ensayo de Vickers (Hv) es una técnica en la que un penetrador de diamante muy pequeño y de geometría piramidal es forzado en la superficie de la muestra. La marca resultante se observa al microscopio y se mide; luego esta medida es convertida en un número de dureza. La dureza de Vickers se designa por Hv y es considerada un ensayo de microdureza debido a la magnitud de la carga y al tamaño del indentador utilizado (Callister, 1995).

El procedimiento consiste en ubicar la muestra sobre una plataforma y ajustar el lente del microindentador hasta que la superficie se observe nítidamente. Posteriormente, se aplica una carga determinada durante un tiempo definido. El indentador deja una huella sobre la muestra con forma de rombo, al medir las diagonales de la huella se obtiene la lectura de microdureza Vickers, que es calculada automáticamente por el microdurómetro a través de la siguiente fórmula:

$$Hv = K \cdot P / d^2$$

Donde:

Hv: Microdureza de Vickers

K: Constante que depende de la máquina

P: Valor numérico de la carga aplicada

d: Valor de la longitud promedio de las diagonales

(Callister, 1995).

Los valores de microdureza obtenidos al realizar indentaciones en la superficie del esmalte se relacionan con el contenido mineral del tejido (Davidson, 1974; Featherstone 1983; Kodaka, 1992). La medición de dureza superficial es una prueba que ha sido utilizada en numerosos estudios para evaluar la desmineralización y remineralización del esmalte con diferentes productos (Lee,

2010; Salehzadeh, 2015), investigar las propiedades mecánicas del esmalte afectado por hipomineralización (Crombie, 2013) y estudiar superficies sometidas a grabado ácido (Collys, 1992). Es considerada como una técnica útil para evaluar la dureza superficial en esmalte y el tratamiento de superficies con fluoruros en forma tópica ya que resulta ser una medida que permite la comparación de cambios en la dureza del tejido y forma de medición directa de la ganancia o pérdida de mineral como consecuencia de la desmineralización o remineralización.

2.12 Microtomografía Computada (*Micro-CT*)

La tomografía computarizada (TC) implica la obtención de una serie de imágenes a partir de la proyección de rayos X desde múltiples ángulos alrededor de un objeto. La visualización y procesamiento de los datos permiten la conversión de este conjunto de imágenes en una serie de cortes que representan una imagen digital tridimensional (Brunke, 2010; Kalender, 2006, Singhal, 2013).

La microtomografía computada es una TC de objetos pequeños con escáneres especializados que tienen una alta resolución espacial. Permite visualizar las estructuras de manera no destructiva y estudiar la morfología y densidad de los objetos en estudio (du Plessis, 2017). Su uso en investigación en el área odontológica ha ido en aumento, utilizándose en la medición de la densidad mineral de los tejidos dentales, evaluación de la anatomía del sistema de canales radiculares, comparación de las técnicas de instrumentación y obturación endodóntica, análisis de la porosidad de materiales de restauración, evaluación del sellado marginal de restauraciones y sellantes, detección de cambios minerales en lesiones de caries y medición de la profundidad de caries dentinaria (Ordinola, 2017; Ortiz, 2018; Swain, 2009).

Se considera presente una lesión cariosa cuando se observa una diferencia de densidad a lo largo de la superficie del esmalte y / o la dentina en cualquiera de los cortes axiales o sagitales. Es una técnica sensible *in vitro* capaz de caracterizar y cuantificar las lesiones de caries (Wong, 2004).

2.13 Planteamiento del Problema

La caries es un problema de salud pública dado a su alta prevalencia y al grado de deterioro que produce en la salud de las personas. En base a esto surge la necesidad de encontrar métodos de prevención y tratamiento de la enfermedad.

Los cambios en los paradigmas sobre la etiología de la caries han tenido gran implicancia en el desarrollo de nuevos agentes preventivos y terapéuticos. De esta manera los protocolos de prevención de caries deben abarcar agentes que interfieran en el proceso de remineralización y desmineralización y cumplan funciones antimicrobianas. En este contexto se diseña BlueRemin®, un agente remineralizante con propiedades antibacterianas, para cuya validación es necesario realizar estudios previos para que pueda ser lanzado al mercado y utilizado en la práctica clínica. Estudios previos han evaluado la capacidad remineralizante del agente en bloques de esmalte utilizando una única concentración equivalente a 6,4 g/100 mL de BlueRemin®.

Nos hemos propuesto resolver la siguiente pregunta de investigación: ¿Existen diferencias en la remineralización de zonas de esmalte desmineralizadas mediante un modelo microbiológico de caries *in vitro*, al utilizar distintas concentraciones de BlueRemin®?

III. HIPÓTESIS

El efecto remineralizador de BlueRemin® en especímenes de esmalte con lesiones de caries producidas en un modelo microbiológico de caries *in vitro* es dependiente de su concentración.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar las diferencias de dureza superficial y densidad mineral en especímenes de esmalte desmineralizado con un modelo de caries microbiológico y sometidos a un protocolo de remineralización con BlueRemin® a distintas concentraciones.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la dureza superficial y densidad mineral de especímenes de esmalte previo a la exposición a un modelo de caries microbiológico *in vitro*.
2. Determinar la dureza superficial y densidad mineral de especímenes desmineralizados en un modelo de caries monoespecie *in vitro*.
3. Determinar la dureza superficial y densidad mineral de especímenes remineralizados a través de protocolos de remineralización con BlueRemin® a distintas concentraciones.
4. Comparar la dureza y densidad mineral entre los especímenes remineralizados a las distintas concentraciones utilizadas.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó el modelo de biopelícula descrito y validado previamente por Ccahuana-Vásquez y Cury (2010), según el cual se simuló un ambiente cariogénico mediante la exposición de bloques de esmalte a sacarosa con previa formación de una biopelícula mono especie de *S. mutans*. Con esto se obtuvo una zona desmineralizada compatible con una lesión de caries no cavitada, sobre la cual se aplicaron diferentes concentraciones del agente remineralizador experimental BlueRemin®. Se evaluó la microdureza de Vickers y la densidad mineral de los bloques de esmalte antes de la exposición a sacarosa, después de la desmineralización en el modelo de caries microbiológico *in vitro* y finalmente una vez aplicado el agente remineralizador.

6.1 Obtención y almacenamiento de las muestras

Las muestras de esmalte se obtuvieron del corte de 12 terceros molares humanos incluidos (sin contacto con el medio oral) extraídos por indicación odontológica. Los dientes fueron proporcionados voluntariamente por los pacientes quienes firmaron un consentimiento informado en el que se entregó la información necesaria y se indicó que la donación era exclusiva para su utilización en este estudio (Anexo 1). Los dientes fueron almacenados en agua destilada hasta el día de su utilización.

6.2 Preparación de las muestras

El corte de los terceros molares se llevó a cabo con un disco de acero diamantado de 0,20 mm de grosor. Se rescató sólo la porción coronaria de los dientes, desechando las raíces (Figura 1), luego se cortaron 24 bloques de un promedio de 7 mm x 3 mm x 4 mm.

La superficie de esmalte de cada bloque seleccionada para realizar el ensayo fue dividida en tres zonas. La primera zona se denominó Zona Sin Desmineralizar, que representó la zona de control de dureza superficial. La segunda, constituida por la superficie sometida al tratamiento desmineralizador, fue posteriormente

llamada Zona Desmineralizada y la tercera zona se llamó Zona Remineralizada una vez que se aplicó el agente remineralizador correspondiente (Figura 2, a).

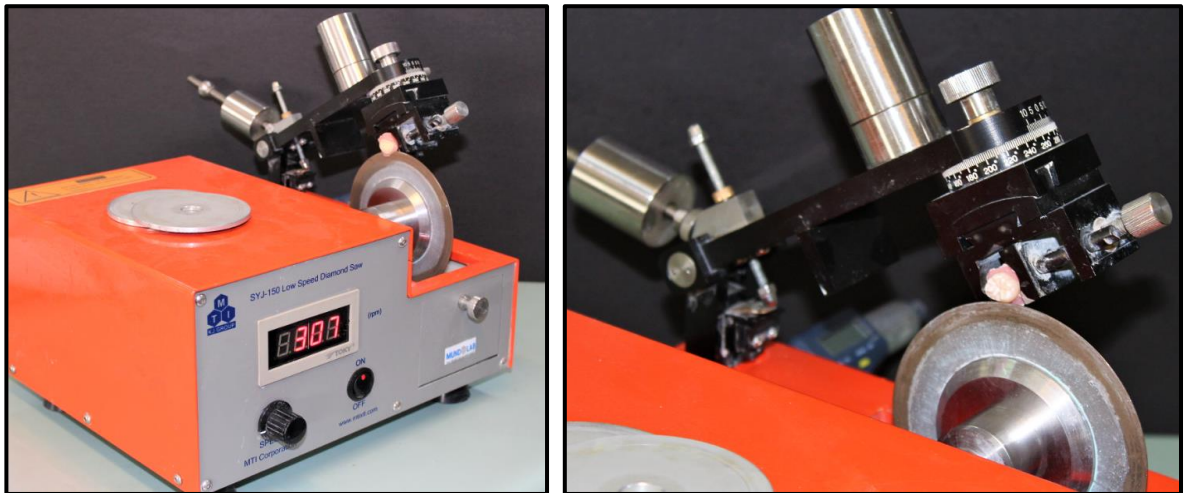


Figura 1. Imágenes de la recortadora con disco de acero diamantado. Instrumento utilizado para cortar de la porción coronaria de los terceros molares.

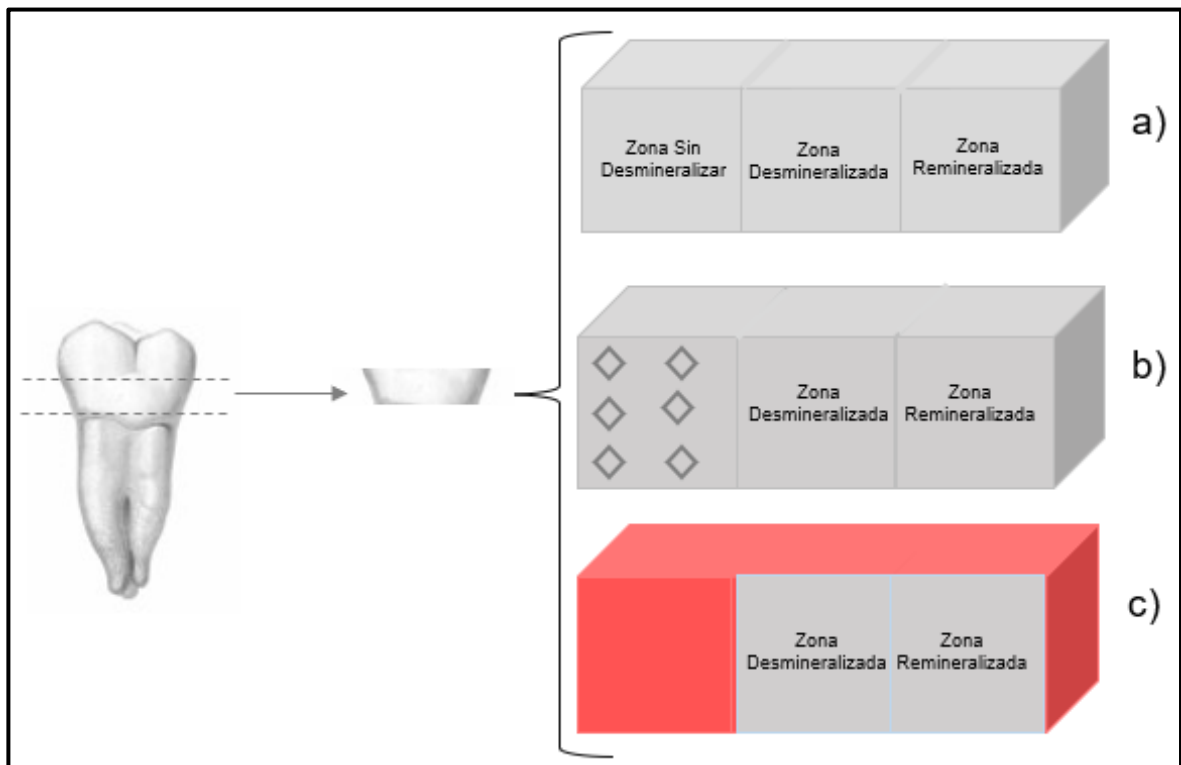


Figura 2. Esquema de muestras de esmalte a) Zona escogida para el ensayo dividida en tres zonas denominadas Zona Sin Desmineralizar, Zona Desmineralizada y Zona Remineralizada. b) Ubicación de la Zona Sin Desmineralizar en donde se realizaron las indentaciones para medir DS1. c) Zona Sin Desmineralizar y áreas que no fueron escogidas para el ensayo pintadas con barniz de uñas color rojo.

6.3 Medición de dureza inicial

En la Zona Sin Desmineralizar se realizó la medición de microdureza superficial mediante 6 indentaciones distribuidas de manera aleatoria, obteniendo un tamaño muestral de N:144. Se utilizó una carga de 1.961 Newton durante 10 segundos. Se denominó DS1 al promedio de las mediciones de dureza superficial inicial en los bloques antes de ser sometidos al tratamiento desmineralizador (Figura 2, b). Este procedimiento se llevó a cabo con el microindentador de Vickers Struers Duramin (USA) proporcionado por el Laboratorio de Ciencias de los Materiales de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Chile (Figura 3).



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

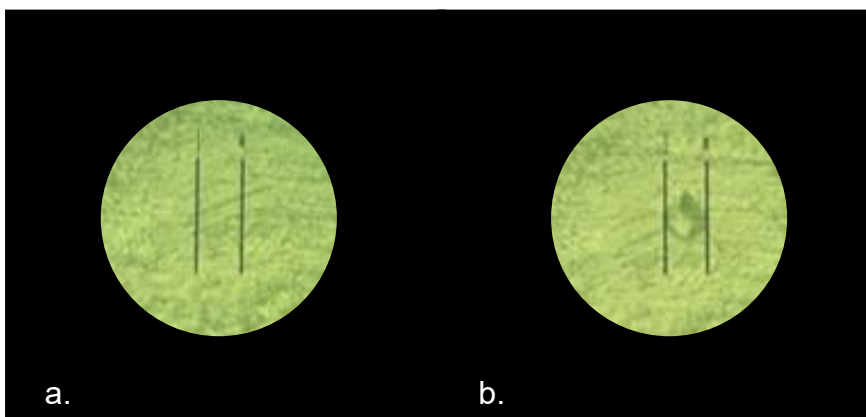


Figura 4. Imagen obtenida en el microindentador visualizada con aumento 40X a) Imagen de la superficie de esmalte antes de realizar la microindentación en la zona sin desmineralizar de una de las muestras. b) Imagen de una microindentación realizada. El rombo corresponde a la

microindentación realizada por el microindentador de Vickers sobre la muestra de esmalte. Las líneas I y II determinan la medida de una de las diagonales del rombo.

6.4 Montaje de las muestras

La Zona Sin Desmineralizar y las superficies que no fueron escogidas para realizar el ensayo se cubrieron con barniz de uñas, delimitando la zona blanco de desmineralización, sin pintar, compuesta por las superficies que se denominaron Zona Desmineralizada y Zona Remineralizada luego de aplicar el tratamiento remineralizador (Figura 2, c).

Se confeccionó un armazón metálico con alambre de ortodoncia de 0,8 mm para cada bloque de esmalte (Figura 5a) y fue adherido en la superficie opuesta a la escogida para el ensayo utilizando resina *flow* (Figura 5b). No se realizó grabado ácido sobre la superficie. La estructura metálica permitió mantener las muestras suspendidas sobre pocillos de las placas de cultivo celular de polietileno.

