



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Ciencias de la Conducta
Doctorado en Ciencias de la Salud

**Modelo de desmineralización en esmalte
temporal: evaluaciones Micro-CT y SEM**

TESIS

Para Obtener el Grado de:
Doctora en Ciencias de la Salud

Presenta:

Mtra. Arlete González Sotelo

1330510

Comité Tutorial:

Dra. en O. Rosalía Contreras Bulnes

Tutor Académico

Dra. en C.S Laura Emma Rodríguez Vilchis

Tutor Interno

Dra. en C.S María de los Angeles Moyaho Bernal

Tutor Externo



Toluca, Estado de México, octubre de 2021.

ÍNDICE

Contenido	Pág
Resumen	2
Introducción	3
1. Antecedentes	4
1.1 Morfología y estructura dental	4
1.1.2 Características del esmalte dental	4
1.1.2.1 Propiedades físicas	4
1.1.2.2 Propiedades químicas	5
1.2 Características del esmalte temporal	5
1.3 Caries Dental	6
1.3.1 Desarrollo de las lesiones	6
1.3.2 Modelos de desmineralización	9
1.4 Microtomografía computarizada (μ-CT)	9
1.5 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	10
1.5.1 Programa ImageJ	10
2. Planteamiento del problema	12
3. Justificación	13
4. Hipótesis	14
5. Objetivo General y específicos	15
6. Diseño metodológico	16
6.1 Diseño del estudio	16
6.2 Universo y muestra	16
6.3 Criterios inclusión/exclusión	16
6.4 Variables de Estudio	16
6.5 Procedimiento	19
6.6 Análisis Estadístico	26
6.7 Ética del estudio	27
7. Resultados	29
7.1 Artículo aceptado	29
7.1.1 Título del artículo	29
7.1.2 Página frontal del manuscrito	29
7.1.3 Carta de aceptación.....	30
7.1.4 Resumen	31
7.2 Artículo enviado.....	32
7.2.1 Título del artículo	32
7.2.2 Página frontal del manuscrito	32
7.2.3 Carta de envío.....	33
7.1.4 Resumen	34
9. Discusión general	35
10. Conclusiones generales	42
11. Bibliohemerografía utilizada	43
9. Anexos	49

Resumen

Antecedentes: Diversos estudios han evaluado diferentes modelos de desmineralización en la superficie del esmalte para la formación de lesiones artificiales; sin embargo, la mayoría de ellos son complejos, lentos, poco claros y se han llevado a cabo en dientes permanentes por lo que, no es apropiado que el modelo de desmineralización se aplique en dentición temporal, debido a las diferencias entre ambas denticiones. Además, han surgido diversas técnicas para el análisis de la profundidad de la lesión entre ellas la micro-CT (μ -CT, por sus siglas en inglés) para evaluar el órgano dentario en 3D y así obtener mediciones más precisas y concisas, por otra parte, la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM, por sus siglas en inglés) para la caracterización morfológica y el programa ImageJ para el análisis de la porosidad.

Objetivo: Evaluar un modelo de desmineralización *in vitro* en el esmalte temporal bajo diferentes períodos de inmersión, a través de la profundidad de la lesión, morfología y porosidad determinadas por μ -CT, SEM e ImageJ.

Métodos. El proyecto se dividió en dos fases: Fase I. Dieciséis incisivos y caninos temporales fueron asignados aleatoriamente en 4 grupos ($n=4$) dependiendo de los días de desmineralización a los que fueron sometidos G1_control, G2_ 2 días, G3_4 días y G4_7 y fueron examinados mediante μ -CT y SEM. Las diferencias entre la profundidad de la lesión antes y después de la desmineralización fueron evaluadas estadísticamente mediante la prueba de t- student ($p\leq 0.05$). Fase II. Nueve incisivos y caninos temporales fueron asignados a tres grupos de acuerdo a los días de desmineralización, evaluando 15 regiones de interés (ROI, por sus siglas en inglés): G1_2 días; G2_ 4 días, y G3_7 días. La morfología fue evaluada mediante SEM y la porosidad fue determinada mediante el programa ImageJ ambas antes de la desmineralización (AD) y después de la desmineralización (DD). Se utilizaron las pruebas t- student, Wilcoxon y ANOVA de una vía ($p\leq 0.05$) para el análisis estadístico.

