

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE ODONTOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FISICAS Y QUIMICAS  
AREA DE BIOESTRUCTURA**

**ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LESIONES DE MANCHA BLANCA  
PRODUCIDAS *IN VITRO***

**Jorge Rafael González Soto  
Álvaro Eduardo Muñoz Schiemann**

**TRABAJO DE INVESTIGACION  
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL  
Prof. Dr. Alejandro Esteban Oyarzún Droguett**

**TUTOR ASOCIADO  
Dra. Paulina San Pedro Bravo**

**Santiago-Chile  
2005**

*A nuestros queridos padres, por su incondicional apoyo y cariño. Sin ellos nada de esto hubiese sido posible.*

*A Claudia Díaz, Claudia Letelier y Claudia Norambuena, por su amistad, apoyo y por los imborrables momentos vividos durante los años de esta carrera.*

*A Macarena y Paula por los gratos momentos que compartimos.*

*A Carmen Paz por alegrar nuestra estadía en el laboratorio.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Prof. Dr. Alejandro Oyarzún Droguett por su amistad, confianza, formación y por transmitirnos conocimientos y experiencia tanto durante la carrera como en la realización de este trabajo.

A la Dra. Paulina San Pedro B. por su colaboración, apoyo y buena disposición en la realización de este estudio.

Al Prof. Ismael Yévenes por su colaboración, apoyo y buena disposición en la realización de este estudio.

Al Sr. Juan Méndez por su ayuda, preocupación, amistad y alegría durante la realización del presente estudio.

Al Sr. Ricardo Díaz por su colaboración en la captación de imágenes de MEB.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
HIPÓTESIS.....	13
OBJETIVO GENERAL .....	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
MATERIAL Y MÉTODO .....	14
RESULTADOS.....	22
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES .....	51
RESUMEN.....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

## INTRODUCCIÓN

La caries dental es considerada, comúnmente, como una enfermedad infecciosa que causa la destrucción localizada de los tejidos dentales mineralizados, provocada por los ácidos bacterianos de la placa microbiana, o biofilm, adherida al diente <sup>(1)</sup> .

Los ácidos producidos por las bacterias del biofilm, principalmente, son los ácidos acético, propiónico y fórmico que son capaces de disolver la hidroxiapatita del esmalte dental <sup>(2)</sup> .

El proceso carioso es iniciado por una disolución del esmalte, seguido por la precipitación en la capa superficial de los minerales menos solubles <sup>(3)</sup> . Junto con esto, algunos ácidos difunden hacia el interior del esmalte, disociándose en protones, resultando en la disolución del esmalte subsuperficial, liberándose calcio y fosfato, los cuales pueden difundir fuera del diente <sup>(2,3,4,5)</sup> .

Esta caries incipiente de esmalte, es posible observarla clínicamente y se conoce comúnmente como lesión de mancha blanca <sup>(2,6)</sup> . Ésta aparece blanca debido a que la pérdida de mineral cambia el índice refractario de la luz en

comparación con el esmalte sano<sup>(2)</sup>. Su principal característica es que el mayor grado de desmineralización ocurre a nivel subsuperficial y la zona superficial aparece relativamente intacta, ya que es regenerada constantemente por un fenómeno de remineralización, donde los iones calcio y fosfato, liberados por la disolución subsuperficial, reprecipitan en el esmalte superficial<sup>(2,3,5,6,7,8)</sup>.

Histológicamente, mediante microscopía de luz polarizada, es posible distinguir diferentes zonas en la lesión de mancha blanca dependiendo del medio de imbibición utilizado<sup>(9,10)</sup>. Desde la porción más profunda hacia la superficie, estas zonas son clasificadas como:

- Zona translúcida.
- Zona oscura.
- Cuerpo de la lesión.
- Zona superficial<sup>(10)</sup>.

Usando quinolina como medio de imbibición, es posible identificar la zona translúcida y la zona oscura en el frente de avance de la lesión. Cuando el fluido de imbibición es cambiado a agua, se pueden identificar las otras dos zonas histológicas de la caries incipiente de esmalte: la zona superficial y el cuerpo de la lesión<sup>(5,8,10,11)</sup>. Al observar bajo microscopía de luz polarizada,

utilizando agua, la porosidad de la zona subsuperficial de una lesión de mancha blanca, presenta una birrefringencia positiva, mientras que la zona superficial mantiene su birrefringencia negativa, semejante al esmalte sano <sup>(5,7,8)</sup>.

La zona translúcida es la primera capa que se distingue en la caries del esmalte, se encuentra en el frente de avance de la lesión <sup>(8,10)</sup>. La apariencia translúcida es consecuencia de los espacios o poros, creados en el esmalte durante las primeras etapas de la caries que se localizan principalmente, en la unión de los prismas <sup>(8)</sup>. Estos poros permiten la entrada de la quinolina, medio de imbibición, que presenta un índice de refracción igual al esmalte, viéndose como una zona menos estructurada, al ser observada por microscopía de luz polarizada <sup>(8)</sup>.

La zona oscura se encuentra localizada entre la zona translúcida y el cuerpo de la lesión <sup>(8,10)</sup>. Denominada de esta forma por el hecho de que aparece de un color café oscuro, al ser examinada por luz polarizada, embebida en quinolina <sup>(8)</sup>. Lo anterior, indica que la quinolina es incapaz de penetrar en todos los microporos de esta zona <sup>(8)</sup>.

El cuerpo de la lesión es la tercera zona de la caries de esmalte y es la mayor parte de ésta<sup>(8)</sup>. Se encuentra ubicada entre la zona oscura y la superficial<sup>(8,10)</sup>. Presenta una porosidad mínima de 5%, pero en el centro es de un 25%<sup>(5,8)</sup>. Se observa de mejor manera, cuando es examinada en agua, presentando una birrefringencia positiva<sup>(5,7,8)</sup>.

La zona superficial es la región más externa de la caries de esmalte, presenta una superficie relativamente intacta, siendo esto una característica importante en la lesión de mancha blanca<sup>(8,10)</sup>. Su porosidad es 1 a 2%, siendo muy cercana al esmalte sano<sup>(5,8,12)</sup>.

La zona oscura y la superficial se forman como resultado de un fenómeno de remineralización, en cambio, la zona translúcida y el cuerpo de la lesión son producto de desmineralización<sup>(10,13)</sup>.

La lesión de caries, debido a su porosidad aumentada, contiene material orgánico que se va acumulando con el tiempo<sup>(14)</sup>. Este material orgánico corresponde principalmente a proteínas exógenas, provenientes de la saliva<sup>(9,14)</sup>.

Sin embargo, la permeabilidad de la lesión de mancha blanca y su relación con la presencia de proteínas salivales, en caries de esmalte, ha sido poco investigada<sup>(9)</sup>. Recientemente, Shore y cols. estudiando lesiones de mancha blanca naturales evidenciaron, debido a la permeabilidad de la capa superficial, la presencia de mayor concentración de proteínas salivales, principalmente amilasa y albúmina, en aquellas zonas con un volumen de poro de 10 a 20%<sup>(9)</sup>.

No obstante, la porosidad de la zona superficial se puede encontrar ocluida parcialmente con proteínas, lo que podría reducir la entrada de iones minerales al interior de la lesión, disminuyendo la remineralización con la consecuente falla en la reparación del esmalte<sup>(9,15)</sup>.