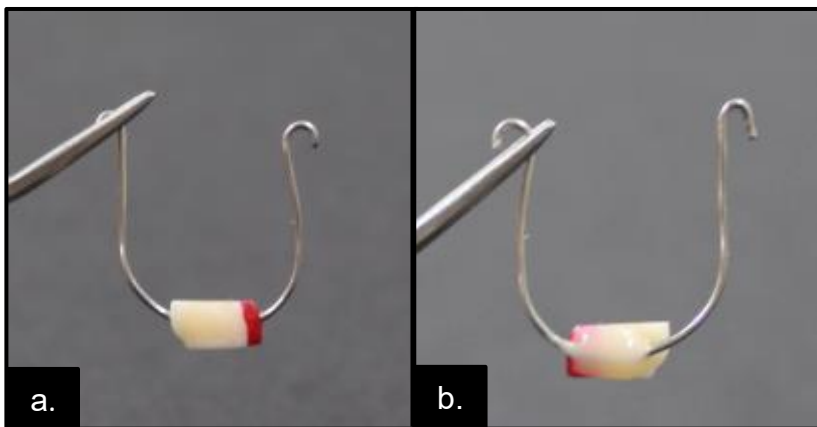


Figura 5. Muestra de esmalte con armazón metálico. a) Vista frontal. b) Vista posterior.

Se distribuyeron los bloques con su armazón sobre placas de Petri y fueron esterilizados durante 30 minutos por lado con luz ultravioleta en una campana de flujo laminar.

Los bloques fueron hidratados en agua destilada estéril por 30 minutos, luego, con una pinza estéril, se montaron las 24 muestras sobre una placa de cultivo celular de polietileno estéril de 24 pocillos (Figura 6). Estas placas presentan una

distribución de los pocillos en filas (A, B, C y D) y columnas (1 al 6), lo que permite la nomenclatura de las muestras para su posterior identificación (Figura 7).

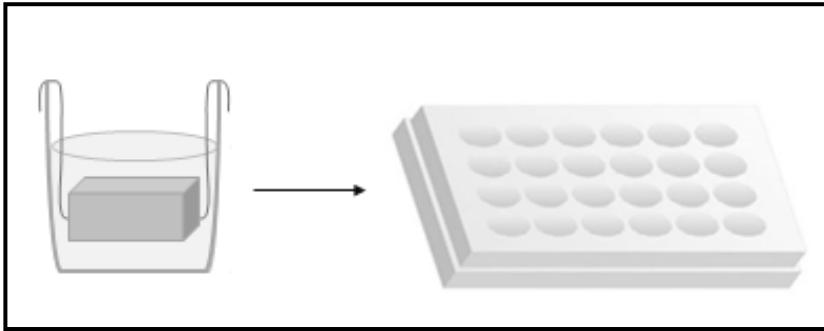


Figura 6. Esquema del montaje de los bloques de esmalte. Bloque de esmalte con armazón metálico suspendido sobre uno de los 24 pocillos de la placa de cultivo celular de polietileno.

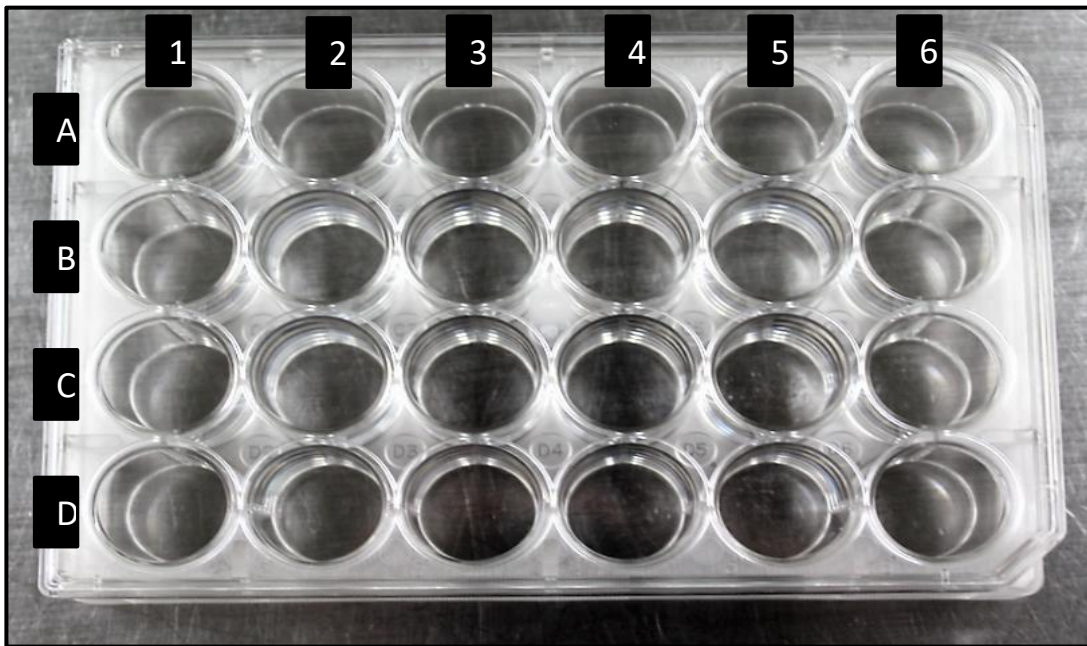


Figura 7. Placa de polietileno estéril de 24 pocillos.

6.5 Recolección y filtrado de saliva

Previo a la formación de la biopelícula, los bloques fueron inmersos en saliva humana para generar la película adquirida. La saliva fue donada voluntariamente por un individuo libre de enfermedades sistémicas, no fumador, sin consumo de antibióticos en los últimos tres meses y que no había ingerido líquidos o alimentos al menos 2 horas antes de la recolección.

Utilizando un método modificado de De Jong & Van der Hoeven (1987) y empleado por Cuadra Saenz y cols. (2012), se recolectaron 40 mL de saliva en un tubo centrífuga estéril y se le agregó Dithiotreitol (DTT) hasta alcanzar una concentración final de 2,5 mM. Esta solución fue incubada en hielo por 10 minutos y centrifugada a 5.000 RPM por 15 minutos a 4°C, luego se extrajo el sobrenadante y fue traspasado a una jeringa conectada a un filtro de marca Biofil® tipo *Syringe Filter* de 0,22 μm que a su vez fue dispuesto sobre un nuevo tubo centrífuga estéril. Se llevó a cabo la filtración de manera manual aplicando una leve presión sobre la jeringa y se almacenó a 4°C hasta su utilización (Cavalcanti, 2014; Botelho, 2016; Fernández, 2016), (Figura 8, a y b).

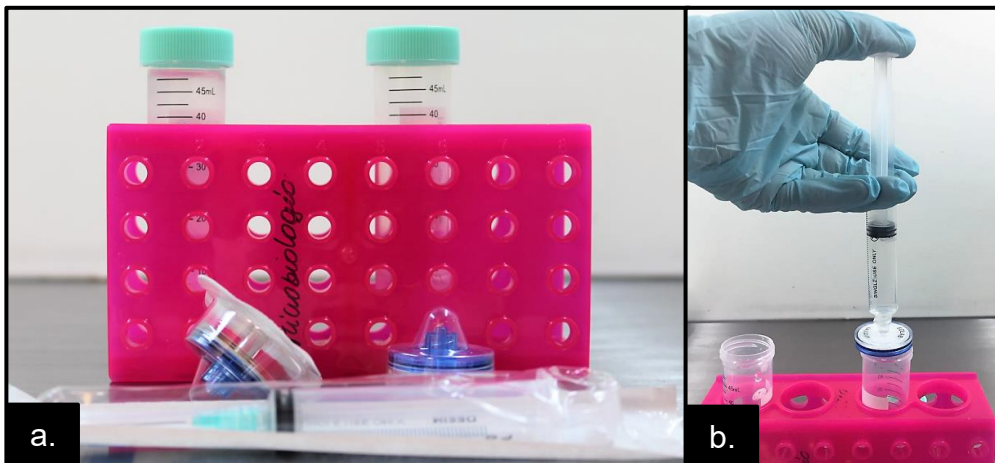


Figura 8. Procedimiento de filtración de saliva. a) Materiales utilizados. b) Procedimiento de filtración manual.

Para comprobar la esterilidad de la saliva filtrada se sembraron 100 μL de ésta en agar TYCS (Tryptona, Levadura, Cisteína, Sacarosa) y en agar sangre. Posteriormente se incubó por 48 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia.

Una vez comprobada la esterilidad de la saliva, se depositaron 2 mL en cada uno de los 24 pocillos de una nueva placa de cultivo celular. Tras la hidratación por 30 minutos en agua destilada estéril, cada muestra de esmalte fue ubicada con su armazón de sostén sobre los pocillos con los 2 mL de saliva filtrada utilizando una pinza estéril (Figura 9).



Figura 9. Imagen de las muestras de esmalte en saliva. Bloques suspendidos en los pocillos de la placa de cultivo celular con saliva filtrada.

La placa de cultivo celular con los bloques de esmalte y saliva filtrada fue cerrada y puesta sobre un TapeShake® por 30 minutos dentro de la estufa a 37°C para bañar los bloques con la saliva e inducir la formación de la película salival adquirida sobre ellos (Figura 10).



Figura 10. Placa de cultivo con los bloques y la saliva sobre el TapeShake®.

6.6 Formación de la biopelícula bacteriana

Se utilizó la cepa ATCC 25175 de *S. mutans* proporcionada por el departamento de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Se prepararon los medios de cultivo agar TYCS y caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) según protocolo y especificaciones del fabricante. La preparación de las placas de cultivo se realizó bajo campana de flujo laminar con el objetivo de reducir el riesgo de contaminación. Éstas fueron incubadas durante 12 horas a

37°C para corroborar que no hubiese contaminación y posteriormente fueron almacenadas a 4°C hasta su utilización.

Luego de corroborar que los medios de cultivo estuviesen estériles, se inocularon 100 µL de un cultivo líquido de *S. mutans* ATCC 25175 en el agar TYCS y se incubó durante 48 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia. Una vez obtenidas las colonias de *S. mutans*, se hizo un análisis macro y micromorfológico para corroborar la pureza del cultivo. Luego se resembraron en caldo BHI suplementado con glucosa 0,1 mM y se incubaron por 48 horas en las condiciones previamente descritas. Este preparado correspondió al inóculo bacteriano.

Pasadas las 48 horas, se preparó una solución de 3 mL de caldo BHI estéril suplementado con 300 µL de glucosa 0,1 mM estéril e inóculo. Esta suspensión bacteriana fue ajustada a una turbidez de 0,5 McFarland.

Se rotularon dos tubos centrífuga, T1 y T2, en los que se depositó:

Tubo 1

41,2 mL de caldo BHI
4,6 mL de sacarosa al 10% estéril
2,2 mL de suspensión de *S. mutans*
ajustada a 0,5 McFarland

Tubo 2

41,2 mL de caldo BHI estéril
4,6 mL de sacarosa al 10% estéril

En una nueva placa de cultivo celular se depositaron 2 mL de T1 a 22 de los 24 pocillos para permitir la formación de la biopelícula sobre los bloques de esmalte. Se depositaron 2 mL de la solución contenida en T2 en cada uno de los 2 pocillos restantes con el objetivo de tener 2 muestras en las que no hubiese formación de biopelícula (Figura 11). Estas muestras sin desmineralizar (D5 y D6) correspondieron al control negativo de desmineralización. Se incubó la placa en condiciones de microaerofilia a 37°C durante 36 horas.



Figura 11. Traspaso de las muestras desde la placa de cultivo celular con saliva a la nueva placa con medio de cultivo y suspensión bacteriana.

6.7 Proceso de desmineralización

Las muestras fueron introducidas en una solución de sacarosa estéril al 10% durante 5 minutos, 4 veces al día por 3 días consecutivos con el objetivo de lograr una zona de desmineralización compatible con una lesión de caries dental no cavitada, como indica el protocolo de Ccahuana y Cury (2010).

Al inicio de la jornada se preparó una solución de 43,2 mL de caldo BHI con 5,8 mL de glucosa 0,1 mM y se depositaron 2 mL de ésta en cada pocillo de una nueva placa de crecimiento celular (P1). Los bloques fueron traspasados todas las mañanas a estos pocillos con medio de cultivo fresco antes de la primera exposición a sacarosa al 10% con el objetivo de mantener cepas bacterianas fisiológicamente activas (Figura 12). Después de esto, las muestras fueron sumergidas durante 5 minutos en su pocillo correspondiente en una segunda placa de cultivo (P2) que contenía una solución de sacarosa estéril al 10%. Finalmente se lavó cada bloque mediante 3 inmersiones en una tercera placa (P3) con NaCl 0.9% estéril y finalmente devuelto a su pocillo con caldo BHI y glucosa (Figura 13). Este procedimiento de exposición a sacarosa al 10% y posterior lavado con suero fisiológico se repitió 4 veces al día, en horarios predeterminados, durante 3 días seguidos como se muestra en el esquema de la figura 14.



Figura 12. Muestras de esmalte suspendidas en los pocillos con medio de cultivo fresco.

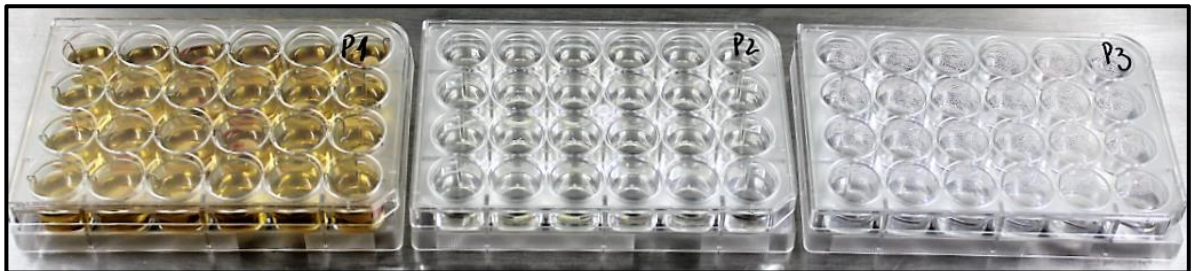


Figura 13. De izquierda a derecha: placa con caldo BHI y glucosa 0,1mM (P1), placa con sacarosa estéril al 10% (P2) y placa con suero fisiológico estéril (P3).

