



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA RESTAURADORA
ÁREA DE CARIOLOGÍA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

**DIFERENCIAS EN LA VARIABILIDAD DE LAS LESIONES DE CARIES
INDUCIDAS EN UN MODELO *IN SITU* Y LAS LESIONES DE CARIES
INDUCIDAS EN UN MODELO *IN VITRO***

Francisca Alexandra Godoy Stahl

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Rodrigo Cabello Ibacache

TUTORES ASOCIADOS

Patricia Palma Fluxá

**Adscrito a Proyecto FIOUCH 17/015
Santiago-Chile
2023**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA RESTAURADORA
ÁREA DE CARIOLOGÍA
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA**

**DIFERENCIAS EN LA VARIABILIDAD DE LAS LESIONES DE CARIES
INDUCIDAS EN UN MODELO *IN SITU* Y LAS LESIONES DE CARIES
INDUCIDAS EN UN MODELO *IN VITRO***

Francisca Alexandra Godoy Stahl

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Rodrigo Cabello Ibacache

TUTORES ASOCIADOS

Patricia Palma Fluxá

**Adscrito a Proyecto FIOUCH 17/015
Santiago-Chile
2023**

AGRADECIMIENTOS

A los profesores de los que más he aprendido y de verdad tienen vocación por enseñar, ojalá todos fueran como ustedes.

A mi tutor de tesis, Dr Rodrigo Cabello, que siempre tuvo una excelente disposición pese a sus tiempos limitados, y que fue mi guía y apoyo en todo este proceso. Le estaré siempre agradecida. Tuve suerte de ser su tesista.

A la Dra Patricia Palma, que nos ayudó muchísimo en el laboratorio. Todos sentimos su enorme cariño y esfuerzo por sacarnos adelante. Mil gracias Dra, tuvimos muchísima suerte de que formara parte de nuestros experimentos y la guía y madre que necesitábamos en el laboratorio. Gracias por ser mucho más que una profesora.

A mis padres Patricia Stahl y Pablo Godoy, que me han apoyado en cada etapa de mi vida, mi mamita con su eterna preocupación y contención emocional y mi papito que se aseguró de que nunca me faltara nada para poder enfocarme sólo en mis estudios. Los amo infinito y siempre estaré agradecida de la suerte que tengo al tenerlos como padres. También les agradezco que me hayan dado una hermana con la que siempre estaremos unidas por el amor que nos han dado.

A mis abuelitos Hela Rodríguez y Jaime Stahl por siempre cuidarme, regalarme y darme infinito apoyo y amor.

A mi Nenin, Ximena Stahl Rodríguez, que me ayudó mil veces a estudiar con infinita paciencia y amor, gracias a ella pude pasar ramos que no sabía cómo lo lograría. Gracias por todo tu esfuerzo y apoyo Nenin, gracias a ti logré entrar a la carrera.

A mis amigos maravillosos Gabo, Vico, Miru, Valerio, Panchi, Tania, Habi, con quienes compartimos penas, alegrías y muchísimas risas. Hicieron que mi paso por esta carrera fuera mejorando cada día. Los adoro y los llevo conmigo en cada cosa chistosa que recuerdo, que son infinitas.

A mis mejores amigas Susana Contreras y Pamela Alvarado. Partieron como amigas de la u y se convirtieron en mis amigas para toda la vida. Ustedes han sido un enorme apoyo y contención cada vez que lo he necesitado. Siempre estaré agradecida de haber coincidido con ustedes en la vida. Las amo mucho.

Al amor de mi vida, Daniel Castillo, que ha estado a mi lado este último año que ha sido un enorme desafío y me ha costado mucho emocionalmente. Gracias por todo el amor, el apoyo, la incondicionalidad y la comprensión que me has demostrado. Te amo con todo mi ser y me haces infinitamente feliz.

El presente trabajo de investigación fue realizado con la colaboración de la estudiante de Magister en Ciencias Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile; Dra. Daniela Susana Tobar Almache, y los alumnos de pregrado de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile; Sophya Consuelo Muñoz Ruiz y Joaquín Eduardo Aliaga ortega, bajo la tutela del profesor guía, Dr. Rodrigo Cabello Ibacache. Dentro de los resultados del mismo, existen datos que son compartidos con los trabajos de investigación titulados: “Efecto del probiótico *Lacticasebacillus rhamnosus* GG en la progresión de caries en un modelo *in situ*”; “Efecto en la progresión de lesiones de caries en esmalte en un modelo *in situ*, mediante el uso de probióticos de manera sistémica” y “Efecto del uso del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SP1 de forma tópica y sistémica, en la progresión en lesiones de caries de esmalte en un modelo *in situ* en la cavidad oral” pertenecientes a los alumnos anteriormente mencionados, respectivamente. La información comprendida en éste y los demás trabajos de investigación, corresponde al resultado del trabajo colaborativo, dentro de una línea de investigación convergente, y por lo tanto, compartida como información necesaria y relevante para el desarrollo de ésta y las demás investigaciones.

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Marco teórico	
2.1 Caries dental.....	2
2.2 Prevalencia de la enfermedad de caries en el mundo y en Chile.....	2
2.3 Composición de la estructura dental y proceso de formación de caries.....	3
2.4 Estudio de la enfermedad de caries: Tipos de modelos.....	5
2.4.1 Modelos <i>in vivo</i>	5
2.4.2 Modelos <i>in situ</i>	7
2.4.3 Modelos <i>in vitro</i>	8
2.5 Análisis de las lesiones de caries artificiales.....	11
2.6 Planteamiento del problema.....	12
3. Hipótesis.....	14
4. Objetivo general.....	14
5. Objetivos específicos.....	14
6. Metodología.....	15
6.1 Lesiones de caries generadas con modelo <i>in situ</i>	15
6.1.1 Aspectos éticos del estudio.....	15
6.1.2 Muestra.....	16
6.1.3 Preparación de las muestras	17
6.1.4 Proceso de desmineralización	20

6.2 Lesiones de caries generadas con modelo <i>in vitro</i>	20
6.2.1 Muestra.....	20
6.2.2 Preparación de las muestras.....	22
6.2.3 Montaje de las muestras.....	24
6.2.4 Procesos para la formación de biopelícula monoespecie de <i>Streptococcus mutans</i>	25
6.2.5 Proceso de desmineralización.....	28
6.2.6 Verificación de viabilidad y pureza de los cultivos.....	31
6.2.7 Medición de pH de caldos.....	32
6.2.8 Eliminación de biopelícula y recolección de las muestras.....	32
6.3 Medición de microdureza superficial de ambos modelos.....	32
7. Resultados.....	36
7.1 Modelo <i>in vitro</i>	36
7.1.1 Formación de biopelícula en las muestras de esmalte.....	36
7.1.2 Controles de viabilidad y pureza de <i>Streptococcus mutans</i>	37
7.1.3 Medición de pH.....	40
7.2 Resultados de prueba de microdureza de Vickers.....	40
7.2.1 Modelo <i>in situ</i>	40
7.2.2 Modelo <i>in vitro</i>	41
7.2.3 Comparación entre modelo <i>in vitro</i> e <i>in situ</i> en cuanto a microdureza.....	41

8. Discusión.....	42
9. Conclusión.....	48
10. Referencias bibliográficas.....	49
11. Anexos.....	61
Anexo N°1: Aprobación comité de ética modelo <i>in situ</i>.....	60
Anexo N°2: Consentimiento informado para la obtención de terceros molares.....	63
Anexo N°3: Criterios de inclusión y exclusión para la selección de voluntarios modelo <i>in situ</i>.....	64
Anexo N°4: Consentimiento informado para la participación en el estudio <i>in situ</i>.....	65
Anexo N°5: Ficha clínica estudio <i>in situ</i>.....	68
Anexo N°6: Protocolo a seguir por los voluntarios para el estudio <i>in situ</i>.....	69
Anexo N°7: Evaluación y registro del protocolo de los voluntarios estudio <i>in situ</i>.....	71
Anexo N°8: Cuestionario de cumplimiento final estudio <i>in situ</i>.....	72

1. RESUMEN

La caries dental es una enfermedad con alta prevalencia a nivel mundial y afecta la calidad de vida del que la padece. Debido a esto, la etiología, el diagnóstico, tratamiento y control de la caries ha sido ampliamente estudiado mediante tres tipos de modelos: *in vivo*, *in situ* e *in vitro*. En los modelos *in vivo* se debe considerar la gran complejidad del medio oral y los problemas éticos que conlleva, por lo que se suele preferir modelos *in vitro* e *in situ*.

Una manera de estudiar esta enfermedad es inducir lesiones de caries de manera artificial en muestras de esmalte. Pese a que existen múltiples modelos de estudio *in vitro* e *in situ* para este fin, no se tiene conocimiento sobre la variabilidad que tienen las caries generadas con un modelo u otro, siendo un punto importante a considerar al momento de seleccionar el modelo de estudio adecuado para llevar a cabo una determinada investigación.

Se realizaron dos estudios para la inducción de caries, uno *in vitro*, en que se expuso bloques de esmalte humano a sacarosa 10%, 4 veces al día por 5 días, previa formación de una biopelícula monoespecie de *Streptococcus mutans*, y un estudio *in situ*, en el que 2 sujetos voluntarios portaron un aparato intraoral removible con 10 bloques de esmalte humano, aplicando sacarosa 20%, 8 veces al día por 28 días. En ambos estudios se midió la microdureza de Vickers y se comparó la variabilidad de las lesiones producidas tanto en el modelo *in situ* como en el *in vitro*.

Resultados: La variabilidad de las lesiones de caries artificiales inducidas en el modelo *in vitro* es menor que la variabilidad de las lesiones de caries artificiales inducidas en el modelo *in situ*.

Conclusiones: En ambos modelos se logró la inducción de caries, aunque existe una menor variabilidad en el modelo *in vitro*, lo que debe ser considerado al momento de planificar un estudio.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Caries dental

La caries dental es una enfermedad prevenible, no transmisible, crónica, dinámica, multifactorial, que involucra a la biopelícula (Pitts et al., 2017; Twetman, 2018), que es una comunidad de bacterias estructurada rodeada de una matriz de exopolisacáridos y adherida a la superficie dental (Zijngel et al., 2010) mediante su interacción con componentes provenientes de la película salival adquirida (Schilling & Bowen, 1992), que corresponde a una capa acelular compuesta principalmente por proteínas llamadas mucinas (Fischer & Aparicio, 2021), que se adhieren mediante adsorción a la superficie dentaria (Fischer & Aparicio, 2021). Además están involucrados los carbohidratos de la dieta, principalmente azúcares, es influenciada por la saliva en su totalidad y factores genéticos, biológicos, conductuales, psicosociales y medioambientales, dando como resultado una pérdida neta de minerales de los tejidos dentales duros y su destrucción progresiva (Pitts & Zero, 2016).

2.2 Prevalencia de la enfermedad de caries en el mundo y en Chile

Respecto a la prevalencia de las enfermedades orales, el *Global Burden of Disease Study 2019* (World Health Organization, 2022) estimó que éstas afectaban cerca de 3.5 billones de personas en el mundo, siendo las lesiones de caries en dientes permanentes la condición más común. Globalmente, se estima que 2 billones de personas sufren lesiones de caries no tratadas en dientes permanentes (World Health Organization, 2022) .

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en la mayoría de los países de renta media y baja, la prevalencia de las enfermedades orales continúa aumentando con la creciente urbanización y los cambios en las condiciones de vida, siendo su causa principalmente: (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2022).

1. La inadecuada exposición al flúor, que es un elemento protector contra la caries (Centers for Disease Control and Prevention, 2001; Nanci, 2018); ya sea en el suministro de agua o en elementos de higiene oral como la pasta dental.
2. La disponibilidad y asequibilidad de comida con alto contenido de azúcar y carbohidratos fermentables
3. Un pobre acceso a servicios de cuidado oral en la comunidad

En cuanto a la prevalencia en Chile, según estudios nacionales disponibles, a los 2 años de edad la prevalencia de caries es de un 17,5%, de 50,46% a los 4 años y de 70,4% a los 6 años. La prevalencia de caries a los 12 años es de 62,5%, aumentando con la edad hasta llegar a un 99,4% en adultos de 65 a 74 años (Ministerio de Salud (MINSAL), 2021).

Además de su alta prevalencia a nivel mundial, la caries dental afecta la calidad de vida sobre la población que la padece, afectando no sólo la función masticatoria, sino también el habla, la sonrisa, el ámbito sicosocial (Mathur & Dhillon, 2018), puede causar dolor, pérdida de funcionalidad y baja autoestima, llevando a un ausentismo de la escuela o el trabajo (Paiva et al., 2021).

2.3 Composición de la estructura dental y proceso de formación de caries

Para comprender el inicio y progresión de las lesiones de caries es importante tener en cuenta la estructura dentaria. Los dientes están formados por una capa superficial dura, inerte y acelular, el esmalte, que es el tejido más mineralizado en el cuerpo, formado en más de un 96% de mineral en forma de cristales de hidroxiapatita de calcio ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Pitts et al., 2017) y trazas de material orgánico (Nanci, 2018). El esmalte está soportado por la dentina, la cual conforma la mayor parte del diente y es un tejido conectivo duro y vital de mayor resiliencia (Nanci, 2018), y está compuesta de un 70% de contenido mineral en peso, también hidroxiapatita, un 20% de contenido orgánico, que es principalmente colágeno, y un 10% de agua (Abou Neel et al., 2016). En ésta se encuentran los túbulos dentinarios, que atraviesan todo su grosor y contienen extensiones de las

células llamadas odontoblastos, que forman y mantienen la dentina y cuyos cuerpos celulares se encuentran alineados a lo largo del borde interno de la dentina, conformando el límite periférico de la pulpa dental con la cual forma el complejo dentino – pulpar al estar relacionadas embriológica y funcionalmente, y que corresponde a tejido conectivo suave que contiene al paquete vasculo nervioso del diente (Nanci, 2018).

En resumen, el diente propiamente consiste en dos tejidos duros: El esmalte y la dentina. Éstos aportan al diente las propiedades de dureza y resiliencia (Nanci, 2018).

En un esmalte sano los cristales de la superficie se encuentran en un estado de equilibrio dinámico con el medio oral local, compuesto por la saliva, la película salival adquirida, la biopelícula, la dieta y la estructura misma del diente (Hara & Zero, 2010).

En este equilibrio, la pérdida de minerales (desmineralización) y la ganancia de minerales (remineralización) de la superficie dental están en balance o a favor de la remineralización (Pitts & Zero, 2016).

En el proceso de progresión de las lesiones de caries se produce un desbalance del equilibrio desmineralización - remineralización, en el que prima la desmineralización, resultando en una pérdida neta sostenida de mineral desde la estructura dentaria al medio (Pitts & Zero, 2016). Durante este proceso, las bacterias de la biopelícula formada sobre la superficie dentaria, en conjunto con carbohidratos de la dieta; principalmente azúcares y en menor medida almidones, metabolizan los azúcares y producen ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico, que disminuyen el pH de la biopelícula y de la saliva que, en condiciones fisiológicas es cercano a 7,0 (Buzalaf et al., 2011). La fase mineral del diente comienza a disolverse al alcanzar el pH crítico 5,5, variando según las concentraciones de iones de flúor, calcio y fosfato presentes en la superficie

dentaria. Al disminuir el pH por los ácidos producidos por las bacterias, se crea un ambiente subsaturado respecto de la fase mineral del diente y consecuentemente la pérdida de minerales de la estructura dental, dando como resultado el inicio de una lesión de caries (Pitts & Zero, 2016).