Debido a lo anterior y en un intento por detener la progresión de la lesión de mancha blanca, se han realizado diversas modalidades terapéuticas, entre otras está el uso de flúor, el aumento local de la concentración de mineral, elevación del pH<sup>(16)</sup> y la eliminación de las proteínas presentes en los poros de la zona superficial, de tal manera de permitir la penetración iónica<sup>(15)</sup>. Por otra parte, Robinson y cols. proponen un tratamiento de operatoria no invasiva, utilizando agentes adhesivos y de enlace (polímeros de metacrilato), previo

grabado ácido, para infiltrar lesiones de mancha blanca *in vitro*, midiendo cuantitativamente la extensión de la penetración y la oclusión de la porosidad de la lesión<sup>(16)</sup>.

### **Métodos *in vitro* para la generación de caries de esmalte**

Para investigar la naturaleza multifactorial de la caries, su histopatología y su prevención, se han desarrollado diversos modelos de laboratorio<sup>(17)</sup>. Dentro de éstos se encuentran una variedad de procedimientos que han sido realizados en un esfuerzo por reproducir la lesión de caries en esmalte dental humano<sup>(11)</sup>, con el objetivo de utilizarlas en el estudio de los fenómenos de desmineralización y remineralización<sup>(18)</sup>, así como también, para obtener información de los mecanismos responsables de la formación de una lesión subsuperficial subyacente a una zona superficial relativamente intacta<sup>(19)</sup>. Estas lesiones generadas *in vitro*, se utilizan frecuentemente y de preferencia a las naturales; debido a que pueden ser creadas con características predeterminadas, permiten tener adecuados controles y hacen posible el estudio indirecto de la estructura del tejido, cuando se las observa en un medio de imbibición con microscopía de luz polarizada<sup>(10)</sup>. De hecho, el conocimiento actual acerca del mecanismo de desarrollo de la caries, efectos del fluoruro y

medidas preventivas se deben, principalmente, a los estudios realizados en lesiones artificiales<sup>(3)</sup>.

Todos los métodos *in vitro* de obtención de lesiones artificiales derivan de 2 sistemas básicos: 1) Cultivos microbiológicos y 2) Técnicas químicas<sup>(11)</sup>, siendo una característica común de estos sistemas que el propósito primario de ellos, es la formación de una lesión subsuperficial subyacente a una zona superficial relativamente bien mineralizada<sup>(20)</sup>.

### 1) Cultivos microbiológicos:

- **Incubación con placa natural:** El sistema realizado por Zahradnik y cols.<sup>(21)</sup> consiste en suspender los especímenes en cultivos de *Streptococcus mutans*, en condiciones anaeróbicas a 37° C, por períodos de 3 a 14 días. Ellos reportan la presencia de una lesión subsuperficial, pero la técnica microrradiográfica usada para examinar estas lesiones no es sensible al ser comparada con la microscopía de luz polarizada<sup>(22)</sup>.

Dummer y cols.<sup>(23)</sup> produjeron lesiones subsuperficiales *in vitro*, utilizando *S. Mutans* NCTC 10832 en un sistema de cultivo secuencial. También se han producido lesiones artificiales con *Streptococcus mutans* FA 1,

cultivados aeróbicamente en tioglicolato con 3,5% p/v de dextrosa y 2% p/v de gelatina, a 37° C durante 6 semanas<sup>(17)</sup>. En ambos sistemas observaron con microscopio de luz polarizada, después de la imbibición en agua, que las lesiones de esmalte tenían una zona superficial con birrefringencia negativa y un cuerpo de la lesión positivamente birrefringente<sup>(13,17)</sup>.

## 2) Técnicas químicas:

- **Sistema inhibidor difosfonato:** Consiste en la inmersión de segmentos dentarios en una solución buffer a 37° C. Las soluciones empleadas contienen ácido láctico entre 0,1 a 0,5 M, más difosfonato entre 0,02 a 0,5 mM, utilizado como inhibidor de la disolución de la superficie del esmalte. El pH fue ajustado a 4,0; 4,5 y 5,0; siendo el tiempo de exposición de 12 horas a 30 días. La muestra evaluada con microscopio óptico, microscopio electrónico de barrido y microrradiografía, mostró que todos los especímenes tenían una zona superficial intacta y una alta desmineralización en la zona del cuerpo de la lesión<sup>(24)</sup>. No obstante, se demostró posteriormente que en estas lesiones no se observa una zona superficial, después de la imbibición en agua, al ser examinadas con microscopio de luz polarizada; a pesar de observarse con microrradiografía una zona superficial radiopaca suprayacente a un cuerpo de la lesión radiolúcido<sup>(22)</sup>.

- **Sistemas de geles acidificados:** Esta técnica desarrollada por Silverstone<sup>(5)</sup>, suspende dientes en un gel de gelatina en concentraciones variables (2, 5, 10, 15, 20%), acidificado con ácidos orgánicos (ácido láctico, fórmico, acético, cítrico o succínico), ajustando pH entre 3,5 a 5,5 y con un período de exposición de 1 a 104 semanas.

Una modificación de esta técnica permite obtener lesiones artificiales, en secciones dentarias longitudinales de 80 a 100  $\mu\text{m}$  de espesor, cuando son expuestas por un período de 6 a 10 semanas a un gel de gelatina al 17%, acidificado con ácido láctico a pH 4,3 con 0,5 g /L de hidroxiapatita sintética<sup>(10)</sup>. Las lesiones generadas mediante estos métodos fueron indistinguibles de las lesiones naturales de mancha blanca al ser examinadas con microrradiografía y con microscopio de luz polarizada<sup>(5,10)</sup>.

Estudios posteriores concuerdan con estos resultados y afirman que el sistema gel de gelatina produce lesiones con las 4 zonas clásicas definidas por la luz polarizada<sup>(22)</sup>, explicando que la presencia de fluoruro en la gelatina es responsable de la preservación de la zona superficial, interfiriendo con el proceso desmineralizante<sup>(22)</sup>. Sin embargo, otros estudios consideran que la

alta impureza mineral de la gelatina puede interferir con el proceso de formación de la lesión artificial produciendo su detención<sup>(18)</sup>.

Otro método descrito para la preparación de lesiones artificiales de caries de esmalte, utiliza una columna de gel de metilcelulosa al 6% que enlentece el ataque de ácido láctico sobre la superficie del esmalte. A la observación con luz polarizada, se evidenciaron 3 de las 4 zonas histológicas clásicas presentes en una lesión de mancha blanca<sup>(11)</sup>.

- **Sistemas buffer:** El desarrollo de lesiones artificiales mediante esta técnica, consiste en sumergir dientes durante 72 horas en una solución buffer lactato a 0,1 M a 25° C. El buffer tiene el 50% de las concentraciones de calcio y fósforo necesarias para la saturación de la solución, con respecto al esmalte dental. La desmineralización subsuperficial obtenida, se mostró a través de microrradiografía<sup>(19)</sup>. Sin embargo, cuando fueron examinadas con luz polarizada no fue posible distinguir una zona superficial<sup>(22)</sup>.

- **Sistemas de ciclaje de pH:** Modelo descrito originalmente por Featherstone y cols.<sup>(25)</sup>, ha sido modificado en diversos experimentos con el

objetivo de preservar la zona superficial del esmalte durante la producción de lesiones artificiales<sup>(3,18,26)</sup> .

Estudios recientes han generado caries artificiales a través de este sistema modificado de ciclaje de pH, con el propósito de estudiar el efecto del fluoruro en la desmineralización del esmalte, evaluando sus resultados a través de la medición de la microdureza superficial y por microscopía de luz polarizada<sup>(3)</sup> , en donde no se aprecia la zona superficial característica de una lesión de mancha blanca natural como se describe clásicamente<sup>(10,11)</sup> .