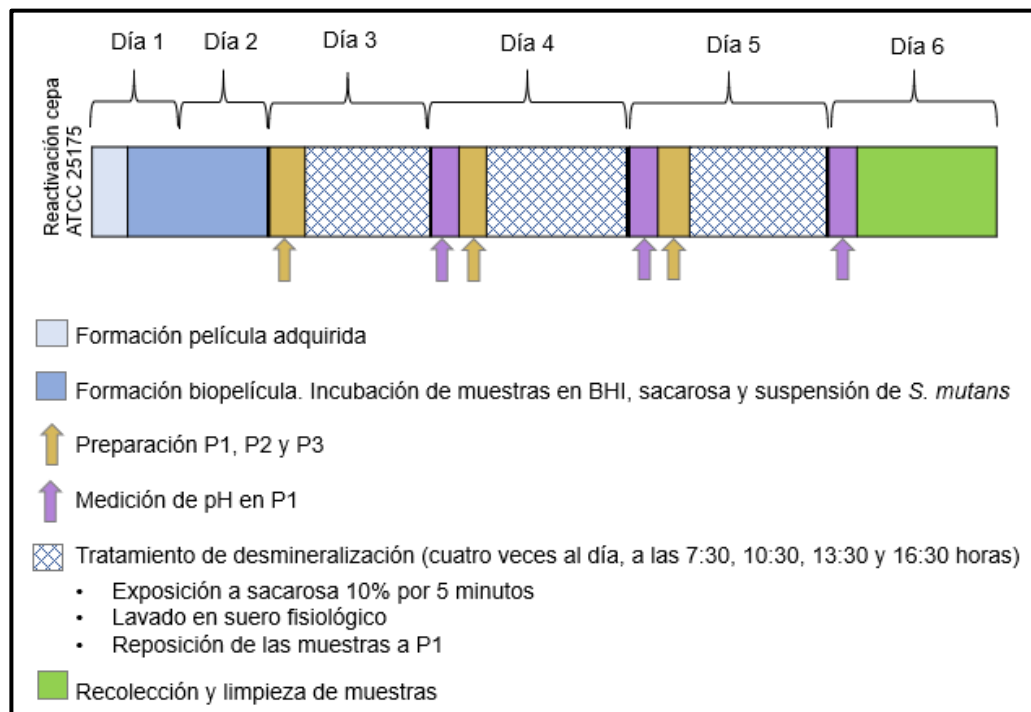


Figura 14. Esquema resumen de protocolo experimental para la formación de biopelícula y desmineralización de las muestras.

Para corroborar la viabilidad de los inóculos de cada pocillo, se realizaron cuatro controles microbiológicos. Para cada uno se dividieron dos placas de agar TYCS en 12 secciones y fueron rotuladas de forma que cada cuadro correspondió a un pocillo de la placa de cultivo celular, en cada cuadro se sembraron 10 μ L del caldo de cada pocillo de la placa P1 antes de ser desechada. Todas las placas fueron incubadas en condiciones de microaerofilia a 37°C durante un tiempo equivalente de 24 horas. Además, una vez obtenidas las colonias, se observó la macromorfología colonial bajo lupa estereoscópica.

Para el análisis de la pureza de los cultivos se realizó un frotis de los caldos de cada pocillo, se realizó tinción Gram y fueron observados al microscopio óptico.

Por otra parte, una de las muestras (D4) fue retirada al quinto día del experimento para ser observada al microscopio electrónico de barrido.

Como control negativo de desmineralización se utilizó una de las muestras sin desmineralizar (D6), sin bacterias, donde no hubo formación de biopelícula. El control positivo de desmineralización se llevó a cabo mediante la desmineralización con ácido ortofosfórico al 37%. Se realizó el grabado ácido según la indicación del fabricante para esmalte de una muestra suspendida en medio de cultivo sin bacterias (D5).

6.8 Acidogenicidad de la biopelícula

Cada mañana se determinó el pH de los medios de cultivo de caldo BHI y glucosa 0,1 mM con un papel indicador de pH directamente en cada pocillo. Las mediciones se realizaron una vez al día en los pocillos de P1, antes del cambio de la placa.

6.9 Remoción de la biopelícula desde los bloques de esmalte

Una vez terminado el proceso de desmineralización, las muestras fueron lavadas con suero fisiológico estéril y un cepillo suave para eliminar los residuos de biopelícula, luego de esto, se retiró el barniz de uñas de cada una de ellas (Figura 15 y 16).

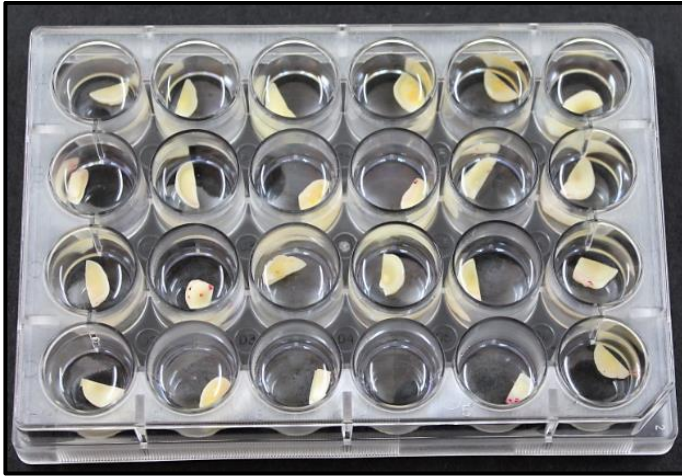


Figura 15. Placa de cultivo con los bloques de esmalte una vez removida la biopelícula y el barniz de uñas.

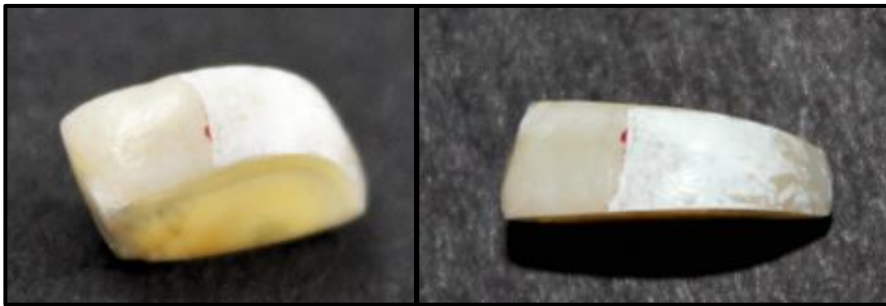


Figura 16. Bloque de esmalte desmineralizado. Muestra sin biopelícula y una vez removido el armazón metálico y el esmalte de uñas.

6.10 Medición de dureza después del tratamiento desmineralizador

La medición de dureza superficial de los bloques desmineralizados se realizó con un microdurómetro mediante 6 indentaciones en la Zona Desmineralizada. Se denominó DS2 al promedio de los valores de dureza superficial obtenidos después del tratamiento desmineralizador.

6.11 Tratamiento remineralizador

Antes de aplicar el agente remineralizante las muestras fueron pintadas con barniz de uñas cubriendo la Zona Sin Desmineralizar y la Zona Desmineralizada dejando libre la superficie por remineralizar como se muestra en la figura 19.

Se utilizaron tres concentraciones distintas del agente remineralizante (Figura 17).

A partir de la primera concentración del agente producida y utilizada en estudios previos se definieron dos nuevas concentraciones. Esta concentración base, fue denominada en este trabajo como Concentración 2 y corresponde a 6,4 g/100 mL de BlueRemin®. Según este valor se determinó el límite de solubilidad que posee el compuesto de BlueRemin® sin alterar el pH de la solución. El valor correspondiente al incremento de compuesto fue sumado y restado de manera equivalente a la Concentración 2 para dar origen a las Concentraciones 1 y 3.

1: 5,6 g/100 mL de BlueRemin®

2: 6,4 g/100 mL de BlueRemin®

3: 7,2 g/100 mL de BlueRemin®

Cada una de ellas fue aplicada en 6 bloques de esmalte (Figura 18).

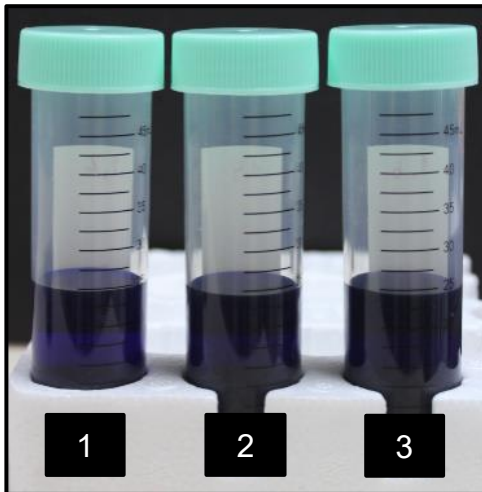


Figura 17. Imagen de los tubos centrífuga con las tres concentraciones utilizadas

	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						
<div style="background-color: yellow; padding: 2px;">1: 5,6g/100mL de BlueRemin (A1, A2, B1, B2, C1, C2)</div> <div style="background-color: lightgreen; padding: 2px;">2: 6,4g/100mL de BlueRemin (A3, A4, B3, B4, C3, C4)</div> <div style="background-color: pink; padding: 2px;">3: 7,2g/100mL de BlueRemin (A5, A6, B5, B6, C5, C6)</div>						

Figura 18. Esquema de una placa de cultivo y distribución de la aplicación de las tres concentraciones de BlueRemin®.

La aplicación de BlueRemin® se llevó a cabo imitando lo realizado en los estudios previos del agente, en los cuales se igualó el protocolo de aplicación clínica del Fluoruro Diamino de Plata, un producto de características similares al BlueRemin® disponible en el mercado.

Una vez limpias las muestras y libres de humedad se llevó a cabo la aplicación de BlueRemin® con un *microbrush* y se dejó actuar sobre la zona previamente designada para aplicar el agente, ahora denominada Zona Remineralizada, por 2 minutos (Figura 19). Posteriormente se retiró el agente remineralizador con una mota de algodón estéril embebida en agua destilada. Las muestras se dejaron en saliva artificial por 16 horas a 37° C para simular las condiciones del medio oral. Cada concentración fue aplicada en 6 muestras de esmalte expuestas a la biopelícula siguiendo el mismo procedimiento.



Figura 19. Imagen de la aplicación del agente remineralizador en una de las muestras de esmalte.

Como control positivo de remineralización, se aplicó sobre dos muestras Fluoruro Diamino de Plata (FAGamin®, Tedequim S.R.L., Córdova – Argentina) (muestra

D1) y Barniz de Flúor (Flúor protector Barniz Ivoclar Vivadent A.G., Madrid – España) (muestra D2) siguiendo el protocolo indicado por los respectivos fabricantes (Figura 20). La muestra D3 fue utilizada como control negativo de la remineralización, a la cual no se le aplicó tratamiento remineralizador.

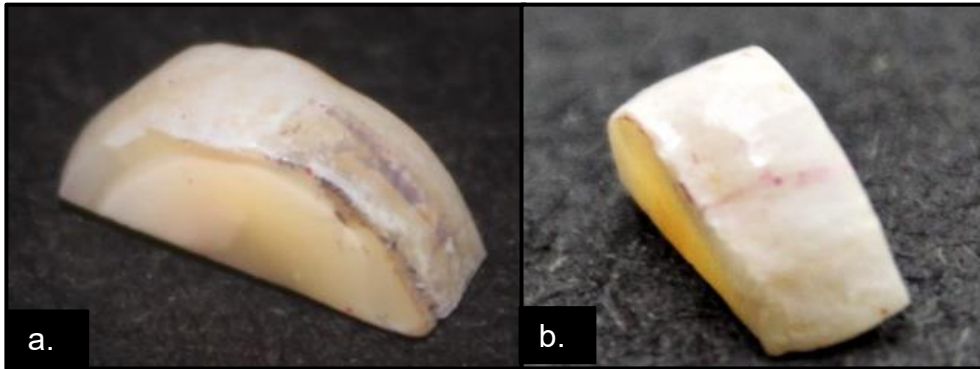


Figura 20. Control positivo de remineralización. a) Muestra D1 remineralizada con Fluoruro Diamino de Plata. b) Muestra D2 remineralizada con Barniz de Flúor.

6.12 Evaluación de remineralización

Se realizó las pruebas de dureza en la Zona Remineralizada siguiendo el mismo protocolo de las dos mediciones de dureza anteriores. El promedio de las mediciones de dureza superficial realizadas luego de aplicar el agente remineralizante se denominó DS3.

6.13 Mediciones densidad mineral

Los bloques de esmalte fueron escaneados en el equipo SKYSCAN1272 de Bruker® de alta resolución en tres ocasiones, previo a la exposición al modelo experimental, después del tratamiento desmineralizador y posterior a la aplicación del protocolo de remineralización. Las pruebas de dureza superficial realizadas en cada etapa se llevaron a cabo después del escaneado de las muestras.

Una vez obtenidas las imágenes, se utilizó el software SkyScan Data Viewer, CTan y CTvox3D para visualizar los cortes y las reconstrucciones en tres dimensiones de los bloques de esmalte.

Se utilizó el software CTan para medir la densidad mineral de las muestras. Se seleccionó una zona determinada de cada bloque, incluyendo la mitad externa del

esmalte, a la cual se le realizaron las mediciones de densidad en tres ocasiones. De esta forma se obtuvo tres valores para una misma zona según la etapa del ensayo en la que fue analizada. Se denominó DM1 a la densidad mineral inicial, DM2 a la densidad del esmalte desmineralizado y DM3 al valor de densidad obtenido luego de aplicar el tratamiento remineralizador.

6.14 Análisis estadístico de valores de dureza y densidad mineral

Se utilizó el porcentaje de pérdida de dureza superficial (%PDS) y porcentaje de pérdida de densidad mineral (%PDM) como indicadores de la desmineralización del esmalte, fueron calculados de la siguiente manera:

$$\%PDS = \frac{(DS1 - DS2) \times 100}{DS1}$$

DS1

$$\%PDM = \frac{(DM1 - DM2) \times 100}{DM1}$$

DM1

La remineralización se determinó mediante el cálculo de los porcentajes de recuperación de dureza superficial (%RDS) y de recuperación de densidad mineral (%RDM) utilizando las siguientes fórmulas:

$$\%RDS = \frac{(DS3 - DS2) \times 100}{(DS1 - DS2)}$$

(DS1 - DS2)

$$\%RDM = \frac{(DM3 - DM2) \times 100}{(DM1 - DM2)}$$

(DM1 - DM2)

El análisis de los datos obtenidos se realizó por tratamiento utilizado y por concentración de BlueRemin® aplicada. Para el análisis estadístico, se evaluó la distribución de los datos mediante el test Shapiro-wilk en el programa STATA. Se compararon las medias y analizó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las durezas y densidades obtenidas con la utilización de las diferentes concentraciones implementando el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

VII. RESULTADOS

7.1 Formación de biopelícula sobre los bloques de esmalte

Mediante inspección visual se evidenció la formación de una capa blanquecina y aspecto rugoso sobre las superficies de las muestras de esmalte inmersas en medio de cultivo con suspensión de *S. mutans* (Figura 21 y Figura 22a). Las muestras incubadas sin bacterias (D5 y D6) mantuvieron sus superficies sin formación de biopelícula (Figura 22b).

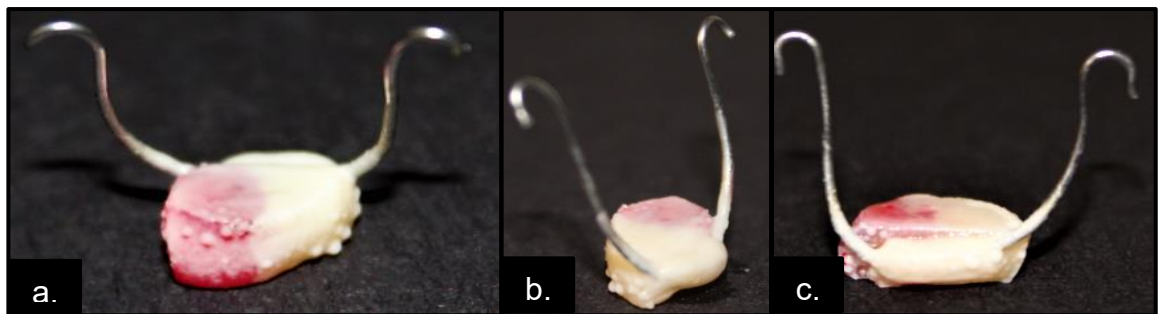


Figura 21. Imagen de un bloque de esmalte al quinto día de formación de biopelícula. a) Vista frontal. b) Vista lateral. c) Vista posterior.