2.4 Estudio de la enfermedad de caries: Tipos de modelos

Es por la relevancia de esta enfermedad que la etiología, el diagnóstico, tratamiento y control de la caries dental ha sido ampliamente estudiado a través de los años (Maske et al., 2017). Para su estudio se han utilizado tres tipos de modelos de estudio: modelos de estudios *in vivo*, modelos *in situ* y modelos *in vitro* (Marsh, 1995).

2.4.1 Modelos *in vivo*

“*In vivo*” viene del Latín, y significa “en el ser vivo”, es decir, que ocurre o tiene lugar dentro de un organismo (Real Academia Española, 2005). Se refiere a experimentación realizada dentro o en el tejido vivo de un organismo vivo, sin que el tejido o componente biológico haya sido removido del organismo, como es en el caso de los modelos *in vitro*. El sujeto de estudio puede ser una planta, un animal o un humano (Dornell, 2022; Seladi-Schulman, 2019).

Los modelos de estudio *in vivo* han contribuido enormemente al entendimiento de la etiología y patogénesis de la caries dental (Bowen, 2016) y al desarrollo de pastas dentales y productos para la prevención de la caries (Bowen, 2013). Una gran ventaja de este tipo de modelos es que permite el estudio de todos los aspectos de la enfermedad de caries, incluyendo el rol de la dieta, los microorganismos, la composición dentaria, los procesos de desmineralización y remineralización y sus interacciones (Bowen, 2016).

En estos modelos se utilizan distintas especies de animales experimentales tales como primates, conejos, hurones, perros (Struillou et al., 2010), hámsteres y

ratones, siendo los roedores los más utilizados (Xuelian et al., 2016). Los estudios en animales son complementarios a los experimentos *in vitro* antes de probar nuevos tratamientos clínicos en los que se requiere la realización de una biopsia para un análisis histológico, la cual generalmente no es aceptada en seres humanos (Struillou et al., 2010).

Las desventajas de la utilización de animales en este tipo de modelos son, entre otras, que no todas las patologías del ser humano pueden ser reproducidas en animales, las conclusiones de los experimentos con animales no pueden ser estrictamente aplicable a los humanos, existen dificultades en extrapolar a los humanos los resultados de los experimentos con animales (Muthanandam et al., 2020) y problemas éticos y sociales al utilizar animales de gran tamaño como perros y primates (Struillou et al., 2010).

Las limitaciones respecto de la aplicación de los resultados de estos estudios directamente a los humanos son debido a las diferencias en la anatomía, dentición, estructura de los tejidos periodontales, la fisiopatología en el caso de animales pequeños (Struillou et al., 2010), la microbiota, la respuesta de los tejidos frente a determinados estímulos (Muthanandam et al., 2020), patrones de alimentación, infecciones producidas por virus o bacterias (Bowen, 2013), etc.

En cuanto a los humanos como sujetos de estudio, un ejemplo son los ensayos clínicos realizados para evaluar la seguridad y eficacia de un medicamento experimental (Dornell, 2022).

En el ámbito de la odontología, se han hecho múltiples estudios *in vivo* para comprender y abordar el inicio, progresión y detención de la caries (Thylstrup et al., 1994), el efecto de distintas sustancias y productos sobre las enfermedades orales como fluoruro diamino de plata (Karched et al., 2019), clorhexidina, flúor barniz (Chhattani et al., 2021), propóleo (Zulhendri et al., 2021), etc.

A pesar de sus grandes hallazgos y utilidades, la complejidad del medio oral y los problemas éticos asociados con los estudios *in vivo* de las enfermedades orales en humanos tales como la caries y la enfermedad periodontal, ha llevado inevitablemente al desarrollo de otro tipo de modelos, como los modelos de laboratorio que simulan el medio oral *in vitro* (Tang et al., 2003; Yu et al., 2017).

2.4.2 Modelos *in situ*

Por otra parte, los modelos de caries *in situ* “en el lugar, en el sitio” (*REAL ACADEMIA ESPAÑOLA: Diccionario de la lengua española*, s. f.), analizan un fenómeno en el lugar y condiciones donde éste se desarrolla. En el caso de la odontología, involucran el uso de aparatos u otros dispositivos intraorales, que crean condiciones definidas en la cavidad oral que simulan el proceso de la caries dental (Zero, 1995). Es por lo que los modelos *in situ* son un punto intermedio entre los modelos *in vitro* e *in vivo* (Tabla 1).

Tabla 1: Los modelos *in situ* pueden ser situados entre los modelos *in vivo* e *in vitro*. (Zero, 1995)

Modelos <i>in vivo</i>	Modelos <i>in situ</i>	Modelos <i>in vitro</i>
Natural	←————→	Artificial
Alta relevancia clínica	←————→	Relevancia clínica posiblemente disminuida
Control científico limitado	←————→	Alto nivel de control científico
Alta variación	←————→	Baja variación
Métodos de detección poco sensibles	←————→	Métodos de detección altamente sensibles
Gran tamaño muestral	←————→	Reducido tamaño muestral

Dada la naturaleza multifactorial de la caries, estos modelos incluyen: un sustrato dental que puede ser esmalte o dentina; la formación o presencia de biopelícula dental con potencial cariogénico; un carbohidrato como estímulo, ya sea controlado de forma experimental o provisto por la dieta normal del sujeto; y tiempo, determinado por la duración del período experimental (Zero, 1995).

Las mayores ventajas de los modelos *in situ* son: Los estudios son realizados en la cavidad oral humana, en contraste con los modelos de laboratorio *in vitro* o los modelos *in vivo* con animales. A diferencia de los modelos con ensayos clínicos, los modelos *in situ* facilitan el control de las variables experimentales y hay flexibilidad en el diseño experimental. Estos modelos facilitan la integración de varias técnicas analíticas de ciencia básica, aumentando la sensibilidad y validez científica de la metodología (Zero, 1995). Éstos han sido utilizados tanto en el pasado como en la actualidad, en varios estudios sobre la caries, por ejemplo, recientemente para estudiar los efectos de distintos vehículos de liberación de flúor (Parkinson et al., 2018; Alexandria et al., 2019), evaluar la des y remineralización después de la aplicación de distintas concentraciones de flúor (Wierichs et al., 2020), y reproducir la biopelícula oral para estudiar el control sobre éste mediante una preparación con arginina (Kuriki et al., 2021). Por lo tanto, los modelos *in situ* optimizan el balance entre la relevancia clínica y el control de las variables (Ferracane, 2017).

2.4.3 Modelos *in vitro*

La complejidad fisiológica asociada a la enorme biodiversidad microbiana de la cavidad oral y los problemas relacionados a la experimentación en los estudios clínicos ha llevado al desarrollo de modelos de laboratorio (*in vitro*), en un esfuerzo por simular aquellas condiciones clínicas en un contexto más controlado (Maske et al., 2017). Los modelos *in vitro* (“en vidrio”) han sido utilizados para la investigación de los factores que afectan el desarrollo de las caries y la evaluación

del crecimiento, patogenicidad y metabolismo de la biopelícula, y mecanismos de desmineralización y remineralización bajo condiciones altamente controladas, dentro de un ambiente que simula los nichos o hábitats orales *in vivo* (Tang et al., 2003). Éstos son particularmente adecuados para experimentos cuyo objetivo es analizar un sólo proceso de forma aislada, donde una situación más compleja con muchas variables puede confundir los datos (Moron et al., 2013). Dentro de estos se encuentran los modelos químicos experimentales como el pH *cycling*, en que el tejido dentario es expuesto a periodos de desmineralización mediante la exposición a ácidos y de remineralización utilizando soluciones de calcio fosfato, y los modelos que utilizan la inmersión en un medio ácido (Steiner-Oliveira et al., 2007).

La composición de varios sistemas de desmineralización (geles y soluciones) han sido desarrollados con el objetivo de simular las condiciones de la biopelícula cariogénico durante el metabolismo del azúcar. Sin embargo, debe tenerse en consideración que las concentraciones de calcio y fosfato, y en algunos casos los valores de pH elegidos en los modelos *in vitro* son más bajos que en el contexto oral natural, con el objetivo de inducir una desmineralización más rápida que como ocurre *in vivo*. Por lo tanto, diferencias entre estas soluciones o geles, tales como el grado inicial de saturación respecto de los minerales del diente, la concentración de flúor, tipo de ácido y viscosidad, pueden resultar en diferencias notables en las características físicas y mecánicas del sustrato desmineralizado, tales como la distribución mineral, composición química y dureza (Moron et al., 2013). Además la gran desventaja de estos modelos es que no simulan el proceso de desmineralización real del medio oral, ya que carece de microorganismos y, consecuentemente, se concentra en los aspectos físico-químicos de la disolución el esmalte (Steiner-Oliveira et al., 2007).

Otro instrumento utilizado para formar lesiones cariosas involucra modelos bacterianos, que pueden involucrar bacterias planctónicas; de libre flotación o libremente suspendidas (Nazar, 2007), o microorganismos organizados en

biopelículas. Los modelos que utilizan biopelículas son probablemente más representativos que los sistemas de bacterias en suspensión debido a que en el proceso de caries participan bacterias pertenecientes a una biopelícula, la cual posee un metabolismo diferente al de los microorganismos que viven libremente (Steiner-Oliveira et al., 2007). Asimismo, se pueden utilizar biopelículas uniespecie (una sola especie bacteriana), multiespecie (varias especies de bacterias) o una biopelícula microcosmo (Bohn et al., 2017; Ferracane, 2017; Fontana et al., 1996). En este último se inocula saliva o biopelícula extraídas directamente de la cavidad oral, en un medio artificial para que se forme una, donde coexisten más de 700 especies de bacterias, y se simula las condiciones del medio oral en el laboratorio (Bohn et al., 2017; Cieplik et al., 2019). La biopelícula microcosmo probablemente refleje la complejidad, diversidad y heterogeneidad de la biopelícula *in vivo*, aunque la mayoría de estos sistemas requieren equipos especializados y su mantenimiento es laborioso (Filoche et al., 2007), además de presentar frecuentes problemas de contaminación y un alto costo económico (Steiner-Oliveira et al., 2007).

En los modelos que utilizan biopelículas se les agrega una fuente de nutrientes a los microorganismos, siendo utilizada ampliamente la sacarosa, ya que es el carbohidrato más consumido por la población mundial y el más cariogénico. Este carbohidrato es metabolizado por las bacterias de la biopelícula (Steiner-Oliveira et al., 2007), que producen ácidos que dan como resultado la desmineralización del tejido dental y la formación de caries *in vitro* (Buzalaf et al., 2011).

La desventaja de la mayor parte de estos modelos es que no reproducen las diversas condiciones presentes en la cavidad oral, tales como la presencia de saliva, proteínas y enzimas antimicrobianas, ausencia de períodos de remineralización, las que pueden afectar el desarrollo de la caries (Steiner-Oliveira et al., 2007). Estos modelos son diseñados y están limitados al estudio de temas específicos como la fisiología bacteriana, formación de biopelícula dental, caries

primaria y secundaria. Por lo tanto, las variables que pueden ser controladas y analizadas individualmente con cada modelo son limitadas (Fontana et al., 1996).

2.5 Análisis de las lesiones de caries artificiales

En el área de investigación de los tejidos dentales duros, la des y remineralización del esmalte dental ha sido un tema ampliamente estudiado. La mayoría de las publicaciones en esta área están relacionadas con las condiciones en las cuales se producen las lesiones de caries subsuperficiales, el mecanismo de estos procesos, y la prevención de caries (Featherstone et al., 1983).

Variadas técnicas han sido utilizadas o desarrolladas específicamente para medir los cambios producidos en los tejidos, por ejemplo, al describir lesiones de caries inducidas de forma artificial. Entre éstas se encuentran las pruebas para cuantificar los cambios en las propiedades físicas como la dureza, la densidad o las propiedades ópticas, o para medir cambios en la composición química del diente (Featherstone et al., 1983).

Para medir la dureza de un cuerpo existen diferentes pruebas, las cuales se dividen en pruebas de macro y microdureza (Donald et al., 2011). Las pruebas de microdureza son las más adecuadas para medir la dureza de la estructura dental, ya que permiten evaluar la dureza de materiales finos y regiones pequeñas y miden

las propiedades mecánicas y la integridad estructural de la superficie dentaria (Lippert & Lynch, 2014)

La determinación de la densidad mineral mediante evaluación cuantitativa es de particular utilidad cuando se estudian lesiones cariosas incipientes (Muñoz, 2019). Varios autores han investigado el contenido mineral del esmalte utilizando

diferentes métodos en el contexto de la caries, los procesos de desmineralización/ remineralización, la edad y enfermedades (Akkus et al., 2017).

El análisis de la microdureza superficial y la densidad mineral puede ser realizado mediante diferentes métodos:

Las técnicas más comúnmente utilizadas para estudiar la pérdida o ganancia mineral (contenido mineral) son usualmente indirectas y algunas destructivas, por ejemplo, los análisis químicos requieren disolución del tejido, mientras que la microradiografía transversa, que es considerada el *gold standard* para la cuantificación del contenido mineral de lesiones de caries *in vitro* (Moron et al., 2013; Wefel, 1990), la microscopía de luz polarizada, y la microscopía electrónica de barrido, requieren el corte y seccionamiento de las muestras (Shahmoradi & Swain, 2016). Por otro lado, de forma más reciente, se ha utilizado la Microtomografía Computarizada, que es una técnica no invasiva con una precisión mayor al 1% y una resolución entre 5 y 30 μm (Wong et al., 2004).

Las mediciones de dureza requieren que se realice una indentación (huella o muesca producida por un elemento penetrador con una carga determinada) en la superficie del esmalte, dañando su superficie, además de que se suele pulir y aplanar la superficie previo al examen (Moron et al., 2013; Wefel, 1990).

2.6 Planteamiento del problema

Se tiene conocimiento de la alta prevalencia y nocivas consecuencias que tiene la caries en la salud oral y general de la población, por lo cual ha sido ampliamente estudiada a través de los años, buscando maneras de prevenirla o proporcionar el mejor tratamiento.

Pese a que existen múltiples tipos de estudios para reproducir la caries de forma artificial y así poder analizar y desarrollar nuevas formas de prevención y tratamiento de esta enfermedad, no se tiene conocimiento realmente sobre la variabilidad que tendrían las caries generadas con un modelo u otro, siendo un punto importante a considerar al momento de seleccionar el modelo de estudio adecuado para una determinada investigación.