Para evaluar el efecto remineralizante del xilitol en esmalte desmineralizado, Miake y cols. utilizaron caries artificiales generadas por una solución buffer acetato seguida por una solución remineralizante, evaluando sus resultados a través de microrradiografías y microscopía electrónica de transmisión<sup>(26)</sup> . Sin embargo, no existe una descripción histológica de las lesiones generadas con esta técnica, que permitan comparar los resultados obtenidos con lesiones naturales de caries de esmalte.

Considerando los antecedentes expuestos, ninguno de estos autores entrega datos suficientes que permitan asumir que esas lesiones artificiales son

histológicamente equivalentes a una lesión natural de caries, situación que es importante debido a que el examen histológico constituye el “gold standard” para el diagnóstico de caries. Dado lo anterior, sería importante conocer si estos modelos *in vitro*, utilizados para la generación de caries en el esmalte, producen lesiones que al menos morfológicamente sean semejantes a una lesión de mancha blanca natural.

## **HIPÓTESIS**

- Lesiones cariosas del esmalte dental generadas *in vitro* no son morfológicamente equivalentes a una lesión de mancha blanca natural.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar que lesiones cariosas del esmalte dental generadas *in vitro* no son morfológicamente equivalentes a una lesión de mancha blanca natural.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Observar las características morfológicas de lesiones de mancha blanca generadas *in vitro*.
- Visualizar, a través de la penetración de agentes adhesivos, la permeabilidad de lesiones de mancha blanca generadas *in vitro*.
- Detectar la incorporación de proteínas salivales en la lesión de mancha blanca generada *in vitro*.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **1. Obtención de la muestra**

Para este estudio, se utilizaron 15 premolares erupcionados, clínicamente sanos, extraídos en la clínica de cirugía de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile por indicación ortodóncica. Los especímenes fueron divididos en 3 grupos, de 5 dientes y almacenados en suero fisiológico durante el período de recolección.

### **2. Procesamiento de los especímenes**

Cada premolar fue lavado con un cepillo suave y abundante suero para remover placa bacteriana, sangre y tejido remanente adherido a la superficie.

Luego cada espécimen fue cortado transversalmente a nivel del límite amelocementario con un disco de carborundum montado sobre una pieza de mano convencional, descartándose la raíz. Las coronas obtenidas fueron depulpadas, utilizando una fresa redonda de carbide de alta velocidad bajo refrigeración constante. Posteriormente, cada corona fue seccionada en 4 segmentos, correspondientes a las caras vestibular, lingual, mesial y distal, con

una piedra de diamante de alta velocidad en forma de llama, obteniéndose 60 segmentos dentarios de la muestra seleccionada.

Cada bloque fue recubierto y protegido en toda su superficie con 2 capas de barniz de uñas ácido-resistente (Artmatic Cosmetics, Brooklyn, New York, USA), dejando despejada un área central de 4mm<sup>2</sup> de esmalte sano<sup>(3,5,7)</sup>.

### **3. Generación de caries *in vitro***

La generación artificial de caries de esmalte se realizó de acuerdo a la técnica de Miake y cols. modificada, que consiste en la exposición de la muestra a soluciones desmineralizantes y remineralizantes en forma secuencial<sup>(26)</sup>.

Para este propósito, se preparó como solución desmineralizante, 1000 ml de solución buffer acetato al 0,01 M, ajustando a pH 4 con ácido clorhídrico y como solución remineralizante, 1000 ml de solución compuesta por CaCl<sub>2</sub> 0,1 M; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01 M; NaF 0,005 M y NaCl 2,0 M, ajustando a pH 7,3 con KOH 50 mM.

Los bloques de cada diente fueron sumergidos en 100 ml de solución buffer, a pH 4 por un período total de 3 días a 50° C. La solución desmineralizante utilizada fue renovada diariamente. Transcurridos los 3 días, cada bloque fue lavado con agua destilada y secado suavemente con papel absorbente.

De los 4 segmentos desmineralizados de cada premolar, se eligió uno de control; quedando los otros 3 como especímenes experimentales.

A continuación, los especímenes experimentales se sumergieron en la solución remineralizante por un período de 2 semanas a 37° C, renovando la solución cada dos días. Al término de las 2 semanas los bloques fueron lavados con agua destilada y secados con papel absorbente. De este modo, al término del proceso se obtuvieron 3 bloques desmineralizados-remineralizados (lesión artificial) y un bloque desmineralizado de cada premolar (control). Como control negativo se utilizó el esmalte de cada especimen cubierto por el barniz.

#### **4. Análisis estructural de la superficie de los especímenes**

##### **a. Examen clínico de los especímenes**

Con el objeto de obtener un registro clínico de las lesiones, se seleccionaron especímenes experimentales y controles correspondientes al primer grupo de 5 premolares. Éstos se sumergieron durante 3 horas en acetona para eliminar completamente el barniz protector de su superficie, con el objetivo de exponer el esmalte sano adyacente a la lesión artificial. Se reemplazó la acetona por solución fresca cada una hora. Una vez eliminado el barniz, los bloques fueron lavados profusamente con agua destilada y secados a 37° C. Tanto estos especímenes como una lesión de mancha blanca natural (control positivo), fueron observados en un microscopio estereoscópico (Lieder, Germany) y las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Sony DSC-W5 (Sony, Tokyo, Japan) y archivadas en formato JPEG.

##### **b. Microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Sombreado metálico de los especímenes

Posteriormente, los mismos especímenes anteriores fueron sombreados con una capa de oro utilizando un Polaron Equipment, SEM Coating Unit-5000 (Polaron plc, Watford, England), a un vacío de 0,2 torr y con 9 mA durante 7 minutos.

Los especímenes se observaron utilizando un Digital Scanning Microscope DSM 940 Zeiss (Carl Zeiss, Germany).

## **5. Procesamiento histológico y observación microscópica**

Los restantes especímenes del primer grupo, además de un control positivo, fueron incluidos en polimetilmetacrilato transparente (Acrílicos Dentales Marche, Chile). Se realizaron cortes transversales seriados utilizando un disco de diamante refrigerado con agua destilada ISOMET 1000 (Buehler, USA), obteniendo de esta manera secciones de 1 mm de grosor, las que fueron adheridas en portaobjetos. Posteriormente, éstas fueron desgastadas para lograr resolución histológica, utilizando papel abrasivo grado 600 y luego pulidas con papel abrasivo grado 800 (Matador Wasserfest, Germany), hasta obtener un espesor aproximado de 100  $\mu\text{m}$ .

Luego, los segmentos se observaron con microscopio óptico de campo claro (Leica, Wetzlar, Germany) y posteriormente fueron embebidos en agua destilada durante 48 horas para ser examinados utilizando un microscopio de luz transmitida, equipado con filtros de epipolarización (Leica, Wetzlar, Germany).

Las imágenes de los cortes histológicos se capturaron con una cámara de video Sony DXC-390 3 CCD (Sony, Tokyo, Japan) conectada a una tarjeta digitalizadora Data Translation DT 3154 (Marlboro, MA., USA). Las imágenes obtenidas fueron archivadas en formato JPEG.

## **6. Evaluación de la permeabilidad de las lesiones artificiales**

### **a. Infiltración de adhesivos dentales**

Para la realización de esta técnica, se utilizaron los segmentos desmineralizados y los especímenes con lesiones artificiales del segundo grupo de 5 premolares, así como también, se realizó sobre una lesión de mancha blanca natural (control positivo).