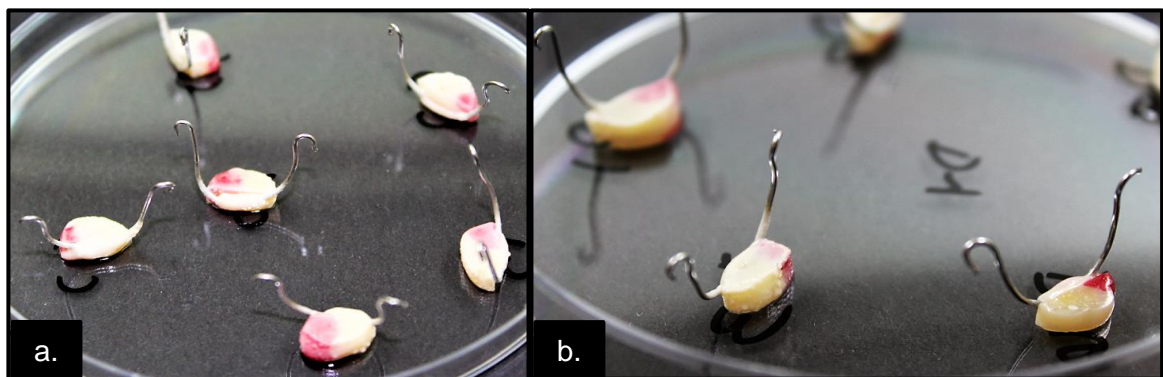


Figura 22. Muestras de esmalte sobre placas de Petri a) Bloques con formación de biopelícula. b) Bloques D5 y D6 sin formación de biopelícula.

Además, crecimiento observó bacteriano en el caldo y aumento de la turbidez al fondo del pocillo de las muestras con formación de biopelícula, mientras que los caldos en los pocillos de las muestras D5 y D6 se mantuvieron limpios y sin turbidez (Figura 23 y 24).



Figura 23. Imagen de la placa de cultivo celular al tercer día de desmineralización. La muestra D4 no se observa debido a que fue retirada para su observación por microscopía electrónica de barrido.

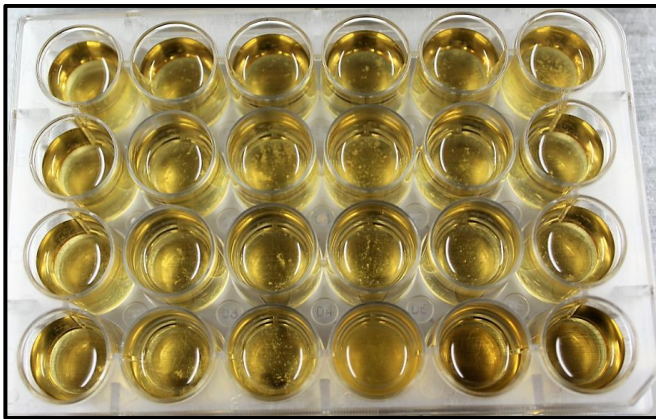


Figura 24. Imagen de P1 luego de retirar las muestras una vez finalizado el proceso de desmineralización.

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

Las pruebas de viabilidad y pureza fueron positivas para todos los caldos con inóculo de *S. mutans*. En el primer control de viabilidad, realizado luego de las 36 primeras horas desde el inicio del ensayo, se pudo observar un leve crecimiento bacteriano en algunos recuadros de la placa de agar (Figura 25). Sin embargo, a partir del primer control efectuado luego del comienzo del tratamiento desmineralizador con exposición a sacarosa, se pudo observar crecimiento de colonias en todos los recuadros de la placas de agar. Como se muestra en las Figuras 26, 27 y 28, hubo crecimiento de colonias bacterianas en las placas de agar TYCS con morfología compatible a la descrita para *S. mutans* en todas las muestras en donde hubo formación de biopelícula. En los recuadros

correspondientes a las muestras D5 y D6 no hubo crecimiento bacteriano debido a que fueron incubadas en caldos sin inóculo de *S. mutans*.

En la observación al microscopio óptico de los frotis de caldo de cada pocillo, se identificaron cocáceas Gram positivo agrupadas en pares o cadenas y no se detectaron elementos que indicasen contaminación de los medios de cultivo (Figura 29a). En la figura 29a se observa una imagen de un frotis de caldo, mientras que la figura 29b muestra una imagen de microscopía electrónica de un frotis de colonia, se puede evidenciar una agrupación variable de la bacteria al ser incubada en medios distintos.

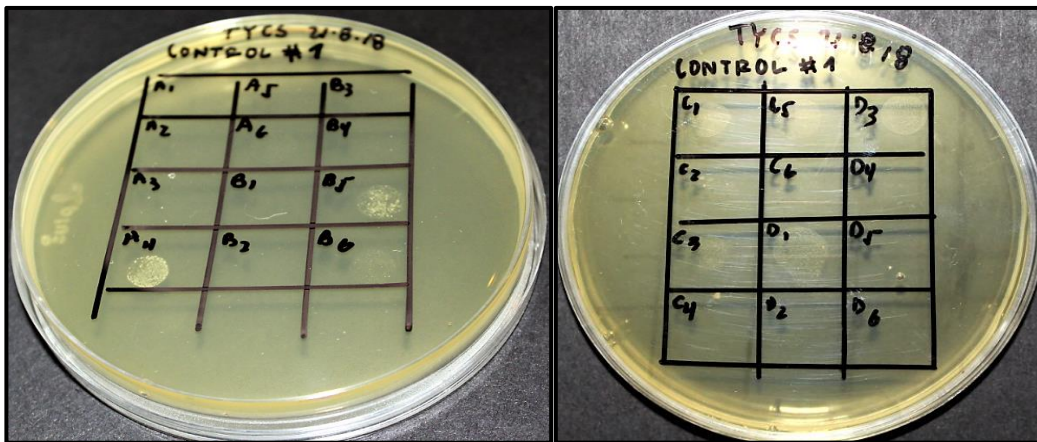


Figura 25. Imagen de placas de agar TYCS utilizadas como control de viabilidad luego de las 36 primeras horas desde el inicio del experimento.

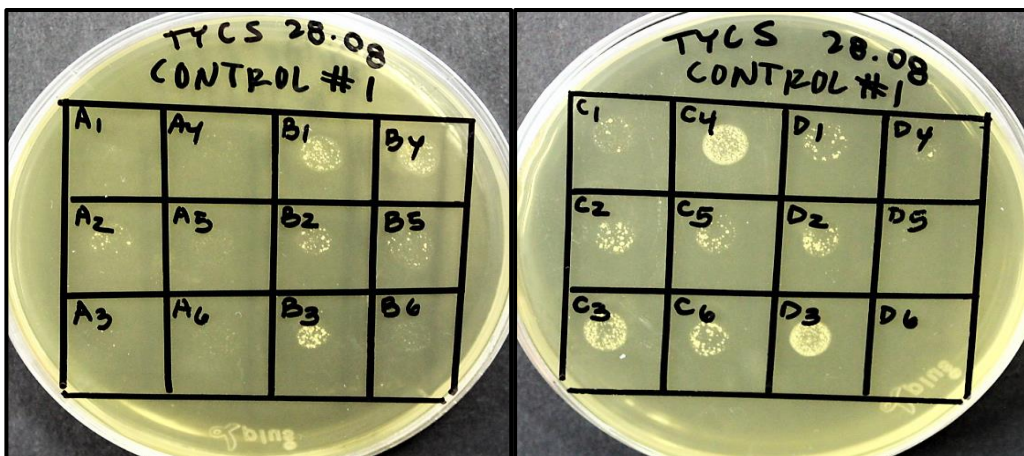


Figura 26. Imagen de placas de agar TYCS utilizadas para el control de viabilidad después del primer día de exposición a sacarosa.

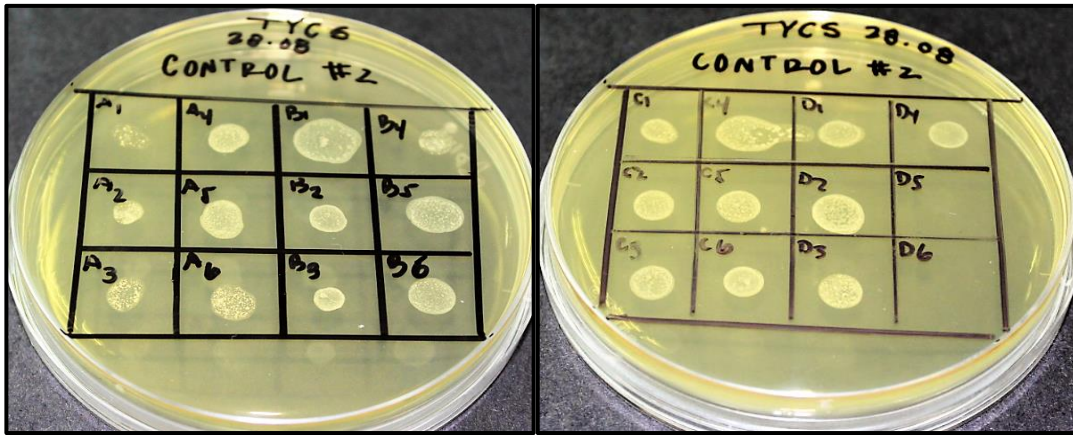


Figura 27. Imagen de placas de agar TYCS utilizadas para el control de viabilidad después del segundo día de exposición a sacarosa.

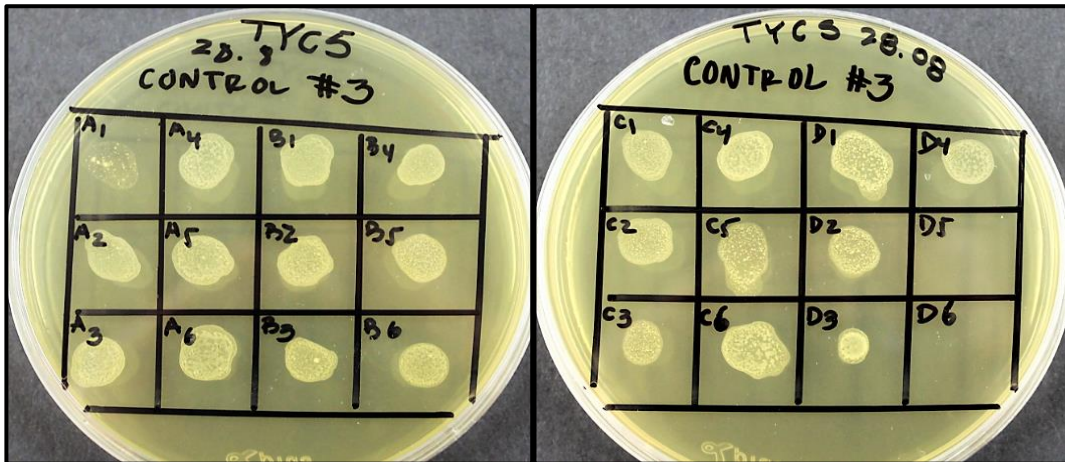


Figura 28. Imagen de placas de agar TYCS usadas para el control de viabilidad de después del tercer día de exposición a sacarosa.

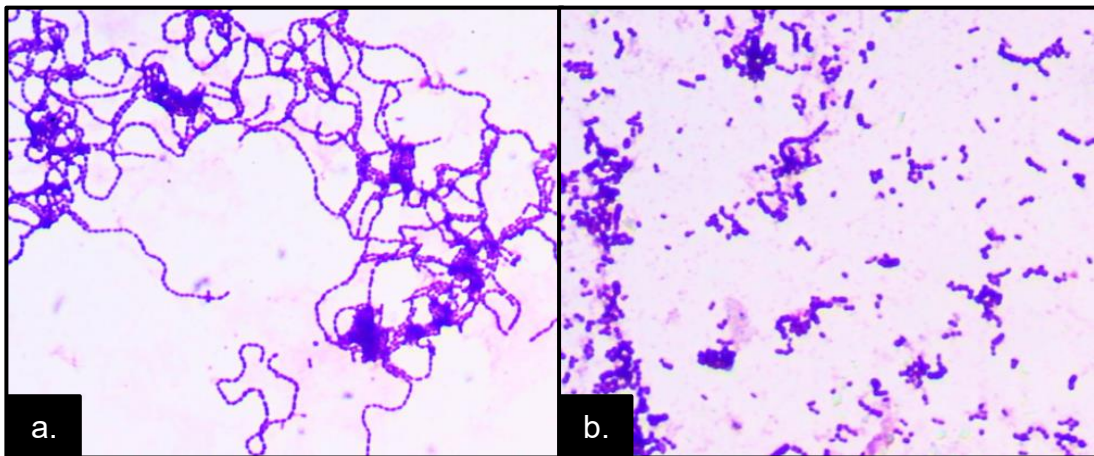


Figura 29. Imagen de microscopía electrónica 100X. a) Frotis obtenido directamente del caldo de uno de los pocillos con formación de biopelícula. b) Frotis obtenido de una colonia crecida en agar TYCS a partir de la siembra de 20 µl de medio de cultivo de un pocillo con bacterias.

La muestra D4 fue retirada y observada al microscopio electrónico de barrido al quinto día de experimento. En las imágenes obtenidas se pudo comprobar la presencia de *S. mutans* donde se identificaron bacterias de morfología cocácea agrupadas en pequeñas cadenas adheridas a la superficie de esmalte (Figura 30).

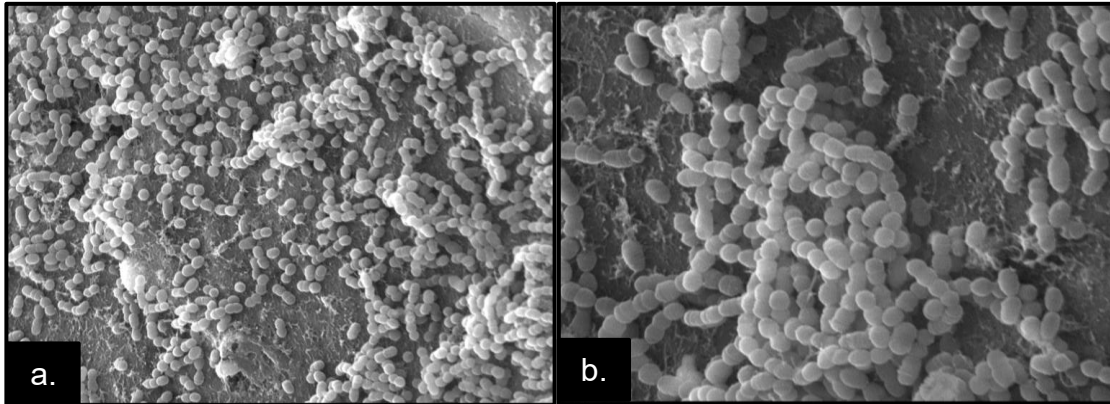


Figura 26. Imagen de microscopía electrónica de barrido de la superficie de un bloque de esmalte con *S. mutans*. a) 5.000X. b) 10.000X.

7.3 Medición de pH

El pH promedio durante los 3 días de tratamiento desmineralizador para los caldos con formación de biopelícula fue de 4,47 (Tabla 1) y para las muestras control negativo de desmineralización (D5 y D6) de 6,83 (Tabla 2).

Tabla 1: Promedios de pH de las muestras con formación de biopelícula.

	pH Día 1	pH Día 2	pH Día 3	Promedio Final
Promedios	4,82	4,36	4,24	4,47 ± 0,31

Promedio final ± Desviación Estándar.

Tabla 2: Promedios de pH de las muestras sin formación de biopelícula.

	pH Día 1	pH Día 2	pH Día 3	Promedio final
Promedios	7	7	6,5	6,83 ± 0,26

Promedio final ± Desviación Estándar.