En este trabajo de investigación se determinará si existen diferencias entre la variabilidad, es decir, la dispersión de los valores de la variable (Dagnino, 2014) microdureza superficial de las lesiones de caries inducidas tanto en un modelo *in situ* como en un modelo *in vitro* y compararlas para determinar en cuál de los dos modelos se presenta mayor variabilidad y por tanto menor reproductibilidad en los resultados. Para esto, se utilizarán los valores de microdureza de lesiones de caries generadas mediante un modelo *in situ* previamente establecido (Colil, 2019). Se realizarán las mismas mediciones en lesiones de caries generadas mediante un modelo *in vitro* microbiológico descrito por Ccahuana-Vásquez y Cury en 2010 (Ccahuana-Vásquez & Cury, 2010) y se comparará descriptivamente la variabilidad de los valores obtenidos entre ambos modelos. Esto con el propósito de validar modelos de investigación sobre lesiones de caries y no solo superficies sanas, de esta manera se pueden investigar efectos terapéuticos y no solo preventivos.

3. HIPÓTESIS.

La variabilidad de las lesiones de caries artificiales inducidas en un modelo *in vitro* es menor que la variabilidad de las lesiones de caries artificiales inducidas en un modelo *in situ*.

4. OBJETIVO GENERAL.

Establecer si existen diferencias desde lo descriptivo entre la variabilidad de las lesiones de caries inducidas en un modelo *in situ* y la variabilidad de las lesiones de caries inducidas en un modelo *in vitro*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Determinar la variabilidad en la dureza de Vickers de las lesiones de caries artificiales inducidas en un modelo *in vitro*.
- Determinar la variabilidad en la dureza de Vickers de las lesiones de caries artificiales inducidas en un modelo *in situ*.
- Comparar descriptivamente la variabilidad en la dureza de Vickers de las lesiones de caries artificiales inducidas en un modelo *in vitro* y la variabilidad en la dureza de Vickers de las lesiones de caries artificiales inducidas en un modelo *in situ*.

6. METODOLOGÍA.

Tipo de estudio y estrategia experimental: Se utilizaron los datos de microdureza de Vickers obtenidos de la inducción de caries en un modelo *in situ* y se compararon descriptivamente con los datos obtenidos de la inducción de caries que se realizó mediante un modelo *in vitro*.

6.1 Lesiones de caries generadas con modelo *in situ*

Consistió en 2 sujetos voluntarios que portaron un aparato intraoral removible con 10 bloques de esmalte humano cada uno, durante 28 días, aplicando sacarosa al 20% como desafío cariogénico, alcanzando 8 aplicaciones diarias. Esto con el objetivo de generar lesiones de caries estandarizadas según un modelo previamente establecido (Colil, 2019). Estos 2 voluntarios correspondieron al grupo control del estudio, cuyos dispositivos sólo fueron expuestos a sacarosa. El grupo experimental no fue considerado para efectos de este documento, puesto que no se relaciona con los objetivos planteados.

6.1.1 Aspectos éticos del estudio

La norma establece acorde a la ley 20.584, en el párrafo 7º de la protección de la autonomía de las personas que participan en una investigación científica, artículo 21, donde se señala que *“Toda persona deberá ser informada y tendrá derecho a elegir su incorporación en cualquier tipo de investigación científica biomédica, en los términos de la ley N°20.120. Su expresión de voluntad deberá ser previa, expresa, libre, informada, personal y constar por escrito. En ningún caso esta decisión podrá significar menoscabo en su atención ni menos sanción alguna”*. En cumplimiento de lo antes descrito, se contó con un consentimiento informado de los pacientes que donaron terceros molares incluidos (Anexo N°2) y los pacientes que participaron en el estudio utilizando el aparato intraoral removible (Anexo N°4), el cual fue

entregado y explicado al paciente en una charla donde también se le instruyó sobre su salud oral y el uso del dispositivo. Por otro lado, se hizo hincapié en que si él o la paciente quisieran desistir, podría hacerlo en cualquier momento del experimento. A su vez, según el artículo 22 de la misma ley se señala que *“Mediante un reglamento expedido por el Ministerio de Salud, en los términos de la ley N°20.120, se establecerán las normas necesarias para regular los requisitos de los protocolos de investigación y los procedimientos administrativos y normas sobre constitución, funcionamiento y financiamiento de comités para la evaluación ético-científica; para la aprobación de protocolos y para la acreditación de los comités por parte de la Autoridad Sanitaria; la declaración y efectos sobre conflictos de interés de investigadores, autoridades y miembros de comités y, en general, las demás normas necesarias para la adecuada protección de los derechos de las personas respecto de la investigación científica biomédica”*. Es por ello que el protocolo de estudio fue presentado ante el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile y al Comité Institucional de Bioseguridad (Anexo N°1). Es importante destacar que este tipo de estudio tiene la ventaja de no poner en riesgo la salud oral de los pacientes, ya que el objeto de estudio no corresponde al esmalte dentario de los voluntarios. Además, la naturaleza del estudio a corto plazo ayudó a superar problemas éticos asociados a ensayos que involucran seres humanos expuestos a una situación determinada dentro de un período (Zero, 1995).

6.1.2 Muestra

La muestra consistió en 20 láminas de esmalte obtenidas del corte en bloque de 10 terceros molares humanos incluidos (sin contacto directo con el medio oral), donados voluntariamente por pacientes sometidos a exodoncias por indicación de ortodoncia en el “Instituto Nacional de Ortodoncia”, que firmaron un consentimiento informado aprobado por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo N° 2).

Estas láminas se dividieron de forma equitativa entre 2 aparatos intraorales acrílicos que fueron utilizados por 2 sujetos voluntarios de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, que cumplían ciertos criterios de inclusión y exclusión (Anexo N°3). Para este fin, cada voluntario firmó un consentimiento informado (Anexo N° 4) y se realizó una evaluación y ficha clínica establecida (Anexo N°5). Posterior a la confección de la ficha clínica, se realizó instrucción de higiene oral a los voluntarios, y se les instruyó sobre el uso del aparato y el protocolo a seguir para el estudio (Anexo N°6).

Para el cálculo del tamaño de muestra se consideró un riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,2. Se asumió una desviación estándar común de 15,3 (Colil, 2019), con una precisión de la estimación de más menos 6.2 unidades con una tasa de pérdidas de seguimiento del 1%. El tamaño muestral requerido fue de un total de 20 unidades de observación, en base a estudios previos con resultados positivos utilizando un tamaño muestral similar (Colil, 2019) y al programa en línea Granmo.

6.1.3 Preparación de las muestras

Bloques de esmalte

Los molares donados fueron examinados de manera individual, excluyendo los que presentaran anomalías, desmineralizaciones o fracturas. Posterior a esto, los 10 molares seleccionados fueron instrumentados y limpiados con un scaler para retirar los restos de tejido periodontal, para luego ser conservados en una solución de Timol 0,2% y refrigerados a 5°C hasta el momento de su utilización.

Cada molar fue montado en acrílico y cortado con una sierra de diamante de baja velocidad (SYJ-150, MTI) y luego con un disco de acero diamantado de 0,20 mm de grosor marca (Horico, Alemania) montado en instrumental rotatorio de baja velocidad hasta obtener bloques de esmalte con dentina subyacente de 3x3x3 mm.

Después se utilizó un disco de carburo de silicio (carburundum) en instrumental rotatorio de baja velocidad para desgastar los cortes hasta obtener bloques de 3x3x3 mm.

Los bloques obtenidos fueron pulidos con piedras de carburo de silicio de grano 600-4000, posteriormente limpiados con ultrasonido y sometidos a autoclave a vapor por 20 min a 120°C, para asegurar su esterilidad.

Dispositivo intraoral removible y montaje de las muestras

Se utilizó un dispositivo intraoral removible maxilar que fue realizado de la siguiente manera:

- 1- Se tomó una impresión de maxilar superior del voluntario utilizando cubeta stock y alginato.
- 2- La impresión fue vaciada con yeso piedra.
- 3- Se envió el modelo del maxilar en yeso al laboratorio dental, con las siguientes instrucciones; dispositivo de acrílico termopolimerización removible el cual debe contar con 4 ranuras de 4x4x4 mm ubicadas en la zona vestibular de molares, 6 ranuras de 4x4x4 mm por palatino: 4 en la zona de molares, 1 en zona de premolares y 1 ranura en la zona media palatina.

Una vez obtenido el dispositivo, los bloques de esmalte fueron montados individualmente en las ranuras mediante cera adhesiva. En las zonas vestibulares de molares, al ser las muestras de 3x3x3 mm y la profundidad de las ranuras de 4x4x4 mm, quedó 1mm de profundidad del acrílico hasta la muestra de esmalte, con el objetivo de dejar espacio para la acumulación de placa o biopelícula en las zonas vestibulares de molares. Los bloques fueron numerados del 1 al 10 desde la zona más posterior derecha vestibular a la zona más posterior derecha palatina, de izquierda a derecha por vestibular y de izquierda a derecha por palatino, siendo nominada la muestra media palatina como la número 7 (Figura 1).

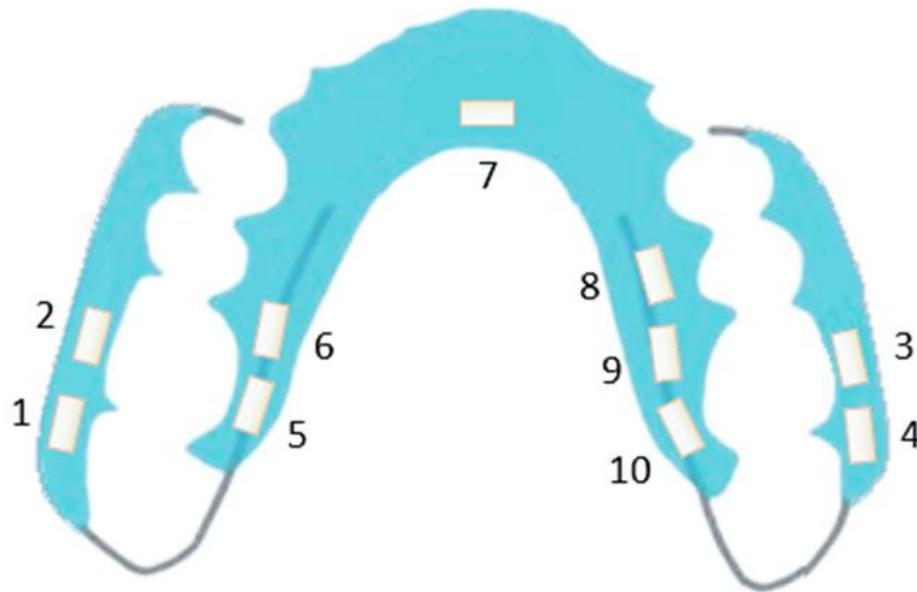


Figura 1: Esquema del dispositivo intraoral removible. Se observa las muestras de esmalte colocadas en sus respectivas ranuras.

La distribución y el tratamiento de las muestras de esmalte se realizó según lo explicado en la Tabla 2.

Tabla 2: Distribución y tratamiento de las muestras. En el experimento hubo un grupo control y uno experimental. El grupo control fue expuesto a sacarosa al 20% en la Fase 1 y la Fase 2 del experimento. El grupo experimental no fue considerado en el presente estudio.

Grupo y número de muestras	Distribución	Tratamiento
Grupo control: 20 muestras, 2 dispositivos (10 en cada dispositivo)	2 voluntarios, cada uno asignado a un dispositivo	Se exponen a sacarosa al 20%

6.1.4 Proceso de desmineralización

Los 2 voluntarios debieron utilizar el dispositivo intraoral removible que portaban las muestras de esmalte durante 28 días por 24 horas al día, e instilar una gota de sacarosa al 20% (Aires et al., 2006) cada 2 horas a cada una de las muestras hasta lograr 8 aplicaciones diarias (Colil, 2019). Esto fue realizado con un gotario fuera de boca, esperando 5 minutos antes de reintroducir el aparato a la cavidad oral. Además se retiró el dispositivo en momentos de alimentación e higiene oral, que debían ser 4 ocasiones máximo de 30 minutos de duración o menos.

Durante este período, se controló el cumplimiento del protocolo de estudio y se resolvieron las dudas o problemas con el dispositivo a los voluntarios mediante llamadas telefónicas diarias y la información se registró en formularios redactados para este propósito. Se registraron los momentos de instilación con sacarosa (Anexo N°7) y al final de cada fase del estudio se realizó un cuestionario para evaluar el cumplimiento del protocolo durante el estudio (Anexo N°8).

6.2 Lesiones de caries generadas con modelo *in vitro*

Se utilizó el modelo de caries descrito por Ccahuana-Vásquez y Cury en 2010 (Ccahuana-Vásquez & Cury, 2010), que consiste en la simulación de un ambiente cariogénico mediante la exposición de bloques de esmalte a sacarosa 10%, 4 veces al día por 5 días, previa formación de una biopelícula monoespecie de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) para obtener una zona de desmineralización compatible con una lesión de caries.

6.2.1 Muestra

La muestra consistió en 34 láminas de esmalte obtenidos del corte en bloque de 17 terceros molares humanos incluidos (sin contacto con el medio oral) proporcionados voluntariamente por pacientes sometidos a exodoncias por indicación de ortodoncia en el “Instituto Nacional de Ortodoncia”. Los donantes

firmaron un consentimiento informado aprobado por el comité de ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo N°2).

Los molares donados fueron examinados de manera individual, excluyendo los que presentaran anomalías, desmineralizaciones o fracturas. Posterior a esto, los 17 molares seleccionados fueron instrumentados con un jaquette y cureta Gracey 3/4 (Hu Friedy, Alemania) para retirar los restos de tejido periodontal, para luego ser conservados en una solución de Timol 2% y refrigerados a 5°C hasta el momento de su utilización.

La distribución y el tratamiento de los cortes se realizó según lo explicado en la Tabla 3.

Tabla 3: Distribución y tratamiento de los cortes. De los 32 bloques de esmalte, 10 fueron denominados como grupo control, a los que se les indujo la formación de biopelícula pero no se continuó con las exposiciones a sacarosa, y los 24 restantes fueron el grupo experimental, que fueron expuestos a sacarosa 10% 4 veces al día por 5 días

Grupo y número de muestras	Distribución	Tratamiento
Grupo control: 10 muestras	Placa de cultivo 1 (P1)	No se exponen a sacarosa posterior a formación inicial de biopelícula
Grupo experimental: 22 muestras	Placas de cultivo 2 (P2) y placa de cultivo 3 (P3)	Se exponen a sacarosa al 10% 4 veces al día por 5 días

Para el cálculo del tamaño de muestra se consideró un riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,2. Se asumió una desviación estándar común de 20 (Colil, 2019), con una precisión de la estimación de más menos 8 unidades con una tasa de pérdidas de seguimiento del 1%. El tamaño muestral requerido fue de un total de 21 unidades de observación, en base a estudios previos con resultados positivos

utilizando un tamaño muestral similar (Ahumada, 2017) y al programa en línea Granmo.

Se recolectó también una muestra de 50 mL de saliva no estimulada, que fue obtenida de tres sujetos voluntarios sin enfermedades sistémicas, no fumadores, habiendo realizado una correcta higiene oral y sin consumir alimentos ni líquidos al menos 2 horas antes de la recolección. Cada voluntario utilizó un tubo de centrífuga de 50 mL Falcon™ para depositar la saliva, y la recolección se realizó el día anterior a su utilización.