Antes de la aplicación del adhesivo, se lavó la superficie de todos los bloques con agua destilada durante un minuto y luego fueron secados con aire.

Se ejecutó la técnica adhesiva, utilizando el sistema Single Bond (3M Dental Products, St. Paul, Mn., USA) sin grabado ácido previo. El adhesivo fue marcado con rodamina B (1 mg/ml).

Se aplicaron 2 capas de adhesivo en cada bloque y se fotopolimerizó utilizando una lámpara de polimerización 3M 2500 (3M Dental Products, St. Paul, Mn., USA) durante un minuto, a una distancia de 5 mm de cada bloque.

#### **b. Infiltración de proteínas salivales**

Se recolectaron 30 ml de saliva estimulada mediante masticación de una pastilla de parafina. Se colocó 1,5 ml de esta saliva en 20 tubos Eppendorf, los que fueron centrifugados a 6000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Hermle Z-160 M (Hermle, Wehingen, Germany), luego se recuperó el sobrenadante y se depositó en 20 nuevos tubos Eppendorf, a los que se les agregó azida de sodio para prevenir proliferación microbiana.

Se tomaron los bloques desmineralizados y con lesiones artificiales del tercer grupo de 5 premolares, siendo cada uno de ellos depositado en un tubo Eppendorf con saliva, debidamente rotulado y se dejaron en la estufa a 37° C. Los segmentos correspondientes a cada premolar se sacaron de incubación a las 48 horas. Terminado este período, se lavaron con agua destilada y se secaron suavemente con papel absorbente, para luego ser fijadas en una solución de formaldehído al 10% en etanol absoluto durante 24 horas. Igual

procedimiento se realizó sobre un espécimen con lesión de mancha blanca natural.

Tanto los especímenes infiltrados con adhesivos dentales (segundo grupo), como los infiltrados con proteínas salivales (tercer grupo), fueron incluidos en polimetilmetacrilato y procesados para la observación histológica de la misma forma utilizada para el primer grupo de premolares y que fue anteriormente descrita.

Los especímenes infiltrados con adhesivo fueron observados en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioscop (Carl Zeiss, Germany) y fotografiados utilizando una película de diapositivas Kodak Elite Chrome Extracolor 100 ASA (Kodak Corporation, USA).

Por otra parte, los especímenes incubados en saliva fueron teñidos con azul de toluidina al 0,5% durante 60 minutos y observados en microscopio óptico convencional (Leica, Wetzlar, Germany). Las imágenes de las observaciones de los cortes fueron capturadas de la misma forma utilizada con los especímenes observados con luz polarizada.

## **RESULTADOS**

### **ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA SUPERFICIE DE LOS ESPECÍMENES**

#### **Examen clínico de los especímenes**

La zona de esmalte expuesta de los especímenes control (desmineralizados) y experimentales (lesión artificial) se observa de un color blanco, opaco, de aspecto tizoso, con una pérdida evidente de translucidez, a diferencia del control negativo, que mantiene intacta las características del esmalte sano.

En la zona expuesta del espécimen control, es posible observar en forma intacta el patrón superficial de periquematíes (lámina 1, fig. 1).

El esmalte no aislado del espécimen experimental, se observa como una superficie con un sobrerrelieve irregular, de aspecto grueso, costroso y áspero (lámina 2, fig. 1), a diferencia de la superficie regular y relativamente lisa que muestra la lesión de mancha blanca natural (control positivo) (lámina 2, fig. 2).

### **Examen con microscopio electrónico de barrido**

En los especímenes control es posible observar con bajos aumentos, en la zona no protegida por el barniz, la mantención del patrón periquematítico característico del esmalte (lámina 1, fig. 2). También es posible advertir la presencia de microperforaciones, irregularmente distribuidas, de forma y tamaño variable (lámina 1, fig. 3). Con mayores aumentos, se puede distinguir el patrón prismático del esmalte, una superficie granular y se puede observar a través de las microperforaciones la presencia de esmalte subyacente igualmente poroso (lámina 1, fig. 4).

En los especímenes experimentales es posible observar, en la zona no protegida por el barniz, la mantención de un patrón de periquematíes similar al del control negativo, en donde no se observan poros (lámina 2, fig. 3). Con mayor aumento se observa la superficie de aspecto filamentoso (lámina 2, fig. 4).

## **ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LOS ESPECÍMENES**

### **Examen con microscopio óptico de campo claro**

En todos los especímenes es posible observar, en la zona de esmalte no aislada, la producción de una lesión de profundidad variable.

En los segmentos controles, se observa que la lesión es de forma aproximadamente rectangular con un frente de avance relativamente paralelo a la zona externa del esmalte (lámina 3, fig. 1). Con altos aumentos es posible observar, en el interior de las lesiones, la conservación del patrón prismático característico del esmalte dentario (lámina 3, fig. 2).

En los segmentos experimentales es posible observar que la lesión presenta una forma regular, aproximadamente rectangular con frentes de avance paralelos a la superficie externa del esmalte (lámina 4, fig. 1 y 3), lo que difiere del frente de avance irregular y de aspecto relativamente cónico que presenta la lesión de mancha blanca natural. En las secciones experimentales se puede observar además, con mayor aumento, la presencia de una zona superficial de morfología y espesor irregular, de límites inespecíficos y

variables, en donde los prismas del esmalte son difícilmente distinguibles (lámina 4, fig. 1, lámina 5, fig. 2).

### **Examen con microscopio de luz polarizada**

Las mismas secciones anteriores, observadas con microscopio de luz polarizada posterior a la imbibición en agua, muestran que los segmentos controles presentan un área con birrefringencia positiva en la región no aislada (lámina 3, fig. 3). En ninguno de estos especímenes se observa una zona superficial negativamente birrefringente.

El examen de las secciones experimentales reveló que la formación de una zona superficial negativamente birrefringente es infrecuente (lámina 4, fig. 4), en la mayoría de los casos no se observa dicha zona. La zona superficial detectada en estas lesiones con microscopio de campo claro (anteriormente descrito), aparecen con birrefringencia positiva al ser observadas con luz polarizada (lámina 4, fig. 2). Subyacente a esto se puede identificar, en la región subsuperficial, el cuerpo de la lesión como un área con birrefringencia positiva.

En el control positivo fue posible observar dos de las cuatro zonas histológicas clásicas. Se identificó el cuerpo de la lesión como un área

positivamente birrefringente subyacente a una zona superficial bien definida con birrefringencia negativa.

## **EVALUACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE LAS LESIONES ARTIFICIALES**

### **Infiltración de adhesivos dentales**

El cuerpo de la lesión artificial de todos los especímenes (controles y experimentales) es infiltrado por el adhesivo.

En los segmentos controles el adhesivo penetra completamente y de manera uniforme hasta el frente de desmineralización (lámina 3, fig. 4).

En los segmentos experimentales el adhesivo es detectable en el cuerpo de la lesión, a profundidades variables, no observándose en ninguno de estos especímenes la infiltración total, es decir, la zona superficial pone atajo a la entrada del adhesivo, disminuyéndola, pero no la impide (lámina 5, fig. 1).

En la lesión de mancha blanca natural, la fluorescencia está circunscrita a la zona más externa de la lesión, infiltrando mínimamente el cuerpo de la lesión.

### **Infiltración de proteínas salivales**

Se detectó la presencia de materia orgánica de origen salival en los segmentos controles y experimentales mediante la tinción azul de la zona del cuerpo de la lesión respectiva.

En los segmentos controles existe una tinción homogénea y uniforme en la zona no aislada de esmalte (lámina 3, fig. 5).