7.4 Resultados de pruebas de dureza

La Tabla 3 muestra los promedios de las mediciones de dureza inicial (DS1), después del tratamiento desmineralizador (DS2) y dureza final luego de aplicar el agente remineralizante (DS3) por tratamiento. En la Tabla 4 se muestran los porcentajes de pérdida (%PDS) y recuperación (%RDS) de dureza superficial registrados según el tratamiento aplicado. Los valores de dureza superficial en cada etapa registrados por concentración de BlueRemin® utilizada se pueden ver en la Tabla 5. Los porcentajes de pérdida y recuperación de dureza obtenidos con las concentraciones 1, 2 y 3 se pueden ver en la Tabla 6.

Tabla 3: Valores de dureza superficial de Vickers (HV) de los bloques de esmalte según el tratamiento aplicado.

Tratamiento	DS1	DS2	DS3
BlueRemin®	330,74 ± 68,58	117,27 ± 38,71	182,43 ± 62,36
Fluoruro Diamino de Plata	369,67 ± 34,87	162,17 ± 25,28	181,33 ± 30,18
Flúor Silano	322 ± 37,05	119,60 ± 42,61	159,33 ± 18,63
Control Negativo Remineralización (Muestra D3 sin aplicación de agente remineralizador)	352 ± 48,27	91,55 ± 29,28	94,90 ± 9,34
Control Positivo Desmineralización (Muestra D5 desmineralizada con ác. ortofosfórico)	387 ± 50,68	171 ± 26,23	173 ± 21,20
Control Negativo Desmineralización (Muestra D6 sin formación de biopelícula)	345 ± 39,06	344,67 ± 48,80	342,17 ± 21,78

Promedios ± Desviación Estándar. DS1 = Dureza superficial inicial. DS2 = Dureza superficial después del tratamiento desmineralizador. DS3 = Dureza superficial después de aplicar el agente remineralizante.

Tabla 4: Dureza Superficial. Porcentajes de desmineralización y remineralización según el tratamiento aplicado.

Tratamiento	%PDS	%RDS
BlueRemin®	62,93 ± 15,05	36,72 ± 51,53
Fluoruro Diamino de Plata	55,41 ± 10,22	5,35 ± 21,11
Flúor Silano	62,16 ± 15,37	11,91 ± 39,64
Control Negativo Remineralización (Muestra D3 sin aplicación de agente remineralizador)	73,86 ± 7,37	1,32 ± 13,74
Control Positivo Desmineralización (Muestra D5 desmineralizada con ác. ortofosfórico)	55,78 ± 4,16	2,34 ± 21,56
Control Negativo Remineralización (Muestra D6 sin formación de biopelícula)	0,09 ± 7,42	0,30 ± 70,5

Promedios ± Desviación Estándar. %PDS = Porcentaje de pérdida de dureza superficial. %RDS = porcentaje de recuperación de dureza superficial.

Tabla 5: Valores de dureza superficial de Vickers (HV) según la concentración de BlueRemin® utilizada.

Concentración	DS1	DS2	DS3
1	349,53 ± 61,72	106,42 ± 34,10	173,30 ± 59,69
2	357,58 ± 62,89	108,99 ± 24,17	185,83 ± 71,09
3	285,11 ± 58,04	136,40 ± 47,60	188,17 ± 56,02

Promedios ± Desviación Estándar. DS1 = Dureza superficial inicial. DS2 = Dureza superficial después del tratamiento desmineralizador. DS3 = Dureza superficial después de aplicar el agente remineralizante.

Tabla 6: Dureza Superficial. Porcentajes de desmineralización y remineralización conforme a la concentración utilizada.

Concentración	%PDS	%RDS
1	68,42 ± 12,19	30,78^{oo} ± 33,62
2	68,45 ± 9,41	30,75^{oo} ± 26,68
3	51,92 ± 16,38	48,61^{oo} ± 77,83

Promedios ± Desviación Estándar. %PDS = Porcentaje de pérdida de dureza superficial. %RDS = Porcentaje de recuperación de dureza superficial. ^{oo} = p > 0,05.

Se encontró una disminución de dureza superficial estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en todas las muestras con formación de biopelícula (Figura 27). Con respecto a la muestra utilizada como control positivo de desmineralización, tratada con ácido ortofosfórico al 37%, hubo una disminución de los valores estadísticamente significativa al comparar DS1 y DS2 (Figura 28). En ambos tratamientos, el porcentaje de pérdida de dureza superficial fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$). En cuanto al control negativo de desmineralización, no se presentó una variación significativa entre los valores de DS1 y DS2 (Figura 28).

Todas las muestras tratadas con BlueRemin® presentaron un aumento significativo en los valores de dureza superficial al comparar los promedios de DS2 y DS3 ($p < 0,05$). Los bloques de esmalte tratados con Fluoruro Diamino de Plata y Flúor Silano, correspondientes a los controles positivos de remineralización, también presentaron un aumento en sus valores de dureza superficial estadísticamente significativo ($p < 0,05$) entre DS2 y DS3 (Figura 27).

No se presentaron diferencias significativas entre los valores de DS2 y DS3 de la muestra control negativo de remineralización, en la cual hubo desarrollo de biopelícula sin la posterior aplicación de un tratamiento remineralizador (Figura 28).

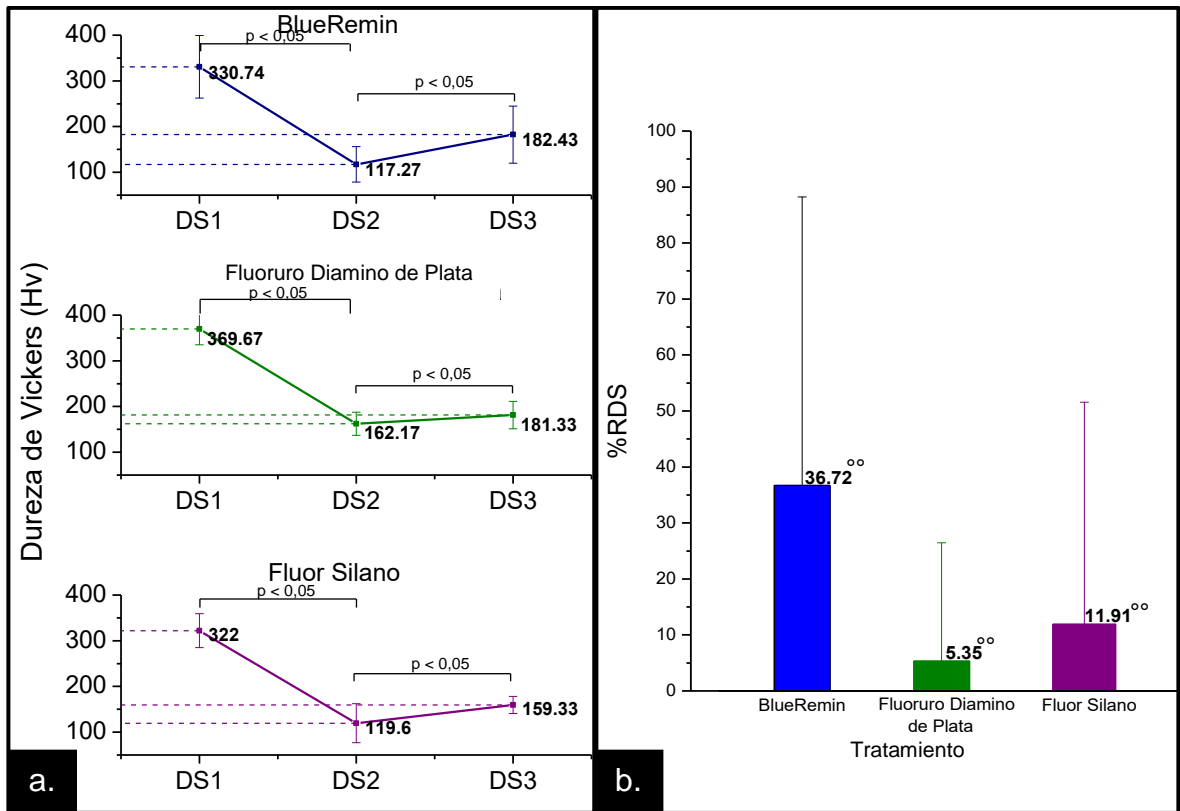


Figura 27. Gráficos de valores de dureza superficial por tratamiento. a) Promedios de Dureza Superficial de Vickers (Hv) en las tres etapas, DS1, DS2 y DS3 (\pm DE) para los bloques es de esmalte con formación de biopelícula y tratamiento remineralizador. b) Porcentajes de recuperación de dureza superficial (%RDS) de cada agente remineralizante utilizado (\pm DE). ^{oo} = $p > 0,05$.

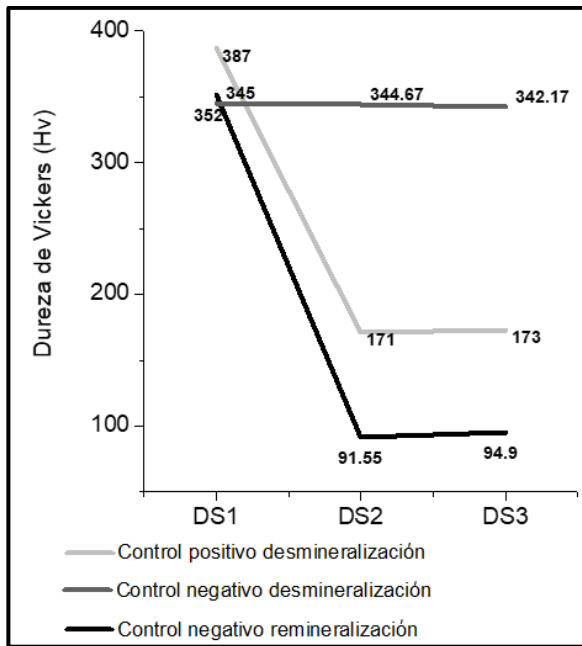


Figura 28. Gráfico de promedios de valores de dureza superficial de las muestras correspondientes a los controles positivo de desmineralización, negativo de desmineralización y negativo de remineralización.

Al contrastar los valores de remineralización obtenidos con los tres agentes remineralizantes utilizados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p > 0,05$), sin embargo, con BlueRemin® se registró el mayor porcentaje de recuperación de dureza superficial correspondiente a un 36,72% (Figura 29).

Al comparar los porcentajes de ganancia de dureza superficial obtenidos con los protocolos de remineralización con BlueRemin® a tres concentraciones diferentes, se observó que el mayor porcentaje se logró en los bloques tratados con la mayor concentración. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones utilizadas ($p > 0,05$) (Tabla 6), (Figura 29).

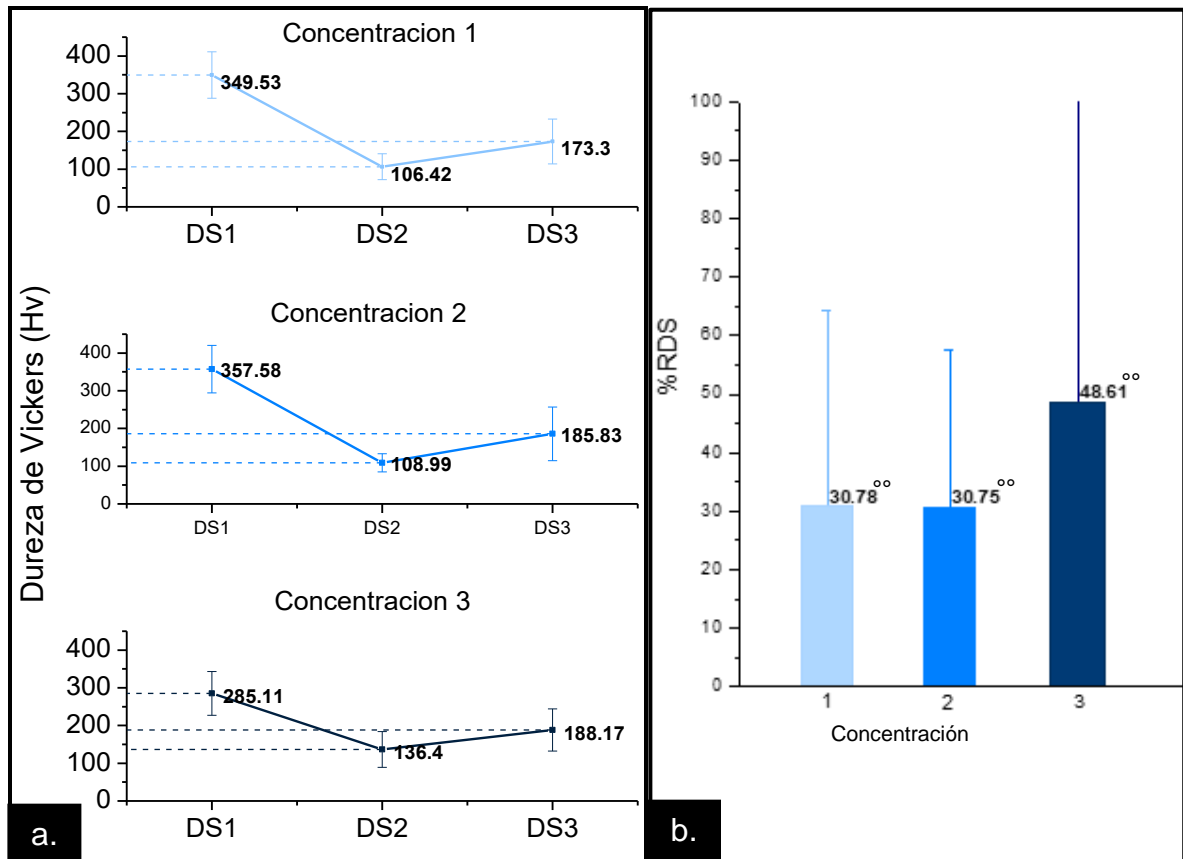


Figura 29. Gráficos de valores de dureza superficial por concentración. a) Promedios de Dureza Superficial de Vickers (Hv) en DS1, DS2 y DS3 (\pm DE). b) Porcentajes de recuperación de dureza superficial (%RDS) registrados con cada concentración utilizada (1,2 y 3) (\pm DE). ° = $p < 0,05$.

7.5 Imágenes obtenidas a partir del Micro-CT

En la figura 30 se muestran dos tipos de imágenes obtenidas a partir del procesamiento en el *Micro-CT* de una muestra expuesta a la biopelícula y posteriormente tratada con BlueRemin®. En las imágenes a1, b1 y c1 se puede observar la imagen de un corte sagital del bloque de esmalte visualizado en el programa CTan y luego en las imágenes a2, b2 y c2 se observa la reconstrucción en tres dimensiones de la serie de imágenes que componen el objeto escaneado en el programa CTvox3D .