6.2.2 Preparación de las muestras

Bloques de esmalte

De cada molar se obtuvieron 2 cortes que contenían esmalte con dentina subyacente, y que fueron realizados utilizando instrumental rotatorio de alta velocidad con una piedra de diamante, forma de aguja, grano azul de 0,12 mm (ISO 806.314.166.524.012) y obtenidos de las caras menos convexas que presentara cada molar. Después se utilizó un disco de carburo de silicio (carburundum) en instrumental rotatorio de baja velocidad para desgastar los cortes hasta obtener bloques de 3x3x3 mm (Figura 2). Los bloques obtenidos fueron pulidos con piedras de carburo de silicio de grano 600-4000, posteriormente limpiados con ultrasonido y cada uno fue conservado en un tubo de microcentrífuga de 2 mL marca Eppendorf® con Timol 2% hasta el día de su utilización.

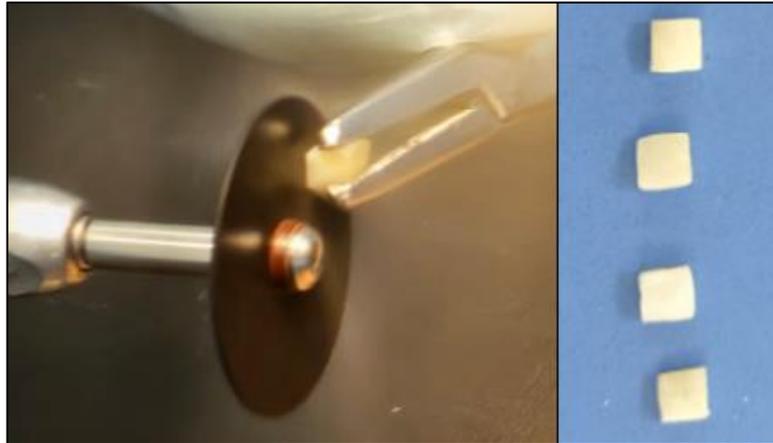


Figura 2: Proceso de corte de muestras de esmalte. Imagen obtenida en el proceso de preparación de las muestras de este estudio. A la izquierda se ve el disco de carburundum dando forma a la muestra de esmalte hasta alcanzar su medida de 3x3x3 mm, y a la derecha se ven las muestras de esmalte ya cortadas del tamaño requerido.

Saliva

La saliva recolectada desde voluntarios sanos fue mezclada en una sola muestra para diversificar la composición de ésta, y se dividió en 2 tubos de centrifuga de 50 mL marca Falcon™ y centrifugada a 4.500 rpm por 20 minutos, a 4°C. Luego de esto, la saliva fue filtrada bajo campana de flujo laminar. Esto fue realizado mediante filtros tipo *Sterile Syringe Filter* de 0.22 µm marca EDLAB y una jeringa de 20 mL. Este proceso fue realizado dos veces para asegurar la esterilidad de la saliva. Para corroborar la ausencia de bacterias se sembraron 200 µL de saliva filtrada con un rastrillo en césped en dos placas de Petri (100 µL en cada placa) con agar sangre, que luego fueron incubadas, una en microaerofilia y la otra en condición de aerobiosis, a 37°C durante 24 horas. Se observaron las placas bajo la lupa para confirmar la ausencia de bacterias.

La saliva se almacenó a 4°C hasta el momento de su utilización.

6.2.3 Montaje de las muestras

Se fabricaron armazones o estructuras metálicas con alambre de ortodoncia de 0,8 mm con ayuda de un alicate para los 32 bloques de esmalte. Los armazones se utilizaron para mantener las muestras en suspensión en los pocillos de las placas de cultivo.

Se extrajeron los bloques de los tubos de centrifuga de 2mL en los que estaban almacenados y se enjuagaron de forma profusa con agua destilada.

Las muestras fueron secadas con papel absorbente y fijadas en los armazones de la siguiente manera: Con un *microbrush* se colocó 1 capa de adhesivo universal *One Coat Bond SL* de la marca Coltene en la cara dentinaria del bloque y se le aplicó aire con una suave presión de la jeringa triple. Se polimerizó el adhesivo por 20 segundos con una lámpara de fotocurado y se colocó una pequeña porción de resina compuesta fluída *Filtek* de la marca 3M™ sobre el adhesivo. Se posicionó el armazón sobre la resina, se cubrió con otra porción de resina y se polimerizó por 40 segundos (Figura 3). Se verificó que no hubiera adhesivo ni resina en el esmalte de la muestra.

Una vez montados todos los bloques en sus armazones, se procedió a colocar cada bloque con su armazón en un tubo de centrifuga marca Falcon™ de 50 mL con agua destilada suficiente para que quedara sumergido.

Estos se mantuvieron de esta forma hasta el día de su utilización.

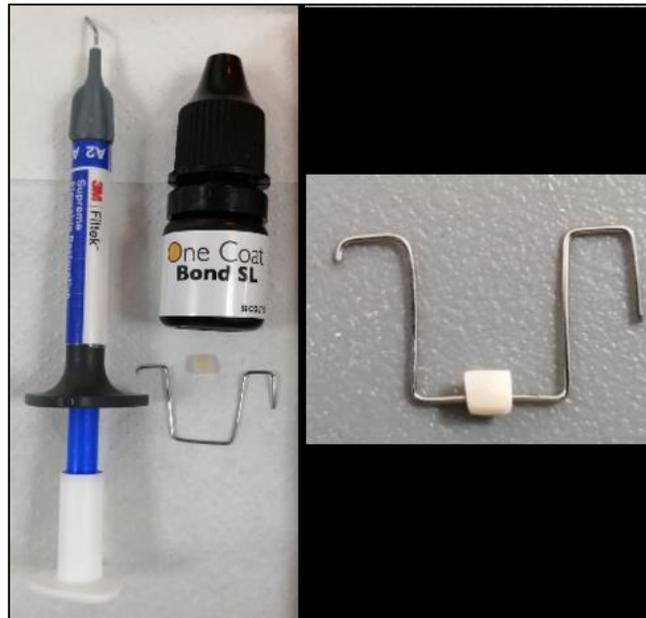


Figura 3: Montaje de las muestras. Imagen obtenida en el proceso de la adhesión de las muestras de esmalte a su armazón. En la imagen de la izquierda se ven la resina, adhesivo, armazón y muestra de esmalte. En la imagen de la derecha se ve la muestra de esmalte ya montada en su armazón.

6.2.4 Procesos para la formación de biopelícula monoespecie de *Streptococcus mutans*

Como primer paso, se esterilizaron en autoclave las muestras de esmalte con sus armazones en sus respectivos tubos Falcon™ por 30 minutos, a 125°C.

Inóculo bacteriano

Se sembró 100 µL de un cultivo líquido de la cepa de colección *Streptococcus mutans* ATCC 25175 proporcionada por la Dra. Patricia Palma F. del laboratorio de microbiología e inmunología oral (Lab Mio) de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, en agar TYCS y se incubó durante 24 horas a 37°C en condiciones de microaerofilia. Posterior a esto se realizó un análisis macro y micromorfológico para verificar la ausencia de contaminación con hongos o

presencia de otras bacterias. Del agar se resembraron 100 μ L de *S. mutans* en caldo BHI estéril en torno a un mechero de gas encendido para mantener esterilidad de la zona de trabajo, y se incubaron por otras 24 horas en las mismas condiciones anteriores. Esta suspensión constituyó “el inóculo bacteriano”.

Película salival adquirida

Para la formación de la película salival adquirida, bajo campana de flujo laminar y con ayuda de una pipeta, se depositó 3,5 mL de saliva microfiltrada en una placa estéril de 12 pocillos y, con una pinza estéril, se retiraron los bloques de esmalte con sus armazones de sus tubos respectivos y fueron colocados de a 2 en cada uno de los 12 pocillos, como se esquematiza en la Figura 4. Una vez colocadas todas las muestras, se tapó la placa y se llevó a una incubadora a 37°C por 30 minutos, agitando la placa de forma manual cada 3 minutos. Este procedimiento se repitió con las 8 muestras restantes.

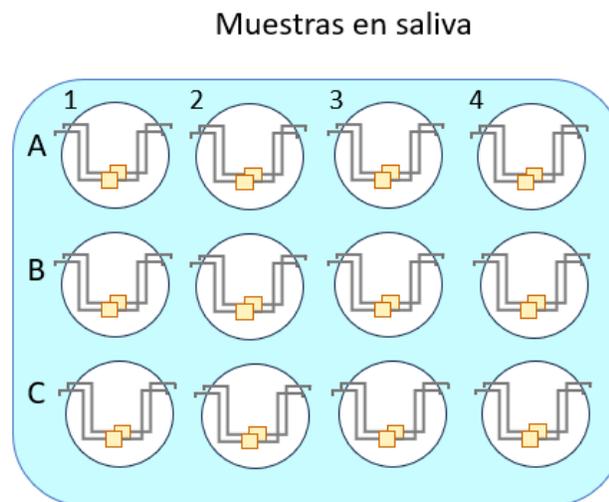


Figura 4: Esquema de la disposición de las muestras en la placa con saliva. Las muestras montadas en sus armazones se ubicaron en los pocillos con saliva filtrada para generar la película salival adquirida.

Formación de biopelícula

En un tubo de ensayo estéril y en torno a un mechero de gas encendido, se ajustó el inóculo bacteriano a 0,5 McFarland adicionando caldo BHI estéril, mediante un espectrofotómetro UV-Vis de haz dividido HALO-10, marca Dynamica™ a 600 nm de longitud de onda, hasta lograr una absorbancia de 0,125.

En torno a un mechero de gas encendido, en un frasco Schott Duran® estéril de 200 mL, se realizó la siguiente preparación, obteniendo 150 mL de ésta:

- 128,75 mL de caldo BHI con glucosa 0,1mM
- 6,88 mL del inóculo bacteriano ajustado a 0,5 McFarland
- 14,38 mL de sacarosa al 10%

Se vertieron 4 mL de la preparación en los pocillos de 3 placas nuevas de 12 pocillos. Se trasladaron con una pinza estéril las 24 muestras desde la placa con saliva a 2 de las placas nuevas con la preparación, y se realizó lo mismo con las 8 restantes posterior a su formación de película salival adquirida al igual que las 24 muestras anteriores, como se muestra en la Figura 5.

Ya distribuidas las muestras en sus placas, fueron incubadas en condiciones de microaerofilia, a 37°C, por 36 horas.

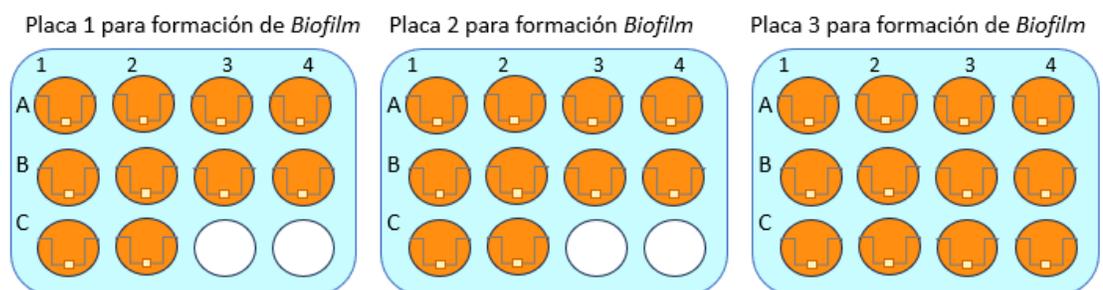


Figura 5: Esquema de la distribución de las muestras en placas 1, 2 y 3. Las muestras con la película salival adquirida formada, fueron dispuestas en las placas de cultivo con la preparación de caldo BHI más glucosa 0,1 mM, inóculo bacteriano y sacarosa 10% para la formación de *Biofilm* monoespecie de *S. mutans*

6.2.5 Proceso de desmineralización:

Las muestras del grupo experimental fueron tratadas para generar una desmineralización compatible con una lesión de caries no cavitada, *in vitro*, mediante la exposición de las muestras a sacarosa 10% por 5 minutos, 4 veces al día por 5 días consecutivos.

Se rotularon las placas para las muestras como P1, P2 y P3, y las placas para el suero y la sacarosa.

Primero se dispensó suero en los pocillos de la placa rotulada para esto y sacarosa 10% en los pocillos de su placa correspondiente.

Luego se dispensó de caldo BHI con glucosa 0,1 mM en cada uno de los 10 pocillos de P1 y P2, al igual que en los 12 de P3.

Después se procedió a retirar las placas con las muestras de la incubadora y también se dispusieron en la campana. Las placas, hasta este punto, se esquematizan en la Figura 6.

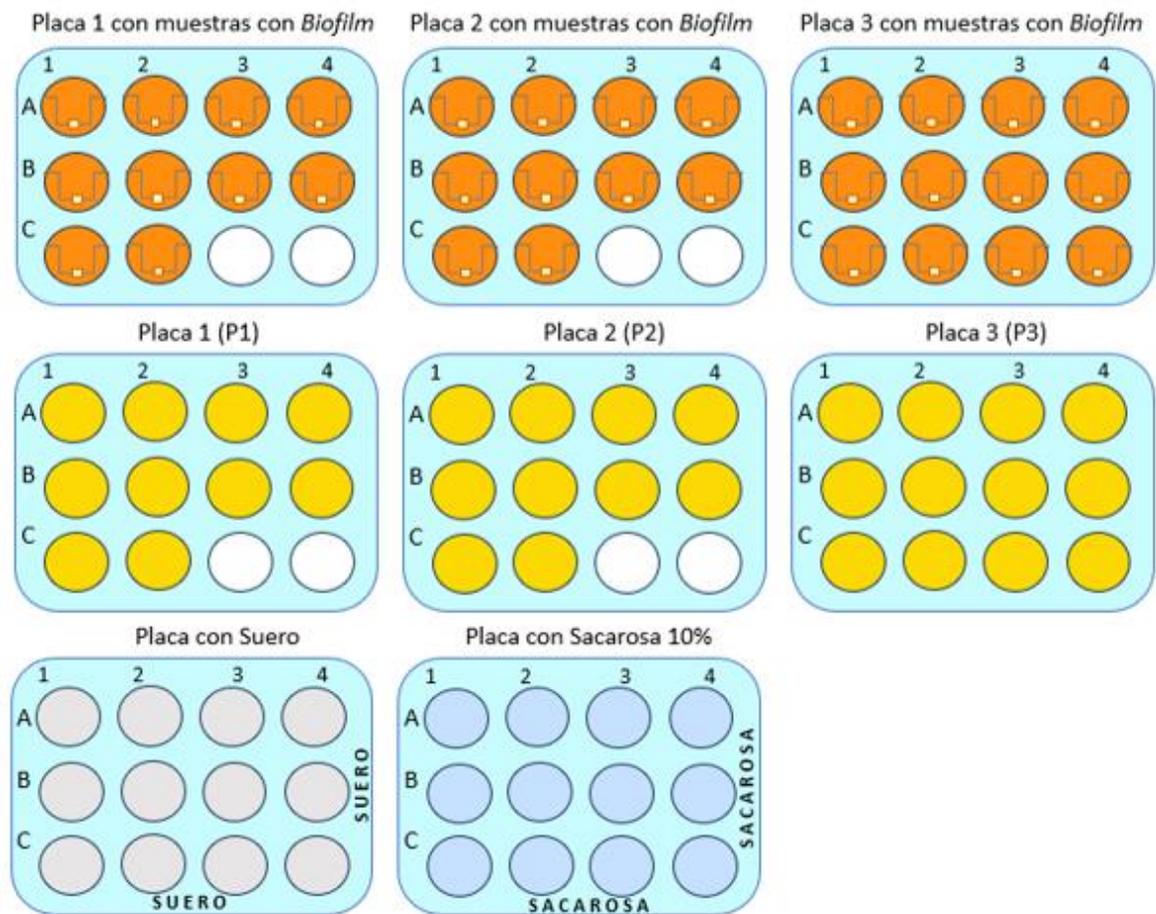


Figura 6: Esquema de las placas y sus contenidos antes de la primera exposición a sacarosa 10%. Las Placas 1, 2 y 3 con las muestras de esmalte, contienen a éstas y la preparación de caldo BHI con glucosa 0,1 mM, inóculo bacteriano ajustado a 0,5 McFarland y sacarosa 10%. Las Placas 1, 2 y 3 nuevas, contienen caldo BHI con glucosa 0,1 mM. Se observan también las placas con suero y sacarosa, cada una rotulada con su contenido.