En los segmentos experimentales es posible distinguir tinción azul en el cuerpo de la lesión, observándose menos afinidad tintorial en la zona superficial (lámina 5, fig. 2), esta misma apariencia se presenta en el control positivo, en donde existe muy poca o nula tinción de la zona superficial a diferencia de un cuerpo de la lesión intensamente teñido.

**Lámina 1**

### **Leyenda de figuras**

Lámina 1, fig. 1: Especimen control, vista macroscópica de la lesión. Flechas señalan el patrón periquematítico que se mantiene en la zona de desmineralización.

Lámina 1, fig. 2: MEB de especimen control. Nótese la delimitación entre la lesión y el esmalte normal. Existe mantención del patrón periquematítico tanto en la zona afectada por la desmineralización como en el esmalte normal.

Lámina 1, fig. 3: MEB de especimen control. Es posible visualizar con mayores aumentos, los periquematíes de la superficie y los prismas del esmalte. Se observa además sobre la superficie, estructuras granulares difusas y la presencia de poros distribuidos irregularmente, de forma y tamaño variable.

Lámina 1, fig. 4: MEB de especimen control. Con grandes aumentos, es posible detectar una microperforación de la superficie. En el fondo de ésta, se advierte poros de menor tamaño.

**Lámina 2**

### **Leyenda de figuras**

Lámina 2, fig. 1: Vista macroscópica de espécimen experimental. Se observa la lesión como un área blanca de menor translucidez que el esmalte vecino no tratado.

Lámina 2, fig. 2: Vista macroscópica de lesión de mancha blanca natural que presenta superficie lisa, de menor opacidad que el espécimen experimental.

Lámina 2, fig. 3: MEB de espécimen experimental. Nótese la delimitación entre la lesión y el esmalte normal. Existe mantención del patrón periquematítico tanto en la zona afectada por la desmineralización-remineralización como en el esmalte normal.

Lámina 2, fig. 4: MEB de espécimen experimental. Con mayor aumento se observa que la superficie está colonizada por un material fibrilar-granular, irregularmente distribuido. No se detecta la presencia de perforaciones o poros.

**Lámina 3**

### Leyenda de Figuras

Lámina 3, fig. 1: Corte longitudinal de un espécimen control. Flechas señalan la lesión artificial que presenta un frente de avance paralelo a la superficie del esmalte. Barra 250 $\mu$ m.

Lámina 3, fig. 2: Corte longitudinal de espécimen control. Con mayor aumento es posible distinguir la conservación del patrón prismático en el cuerpo de la lesión (recuadro). Barra 100 $\mu$ m.

Lámina 3, fig. 3: Observación con luz polarizada del mismo segmento mostrado en lámina 3, fig. 1. La lesión presenta en toda su superficie una birrefringencia positiva (elipse), en comparación con el esmalte normal el que presenta una birrefringencia negativa (asterisco). Barra: 250 $\mu$ m.

Lámina 3, fig. 4: Corte de espécimen control. Se observa que la lesión se encuentra totalmente infiltrada por el adhesivo, el que se visualiza como un área fluorescente de color amarillo. Barra: 100 $\mu$ m.

Lámina 3, fig. 5: Corte longitudinal de segmento control. Se puede observar en detalle la tinción azul en la zona desmineralizada, que señala la presencia de materia orgánica salival. Barra 100 $\mu$ m.

**Lámina 4**

### **Leyenda de figuras**

Lámina 4, fig. 1: Corte longitudinal de espécimen experimental. Nótese la forma aproximadamente rectangular de la lesión, cuyo frente de avance (flechas) es relativamente paralelo a la superficie del esmalte. Barra 100 $\mu$ m.

Lámina 4, fig. 2: Corte de espécimen experimental observado con luz polarizada. Nótese la birrefringencia positiva de la lesión. Barra 100 $\mu$ m.

Lámina 4, fig. 3: Corte longitudinal de espécimen experimental. Nótese la forma aproximadamente rectangular de la lesión, además se aprecia que el frente de avance (flechas) es relativamente paralelo a la superficie del esmalte. Barra 250 $\mu$ m.

Lámina 4, fig. 4: Corte de espécimen experimental. Observación de una capa superficial (CS) negativamente birrefringente. Barra: 250 $\mu$ m.

**Lámina 5**

### **Leyenda de figuras**

Lámina 5, fig. 1: Corte especimen experimental. Se observa que el adhesivo presenta una intensa fluorescencia de color amarillo-anaranjado. Esta fluorescencia se detecta infiltrando parcialmente el cuerpo de la lesión. Flechas blancas: frente de avance de la lesión, flechas rojas: frente de penetración del adhesivo. Barra: 100 $\mu$ m.

Lámina 5, fig. 2: Corte longitudinal de segmento experimental. Nótese la presencia de tinción azul en la zona más profunda de la lesión. Obsérvese la clara delimitación de la zona superficial (CS) remineralizada respecto de zonas más profundas. CL: cuerpo de la lesión. Barra 100 $\mu$ m.

## DISCUSIÓN

La caries es una de las enfermedades infecciosas más prevalentes en el ser humano, por este motivo, desde ya hace muchos años, se han desarrollado distintos métodos *in vitro* para su estudio, con el objeto de comprender su biopatología y de desarrollar alternativas preventivas y terapéuticas para su tratamiento<sup>(3,4,6,9,11,12,15,17,18,22)</sup>.

Los sistemas más frecuentemente utilizados para la generación de caries artificial corresponden a los métodos químicos, dentro de éstos se encuentra el ciclaje de pH<sup>(3,5,7,11,18,19,22,24,26,27)</sup>.

En el presente estudio se utilizó el ciclaje de pH con el propósito de generar lesiones artificiales para determinar si son morfológicamente equivalentes a una lesión natural de caries. Con este mismo propósito, diversos investigadores han estudiado las lesiones *in vitro* mediante microscopía electrónica de barrido, de luz polarizada o a través de microrradiografías, sin embargo, ninguno de ellos ha considerado todas estos métodos de observación en conjunto<sup>(3,5,7,8,11,19,20,22,24,28,29,30,31)</sup>, así como tampoco han incluido una

evaluación funcional mediante la determinación de la permeabilidad de la capa superficial de las lesiones, como fue considerado en este estudio.

A la inspección clínica, las lesiones artificiales generadas en el presente estudio muestran una pérdida de translucidez que se evidencia como un color blanco-opaco del esmalte que concuerda con el aspecto de lesiones de mancha blanca natural descrito por otros autores<sup>(2,20,32,33)</sup>. Este cambio en la translucidez corresponde a un fenómeno óptico que puede ser explicado por un aumento del tamaño de los espacios intercristalinos, determinando un incremento en la porosidad del tejido, y del cambio del contenido de dichos espacios como consecuencia de lo anterior<sup>(34)</sup>.

Los espacios intercristalinos, en condiciones de normalidad, están llenos por una solución acuosa que posee un índice de refracción de 1,33 considerado cercano al de la hidroxiapatita del esmalte (1,62). Debido a que esta diferencia de refracción es minimizada y compensada por los pequeños espacios que presenta el esmalte sano y bien mineralizado, no se ve afectada su translucidez<sup>(34)</sup>. Por lo tanto, si está aumentada la porosidad y si se sustituye la solución acuosa de los espacios intercristalinos por aire, que posee un índice refractario de 1,0; por ejemplo al secar el diente, se produce un cambio en las

propiedades ópticas del esmalte, perdiendo su translucidez lo que se observa clínicamente como una zona blanca-opaca<sup>(34)</sup>.