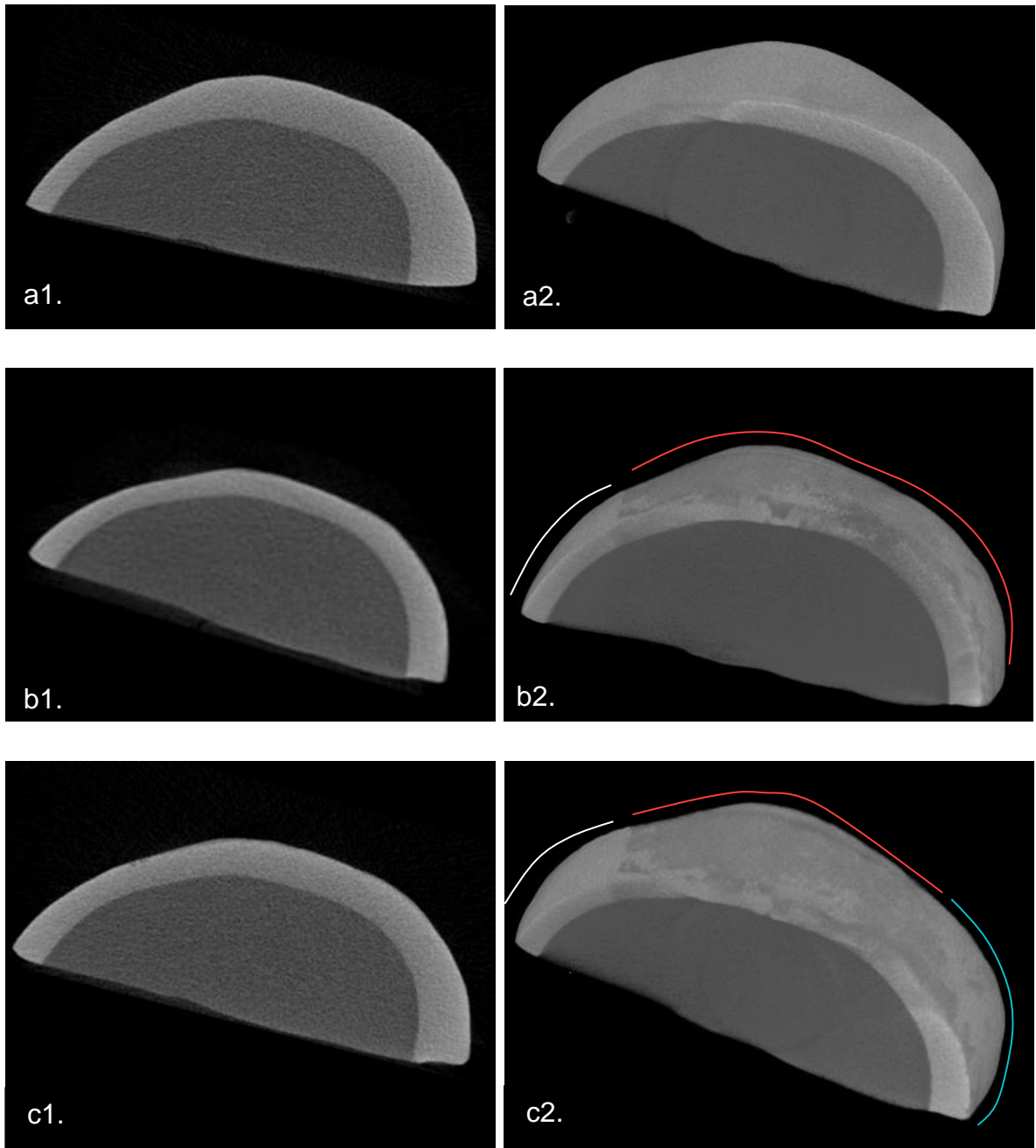


Figura 30. Imágenes de un bloque de esmalte tratado con BlueRemin® obtenidas a partir de los softwares CTan (a1-c1) y CTvox3D (a2-c2) a) Imágenes del bloque de esmalte antes de ser sometido al tratamiento desmineralizador. a1) Corte saital a2) Reconstrucción 3D b) Bloque de esmalte después del tratamiento desmineralizador. b1) Corte sagital b2) Reconstrucción 3D. Bajo la línea curva de color rojo se puede identificar la zona desmineralizada, la zona sin desmineralizar se muestra bajo la línea color blanco. c) Bloque de esmalte después del tratamiento remineralizador. c1) Corte Sagital c2) Reconstrucción 3D. La zona comprendida bajo la línea de color celeste representa la zona remineralizada donde se aplicó BlueRemin®.

En la figura 30a se puede apreciar la imágenes del bloque antes de ser expuesto a la biopelícula de *S. mutans*, en el cual se observa una superficie lisa y homogénea.

La figura 30b muestra el mismo espécimen de esmalte después del tratamiento desmineralizador. En la imagen del corte sagital se puede observar un leve cambio de densidad en la superficie del esmalte al compararla con la imagen 30a1. En la reconstrucción 3D se puede apreciar el cambio de la superficie del bloque hacia una de aspecto rugoso y manchado, a diferencia de la que se puede observar en la figura 30a2. Se puede diferenciar la zona sin desmineralizar, anteriormente cubierta con esmalte de uñas, de la zona desmineralizada expuesta a la biopelícula.

En las imágenes 30c1 y 30c2, se observa el mismo bloque de esmalte una vez aplicado el agente remineralizador. En cuanto la imagen 30c1, que muestra un corte sagital de la muestra, las diferencias entre la zona desmineralizada y la remineralizada son casi imperceptibles. Sin embargo, en la imagen 30c2 que representa la reconstrucción 3D, se puede identificar, bajo las líneas de color blanco, rojo y celeste, claramente las tres zonas a lo largo de la superficie del espécimen de esmalte.

7.6 Resultados de mediciones de densidad mineral

Los promedios de las mediciones de densidad mineral por tratamiento, inicial (DM1), después del tratamiento de desmineralización (DM2) y luego de la aplicación del protocolo remineralizador (DM3) se muestran en la Tabla 7. En la Tabla 8 se encuentran los porcentajes de pérdida (%PDM) y recuperación (%RDM) de densidad mineral. Los valores de densidad registrados por concentración de BlueRemin® utilizada se muestran en la Tabla 9. Los porcentajes de desmineralización y remineralización según la concentración de BlueRemin® aplicada se exponen en la tabla 10.

Tabla 7: Valores de densidad mineral (g/cm³) según el tratamiento aplicado.

Tratamiento	DM1	DM2	DM3
BlueRemin®	2,8212 ± 0,0682	2,7298 ± 0,0638	2,7668 ± 0,0603
Fluoruro Diamino de Plata	2,7072 ± 0,0053	2,6007 ± 0,0087	2,6276 ± 0,0029
Flúor Silano	2,8566 ± 0,0111	2,6432 ± 0,0028	2,7384 ± 0,0088
Control Negativo Remineralización (Muestra D3 sin aplicación de agente remineralizador)	3,0779 ± 0,0173	2,9205 ± 0,0446	2,9191 ± 0,0077
Control Positivo Desmineralización (Muestra D5 desmineralizada con ác. ortofosfórico)	2,8229 ± 0,0217	2,7058 ± 0,0189	2,7056 ± 0,0080
Control Negativo Desmineralización (Muestra D6 sin formación de biopelícula)	2,7697 ± 0,0082	2,7638 ± 0,0034	2,7637 ± 0,0040

Promedios ± Desviación Estándar. DM1 = Densidad mineral inicial. DM2 = Densidad mineral después del tratamiento desmineralizador. DM3 = Densidad mineral después de aplicar el agente remineralizante.

Tabla 8: Densidad Mineral. Porcentajes de desmineralización y remineralización según el tratamiento aplicado.

Tratamiento	%PDM	%RDM
BlueRemin	3,22 ± 1,96	40,99 ± 6,59
Fluoruro Diamino de Plata	3,94 ± 0,50	24,99 ± 3,38
Flúor Silano	7,47 ± 0,03	44,83 ± 5,81
Control Negativo Remineralización (Muestra D3 sin aplicación de agente remineralizador)	5,12 ± 0,96	-4,75 ± 3,05
Control Positivo Desmineralización (Muestra D5 desmineralizada con ác. ortofosfórico)	4,15 ± 0,60	-1,05 ± 6,66
Control Negativo Desmineralización (Muestra D6 sin formación de biopelícula)	0,02 ± 0,40	-1,69 ± 4,17

Promedios ± Desviación Estándar. %PDM = porcentaje de pérdida de densidad mineral. %RDM = porcentaje de recuperación de densidad mineral.

Tabla 9: Valores de densidad mineral (g/cm^3) conforme a la concentración de BlueRemin® utilizada.

Concentración	DM1	DM2	DM3
1	$2,8397 \pm 0,0571$	$2,7437 \pm 0,0334$	$2,7773 \pm 0,0595$
2	$2,8343 \pm 0,0527$	$2,7541 \pm 0,0747$	$2,7908 \pm 0,0511$
3	$2,7835 \pm 0,0833$	$2,6838 \pm 0,0549$	$2,7256 \pm 0,0523$

Promedios \pm Desviación Estándar. DM1 = Densidad mineral inicial. DM2 = Densidad mineral después del tratamiento desmineralizador. DM3 = Densidad mineral después de aplicar el agente remineralizante.

Tabla 10: Densidad Mineral. Porcentajes de desmineralización y remineralización según la concentración de BlueRemin® utilizada.

Concentración	%PDM	%RDM
1	$3,35 \pm 1,73$	$30,96^\circ \pm 29,87$
2	$2,82 \pm 2,93$	$47,72^\circ \pm 10,37$
3	$3,54 \pm 0,40$	$53,57^\circ \pm 35,17$

Promedios \pm Desviación Estándar. %PDM = Porcentaje de pérdida de densidad mineral. %RDS = porcentaje de recuperación de densidad mineral. $^\circ = p > 0,05$.

El porcentaje de pérdida de densidad mineral fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) para todas las muestras sometidas al tratamiento de desmineralización mediante la formación de biopelícula (Figura 31). También hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los valores de DM1 y DM2 del control positivo de desmineralización tratado con ácido ortofosfórico al 37%. No se registró una variación significativa entre los valores de DS1 y DS3 del control negativo de remineralización (Figura 32).

Todas las muestras en las que se aplicó un agente remineralizante presentaron un porcentaje de recuperación de densidad mineral estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Al contraponer los valores de remineralización obtenidos con los tres agentes remineralizantes utilizados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p > 0,05$). En este caso, el Flúor Silano

fue el producto que alcanzó el mayor porcentaje de recuperación de densidad mineral , llegando a un 44,83%, seguido por el BlueRemin® con un 40,99%. El menor porcentaje registrado fue de 24,99%, obtenido a partir de tratamiento con Fluoruro Diamino de Plata (Figura 31).

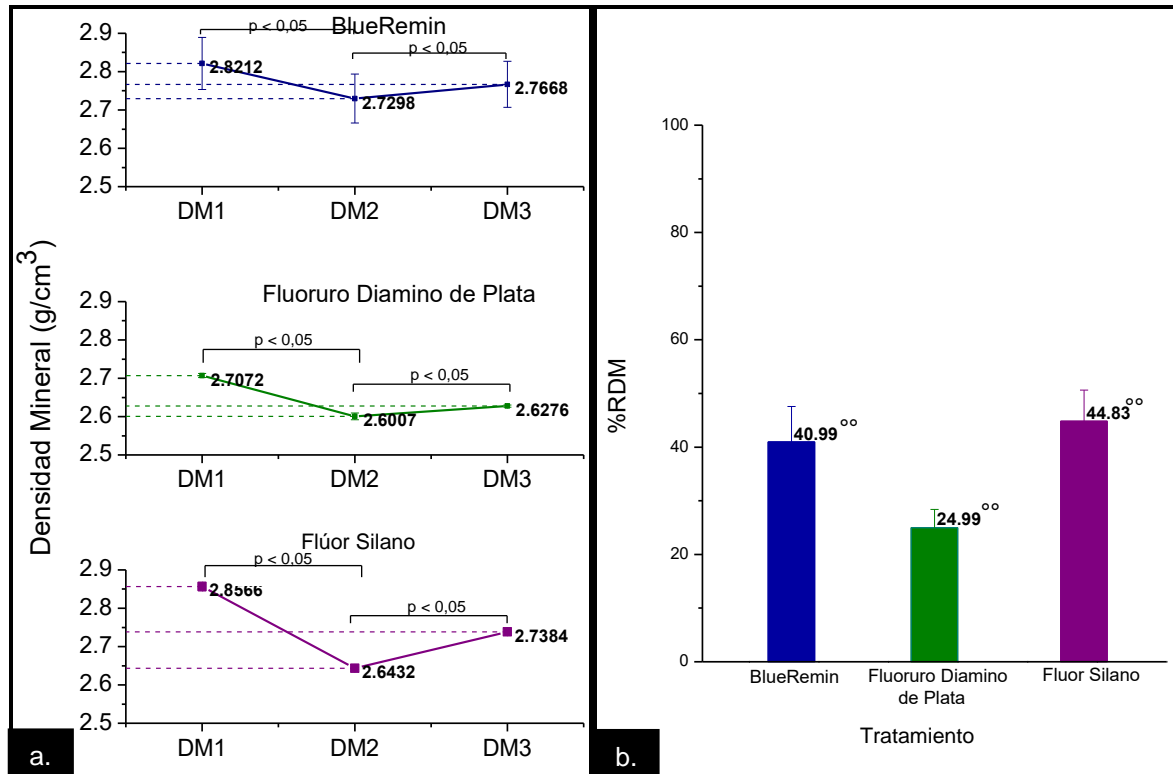


Figura 31. Gráficos de valores de densidad mineral. a) Promedios de Densidad Mineral (g/cm³) en las tres etapas, DS1, DS2 y DS3 (\pm DE) para los bloques es de esmalte con formación de biopelícula y tratamiento remineralizador. b) Porcentajes de recuperación de densidad mineral (%RDM) de cada agente remineralizante utilizado (\pm DE). ^{oo} = $p > 0,05$.

El control negativo de remineralización, en el cual hubo formación de biopelícula y desmineralización sin la posterior aplicación de un tratamiento remineralizador, no presentó diferencias entre los valores de DM2 y DM3 (Figura 32).

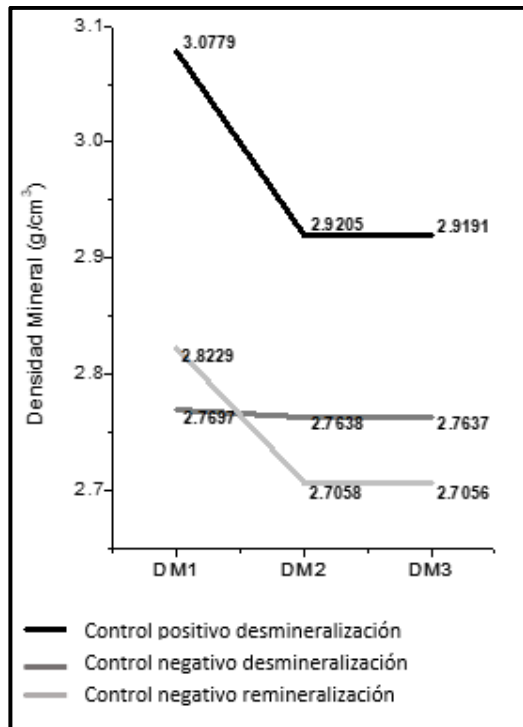


Figura 32. Gráfico de los valores de densidad mineral de las muestras correspondientes a los controles positivo de desmineralización, negativo de desmineralización y negativo de remineralización.

Al comparar los porcentajes de ganancia de densidad mineral obtenidos con los protocolos de remineralización con BlueRemin® a tres concentraciones diferentes, se observó que el mayor aumento se logró en los bloques tratados con la mayor concentración, con la cual hubo un 53,57% de recuperación de densidad mineral. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones utilizadas ($p > 0,05$) (Tabla 10), (Figura 33).