Se retiraron las muestras de las placas antiguas y se distribuyeron en las placas nuevas con caldo, 10 en P1, 10 en P2 y 12 en P3. Esto con el objetivo de mantener vivas a las bacterias del inóculo.

La primera exposición se realizó a P2, en que se retiró con una pinza estéril la primera muestra y se depositó en el primer pocillo de la placa con sacarosa, momento en el que comenzó el conteo de los 5 minutos de la exposición.

A continuación de la primera, se trasladó el resto de las muestras a los pocillos con sacarosa.

Pasados los 5 minutos, se retiró la primera muestra de la sacarosa, y se sumergió 3 veces en el primer pocillo de la placa con suero para lavar la sacarosa. Posterior a esto se llevó nuevamente a su pocillo correspondiente en la P2. Esto se repitió para el resto de las muestras y se realizó el mismo procedimiento para P3. Las muestras de P1 no se expusieron a sacarosa. Este proceso puede verse en el esquema de la Figura 7.

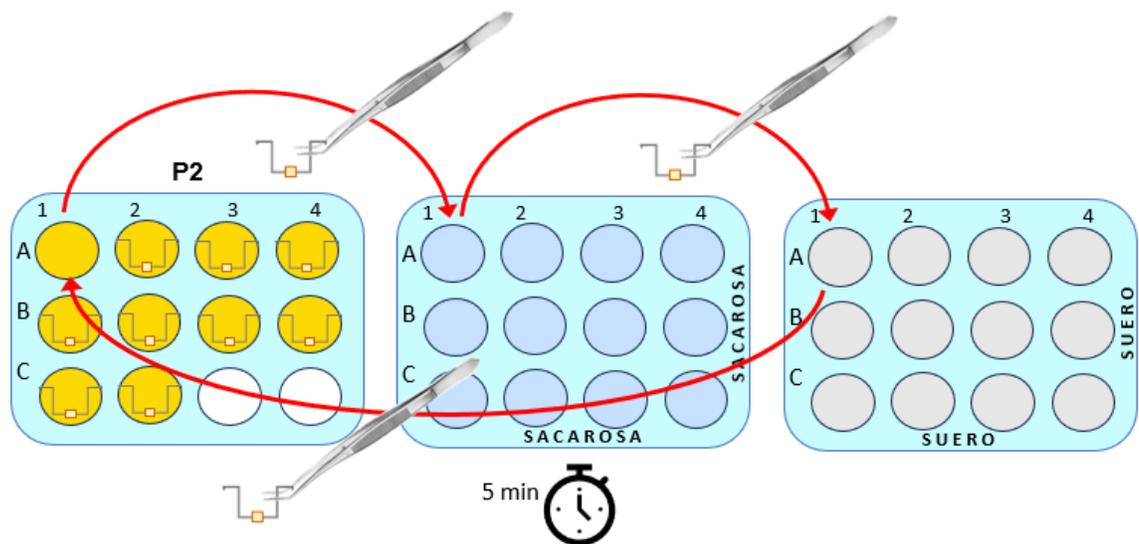


Figura 7: Esquema del proceso de exposición de las muestras a Sacarosa 10%. Se observa el flujo que se realizó a cada muestra a través de las placas con sus diferentes contenidos, y el tiempo que se expusieron a sacarosa 10%.

Las 3 placas fueron tapadas y llevadas a incubación en microaerofilia, a 37°C hasta la siguiente exposición.

Al inicio de cada jornada del experimento se cambió el caldo de cada placa por caldo estéril fresco, bajo campana, retirando el caldo antiguo y depositando el nuevo caldo en los pocillos.

La síntesis del experimento puede verse en la Figura 8.

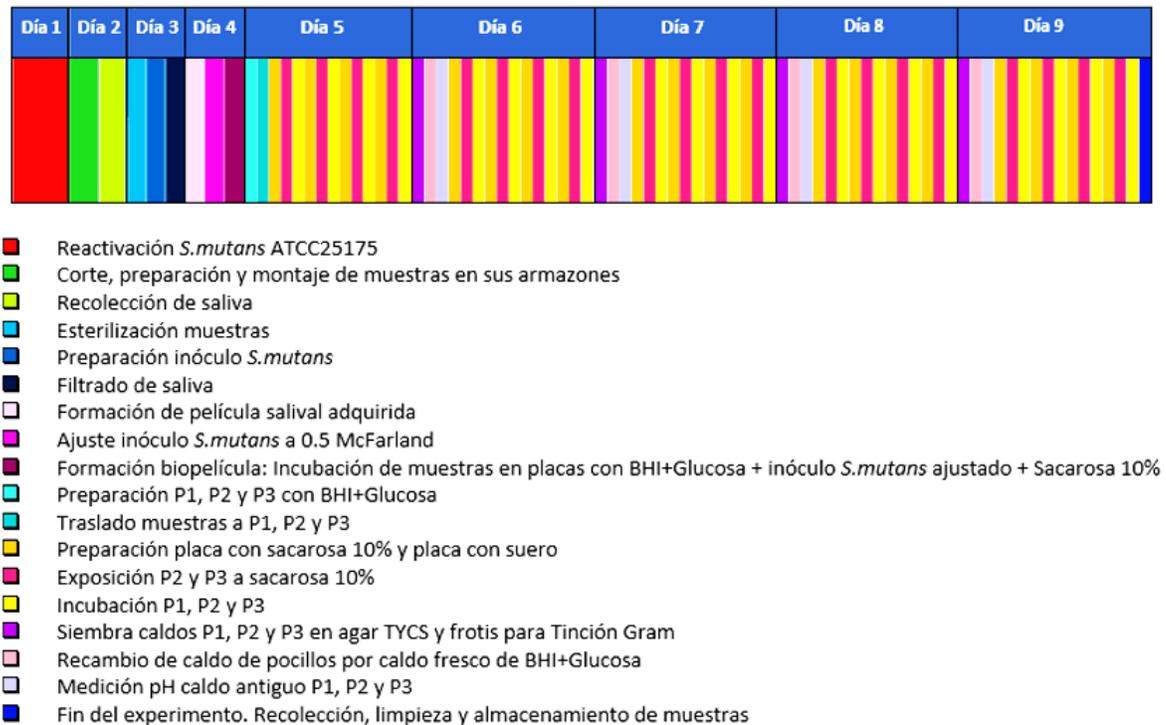


Figura 8: Síntesis del modelo *in vitro*. Se observan los días en los que se desarrolló el experimento y las actividades realizadas.

6.2.6 Verificación de viabilidad y pureza de los cultivos

Al principio de cada jornada, antes del inicio de las exposiciones, lo primero que se realizó fue la siembra del caldo de cada placa en agar TYCS, y se tomó una alícuota en un portaobjeto para realizar tinción Gram.

Se tomaron las muestras del fondo de los pocillos y se sembraron en el agar de cada placa. Posteriormente se incubaron las placas en microaerofilia, por 24 horas, a 37°C. Este procedimiento se realizó 2 veces el quinto día para corroborar la ausencia de contaminación externa hasta el último momento y la viabilidad del cultivo.

Pasadas las 24 horas de cada siembra, se realizó el análisis macromorfológico de cada segmento de las placas de Petri mediante su observación bajo lupa estereoscópica.

Para la tinción Gram se tomó una alícuota de un pocillo al azar de cada placa y se realizó un frotis en un portaobjetos que se sometió a tinción Gram para posteriormente ser observado bajo microscopio Axiostar Plus de Carl Zeiss®.

6.2.7 Medición pH de caldos

Con el objetivo de determinar la acidificación del medio por parte de la biopelícula de *S. mutans*, al inicio de cada jornada, antes del cambio de caldo a caldo fresco, se procedió a retirar los caldos antiguos de las placas y se realizó la medición de pH de cada caldo con el medidor de pH de sobremesa Orion Star™ A211 (Thermo Scientific™).

6.2.8 Eliminación de biopelícula y recolección de las muestras

El quinto y último día de experimento, después de la última exposición a sacarosa, se retiró las muestras de sus pocillos, fueron removidas de sus armazones y se cepillaron utilizando un cepillo suave, se les agregó gluconato de clorhexidina al 0,12% y finalmente enjuagadas con agua destilada. Posteriormente fueron introducidas en tubos de microcentrifuga Eppendorf® con agua destilada estéril, rotulados con el número de la muestra y almacenados a la espera de la medición de microdureza.

6.3 Medición de microdureza superficial de ambos modelos

Posterior al periodo experimental se realizó la medición de la microdureza superficial utilizando el microdurómetro de Vickers Struers Duramin (Estados Unidos) del Laboratorio de Propiedades Mecánicas perteneciente al Departamento

de Ciencia de los Materiales de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile (Figura 9).

Las muestras del modelo *in situ* fueron previamente hidratadas con timol al 2% por 48h, y posicionadas en el microdurómetro en una base de acrílico con cera adhesiva (Figura 10).

Las muestras del modelo *in vitro* se recolectaron de sus tubos de microcentrífuga y se posicionaron en el microdurómetro en una base de cera amarilla (Figura 11).

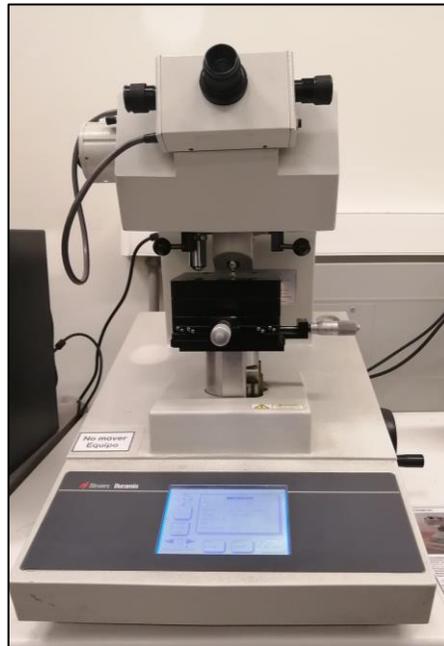


Figura 9: Microdurómetro de Vickers Struers Duramin (Estados Unidos). Imagen tomada en el Laboratorio de Propiedades Mecánicas de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile. Equipo utilizado para medir la microdureza de las muestras de esmalte.



Figura 10: Base de acrílico para posicionar muestras en microdurómetro. Imagen obtenida de este estudio. Las muestras del modelo *in situ* fueron ubicadas en esta base con cera adhesiva para medir su microdureza.



Figura 11: Muestra de esmalte en microdurómetro. Imagen obtenida de este estudio. Muestra de esmalte del modelo *in vitro* en base de cera amarilla para medir su microdureza.

A cada uno de los 20 bloques de esmalte del modelo *in situ* se le realizó 3 indentaciones con una carga de 1,96 N durante 20 segundos y se les calculó el promedio de las 3 mediciones obtenidas.

A los 32 bloques de esmalte del modelo *in vitro* se les realizó 3 indentaciones (Figura 12) en con una carga de 1,96 N durante 15 segundos e igualmente se calculó el promedio de las 3 mediciones.

Los valores de microdureza calculados por el equipo se realizan mediante la siguiente fórmula: Microdureza Vickers (VH) = $(1,8544 \times P) \times 103 / d^2$ HV: microdureza de Vickers P: test de carga aplicada (N) d: promedio de las diagonales de la indentación (mm) (Moore & Booth, 2015).

$$HV = \frac{1.8544 \times P}{d^2}$$

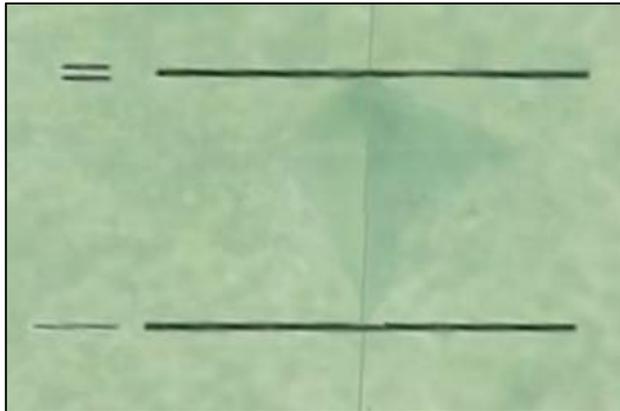


Figura 12: Indentación en bloque de esmalte. Imagen obtenida en el microindentador. El rombo corresponde a la indentación realizada por el microindentador sobre la muestra de esmalte y las líneas I y II determinan la medida de una de las diagonales del rombo.

Plan de análisis de datos: En la presente investigación se aplicó un análisis estadístico descriptivo. Los datos de ambos modelos fueron codificados e ingresados a una base de datos en archivo Excel Office para Windows y el programa STATA. Se realizó un análisis descriptivo de los datos de microdureza de las 24 muestras del modelo *in vitro* que fueron sometidas al desafío cariogénico y de las 20 muestras del grupo control del modelo *in situ*.

Finalmente, se calculó la variabilidad de la microdureza para las muestras de cada modelo y se realizó una comparación de carácter descriptiva entre ambos modelos.

7. RESULTADOS

7.1 Modelo *in vitro*

7.1.1 Formación de biopelícula en las muestras de esmalte

Se verificó la formación de biopelícula monoespecie de *S. mutans* en las muestras mediante inspección visual, observándose una capa blanquecina, densa y aspecto rugoso sobre las superficies de las muestras de esmalte sumergidas en los pocillos con caldo BHI con glucosa, que fue creciendo y abarcando parte del armazón metálico que estuvo sumergido en el caldo (Figura 13).

Además se evidenció la presencia de biopelícula al haber depósitos de *S. mutans* en el fondo de los pocillos (Figura 14).

Las muestras de la P1, que eran el grupo control y que no se expuso a sacarosa posterior a la formación de biofilm al principio del experimento, mostraron sólo una leve formación de biopelícula, pero menos densa que las de P2 y P3 (Figura 14).