Es importante mencionar que en estudios anteriores de generación de caries *in vitro* no consideran el aspecto macroscópico de las lesiones, que nos permitan contrastar nuestros resultados con los de dichos estudios.

El análisis de los especímenes realizado con microscopía electrónica de barrido nos permitió destacar el hecho de que en las lesiones controles y experimentales hubo mantención del patrón periquematítico. Esta observación es concordante con lo encontrado por Holmen y cols. quienes, a través de lesiones de caries generadas utilizando una solución buffer lactato con y sin difosfonato, determinaron la presencia, por medio de microscopía electrónica de barrido, de un marcado patrón de periquematíes<sup>(35)</sup>. Esta misma situación ocurre, según Haikel y cols., en lesiones de mancha blanca natural en donde el patrón de periquematíes es preservado<sup>(36)</sup>.

En nuestro estudio, en la superficie de los periquematíes de las lesiones control se pudo observar el patrón prismático y poros de dimensiones variables, al igual como ocurre en las lesiones de mancha blanca natural<sup>(36)</sup>.

Los poros encontrados en una lesión natural son explicados por Haikel y cols. como un ensanchamiento de la interfase prisma-sustancia interprismática, seguida por la disolución del núcleo del prisma debido al ataque ácido (patrón prismático de destrucción), lo que provee finalmente un acceso a la subsuperficie del esmalte<sup>(36)</sup>. Sin embargo, a pesar de que esta explicación sobre la presencia de poros resultaría parcialmente adecuada para las lesiones naturales, nosotros pensamos que no es aplicable a las lesiones obtenidas en el presente estudio. En modelos *in vitro*, Goldberg y cols. quienes estudiando la zona superficial de lesiones artificiales obtenidas mediante un buffer lactato, describieron microcanales en vez de poros, ya que ellos notaron que no existe relación entre estos microcanales y la dirección de la interfase prisma-sustancia interprismática<sup>(37)</sup>. Haikel y cols. concluyeron que si éstos son hallazgos frecuentes en lesiones producidas *in vitro*, este tipo de lesiones artificiales difieren de las lesiones de caries naturales ya que estas últimas no presentan tales defectos<sup>(36)</sup>.

En las lesiones experimentales del presente estudio, sólo se pudo observar el patrón periquematítico sin distinguir el patrón prismático y la presencia de poros, generando una marcada diferencia estructural con los especímenes control y las lesiones naturales. La mantención del patrón

periquematítico en las lesiones experimentales, podría ser explicado basándonos en la teoría del crecimiento epitaxial, que consiste en la precipitación de una sustancia cristalina de distinta naturaleza la que actúa como sustrato, donde los iones calcio y fosfato presumiblemente son mantenidos mediante fuerzas electrostáticas sobre el nucleador epitáctico<sup>(38)</sup>.

El aspecto filamentososo encontrado en los especímenes experimentales, también fue observado por Holmen y cols. en lesiones artificiales realizadas a través de buffer lactato. Estos autores, señalan que este aspecto se debe a la presencia de un material cristalino irregularmente dispuesto sobre la superficie del esmalte y sugieren que se debe a la reprecipitación de minerales<sup>(35)</sup>. Sin embargo, la naturaleza exacta del tipo de mineral es desconocida.

De acuerdo a lo observado en el análisis estructural y en lo descrito por otros autores<sup>(39)</sup>, podemos afirmar que el esmalte dental sometido a condiciones extremas de bajo pH y alta temperatura, logra resistir parcialmente el ataque ácido conservando su organización estructural.

Haikel y cols., estudiando las superficies de lesiones de caries naturales de esmalte, han descrito la presencia de cuatro características principales: 1)

una superficie aparentemente intacta, 2) presencia de poros relativamente grandes, 3) patrón irregular de destrucción superficial y, 4) patrón prismático de destrucción (aspecto frecuentemente encontrado en lesiones de mancha blanca)<sup>(36)</sup>. En nuestro estudio, los especímenes controles cumplen dos de las cuatro características mencionadas (presencia de poros y patrón de destrucción irregular), en cambio, los especímenes experimentales, que son nuestras lesiones de caries artificiales, sólo cumplen con una característica que es la presencia de una superficie aparentemente intacta. Por lo tanto, nuestras lesiones experimentales, basándonos exclusivamente en el análisis estructural de superficie, **no** son morfológicamente equivalentes a una lesión de mancha blanca natural.

La histopatología de la caries de esmalte ha sido muy estudiada. Diversos investigadores desde mediados del siglo pasado hasta el presente, han descrito las características histológicas de lesiones tempranas de esmalte a través de técnicas microscópicas<sup>(5,40,41,42)</sup>. Dentro de estas técnicas, la más utilizada es la observación por microscopía de luz polarizada, la que ha permitido describir la lesión temprana de caries y las alteraciones en su estructura debido a los procesos de desmineralización y remineralización<sup>(22)</sup>.

Silverstone y cols. observando con microscopía de luz polarizada, describen la presencia de cuatro zonas histológicas características en una lesión de mancha blanca, dependiendo del medio de imbibición utilizado (zona superficial, cuerpo de la lesión, zona oscura y translúcida)<sup>(10)</sup>, siendo un signo histológico patognomónico de la caries temprana de esmalte la presencia de una capa superficial sobre una subsuperficie desmineralizada<sup>(5,8,10)</sup>.

En nuestro estudio se realizó la observación de la muestra través de microscopía de luz polarizada, embebidas en agua, para detectar la presencia de la zona superficial y contrastarlas con la observación de los mismos especímenes a través de microscopía de campo claro.

El espesor variable de la capa superficial, encontrada en las lesiones de los especímenes experimentales del presente estudio, a través de microscopía de campo claro, probablemente depende de la distinta capacidad de resistencia al medio ácido del esmalte de cada espécimen, lo que a la vez se debería a su diferente composición físico-química<sup>(12)</sup>, es decir que mientras más soluble es el esmalte, se genera una porosidad mayor durante el ataque ácido, lo que finalmente permitiría el ingreso de la solución remineralizante a mayor profundidad, generando zonas superficiales de mayor espesor.

Luego de las observaciones realizadas con microscopía de campo claro, podemos asegurar que el patrón prismático nunca se pierde en los especímenes controles y experimentales. El hecho de que no se aprecie superficialmente en las lesiones experimentales, a través microscopía electrónica de barrido, podría deberse a que la reprecipitación iónica genera una superficie amorfa.

A pesar de que en nuestras observaciones de los especímenes experimentales se encuentra una capa superficial de material cristalino amorfo, de grosor variable, mediante la observación por microscopía de luz polarizada fue inconstante la aparición de una zona superficial negativamente birrefringente, hecho que se puede explicar, probablemente, por una disposición cristalina irregular ya que la birrefringencia es un fenómeno óptico que depende de la disposición estructural de los cristales y del espacio existente entre ellos<sup>(43)</sup>. No obstante, para Silverstone y cols. la presencia de una zona superficial negativamente birrefringente es necesaria para poder considerar la lesión como una lesión de caries y no solamente como una simple erosión<sup>(5,8,10)</sup>. De esa perspectiva, las lesiones experimentales generadas en el presente estudio, no cumplen con ese principio básico, por lo que no deberían ser consideradas como caries artificiales. Sin embargo, otros autores no muestran

imágenes de sus lesiones *in vitro* (generadas por ciclaje de pH) con microscopía de luz polarizada, en donde se pueda observar una zona superficial negativamente birrefringente, y aún así, la consideran como caries<sup>(3,26)</sup>.