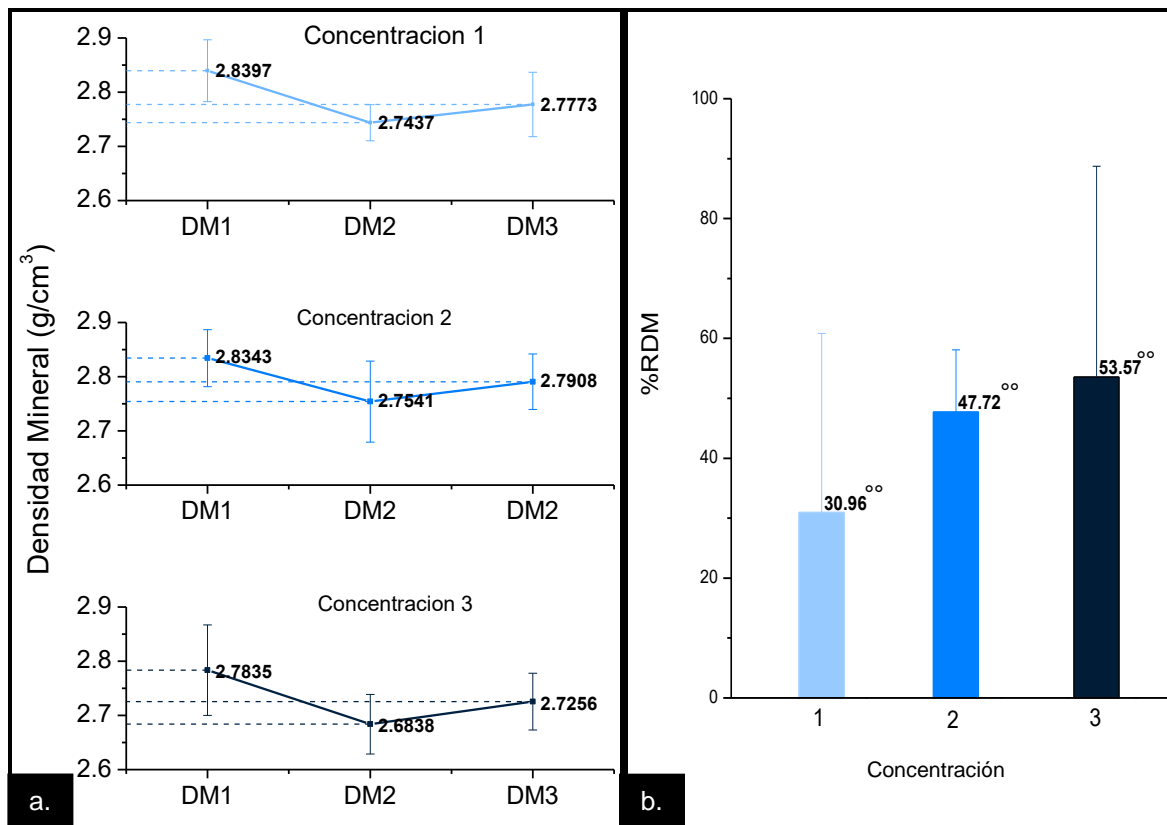


Figura 33. Gráficos de valores de densidad mineral por concentración de BlueRemin® utilizada. a) Promedios de densidad mineral (g/cm³) en las tres etapas, DS1, DS2 y DS3 (\pm DE) para los bloques es de esmalte tratados con las concentraciones 1, 2 y 3. b) Porcentajes de recuperación de densidad mineral (%RDM) obtenido con cada concentración utilizada (\pm DE). ^{oo} = $p > 0,05$.

VIII. DISCUSIÓN

En este estudio se desarrolló un modelo de biopelícula monoespecie de *S. mutans in vitro* sobre bloques de esmalte humano que permitió desmineralizar la superficie dental y luego evaluar los efectos de la aplicación de distintas concentraciones de un agente remineralizante a base de flúor y grafeno. Analizando las variaciones en los valores de dureza superficial y densidad mineral. Los modelos de biopelícula de *S. mutans in vitro* se han utilizado debido a las dificultades de desarrollar *in vivo* estudios en ambientes cariogénicos controlados (Sissons, 1997). Los modelos microbiológicos de caries *in vitro* son herramientas importantes para evaluar la composición bioquímica y microbiológica de la biopelícula dental formada bajo diferentes condiciones, estudiar los cambios causados en la superficie del sustrato al cual la biopelícula estuvo adherida y estudiar el efecto de sustancias sobre la desmineralización causada sobre la superficie dental (Ccahuana-Vásquez y Cury, 2010). La utilización de un modelo de biopelícula monoespecie puede ser considerado una desventaja, debido a que la composición de la biopelícula dental involucra cientos de especies bacterianas, lo que hace imposible reproducir exactamente esta complejidad en un modelo *in vitro* (Fernández, 2016). La elección de *S. mutans* como única especie constituyente de la biopelícula desarrollada en este trabajo, radica en que es la especie bacteriana con mayor número de resultados favorables respecto a la formación de biopelícula y desmineralización de esmalte en trabajos con modelos bacterianos similares (Steiner, 2007; Ccahuana-Vásquez y Cury, 2010; Giacaman, 2012) y debido a que posee propiedades únicas para metabolizar la sacarosa, el hidrato de carbono más cariogénico proveniente de la dieta (Paes, 2006).

En este trabajo se evidenció que todos los bloques de esmalte expuestos al modelo microbiológico monoespecie de *S. mutans* con formación de biopelícula registraron una disminución estadísticamente significativa de los valores de dureza superficial y una desmineralización similar a la muestra utilizada como control positivo de desmineralización. Los porcentajes de pérdida de dureza superficial concuerdan con los resultados obtenidos por Giacaman (2013), Fernández y cols.

(2015), Botelho y cols. (2016) y Fernández y cols. (2016). Adicionalmente, se pudo observar cambios en la coloración y textura en la superficie del esmalte, evidenciándose un aspecto blanquecino opaco y poroso luego del secado con aire, concordante con lesiones ICDAS I (International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) Coordinating Committee, 2007; Ismail, 2007). Contrariamente, la muestra sin formación de biopelícula, utilizada como control negativo de desmineralización, no presentó variaciones en los valores de dureza ni cambios superficiales de color o textura. Estos resultados demuestran la capacidad de este modelo de biopelícula monoespecie de *S. mutans* de simular las condiciones presentes en el proceso de desmineralización de los tejidos dentales y de generar lesiones de caries *in vitro*. El modelo microbiológico de caries utilizado en este estudio es una herramienta fundamental para analizar los cambios que ocurren en los tejidos expuestos a éste y representa una base para el desarrollo de futuros trabajos enfocados al estudio de la enfermedad.

Con respecto a la recuperación de dureza superficial, todas las muestras tratadas con BlueRemin® presentaron porcentajes de recuperación estadísticamente significativos al comparar los valores de dureza de los bloques remineralizados con los desmineralizados, al igual que los controles positivos de remineralización tratados con Fluoruro Diamino de Plata y Flúor Silano. En cuanto al control negativo de remineralización, que fue incubado bajo las mismas condiciones que las anteriores muestras, exceptuando la aplicación de un agente remineralizador, no experimentó variaciones de dureza superficial. Todo esto sugiere que el aumento de dureza superficial de las muestras es atribuible a la acción de los agentes remineralizantes. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Maia (2003), Manarelli (2014), Mohd (2016) y Nóbrega (2016).

Los porcentajes de recuperación de dureza superficial fueron estadísticamente significativos con todas las concentraciones aplicadas al comparar los valores de DS2 y DS3. A pesar de que la mayor concentración utilizada tuvo el mayor porcentaje de recuperación de dureza, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre éstos, lo que indica que las tres

concentraciones utilizadas tienen capacidad remineralizante, pero no hay diferencias entre el potencial remineralizante de cada una de éstas.

Las imágenes obtenidas a partir de la microtomografía computada (*Micro-CT*) permitieron evaluar cualitativa y cuantitativamente los bloques de esmalte desmineralizados y sometidos a los protocolos de remineralización. Se pudo observar una zona de desmineralización superficial, limitada a la mitad externa del esmalte, similar a la analizada en las imágenes publicadas por Deyhle (2015), Boca (2017) y Shahmoradi (2017).

Los valores de densidad mineral de esmalte sano medidos en este estudio son similares a los reportados por Dowker (2003), Shahmoradi (2016) y Alyahya (2019), sin embargo, al comparar los valores de densidad mineral después del tratamiento desmineralizador, la diferencia de desmineralización fue menor en este trabajo. Esto puede deberse a que, en los otros estudios, el periodo de desmineralización fue más prolongado, por lo que hubo una mayor pérdida de mineral y la generación de lesiones de mayor magnitud. Por esto, para evidenciar un cambio más significativo en los valores de densidad de los bloques desmineralizados, se sugiere aumentar el tiempo del tratamiento de desmineralización. Sin embargo, considerando que el objetivo de este trabajo fue obtener una zona desmineralizada compatible con una lesión de caries incipiente, se considera que el tiempo de exposición al tratamiento desmineralizador fue apropiado.

Con respecto a la recuperación de densidad mineral obtenida por tratamiento utilizado, todas las muestras tratadas con un agente remineralizante presentaron porcentajes de recuperación estadísticamente significativos al comparar los valores de DM2 y DM3. En este caso, el tratamiento con Flúor Silano fue el que tuvo el mayor porcentaje de remineralización de los tres productos aplicados, sin embargo, al igual que en las mediciones de dureza, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellos. El control negativo de remineralización no tuvo una variación significativa entre los valores de DM2 y DM3.

Al comparar las diferencias de remineralización alcanzadas por cada concentración utilizada, se observó que a medida que aumenta la concentración de BlueRemin®, aumenta el porcentaje de recuperación de densidad mineral, sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Esto muestra que existe una posible tendencia hacia una relación dosis dependiente del efecto del agente remineralizante. Un aumento en el número de especímenes estudiados podría aclarar la relación existente entre la concentración utilizada y la capacidad remineralizante de BlueRemin®.

La dureza superficial ha sido ampliamente utilizada como indicador de pérdida (Vale, 2011; Cavalcanti, 2014, Cury, 2000) y recuperación (Cury 2005; Manarelli, 2014) de mineral de los tejidos dentales y tiene una estrecha relación con la microtomografía computada, que cuantifica directamente la pérdida de mineral en esmalte y dentina (Thomas, 2006; Magalhães, 2009). En este trabajo se determinó la dureza superficial de los bloques de esmalte y se analizó las diferencias de desmineralización y remineralización, cuyos valores de pérdida y recuperación de dureza se relacionaron con una pérdida y recuperación de densidad mineral determinada cuantitativamente mediante microtomografía computada. Sin embargo, no se determinó exactamente una correlación entre los valores de dureza superficial y densidad mineral y las variaciones que éstos pudieran tener. Por esto se sugiere investigar sobre la asociación de estas variables en futuros estudios.

En este trabajo de investigación se demostró la capacidad remineralizante de tres concentraciones diferentes de BlueRemin® mediante la recuperación de dureza superficial y de densidad mineral de bloques de esmalte humano. Esto representa un antecedente importante para la futura implementación del agente en la práctica clínica, en la cual podrá ser aplicado con el objetivo de tratar lesiones de caries incipientes y controlar las condiciones locales orales para prevenir la aparición de futuras lesiones de caries en esmalte.

IX. CONCLUSIONES

Considerando que la hipótesis de este trabajo fue, “El efecto remineralizador de BlueRemin® en especímenes de esmalte con lesiones de caries producidas en un modelo microbiológico de caries *in vitro* es dependiente de su concentración”, podemos concluir que:

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los valores de remineralización de los bloques de esmalte sometidos al protocolo de remineralización con BlueRemin® a distintas concentraciones, sin embargo, se detectó una tendencia hacia una relación dosis dependiente de éstos.

Además, a partir de los resultados obtenidos en este trabajo se puede desprender que el modelo de biopelícula monoespecie de *S.mutans in vitro* es eficiente en el proceso de desmineralización superficial del esmalte. Adicionalmente, se sugiere que BlueRemin® posee capacidad remineralizante ya que aumentó la dureza superficial y la densidad mineral de todos los bloques de esmalte expuestos a éste y que puede tener una capacidad remineralizante equivalente al Fluoruro Diamino de Plata y al Flúor Silano.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdullah Z, John J (2015). Minimally Invasive Treatment of White Spot Lesions – A Systematic Review. *Oral Health Prev Dent* 14:197-205.
- Alyahya A, Alqareer A, Swain M (2019). Micro-CT Calibration Using Polymers and Minerals for Enamel Mineral Content Quantitation. *Med Princ Pract*
- Akhavan O, Ghaderi E (2010). Toxicity of Graphene Oxide Nanowalls Against Bacteria. *ACS Nano* 4(10):5731-5736.
- Askeland DR (1998). Control de la microestructura y de las propiedades mecánicas de los materiales. En: Ciencia e Ingeniería de los Materiales. 3era ed. International Thompson Editores, México D.F, pp.142-143.
- Avery JK, Chiego DJ Jr. (2007). Principios de Histología y Embriología Bucal con Orientación Clínica. 3^{era} ed. Elsevier España, S.A.
- Avilés-Reyes A, Freires IA, Kajfasz JK, Barbieri D, Miller JH, Lemos JA, *et al.* (2018). Whole genome sequence and phenotypic characterization of a Cbm⁺ serotype e strain of *Streptococcus mutans*. *Molecular Oral Microbiology* 33:257-269.
- Badenier O, Cueto A, Moya R (2007). Estudio de Prevalencia de las enfermedades bucodentales y necesidades de tratamiento en la V Región.
- Boca C, Truyen B, Henin L, Schulte AG, Stachniss V, De Clerck N, *et al.* (2017). Comparison of micro-CT imaging and histology for approximal caries detection. *Sci Rep* 7;7(1):6680.

Bothelo JN, Villegas-Salinas M, Troncoso-Gajardo P, Giacaman RA, Cury JA (2016). Enamel and dentine demineralization by a combination of starch and sucrose in a biofilm – caries model. *Braz Oral Res* 30(1):e52.

Bowden GH, Hamilton IR (1998) Survival of oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 9:54-85.

Busuoiu M, Mackiewicz K, Buttaro BA, Piggot PJ (2009). Role of intracellular polysaccharide in persistence of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 191:7315-7322.

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

Callister WD, Jr. (1995). Propiedades mecánicas de los materiales. En: Introducción a la Ciencia e Ingeniería de los Materiales. Editorial Reverté S.A., Barcelona; traducción de: William D. Callister, Jr., Materials Science and Engineering, an Introduction, 3ed. Ed., John Wiley and Sons, Inc., New York, pp.136-140.

Boca C, Truyen B, Henin L, Schulte AG, V Stachniss, De Clerck N, *et al.* (2017). Comparison of micro-CT imaging and histology for approximal caries detection. *Sci Rep* 7:6680.

Botelho JN, Villegas-Salinas M, Troncoso-Gajardo P, Giacaman RA, Cury JA (2016). Enamel and dentine demineralization by a combination of starch and sucrose in a biofilm – caries model. *Braz. Oral Res* 30(1):e52

Brunke O (2010) High-resolution CT-based defect analysis and dimensional measurement. *Insight-Non-Destruct Testing Condition Monitor* 52(2):91–3.

Carlsson J (1997) Bacterial metabolism in dental biofilms. *Adv Dent Res* 11:75-80.

Cavalcanti YW, Bertolini MM, da Silva WJ, Del-Bel-Cury AA, Tenuta LMA, Cury JA (2014). A three-species biofilm model for the evaluation of enamel and dentin demineralization. *Biofouling* 30(5):579-588.

Chen D, Tang L, Li J (2009). Graphene-based materials in electrochemistry. *Chem Soc Rev* 39:3157-3180.

Chu CH, Mei L, Seneviratne CJ, Lo EC (2012). Effects of silver diamine fluoride on dentine carious lesions induced by *Streptococcus mutans* and *Actinomyces naeslundii* biofilms. *Int J Paediatr Dent* 22(1):2-10.

Collys K, Slop D, Cleymaet R, Coomans D, Michotte Y (1992). Load dependency and reliability of microhardness measurements on acid-etched enamel surfaces. *Dent Mater* 8(5): 332-335.