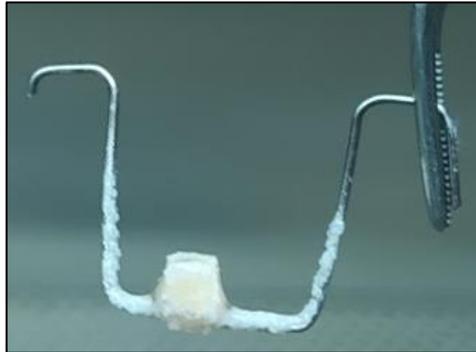


Figura 13: Muestra de esmalte en su armazón. Imagen obtenida de este estudio. Se observa la formación de biopelícula con aspecto blanquecino y rugoso.

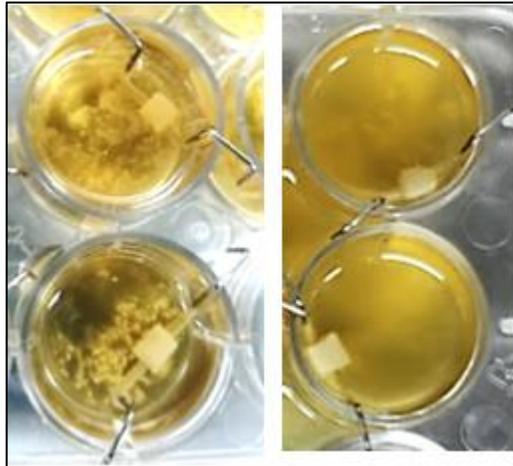


Figura 14: Muestras de distintas placas con biopelícula. Imagen obtenida de este estudio. Se observa P2 con biopelícula densa y muestras de P1 con biopelícula muy escasa

7.1.2 Controles de viabilidad y pureza de *Streptococcus mutans*

En el análisis del agar TYCS con la cepa de *S. mutans* ATCC 25175 después de ser incubada durante 24 horas a 37°C, se observó un crecimiento positivo de las colonias y ausencia de contaminación con hongos u otro tipo de bacterias (Figura 15).

Además, los controles de viabilidad y pureza fueron positivos para todos los pocillos con inóculo de *S. mutans*, observándose colonias en todos los segmentos del agar de cada pocillo (Figura 16).

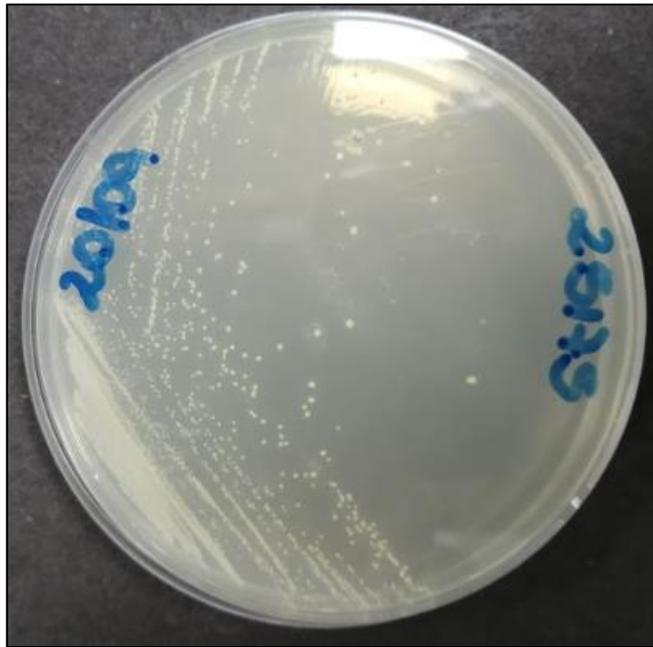


Figura 15: Agar TYCS con cepa de *S. mutans* ATCC 25175. Imagen obtenida de este estudio. Se observan colonias redondas, blancuecinas y delimitadas.

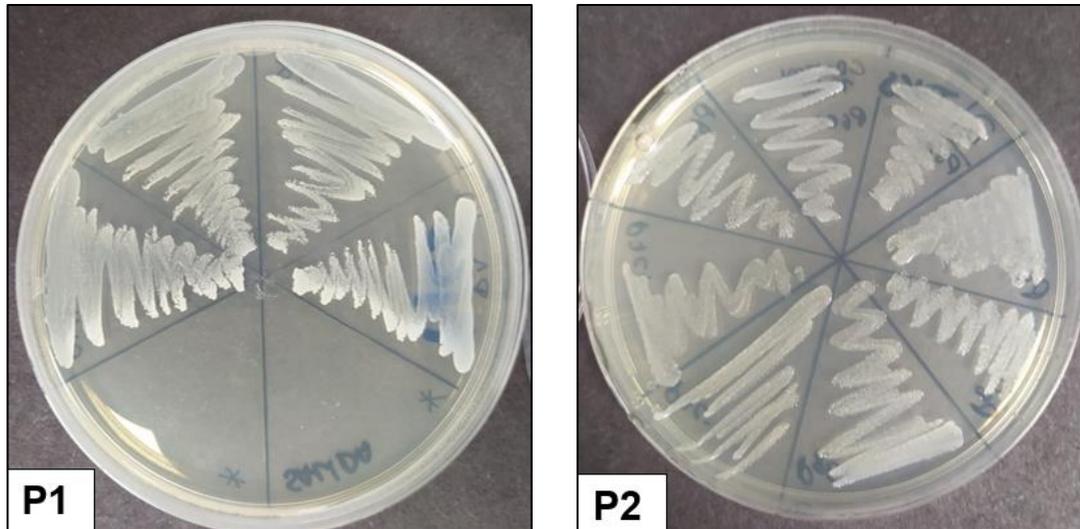


Figura 16: Agar TYCS con siembras de P1 y P2. Imagen obtenida de este estudio. Se observan colonias características de *S. mutans*.

En la observación al microscopio óptico de los frotis de caldo de cada pocillo, se identificaron células cocáceas, de pared Gram positivo agrupadas en pares o cadenas compatibles con la micromorfología y agrupación de *S. mutans*, y no hubo presencia de elementos que indicaran contaminación de la muestra (Figura 17).

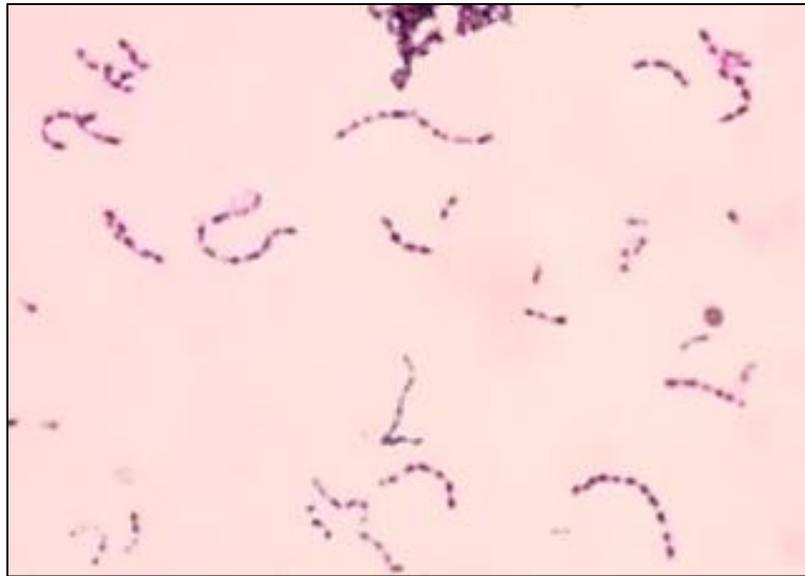


Figura 17: Frotis de un pocillo de P3 con tinción Gram en microscopio óptico. Imagen obtenida de este estudio. Se observan células cocáceas de reacción tintorial Gram positivo agrupadas en cadenas.

7.1.3 Medición de pH

El pH promedio de los 5 días del tratamiento con sacarosa de P1 y P2 fue de 4,76 para ambas, y para P1, en que las muestras fueron expuestas a sacarosa de manera inicial sólo para la formación de biofilm (grupo control) fue de 5,2 (Tabla 4).

Tabla 4. pH de caldos de cultivo de P1, P2 y P3 según día del experimento.

Día del experimento	pH P1	pH P2	pH P3
1	4,2	4,3	4,3
2	5,2	5,0	5,0
3	5,2	4,9	4,9
4	5,4	4,7	4,7
5	6,0	4,9	4,9
Promedio pH	5,2	4,76	4,76

7.2 Resultados de prueba de microdureza de Vickers

7.2.1 Modelo *in situ*

Se realizó prueba de microdureza a las 20 muestras correspondientes al grupo control, que fueron expuestas a sacarosa. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Análisis descriptivo, valor de la microdureza superficial obtenida en durómetro en modelo *in situ*. El grupo control fue expuesto únicamente a sacarosa.

Grupo de estudio modelo <i>in situ</i>	Media MDS (HV)	Desviación estándar	N
Control	180,59	59,66	20

7.2.2 Modelo *in vitro*

Se le realizó prueba de microdureza a las 22 muestras expuestas a sacarosa (P2 y P3). Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Análisis descriptivo, valor de la microdureza superficial obtenida en durómetro, posterior a las exposiciones a sacarosa en modelo *in vitro*.

Grupo de estudio modelo <i>in vitro</i>	Media MDS (HV)	Desviación estándar	Mín	Max	N
Experimental (P2 y P3)	135,27	20,038	102	169	22
Control (P1)	192,6	26,545	163,67	250,67	10

7.2.3 Comparación entre modelo *in situ* e *in vitro* en cuanto a microdureza

En cuanto a los resultados obtenidos de la medición de la microdureza de las muestras de los modelos *in vitro* e *in situ*, se calculó la desviación estándar y la media con el objetivo de comparar la variabilidad de las lesiones de caries inducidas en el modelo *in situ* y el *in vitro*.

La desviación estándar del modelo *in situ* fue de 59,66, mientras que la del *in vitro* fue de 20,038. En estos resultados demuestran que hay una diferencia evidente entre las desviaciones estándar de ambos modelos, siendo ésta de 39,622, existiendo una mayor desviación estándar en la microdureza entre las lesiones de caries inducidas en el modelo *in situ* que en el *in vitro*, como se ve en la Tabla 7.

Tabla 7. Comparación entre desviaciones estándar de modelos *in situ* e *in vitro*.

Modelos	Desviación Estándar (DE) de microdureza de las muestras	Diferencia entre DE
<i>In Situ</i>	59,66	39,622
<i>In Vitro</i>	20,038	

8. DISCUSIÓN

Se han realizado múltiples estudios para generar caries de forma artificial, utilizando modelos *in situ* como *in vitro*, pero no hay estudios en que se compare la variabilidad de las lesiones de caries inducidas con cada modelo.

En este estudio se llevaron a cabo dos modelos para la inducción de caries, uno *in situ* y otro *in vitro*, en los que se midió la microdureza superficial de las muestras con caries inducidas, y se compararon las variabilidades en los resultados de cada modelo. El resultado fue que en el modelo *in situ* hay una mayor variabilidad de las lesiones de caries inducidas que en el modelo *in vitro*, por lo que el modelo *in vitro* sería más reproducible y obtener resultados menos dispersos.

La evaluación de la microdureza se realizó como método elemental para valorar la desmineralización de la superficie dentaria, proceso que ocurre en una lesión de caries de forma natural (Pitts & Zero, 2016), por lo que es un indicador para comprobar la generación de una lesión de caries en las muestras (Featherstone et al., 1983; Gutiérrez & Reyes, 2001).

Para verificar la formación de lesiones de caries mediante la evaluación de la microdureza de Vickers, se debe conocer los valores de microdureza superficial del esmalte sano, que es de 283 – 374 HV (Chun et al., 2014), lo que se condice con valores muy similares obtenidos en otros estudios *in situ* (Azán, 2019; Colil, 2019; Muñoz, 2019) e *in vitro* (Jara, 2017; Majithia et al., 2016; Padilla, 2018). Considerando estos valores y los del promedio de la microdureza obtenida en las muestras del modelo *in situ* (180,59 HV) e *in vitro* (135,27), se puede afirmar que son compatibles con una lesión de caries.

En el modelo *in situ* se generaron las lesiones de caries estandarizadas según un modelo previamente establecido (Colil, 2019), en que se utilizó el mismo dispositivo pero con menos muestras en cada aparato removible, pero se utilizaron

6 aparatos para cada grupo, por lo que hubo 6 voluntarios para el grupo que exponía las muestras a sacarosa. Además el estudio constó sólo de 14 días y no 28 como en el presente estudio. Las instrucciones de uso del aparato fueron las mismas. Al igual que en este estudio, se midió la microdureza de Vickers de las muestras al finalizar el experimento, con una carga de 1,961 N por 10 segundos. Los resultados de microdureza tuvieron una desviación estándar de 82, que es mayor a la obtenida en el modelo *in situ* realizado para este estudio, que fue de 59,66, y por lo tanto mayor a la desviación estándar del modelo *in vitro*, que fue de 20,038.

En cuanto al modelo *in vitro*, éste se basó en un modelo de caries descrito por Ccahuana-Vásquez & Cury, 2010, en que se utilizaban muestras de esmalte bovino y se las exponía a sacarosa 10% por 1 minuto, 8 veces al día por 5 días, previa formación de una biopelícula monoespecie de *S. mutans*. En una adaptación de este modelo (Ahumada, 2017; Jara, 2017; Padilla, 2018) se utilizaron muestras de esmalte humano. En los experimentos de Ahumada, Jara y Padilla, las muestras se dividieron en 3 zonas, una para control, a la que se midió la dureza de Vickers antes del experimento, otra que fue expuesta a sacarosa 10% y una tercera expuesta a probiótico o alguna sustancia remineralizadora. Las muestras se expusieron a sacarosa 4 veces al día, por 5 minutos cada vez.

Para medir microdureza se utilizó una carga de 1,961 N por 10 segundos.

Pese a que en estos experimentos no se calculó desviación estándar de las muestras expuestas a sacarosa, se pudo calcular en base a los datos expuestos en cada estudio. El de Padilla arrojó una desviación estándar de 35,533, el de Jara 51,433, siendo mucho mayor que la del estudio actual (20,038) pero aun así, menor que la del estudio *in situ* (59,66).

En los estudios *in vitro* e *in situ* las condiciones son muy diferentes, destacando principalmente el ambiente en el que se desarrollan, la *in situ* en la boca de un ser humano, y el *in vitro* en el laboratorio. Naturalmente las condiciones en el

laboratorio son más controlables que en la boca, aunque ambos experimentos involucran al componente humano, lo que puede llevar a más de un error en ambos modelos. He ahí la importancia de anotar todos los pasos, equivocaciones y errores en una bitácora de laboratorio, en caso del modelo *in vitro*, y de controlar estrictamente el cumplimiento del protocolo por parte de los participantes en el modelo *in situ*. En el modelo *in situ* se debe considerar, además, que hay mucho menos control sobre las muestras, ya que están a merced de los voluntarios, que pueden o no seguir las instrucciones y omitir información o francamente mentir al respecto del cumplimiento del acuerdo.

En el modelo *in vitro* se llevaron a cabo varios experimentos a la vez, por lo que junto a las placas 1, 2 y 3, había una placa 4 que involucraba el uso de un probiótico, por lo que fue más lento que lo que hubiera sido realizar el experimento por sí sólo.