La capa superficial de una lesión temprana de caries de esmalte, debido a su porosidad, permite el paso de ciertos elementos hacia dentro y fuera de la lesión<sup>(15,36)</sup>. Es así, como diversos autores han encontrado las posibles formas para explicar los fenómenos de desmineralización-rem mineralización, así como también la presencia de sustancias de origen salival, como proteínas, en el cuerpo de la lesión<sup>(9,28)</sup>. La permeabilidad de la capa superficial es una característica importante de considerar al evaluar las lesiones creadas *in vitro*, debido a que nos permite evidenciar el comportamiento de estas lesiones en relación a los especímenes controles y a las lesiones de mancha blanca natural. Esto constituye un aspecto de interés en el presente estudio, ya que diversas investigaciones intentan aclarar los mecanismos íntimos de los procesos de desmineralización-rem mineralización y buscan alternativas para el tratamiento de la caries, utilizando lesiones *in vitro*, que eventualmente podrían no ser equivalentes a una lesión natural<sup>(3,16,26,44)</sup>. Es por esto que en nuestro estudio, además de evaluar la estructura superficial e histológica también se consideró la permeabilidad de las lesiones artificiales.

Al evaluar la permeabilidad de la capa superficial, mediante la infiltración de adhesivo, la penetración de éste en la totalidad de la lesión generada en los especímenes controles, es consecuente con la gran porosidad encontrada mediante microscopía electrónica de barrido. En cambio, nos llama profundamente la atención que pese a que en los especímenes experimentales no fue posible detectar porosidad en su capa superficial, hubo infiltración del adhesivo en la lesión. Este hecho se podría deber a la disposición espacial irregular que presenta el material cristalino depositado en la superficie, el que genera una barrera semipermeable. Esto se diferencia notablemente de la lesión natural (control positivo), en el que el adhesivo infiltra mínimamente, por lo que se podría deducir que la capa superficial de ésta constituye una barrera más eficiente para la penetración de este tipo de biomateriales. Estos resultados no pueden ser contrastados ya que no existe información previa disponible en la literatura odontológica.

De lo expuesto, se podría inferir que la capa superficial de las lesiones artificiales (especímenes experimentales), generadas en este estudio, presenta una porosidad mayor que la existente en las lesiones naturales, que no fue posible detectar mediante microscopía electrónica de barrido. Esto puede tener una significativa implicancia, por ejemplo, en estudios de remineralización,

debido a que la penetración iónica en estas las lesiones artificiales sería más eficiente en comparación a lo que podría ocurrir en las lesiones naturales.

En lesiones de caries se ha demostrado que existe un incremento del contenido orgánico en comparación con el esmalte normal<sup>(45)</sup>. Diversos autores han determinado la presencia de materia orgánica de origen salival, en lesiones de caries de esmalte<sup>(9,28,46)</sup>. En estos estudios, utilizando técnicas de inmunohistoquímica, se detectó la presencia de proteínas salivales como albúmina y amilasa dentro de lesiones de mancha blanca<sup>(9,28)</sup>. Por otro lado, Teranaka y cols., quienes estudiando el contenido proteico de lesiones de caries detenidas, determinaron que existe acumulación de material orgánico en lesiones de caries de esmalte a través del tiempo<sup>(46)</sup>.

En nuestro estudio determinamos la presencia de materia orgánica de origen salival, dentro de las lesiones de los especímenes controles y experimentales, lo que concuerda con lo descrito en la literatura<sup>(9,28,46)</sup>. Además, se observó que la capa superficial de la lesión natural (control positivo) permite el paso de proteínas salivales, al igual como ocurre en las lesiones artificiales generadas en este estudio.

De acuerdo con lo anterior, la prueba de infiltración salival permitiría demostrar que las lesiones controles y experimentales, son permeables a la materia orgánica salival, hecho que también se observa en las lesiones de mancha blanca natural.

## CONCLUSIONES

1. Las lesiones generadas por el sistema de ciclaje de pH, utilizado en este estudio, **no** son morfológicamente equivalentes a una lesión de mancha blanca natural.
2. Las lesiones artificiales generadas, bajo las condiciones experimentales utilizadas en el presente estudio, son más permeables que una lesión de mancha blanca natural.

## RESUMEN

Este estudio fue diseñado con el propósito de determinar si lesiones de caries generadas mediante ciclaje de pH, son morfológicamente semejantes a una lesión de mancha blanca natural. Para tal efecto, se utilizaron 15 premolares extraídos por ortodoncia, los que fueron divididos en tres grupos, más una lesión de mancha blanca natural como control positivo. La corona de cada premolar fue dividida en cuatro segmentos los que fueron sometidos a un sistema de ciclaje de pH, dejando sin remineralizar una sección de cada corona, la que se utilizó como control. Como control negativo se utilizó esmalte sano. El primer grupo de premolares fue observado clínicamente y su superficie fue examinada mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Los restantes especímenes de este grupo fueron procesados histológicamente para la observación con microscopio óptico de campo claro y de luz polarizada.

Sobre el segundo grupo de premolares se realizó una técnica adhesiva utilizando el sistema Single Bond (3M). Los cortes histológicos fueron observados en un microscopio de epifluorescencia.

El tercer grupo de premolares fue incubado en saliva durante 48 horas y fijados en formaldehído al 10%. Los cortes fueron teñidos con azul de toluidina al 0,5% y observados en microscopio óptico.

En los especímenes experimentales (lesiones artificiales) fue posible observar con MEB, en la zona no aislada, una superficie regular, con mantención del patrón periquematítico en donde no se observan poros. Con mayor aumento se observa la superficie de aspecto filamentoso. Con microscopio de campo claro se distinguió una zona superficial de grosor variable. Esta zona aparece positivamente birrefringente en la mayoría de los especímenes, no obstante, algunos especímenes presentaban la superficie negativamente birrefringente al observarla con luz polarizada.

En las lesiones experimentales se detectó mayor infiltración de adhesivo que en el control positivo, pero menor infiltración que en el grupo control. Además se evidenció que en las lesiones experimentales hubo infiltración de proteínas salivales.

Nuestros resultados nos permiten inferir que las lesiones generadas por el sistema de ciclaje de pH, utilizado en el presente estudio, no son morfológicamente equivalentes a una lesión de mancha blanca natural.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fejerskov, O. (1997), Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 25: 5-12.
2. Featherstone, J. D. (1999), Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 27: 31-40.
3. Aparecido, J., Machado, C., Orth, R. (2003), A modified pH-cycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. *Pesqui. Odontol. Bras.* 17 (3): 241-246.
4. Christoffersen, J., Arends, J. (1982), Progress of artificial carious lesions in enamel. *Caries Res.* 16: 433-439.
5. Silverstone, L. M. (1968), The surface zone in caries and in caries-like lesions produced in vitro. *Br. Dent. J.* 125: 145-157.
6. Margolis, H. C., Moreno, E. C. (1985), Kinetic and thermodynamic aspects of enamel demineralization. *Caries Res.* 19: 22-35.
7. Kidd, E. A. M., Thylstrup, A., Fejerskov, O., Silverstone, L. M. (1978), Histopathology of caries-like lesions created in vitro in fluorosed and sound enamel. *Caries Res.* 12: 268-274.
8. Silverstone, L. M. (1970), The histopathology of early approximal caries in the enamel of primary teeth. *J. Dent. Child.* 37 (3): 201-210.