Contreras V, Toro MJ, Elías-Boneta AR, Encarnación-Burgos A (2017). Effectiveness of silver diamine fluoride in caries prevention and arrest: a systematic literature review. *Gen Dent* 65:22-29.

Crombie FA, Manton DJ, Palamara JEA, Zaluzniak I, Cochrane NJ, Reynolds EC (2013). Characterisation of developmentally hypomineralised human enamel. *Journal of Dentistry* 41:611-618.

Cuadra-Sáenz G, Rao DL, Underwood AJ, Belapure SA, Campagna SR, Sun Z *et al.* (2012). Autoinducer-2 influences interactions amongst pioneer colonizing streptococci in oral biofilms. *Microbiology* 158 (Pt 7):1783-1795.

Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP (2000). Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose or fructose. *Caries Res* 34:491-497.

Cury JA, Simões GS, Del Bel Cury AA, Gonçalves NC, Tabchoury CPM (2005). Effect of a Calcium Carbonate Based Dentifrice on in situ Enamel Remineralization. *Caries Res* 39:255-257.

Cury JA, Tenuta LMA (2009). Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? *Braz Oral Res* 23(Spec Iss 1):23-30.

Davidson CL, Hoekstra IS, Arends J (1974). Microhardness of sound, decalcified and etched tooth enamel related to the calcium content. *Caries Res* 8(2):135-144.

De Jong MH, Van Der Hoeven JS (1987). The Growth of Oral Bacteria on Saliva. *J Dent Res* 66 (2):498-505.

Deyyle H, Dziadowiec I, Kind L, Thalmann P, Schulz G, Müller B (2015). Mineralization of Early Stage Carious Lesions In Vitro – A Quantitative Approach. *Dent J* 3:111-122.

Díaz-Garrido N, Lozano C, Giacaman RA (2012). Frequency of sucrose exposure on the cariogenicity of a biofilm-caries model. *Eur J Dent* 10(3):345-350.

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(4):237-45.

du Plessis A, Broeckhoven C, Guelpa A, le Roux SG (2017). Laboratory x-ray micro-computed tomography: a user guideline for biological samples. *Gigascience* 6(6):1-11.

Featherstone JDB, ten Cate JM, Shariati M, Arends (1983). Comparison of Artificial Caries-Like Lesions by Quantitative Microradiography and Microhardness Profiles. *Caries Res* 17:385-391.

Fernández CE, Fontana M, Samarian D, Cury JA, Rickard AH, González-Cabezas C (2016). Effect of Fluoride-Containing Toothpastes on Enamel Demineralization and *Streptococcus mutans* Biofilm Architecture. *Caries Research* 50:151-158.

Flemming HC, Wingender, J (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* 8:623–633.

Fejerskov O, Kidd E (2008). Chemical interactions between the tooth and oral fluids. In: Dental Caries. The Disease and its Clinical Management. 2nd rev ed. pp. 210-215.

Fejerskov O (2004). Changing Paradigms in Concepts of Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. *Caries Research* 38:182-191.

Forssten SD, Björklund M, Ouwehand AC (2010). *Streptococcus mutans*, Caries and Simulation Models. *Nutrients* 2(3):290-298.

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.

Gómez ME, Campos A (1999). Histología y Embriología Bucodental. Editorial Médica Panamericana S.A.

Gómez S (2010). Fluorterapia en Odontología: Fundamentos y Aplicaciones Clínicas. 4ta ed. Santiago, Chile.

Hannig M (1999). Ultrastructural investigation of pellicle morphogenesis at two different intraoral sites during a 24-h period. *Clin Oral Investig* 3:88-95.

Hannig M, Joiner A (2006). The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci* 19:29-64.

He J, Zhu X, Qi Z, Wang C, Mao X, Zhu C *et al.* (2015). Killing Dental Pathogens Using Antibacterial Graphene Oxide. *ACS Appl Mater Interfaces* 7:5605–5611.

Hu W, Peng C, Luo W, Lv M, Li X, Li D *et al.* (2010). Graphene Based Antibacterial Paper. *ACS Nano* 4(7):4317-4323.

Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, *et al.* (2007). The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 35(3):170-8.

International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) Coordinating Committee (2007). Rationale and Evidence for the International Caries Detection and Assessment System (ICDAS II). In: Stookey GK, editor. Early detection of dental caries: proceedings of the 2005 Indiana conference, Indianapolis: Indiana University, in press.

Jakubovics NS, Kolenbrander PE (2010). The Road to Ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Diseases* 16:729-739.

Jensen JL, Lamkin MS, Oppenheim FG (1992). Adsorption of human salivary proteins to hydroxyapatite: a comparison between whole saliva and glandular salivary secretions. *J Dent Res* 71:1569-1576.

Ji H, Sun H, Qu X (2016). Antibacterial applications of graphene-based nanomaterials: Recent achievements and challenges. *Elsevier, Advanced Drug Delivery Reviews* 100:0-14.

Kalender WA (2006). X-ray computed tomography. *Physics in Medicine and Biology* 51(13):29–43.

Karlinsey RL, Pfarrer AM (2012). Fluoride plus functionalized b-TCP: a promising combination for robust remineralization. *Adv Dent Res* 24:48-52.

Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabé E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T *et al.* (2017). Global, Regional and National Prevalence, Incidence and Disability-Adjusted Life years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries and Risk Factors. *Journal of Dental Research* 96:380-387.

Kidd EA, Fejerskov O (2004). What Constitutes Dental Caries? Histopathology of Carious Enamel and Dentin Related to the Action of Cariogenic Biofilms. *Journal of Dental Research* 83: C35-38.

Kuper NK, Van de Sande FH, Opdam NJM, Bronkhorst EM, De Soet JJ, Cenci MS *et al.* (2015). Restoration Materials and Secondary Caries Using an In Vitro Biofilm Model. *J Dent Res* 94(1): 62-68.

Lamkin MS, Arancillo AA, Oppenheim FG (1996). Temporal and compositional characteristics of salivary protein adsorption to hydroxyapatite. *J Dent Res* 75:803-808.

Lee YE, Baek HJ, Choi YH, Jeong SH, Park YD, Song KB (2010). Comparison of remineralization effect of three topical fluoride regimens on enamel initial carious lesions. *J Dent* 38(2):166-171.

LeGeros RZ (1991). Calcium phosphates in enamel, dentin and bone. In Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. *Monogr Oral Sci. Basel, Karger* 15:108-129.

Leme Paes AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA (2006). The Role of Sucrose in Cariogenic Dental Biofilm Formation – New Insight. *J Dent Res* 85(10): 878-887.

Lendenmann U, Grogan J, Oppenheim FG (2000). Saliva and dental pellicle —a review. *Adv Dent Res* 14:22-28.

Li D, Kaner RB (2008). Graphene-Based Materials. *Science* 320:1170-1171.

Liu S, Zeng TH, Hofmann M, Burcombe E, Wei J, Jiang R *et al.* (2011). Antibacterial Activity of Graphite, Graphite Oxide, Graphene Oxide and Reducen Graphene Oxide: Membrane and Oxidative Stress. *ACS Nano* 5(9):6971-6980.

Luoto A, Lahti S, Nevanperä T, Tolvanen M, Locker D (2009). Oral-health related quality of life among children with and without dental fear. *Int J Paediatr Dent* 19(2):115-20.

Magalhães AC, Moron BM, Comar LP, Wiegand A, Buchalla W, Buzalaf MAR (2009). Comparison of Cross-Sectional Hardness and Transverse Microradiography of Artificial Carious Enamel Lesions Induced by Different Demineralising Solutions and Gels. *Caries Res* 43:474-483.

Manarelli MM, Delbem ACB, Lima TMT, Castilho FCN, Pessan JP (2014). In vitro Remineralizing Effect of Fluoride Varnishes Containing Sodium Trimetaphosphate. *Caries Res* 48:299-305.

Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S (2003). Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* (1):CD002278.

Marsh PD (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 149:279-294

Marsh PD (2006). Dental Plaque as a biofilm and microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health* 6(Suppl1):S14.

Mendoza C (2007). El dilema ético de la fluoración del agua potable. *Revista Médica Chile* 135:1487-1493.

MINSAL (2003). Encuesta Nacional de Salud (ENS), Chile. URL: <http://web.minsal.cl/portal/url/item/7dc33df0bb34ec58e04001011e011c36.pdf> (13/09/2017).

Moncada G, Urzúa I (2008). *Cariología Clínica: Bases Preventivas y Restauradoras*. 1era ed. Santiago, Chile.

OMS (2012). Nota Afirmativa N°318. Salud Bucodental. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/> (13/09/2017).

Ordinola-Zapata R, Martins JN, Bramante CM, Villas-Boas MH, Duarte MH, Versiani MA, *et al.* (2017). Morphological evaluation of maxillary second molars with fused roots: A micro-CT study. *International Endodontic Journal*. 50: 1192-2000.

Ortiz FG, Jimeno EB (2018). Analysis of the porosity of endodontic sealers through micro-computed tomography: A systematic review. *Journal of Conservative Dentistry* 21(3): 238-242.

Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedy G, Cury JA (2006). The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation – new insight. *J Dent Res* 85(10):878-887.

Pham V, Truong V, Quinn M, Notley S (2015). Graphene Induces Formation of Pores That Kill Spherical and Rod-Shaped Bacteria. *American Chemical Society* 9(8): 8458-8467.

Petersen PE (2008). World Health Organization global policy for improvement of oral health – World Oral Health Assembly 2007. *International Dental Journal* 58:115-121.

Salehzadeh EK, Mazaheri R, Pischevar L (2015). Effects of Treatment with Various Remineralizing Agents on the Microhardness of Demineralized Enamel Surface. *J Dent Res Dent Clin Prospects* 9(4):239-245.

Santos AP, Oliveira BH, Nadanovsky P (2013). Effects of low and standard fluoride toothpastes on caries and fluorosis: systematic review and meta-analysis. *Caries Res* 47(5):382-390.

Saravia ME, Nelson-Filho P, Yoko Ito I, Assed Bezerra da Silva L, Assed Bezerra da Silva R, Claes-Göran E (2011). *Microbiological Research* 166:63-67.

Seeman R, Bizhang M, Klück I, Loth J, Roulet J (2005). A novel in vitro microbial based model for studying caries formation – Development and initial testing. *Caries Res* 39(3):185-190.

Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB (2007). Dental Caries. *Lancet* 369:51-59.

Shao HJ, Demuth DR (2010). Quorum sensing regulation of biofilm growth and gene expression by oral bacteria and periodontal pathogens. *Periodontology 2000* 52:53-67.

Shahmoradi M, Hunter N, Swain M (2017). Efficacy of Fluoride Varnishes with Added Calcium Phosphate in Protection of the Structural and Mechanical Properties of enamel. *Biomed Res Int* 2017:7834905.

Singhal A, Grande JC, Zhou Z (2013). Micro/Nano CT for visualization of internal structures. *Microscopy Today* 21(02):16–22.

Siqueira WL, Custodio W, McDonald EE (2012). New Insights into the Compositions and Functions of the Acquired Enamel Pellicle. *J Dent Res* 91(12):1110-1118.

Sissons CH (1997). Artificial Dental Plaque Biofilm Model Systems. *Adv Dent Res* 11(1):110-126.

Soto L, Tapia R, Jara G *et al.* (2007). Diagnóstico Nacional de Salud Bucal del Adolescente de 12 años y Evaluación del Grado de Cumplimiento de los Objetivos Sanitarios de Salud Bucal 2000-2010. Chile

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 Cate AR (2008). Oral Histology. Development, Structure and Function. 7th ed. The C.V. Mosby Inc. Elsevier Inc. USA.

ten Cate JM (2012). Novel Anticaries and Remineralizing Agents: Prospects for the Future. *Journal of Dental Research* 91:813-815.

ten Cate JM (2013). Contemporary perspective on the use of fluoride products in caries prevention. *Br Dent J* 214:161-167.

Thomas RZ, Ruben JL, de Vries J, ten Bosch JJ, Huysmans MCDNJM (2006). Transversal Wavelength-Independent Microradiography, a Method for Monitoring Caries Lesions over Time, Validated with Transversal Microradiography. *Caries Res* 40:281-291.

Twetman S, Axelsson S, Dahlgren H, Holm AK, Kallestal C, Lagerlof F, *et al.* (2003). Caries-preventive effect of fluoride toothpaste: a systematic review. *Acta Odontol Scand* 61(6):347-55.

Vacca Smith AM, Bowen WH (2000). In situ studies of pellicle formation on hydroxyapatite discs. *Arch Oral Biol* 45:277-291.

Vale GC, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, ten Cate JM, Cury JA. APF and dentifrice effect on root dentin demineralization and biofilm (2011). *J Dent Res* 90(1):77-81.

Vecitis CD, Zodrow KR, Kang S, Elimelech M (2010). Electronic-Structure-Dependent Bacterial Cytotoxicity of Single-Walled Carbon Nanotubes. *ACS Nano* 4(9):5471-5479.

Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VC, Shi X (2010). Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev* (1):CD007868.

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

Wright CJ, Burns LH, Jack AA, Back CR, Dutton LC, Nobbs AH *et al.* (2013). Microbial interactions in building of communities. *Molecular Oral Microbiology* 28:83-101.

Yee R, Sheiman A (2002). The burden of restorative dental treatment for children in third world countries. *International Dental Journal* 52:1-9.

XI. ANEXO 1: Consentimiento Informado



Edición del CI 01/08/2018

Consentimiento Informado Para Participación en Proyecto de Investigación Dirigido a Adultos

Título del Protocolo: "Efecto remineralizante de distintas concentraciones de un agente a base de flúor y grafeno en bloques de esmalte desmineralizado".

Investigador Principal: Dr. Mario Díaz Dosque
Instituto de investigaciones en ciencias odontológicas
Fono: +56 9 98249695 E-mail: mrdiaz@uchile.cl

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

Nombre del Participante:

.....

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

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted).
- Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar).

Ud. recibirá una copia completa del Documento de Consentimiento Informado.

Mi nombre es Mario Díaz Dosque y soy académico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación cuyo objetivo es comparar la dureza superficial en especímenes de esmalte desmineralizado y sometidos a un protocolo de remineralización con un agente en base a flúor y grafeno a distintas concentraciones.

Le proporcionaré información y lo(s) invitaré a ser parte de este proyecto. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. Antes de tomar su decisión puede hablar acerca de la investigación con cualquier persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude aclarar sus dudas al respecto.

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



Información

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

Aclaraciones

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



Carta de Consentimiento Informado

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

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

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

Nombre del Paciente: _____

Firma: _____

Fecha: _____

Sección a llenar por el Investigador Principal

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

Nombre del Investigador Principal: _____

Firma: _____

Fecha: _____

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

Firma: _____

Fecha: _____



ANEXO 2: Acta de aprobación de protocolo de investigación



Ed-19 de octubre 2016

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

INFORME 2016/15

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

Dr. Eduardo Fernández
Presidente CEC

Srta. Paulina Navarrete
Secretaria CEC

Dr. Marco Comejo
Vice Pdte. CEC

Dra. Weronika Well
Miembro permanente CEC

Dr. Mauricio Baeza
Miembro permanente CEC

Sr. Roberto La Rosa
Miembro permanente CEC

Dr. Alfredo Molina
Miembro Alterno CEC

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

8.- Fundamentación de la aprobación

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

Ed-19 de octubre 2016

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

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, ha aprobado el Protocolo del estudio titulado "Efecto remineralizante de distintas concentraciones de un agente a base de flúor y grafeno en bloques de esmalte desmineralizado"SM Halley 2015.



Dr. Eduardo Fernández G.
Presidente CEC



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