Uno de los inconvenientes del experimento fue que se desprendieron de sus armazones 2 muestras de P2, pero no se consideraron como perdidas, ya que se siguieron exponiendo a sacarosa, trasladándolas entre placas con una pinza desde los márgenes de la muestra para no interferir en la biopelícula formada. Esto fue un posible error de montaje y/o manipulación de las muestras, ya que lo más probable es que al ser montadas las muestras no se haya colocado suficiente resina sobre el armazón, o que al manipular las muestras se haya sujetado desde el centro del armazón, donde estaba adherida la muestra en vez de uno de los extremos.

En cuanto a los horarios de exposición, los intervalos cambiaron bastante entre los días, variando de exposiciones cada 2 horas a cada 4 horas en distintos momentos del día debido a distintas razones como la existencia de un horario de cierre del laboratorio determinados días, inicio de exposiciones muy tarde por realizar la siembra de los caldos de cada pocillo en agar antes de realizar el cambio de caldos, y compromisos o imprevistos de los investigadores al momento de realizar las exposiciones.

En el modelo *in situ* se perdió una muestra durante el proceso de análisis de éstas, afectando el tamaño de la muestra (aunque no significativamente). Además no se pudo lograr un inicio simultáneo con todos los voluntarios en la fase experimental debido a un retraso del laboratorista y enfermedad de uno de los voluntarios.

En cuanto a las complicaciones reportadas de parte de los voluntarios durante el periodo experimental, algunos voluntarios reportaron incomodidad al usar el dispositivo y dificultades horarias para la aplicación de la sacarosa, sobre todo en días feriados, viajes y trabajo.

A parte de los errores antes mencionados, en los modelos *in situ* para inducir caries de manera artificial, en general, existen muchas más variables que en los modelos *in vitro*. La primera es la diferencia entre los voluntarios que utilicen el dispositivo, ya sea en cuanto a genética, hábitos, cantidad, calidad y composición de la saliva y características de los dientes. Es por esto que los parámetros experimentales clave que deben considerarse en el desarrollo de un modelo *in situ*, son las características de los sujetos voluntarios, el diseño físico del modelo, el tipo de tejido utilizado como sustrato, el método de evaluación del estado mineral, el diseño del estudio y el protocolo clínico (Zero, 1995). El cumplimiento del protocolo depende del voluntario, por lo que en este estudio se realizó un registro de las aplicaciones de sacarosa y probiótico de cada uno de los voluntarios para hacer el seguimiento del proceso y controlar el cumplimiento del protocolo.

En cuanto al modelo *in vitro*, la utilización de un modelo de biopelícula monoespecie de *S. mutans* puede ser considerado una desventaja, debido a que la composición de la biopelícula dental involucra cientos de especies bacterianas (Padilla, 2018), lo que hace imposible reproducir exactamente esta complejidad en un modelo *in vitro* (Fernández et al., 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 (Ccahuana-Vásquez & Cury, 2010; Díaz-Garrido et al., 2016; Steiner-Oliveira et al., 2007) y debido a que posee propiedades únicas para metabolizar la sacarosa, el hidrato de carbono más cariogénico proveniente de la dieta (Leme et al., 2006).

Con respecto a los controles de viabilidad y pureza de *Streptococcus mutans* del modelo *in vitro*, considerando que las distintas especies de *Streptococcus* poseen una morfología muy similar entre sí, para confirmar la presencia única de *S. mutans*, se podrían haber utilizado otros métodos más específicos, como la siembra en medios selectivos, como MSB (mitis-salivarius-bacitracina), que contiene entre otros compuestos sacarosa al 20% y como sustancias inhibidoras de otras bacterias telurito potásico, azul tripan, cristal violeta, y 0,2 U/ml de bacitracina (Gamboa, 2014; Liébana, 2010), pruebas bioquímicas como fermentación de rafinosa, manitol, melobiosa, trehalosa e inulina; hidrólisis de la esculina en presencia y ausencia de bilis; ureasa; hidrólisis de la arginina, y resistencia a la bacitracina (Gamboa, 2014).

Además está la secuenciación del ADN (Abranches et al., 2018) y la AP-PCR (arbitrarily primed PCR), que es rápida y reproducible, siendo de gran valor para distinguir especies de *S. mutans*, *S. sobrinus* y otras cepas de *Streptococcus* spp. orales (Truong et al., 2000).

Este estudio se realizó para validar modelos de investigación sobre lesiones de caries y no solo superficies sanas, de esta manera se pueden investigar efectos terapéuticos y no solo preventivos. En ambos modelos llevados a cabo en este estudio se induce caries de manera efectiva, siendo ambos válidos para ser utilizados como punto de partida en estudios de efectos terapéuticos de diferentes sustancias para remineralizar lesiones de caries. Sin embargo, cabe considerar la

mayor reproductibilidad y menor variabilidad entre las lesiones de caries inducidas por el modelo *in vitro* para obtener lesiones más estandarizadas en el experimento a realizar.

Se sugiere realizar más estudios comparando variabilidades de las lesiones de caries inducidas por diferentes modelos de estudio mediante variados parámetros como la microdureza de Vickers utilizada en los estudios realizados, densidad mineral, caracterización morfológica superficial, etc.

Además se podría realizar el mismo estudio con los mismos experimentos, evitando cometer los mismos errores para validar los resultados encontrados en éste, o buscar maneras de estandarizar aún más las variables, especialmente del modelo *in situ*, para disminuir la variabilidad en sus resultados.

9. CONCLUSIÓN

La variabilidad de las lesiones de caries artificiales inducidas en el modelo *in vitro* es menor que la variabilidad de las lesiones de caries artificiales inducidas en el modelo *in situ*.

En ambos modelos se logró positivamente la inducción de una caries artificial, que puede ser utilizada como base para el estudio de diferentes métodos terapéuticos para el tratamiento de las caries, teniendo una menor variabilidad y mayor control de las variables en el modelo *in vitro*, lo que debe ser considerado al momento de planificar el estudio.

Con el objetivo de validar y mejorar distintos modelos de estudio para la inducción de caries de manera artificial, se hace necesario realizar otros estudios de comparación de la variabilidad de los resultados.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou Neel, E., Aljabo, A., Strange, A., Ibrahim, S., & Coathup, M. (2016).

Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone.

International Journal of Nanomedicine, Volume 11, 4743-4763.

<https://doi.org/10.2147/IJN.S107624>

Abranches, J., Zeng, L., Kajfasz, J. K., Palmer, S. R., Chakraborty, B., Wen, Z. T.,

Richards, V. P., Brady, L. J., & Lemos, J. A. (2018). Biology of Oral

Streptococci. *Microbiology Spectrum*, 6(5), 6.5.11.

<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018>

Ahumada, J. T. (2017). *Efecto remineralizante de un agente a base de flúor y*

grafeno, sobre bloques de dentina desmineralizada, con un modelo de

biopelícula de Streptococcus mutans. Facultad de Odontología de la

Universidad de Chile.

Aires, C. P., Tabchoury, C. P. M., Del Bel Cury, A. A., Koo, H., & Cury, J. A.

(2006). Effect of Sucrose Concentration on Dental Biofilm Formed in situ

and on Enamel Demineralization. *Caries Research*, 40(1), 28-32.

<https://doi.org/10.1159/000088902>

Akkus, A., Karasik, D., & Roperto, R. (2017). Correlation between micro-hardness

and mineral content in healthy human enamel. *Journal of Clinical and*

Experimental Dentistry, 0-0. <https://doi.org/10.4317/jced.53345>

Alexandria, A. K., Nassur, C., Nóbrega, C. B. C., Branco-de-Almeida, L. S., dos

Santos, K. R. N., Vieira, A. R., Neves, A. A., Rosalen, P. L., Valença, A. M.

- G., & Maia, L. C. (2019). Effect of TiF4 varnish on microbiological changes and caries prevention: In situ and in vivo models. *Clinical Oral Investigations*, 23(6), 2583-2591. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2681-x>
- Azán, N. (2019). *Efecto del consumo de probiótico lactobacillus rhamnosus en la densidad mineral, dureza superficial y morfología superficial de esmalte en un modelo in situ de caries*. Universidad de Chile.
- Bohn, A. C. C. E., Vale, G. C., Padovani, G. C., Rodrigues, L. K. A., & Prado-Júnior, R. R. (2017). Sucrose Induced Dentin Demineralization in a Microcosm Biofilm Model. *International Journal of Odontostomatology*, 11(1), 107-112. <https://doi.org/10.4067/S0718-381X2017000100017>
- Bowen, W. H. (2013). Rodent model in caries research. *Odontology*, 101(1), 9-14. <https://doi.org/10.1007/s10266-012-0091-0>
- Bowen, W. H. (2016). Dental caries—Not just holes in teeth! A perspective. *Molecular Oral Microbiology*, 31(3), 228-233. <https://doi.org/10.1111/omi.12132>
- Buzalaf, M. A. R., Pessan, J. P., Honório, H. M., & ten Cate, J. M. (2011). Mechanisms of Action of Fluoride for Caries Control. En M. A. R. Buzalaf (Ed.), *Monographs in Oral Science* (Vol. 22, pp. 97-114). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000325151>
- Ccahuana-Vásquez, R. A., & Cury, J. A. (2010). S. mutans biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Brazilian Oral Research*, 24(2), 135-141. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242010000200002>

- Centers for Disease Control and Prevention. (2001). *Recommendations for using fluoride to prevent and control dental caries in the United States*.
<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5014a1.htm>
- Chhattani, B., Kulkarni, P., Agrawal, N., Mali, S., Kumar, A., & Thakur, N. (2021). Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of silver diamine fluoride, chlorhexidine varnish with conventional fluoride varnish as a caries arresting agent. An in vivo sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis study. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 39(4), 398. https://doi.org/10.4103/jisppd.jisppd_246_21
- Chun, K., Choi, H., & Lee, J. (2014). Comparison of mechanical property and role between enamel and dentin in the human teeth. *Journal of Dental Biomechanics*, 5(0), 5/0/1758736014520809.
<https://doi.org/10.1177/1758736014520809>
- Cieplik, F., Zaura, E., Brandt, B. W., Buijs, M. J., Buchalla, W., Crielaard, W., Laine, M. L., Deng, D. M., & Exterkate, R. A. M. (2019). Microcosm biofilms cultured from different oral niches in periodontitis patients. *Journal of Oral Microbiology*, 11(1), 1551596.
<https://doi.org/10.1080/20022727.2018.1551596>
- Colil, M. (2019). *Efecto del uso tópico del probiótico Lactobacillus Rhamnosus SP1 en un modelo de caries in situ*.
- Dagnino S., J. (2014). Muestras, variabilidad y error. *Revista Chilena de Anestesia*, 43(2). <https://doi.org/10.25237/revchilanestv43n02.04>

- Díaz-Garrido, N., Lozano, C., & Giacaman, R. A. (2016). Frequency of sucrose exposure on the cariogenicity of a biofilm-caries model. *European Journal of Dentistry*, 10(03), 345-350. <https://doi.org/10.4103/1305-7456.184163>
- Donald, R., Pradeep, P., & Wendelin, J. (2011). *Ciencia e ingeniería de materiales* (6.^a ed., pp. 221-223). Cengage Learning.
- Dornell, J. (2022, marzo 14). In Vivo vs In Vitro: Definition, Pros and Cons. *Technology Networks*. <https://www.technologynetworks.com/drug-discovery/articles/in-vivo-vs-in-vitro-definition-pros-and-cons-350415>
- Featherstone, J. D. B., Ten Cate, J. M., Shariati, M., & Arends, J. (1983). *Comparison of Artificial Caries-Like Lesions by Quantitative Microradiography and Microhardness Profiles*. 17(5), 385-391.
- Fernández, C. E., Fontana, M., Samarian, D., Cury, J. A., Rickard, A. H., & González-Cabezas, C. (2016). Effect of Fluoride-Containing Toothpastes on Enamel Demineralization and Streptococcus mutan Biofilm Architecture. *Caries Research*, 50(2), 151-158. <https://doi.org/10.1159/000444888>
- Ferracane, J. L. (2017). Models of Caries Formation around Dental Composite Restorations. *Journal of Dental Research*, 96(4), 364-371. <https://doi.org/10.1177/0022034516683395>
- Filoche, S. K., Soma, K. J., & Sissons, C. H. (2007). Caries-related plaque microcosm biofilms developed in microplates. *Oral Microbiology and Immunology*, 22(2), 73-79. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00323.x>

- Fischer, N. G., & Aparicio, C. (2021). The salivary pellicle on dental biomaterials. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 200, 111570.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111570>
- Fontana, M., Dunipace, A. J., Gregory, R. L., Noblitt, T. W., Li, Y., Park, K. K., & Stookey, G. K. (1996). An in vitro Microbial Model for Studying Secondary Caries Formation. *Caries Research*, 30(2), 112-118.
<https://doi.org/10.1159/000262146>
- Gamboa, F. (2014). Microbiological, Phenotypic, and Genotypic Characterization of *Streptococcus mutans*: Research Experiences. . . ISSN.
- Gutiérrez, M. P., & Reyes, J. (2001). Enamel hardness and caries susceptibility in human teeth. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 21(2), 36-40.
- Hara, A. T., & Zero, D. T. (2010). The Caries Environment: Saliva, Pellicle, Diet, and Hard Tissue Ultrastructure. *Dental Clinics of North America*, 54(3), 455-467. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.03.008>
- Jara, M. (2017). *Efecto remineralizante de un agente a base de flúor y grafeno sobre bloques de esmalte desmineralizados con un modelo de biopelícula de Streptococcus mutans*. Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.
- Karched, M., Ali, D., & Ngo, H. (2019). In vivo antimicrobial activity of silver diammine fluoride on carious lesions in dentin. *Journal of Oral Science*, 61(1), 19-24. <https://doi.org/10.2334/josnusd.17-0366>

- Kuriki, N., Asahi, Y., Sotozono, M., Machi, H., Noiri, Y., Hayashi, M., & Ebisu, S. (2021). Next-Generation Sequencing for Determining the Effect of Arginine on Human Dental Biofilms Using an In Situ Model. *Pharmacy*, 9(1), 18. <https://doi.org/10.3390/pharmacy9010018>
- Leme, A. F. P., Koo, H., Bellato, C. M., Bedi, G., & Cury, J. A. (2006). The Role of Sucrose in Cariogenic Dental Biofilm Formation—New Insight. *Journal of Dental Research*, 85(10), 878-887. <https://doi.org/10.1177/154405910608501002>
- Liébana, J. (2010). *Microbiología oral* (2^a ed. [reimp. 2010]). Interamericana-McGraw Hill.
- Lippert, F., & Lynch, R. J. M. (2014). Comparison of Knoop and Vickers surface microhardness and transverse microradiography for the study of early caries lesion formation in human and bovine enamel. *Archives of Oral Biology*, 59(7), 704-710. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.04.005>
- Majithia, U., Venkataraghavan, K., Choudhary, P., Trivedi, K., Shah, S., & Virda, M. (2016). Comparative evaluation of application of different fluoride varnishes on artificial early enamel lesion: An in vitro study. *Indian Journal of Dental Research*, 27(5), 521-527. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.195642>
- Marsh, P. D. (1995). *The role of microbiology in models of dental caries*. 244-254.
- Maske, T. T., van de Sande, F. H., Arthur, R. A., Huysmans, M. C. D. N. J. M., & Cenci, M. S. (2017). In vitro biofilm models to study dental caries: A systematic review. *Biofouling*, 33(8), 661-675. <https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1354248>