9. Shore, R. C., Kirkham, J., Brookes, S. J., Wood, S.R., Robinson, C. (2000), Distribution of exogenous proteins in caries lesions in relation to the pattern of demineralization. *Caries Res.* 34: 188-193.
10. Silverstone, L. M., Hicks, M. J., Featherstone, M. J. (1988), Dynamic factors affecting lesion initiation and progression in human dental enamel. Part I. The dynamic nature of enamel caries. *Quintessence international.* 19 (10): 773-785. Special report.
11. Ingram, G. S., Silverstone, L. M. (1981), A chemical and histological study of artificial caries in human dental enamel in vitro. *Caries Res.* 15: 393-398.
12. Robinson, C., Shore, R. C., Brookes, S. J., Strafford, S., Wood, S. R., Kirkham, J. (2000), The chemistry of enamel caries. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 11 (4): 481-495.
13. Hicks, M. J., Silverstone, L. M. (1985), Internal morphology of surface zones from acid-etched caries like-lesions: a scanning electron microscopic study. *J. Dent. Res.* 64 (11): 1296-1301.
14. Shellis, R. P., Hallsworth, A. S., Kirkham, J., Robinson, C. (2002), Organic material and the optical properties of the dark zone in caries lesions of enamel. *Eur. J. Oral Sci.* 110: 392-395.

15. Robinson, C., Hallsworth, A. S., Shore, R. C., Kirkham, J. (1990), Effect of surface zone deproteinization on the access of mineral ions into subsurface carious lesions of human enamel. *Caries Res.* 24: 226-230.
16. Robinson, C., Brookes, S. J., Kirkham, J., Wood, S. R., Shore, R. C. (2001), In vitro studies of the penetration of adhesive resins into artificial caries-like lesions. *Caries Res.* 35: 136-141.
17. Clarkson, B. H., Wefel, J. S., Miller, I. (1984), A model for producing caries-like lesions in enamel and dentin using oral bacteria *in vitro*. *J. Dent. Res.* 63 (10): 1186-1189.
18. Damato, F. A., Strang, R., Stephen, K. W. (1988), Comparison of solution- and gel prepared enamel lesions- an *in vitro* pH-cycling study. *J. Dent. Res.* 67 (8): 1122-1125.
19. Moreno, E. C., Zahradnik, R. T. (1974), Chemistry of enamel subsurface demineralization *in vitro*. *J. Dent. Res.* 53: 226-234.
20. Holmen, L., Thylstrup, A., Ogaard, B., Kragh, F. (1985), A polarized light microscopic study of progressive stages of enamel caries *in vivo*. *Caries Res.* 19: 348-354.
21. Zahradnik, R. T., Propas, D., Moreno, E. C. (1977), *In vitro* enamel demineralization by *Streptococcus mutans* in the presence of salivary pellicles. *J. Dent. Res.* 56 (9): 1107-1110.

22. Wefel, J. S., Harless, J. D. (1984), Comparison of artificial white spots by microradiography and polarized light microscopy. *J. Dent. Res.* 63 (11):1271-1275.
23. Dummer, P. M. H., Edmunds, D. H., Green, R. M. (1982), Demineralisation of human enamel by *Streptococcus mutans* nctc 10832 using a sequential batch culture technique. *Caries Res.* 16: 193-196.
24. Featherstone, J. D. B. (1977), Diffusion phenomena during artificial carious lesion formation. *J. Dent. Res.* 56: D 48-D 52. Special issue.
25. Featherstone, J. D. B., O'Reilly, M. M., Shariati, M., Brugler, S. (1986), Enhancement of remineralization *in vitro* and *in vivo*. In: Leach SA. Factors affecting de- and remineralization of the teeth. Oxford: IRL Press: p. 23-24.
26. Miake, Y., Saeki, Y., Takahashi, M., Yanagisawa, T. (2003), Remineralization effects of xylitol on demineralized enamel. *Journal of Electron Microscopy.* 52 (5): 471-476.
27. Amaechi, B. T., Higham, S. M., Edgar, W. M. (1998), Factors affecting the development of carious lesions in bovine teeth *in vitro*. *Arch of Oral Biol.* 43: 619-628.
28. Robinson, C., Shore, R. C., Bonass, W. A., Brookes, S. J., Boteva, E., Kirkham, J. (1998), Identification of human serum albumin in human

caries lesions of enamel: the role of putative inhibitors of remineralization. *Caries Res.* 32: 193-199.

29. Jeffries, B. (1962), The zone of air imbibition in carious lesions. *J. Dent. Res.* 41 (1): 136-141.
30. Ripa, L. (1966), The histology of the early carious lesion in primary teeth with special reference to a prismless outer layer of primary enamel. *J. Dent. Res.* 45 (1): 5-11.
31. Zahradnik, R. T., Moreno, E. C., Burke, E. J. (1976), Effect of salivary pellicle on enamel subsurface demineralization *in vitro*. *J. Dent. Res.* 55 (4): 664-670.
32. Arends, J., Christoffersen, J. (1986), The nature of early caries lesions in enamel. *J. Dent. Res.* 65 (1): 2-11.
33. Aoba, T. (2004), Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries. *Oral Diseases.* 10: 249-257.
34. Thylstrup, A., Fejerskov, O. "Caries". Ediciones Doyma S. A., Barcelona, 1988. p.p. 170-196. Cap. 11.
35. Holmen, L., Thylstrup, A., Featherstone, J. D. B., Fredebo, L., Shariati, M. (1985), A scanning electron microscopic study of surface changes during development of artificial caries. *Caries Res.* 19: 11-21.

36. Haikel, Y., Frank, R. M., Voegel, J. C. (1983), Scanning electron microscopy of the human enamel surface layer of incipient carious lesions. *Caries Res.* 17: 1-13.
37. Goldberg, M., Arends, J., Septier, D., Jongebloed, W. (1981), Microchannels in the surface zone of artificially produced caries-like enamel lesions. *J. Biol. Buccale.* 9 (3): 297-314.
38. Cole, A., Eastoe, J., "Biochemistry and Oral Biology", Segunda edición, Butterworth International Edition, 1988. 555 p. p. 452-59. Cap. 31.
39. Arends, J., Jongebloed, W., Ögaard, B., Rölla, G. (1987), SEM and microradiographic investigation of initial enamel caries. *Scand. J. Dent. Res.* 95: 193-201.
40. Darling, A. (1958), Studies of the early lesion of enamel caries. Its nature, mode of spread and points of entry. *Br. Dent. J.* 105: 119-135.
41. Gustafson, G. (1957), The histopathology of caries in human dental enamel. *Acta Odontol. Scand.* 15 (43): 13-55.
42. Johnson, A. R. (1975), The early carious lesion of enamel. *J. Oral Pathol.* 4: 128-157.
43. Nikiforuk, G., "Caries Dental. Aspectos Básicos y Clínicos", editorial Mundi S.A.I.C. y F. Buenos Aires, Argentina, 1986. 591 p. p. 261-89. Cap. 10.

44. Meyer-Lueckel, H., Paris, S., Mueller, J., Cölfen, H., Kielbassa, A. (2005), Influence of application time on the penetration of different dental adhesives and a fissure sealant into artificial subsurface lesions in bovine enamel. *Dental Materials*. 22: 1-7.
45. Weatherell, J., Deutsch, D., Robinson, C., Hallsworth, A. (1977), Assimilation of fluoride by enamel throughout the life of the tooth. *Caries Res*. 11: 85-115
46. Teranaka, T., Koulourides, T., Butler, W. T. (1986), Protein content and amino-acid content of consolidated carious lesions in human enamel and of experimental lesions in bovine enamel exposed to the human mouth. *Archs. Oral Biol*. 31 (6): 405-410.