- Mathur, V. P., & Dhillon, J. K. (2018). Dental Caries: A Disease Which Needs Attention. *The Indian Journal of Pediatrics*, 85(3), 202-206.
<https://doi.org/10.1007/s12098-017-2381-6>
- Ministerio de Salud (Minsal). (2021). *Plan nacional de salud bucal 2021-2030*.
- Moore, P., & Booth, G. (2015). Mechanical testing of welds. En *The Welding Engineer's Guide to Fracture and Fatigue* (pp. 113-141). Elsevier.
<https://doi.org/10.1533/9781782423911.2.113>
- Moron, B. M., Comar, L. P., Wiegand, A., Buchalla, W., Yu, H., Buzalaf, M. A. R., & Magalhães, A. C. (2013). Different Protocols to Produce Artificial Dentine Carious Lesions in vitro and in situ: Hardness and Mineral Content Correlation. *Caries Research*, 47(2), 162-170.
<https://doi.org/10.1159/000345362>
- Muñoz, F. (2019). *Modelo insitu de caries dental: Estudio piloto*. Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.
- Muthanandam, S., Muthu, J., Mony, V., RI, P., & Lal K, P. (2020). Animal models in dental research – A review. *International Dental Journal of Student's Research*, 8(2), 44-47. <https://doi.org/10.18231/j.idjsr.2020.010>
- Nanci, A. (2018). *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function*. (9th ed.). Elsevier.
- Nazar C, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 67(1). <https://doi.org/10.4067/S0718-48162007000100011>

- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2022, marzo 15). *Salud bucodental*.
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>
- Padilla, M. (2018). *Efecto remineralizante de distintas concentraciones de un agente en base de fluor y grafeno en bloques de esmalte desmineralizado*.
- Paiva, S. M., Abreu-Placeres, N., Camacho, M. E. I., Frias, A. C., Tello, G., Perazzo, M. F., & Pucca-Júnior, G. A. (2021). Dental caries experience and its impact on quality of life in Latin American and Caribbean countries. *Brazilian Oral Research*, 35(suppl 1), e052. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0052>
- Parkinson, C. R., Hara, A. T., Nehme, M., Lippert, F., & Zero, D. T. (2018). A randomised clinical evaluation of a fluoride mouthrinse and dentifrice in an in situ caries model. *Journal of Dentistry*, 70, 59-66.
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.12.015>
- Pitts, N., & Zero, D. (2016). *White Paper on Dental Caries Prevention and Management*. 59.
- Pitts, N., Zero, D., Marsh, P., Ekstrand, K., Weintraub, J., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G., & Ismail, A. (2017). Dental caries. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17030.
<https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.30>
- Real Academia Española. (2005). *Diccionario Panhispánico de Dudas*.
<https://www.rae.es/dpd/in%20vivo>

- REAL ACADEMIA ESPAÑOLA: Diccionario de la lengua española* (23.^a (versión 23.6 en línea)). (s. f.). Recuperado 21 de febrero de 2023, de <https://dle.rae.es>
- Schilling, K. M., & Bowen, W. H. (1992). Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, *60*(1), 284-295. <https://doi.org/10.1128/iai.60.1.284-295.1992>
- Seladi-Schulman, J. (2019, agosto 19). *In Vivo vs. In Vitro: What Does It All Mean?* <https://www.healthline.com/health/in-vivo-vs-in-vitro#takeaway>
- Shahmoradi, M., & Swain, M. V. (2016). Quantitative characterization and micro-CT mineral mapping of natural fissural enamel lesions. *Journal of Dentistry*, *46*, 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.01.012>
- Steiner-Oliveira, C., Maciel, F. A., Rodrigues, L. K. A., Napimoga, M. H., Pimenta, L. A. F., Höfling, J. F., & Gonçalves, R. B. (2007). An in vitro microbial model for producing caries-like lesions on enamel. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, *6*(22), 1392-1396.
- Struillou, X., Boutigny, H., Soueidan, A., & Layrolle, P. (2010). Experimental Animal Models in Periodontology: A Review. *The Open Dentistry Journal*, *4*(1), 37-47. <https://doi.org/10.2174/1874210601004010037>
- Tang, G., Yip, H.-K., Cutress, T. W., & Samaranayake, L. P. (2003). Artificial mouth model systems and their contribution to caries research: A review. *Journal of Dentistry*, *31*(3), 161-171. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(03\)00009-](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(03)00009-5)

- Thylstrup, A., Bruun, C., & Holmen, L. (1994). In Vivo Caries Models-Mechanisms for Caries Initiation and Arrestment. *Advances in Dental Research*, 8(2), 144-157. <https://doi.org/10.1177/08959374940080020401>
- Truong, T. L., Ménard, C., Mouton, C., & Trahan, L. (2000). Identification of mutans and other oral streptococci by random amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Medical Microbiology*, 49(1), 63-71. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-1-63>
- Twetman, S. (2018). Prevention of dental caries as a non-communicable disease. *European Journal of Oral Sciences*, 126(S1), 19-25. <https://doi.org/10.1111/eos.12528>
- Wefel, J. S. (1990). Effects of Fluoride on Caries Development and Progression Using Intraoral Models. *Journal of Dental Research*, 69(2_suppl), 626-633. <https://doi.org/10.1177/00220345900690S122>
- Wierichs, R. J., Musiol, J., Erdwey, D., Esteves-Oliveira, M., Apel, C., & Meyer-Lueckel, H. (2020). Re- and demineralization characteristics of dentin depending on fluoride application and baseline characteristics in situ. *Journal of Dentistry*, 94, 103305. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103305>
- Wong, F. S. L., Anderson, P., Fan, H., & Davis, G. R. (2004). X-ray microtomographic study of mineral concentration distribution in deciduous enamel. *Archives of Oral Biology*, 49(11), 937-944. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2004.05.011>
- World Health Organization. (2022, noviembre 18). *Oral Health*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral->

11. ANEXOS

Anexo N°1: Aprobación comité de ética estudio *in situ*



Ed-24 Agosto 2017

ACTA DE APROBACION DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

INFORME N°:2016/30

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

1. Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

Dr. Eduardo Fernández
Presidente CEC

Dr. Marco Cornejo
Vicepresidente CEC

Dra. Weronika Weil
Miembro Permanente CEC

Sra. Paulina Navarrete
Miembro Permanente CEC

Sr. Roberto La Rosa
Miembro Permanente CEC

Dr. Rodrigo Cabello
Miembro Permanente CEC

Dr. Alfredo Molina
Miembro Permanente CEC

Dra. Paola Llanos
Miembro Permanente CEC

Dr. Juan Estay
Miembro Permanente CEC

Sra. Rebeca Galarce
Representante de la Comunidad

Dra. Viviana Toro
Miembro Alterno CEC

2. Fecha de Aprobación: 03/05/2017

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

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

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

6. Fundamentación de la aprobación

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

RESPECTO A ASPECTOS METODOLÓGICOS:

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

RESPECTO A ASPECTOS JURIDICOS:

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

Ed-24 Agosto 2017

RESPECTO A ASPECTOS ÉTICOS:

Realizar las siguientes modificaciones al C.I.:

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

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



Dr. Eduardo Fernández G.
Presidente CEC



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

Anexo N°2: Consentimiento informado para la obtención de terceros molares



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

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

Investigador Principal: Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

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

Nombre del Donante

Este documento de Consentimiento Informado se aplicará a pacientes con indicación de extracción de terceros molares, y consta de dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted).
 - Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar).
- Ud. recibirá una copia completa del Documento de Consentimiento Informado.

Mi nombre es Gonzalo Rodríguez Martínez y soy académico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación de la cual le proporcionaré información y a la que lo invitaré a participar. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. Antes de tomar su decisión puede hablar acerca de la investigación con cualquier persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude aclarar sus dudas al respecto.

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

Justificación de la Investigación

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

Objetivo

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

Beneficios

No existe ningún tipo beneficio inmediato por la participación en el estudio ya que los dientes a utilizar son normalmente desechados. Sin embargo, como consecuencia de esta donación y de la investigación a realizar se espera contribuir a aplicaciones futuras en el ámbito de la odontología.

Tipo de Intervención y Procedimiento

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

Riesgos

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

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

Criterios para selección de los participantes en el estudio

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



Anexo N°3: Criterios de inclusión y exclusión para la selección de voluntarios de estudio *in situ*

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
<ul style="list-style-type: none">• Cantidad mínima de 22 dientes en boca• Pacientes ASA I• Edad entre 18 – 35 años• COPD < 8	<ul style="list-style-type: none">• Hiposialia• Edéntulos• Fumadores• Mujeres Embarazadas• Portadores de aparatos intraorales• Enfermedad Periodontal• Lesiones cariosas activas o cavitadas• Uso de antibióticos o antisépticos bucales en menos de 3 meses antes de la intervención

Anexo N°4: Consentimiento informado para la participación en el estudio *in situ*



Edición del 25/08/2017

Consentimiento Informado Para Participación en Proyecto de Investigación Dirigido a Adultos

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

Investigador Principal: Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez

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

Nombre del Participante:

.....



Este documento de Consentimiento Informado se aplicará a Adultos y consta de dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted).
 - Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar).
- Ud. recibirá una copia completa del Documento de Consentimiento Informado.

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

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

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



Justificación de la Investigación

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

Objetivo de la Investigación

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

Beneficio de la Investigación.

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

Tipo de Intervención y Procedimiento.

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

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

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

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

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

Riesgo de la Investigación.

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

Criterios para selección de los participantes en el estudio

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



Edición del CI 25/08/2017

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

Confidencialidad y difusión de datos.

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

Aclaraciones

- La participación es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la intervención y/o participación.
- Si usted decide puede retirarse cuando lo desee.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable.
- La información obtenida de la investigación, respecto de la identificación de pacientes, será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores.
- Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, puede si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa al documento.



Anexo N°5: Ficha clínica estudio *in situ*

Evaluación de voluntarios para participación en trabajo de investigación titulado “Efecto terapéutico en la progresión de caries en un modelo *in situ* expuesto a probiótico vía sistémica, tópica y mixta”.

Nombre:			Rut:	
Edad:		Sexo:	(M)	(F)
Teléfono:		Fecha de nacimiento:		

Anamnesis

1. Antecedentes mórbidos:
2. Antecedentes quirúrgicos (Fecha, diagnóstico, procedimiento, complicaciones):
3. Alergias:
4. Medicamentos (Nombre, dosis, fecha inicio):

Examen Intraoral

- Apreciación periodontal
 - Gingivitis: ()
 - Periodontitis: ()
- Dentición
 - C:
 - O:

Anexo N°6: Protocolo a seguir por los voluntarios para el estudio *in situ*

Universidad de Chile Facultad de odontología

Protocolo por seguir de los voluntarios

Estimado Participante, bienvenido al estudio agradecemos profundamente su generosa disposición para ser parte de este proyecto de investigación. A continuación, explicaremos paso a paso las maniobras que deberá realizar durante el periodo de experimentación.

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

- Dispositivo intraoral: es una estructura acrílica removible que tiene incorporadas 10 muestras dentarias: 1 muestra en la zona palatina, 2 muestras en la zona vestibular derecha, 2 muestras en la zona vestibular izquierda, 5 en la zona palatina posterior (fig. 1).

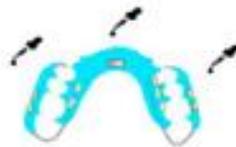


Figura 1: Dispositivo intraoral

- 2 frascos de 30 ml con sacarosa.
- Recipiente para guardar el dispositivo durante la comida.
- Sobres de probiótico.

Ud. deberá utilizar el dispositivo intraoral durante un periodo de 28 días, 24 horas al día. Sólo podrá remover el dispositivo de la boca para higienizarse los dientes (cepillado), beber líquidos o comer. Esto significa que deberá dormir con el dispositivo por el tiempo que dure el estudio, además el dispositivo podrá ser removido máximo 4 veces al día, 30 minutos cada vez.

Al remover el dispositivo almacenarlo en la caja para ello envuelto en 1 cuadrado de toalla de 20x20cm humedecida.

Se recomienda lavarse los dientes al menos dos veces al día, por dos minutos y con pasta fluorada. Durante el periodo de experimentación, se debe evitar el uso de los siguientes elementos:

- Enjuague bucal
- Antiácidos
- Medicamentos (por ejemplo, antibióticos)

En caso de necesitar alguno de los elementos descritos, debe comunicarse inmediatamente con el equipo de investigadores para determinar la conducta a seguir. Todos los elementos entregados para el estudio se deben guardar en el bolso original y al finalizar el estudio se deben entregar de la misma forma al equipo investigador.

Protocolo inicial (generación de lesión inducida):**Paso 1:**

- Al levantarse por la mañana debe realizar la primera aplicación de sacarosa que se encuentra contenida en el frasco. Una vez retirado el dispositivo de la boca, debe aplicar 1 gota de sacarosa en cada una de las muestras. Se debe tener mucho cuidado de evitar que la solución de sacarosa chorree hacia los lados, por lo cual se recomienda mantener el dispositivo de forma horizontal para que el líquido no escurra. Luego de aplicar la gota de sacarosa debe esperar 5 minutos antes de volver a colocar el dispositivo dentro de la boca.

Paso 2:

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

Debe recordar aplicar la solución cada 2 horas. Procure que los horarios sean lo más similares posible dentro del periodo experimental, para esto puede poner alarmas. Se le entregará una tabla donde deberá anotar los horarios de aplicación.

En el caso de olvidar alguna aplicación deberá realizarla lo más pronto posible y esperar 2 horas para una nueva aplicación.

Anexo N°7: Evaluación y registro del protocolo de los voluntarios estudio *in situ*

Primera fase (voluntaria 1)								
Día	Aplicación de Sacarosa primera fase							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	10:00	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	00:00
2	09:00	11:00	13:00	15:30	17:00	19:00	21:00	23:00
3	10:00	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	no aplica
4	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	24:00	02:00
5	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	24:00	02:00	no aplica
6	10:00	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	no aplica
7	09:00	11:00	13:00	15:00	17:00	19:00	21:00	23:00
8	10:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	00:00	02:00
9	10:00	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	00:00
10	10:00	12:00	14:00	16:00	no aplica	no aplica	09:00	11:00
11	10:00	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	00:00
12	09:30	11:30	13:00	15:00	17:00	19:00	no aplica	22:30
13	09:45	12:00	14:00	16:00	18:30	21:00	23:00	01:30
14	10:00	12:00	14:00	16:00	18:00	20:00	22:00	no aplica

Anexo N°8: Cuestionario de cumplimiento final estudio *in situ*

Evaluación de cumplimiento final

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

1. Cumplió con todas las aplicaciones: Si ___ No ___
2. Las aplicaciones de sacarosa fueron cada 2 horas: Si ___ No ___
3. Marque con una x las siguientes frases si representaron su experiencia

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

4. Notifique las dificultades que tuvo durante el periodo experimental.