Resultados: Fase I. La profundidad de la lesión artificial fue similar entre los grupos experimentales; los valores fueron de $38.16 \pm 05.40 \mu\text{m}$ a $42.61 \pm 04.75 \mu\text{m}$. Se formaron un total de 14 a 17 lesiones incipientes artificiales por grupo, la extensión y distribución fueron diferentes para cada período de incubación. Se produjeron cinco lesiones erosivas en G_7D. Fase II: en la porosidad AD la cantidad de poros fueron de 64.26 ± 37.62 a 97.93 ± 34.25 , y DD de 150.06 ± 64.86 a 256 ± 58 .

Conclusiones: Todos los modelos de desmineralización evaluados fueron capaces de formar lesiones artificiales incipientes e incrementar el número de poros en el esmalte primario, aunado a cambios morfológicos más evidentes a mayor periodo de inmersión del modelo, siendo el de 4 días el más recomendado para facilitar su evaluación, debido a la extensión y solo formación de lesiones.

Introducción

Los órganos dentarios están constituidos por diferentes tejidos, el que esta en contacto con la cavidad oral es el esmalte, considerado el tejido más duro del cuerpo humano. El esmalte se encuentra sometido a procesos de desmineralización-remineralización de forma continua, natural y en constante equilibrio entre factores protectores y patológicos. Sin embargo, cuando persiste el factor patológico de forma constante, surge un desequilibrio que originará una lesión de caries. Durante el proceso de desmineralización existe una pérdida de minerales como calcio y fósforo, originando una lesión y un tejido más poroso.

Es importante considerar que el esmalte temporal presenta diferentes características al esmalte permanente, sobresaliendo un menor grosor del tejido, una mayor difusión de iones y, por lo tanto, un mayor riesgo a desarrollar caries en la dentición temporal.

Diversos modelos de desmineralización han surgido para simular el proceso de desmineralización *in vitro*, han usado soluciones desmineralizantes o geles; sin embargo, la mayoría se han aplicado para la dentición permanente o el esmalte bovino, por lo que estos modelos no son adecuados para la dentición temporal, debido a las diferencias previamente mencionadas.

Dentro de las técnicas más empleadas para evaluar la profundidad de la lesión en el esmalte destacan la luz polarizada, el SEM, la microradiografía y la microscopía transversa, aunado al surgimiento de nuevas tecnologías como la μ -CT.

Así mismo, debido a la diversidad de modelos de desmineralización y a las diferencias en las metodologías aplicadas y a los tipos de esmalte evaluados, el presente estudio evaluó un modelo de desmineralización en el esmalte temporal, considerando la profundidad de la lesión artificial incipiente, la morfología y la porosidad del esmalte, determinada por μ -CT, SEM e ImageJ.

Los hallazgos del presente estudio contribuyeron a determinar el modelo de desmineralización apropiado para su aplicación en la evaluación de diversas medidas preventivas entre otras aplicaciones, sugiriendo que 4 días de desmineralización son los más apropiados, si bien todos los modelos de desmineralización estudiados fueron capaces de formar lesiones artificiales incipientes e incrementar el número de poros en el esmalte temporal, produciendo cambios morfológicos más evidentes acorde a una mayor duración de la inmersión en la solución desmineralizante.

1. Antecedentes

La función más importante relacionada a la masticación son los órganos dentarios que se clasifican de acuerdo con la aparición en la cavidad oral en dentición temporal y dentición permanente.¹ La dentición temporal inicia su periodo de erupción a los 6 meses aproximadamente y concluye alrededor de los 3 años, constituida por un total de 20 órganos dentarios² mientras que la dentición permanente sustituye a la dentición temporal alrededor de los 6 años y completada a los 21 años con un total de 32 órganos dentarios.

Los órganos dentarios cumplen una función de acuerdo con su forma: los incisivos cortan los alimentos, los caninos desgarran, mientras que los premolares y molares trituran la comida.^{1,2}

1.1 Morfología y estructura dental

Los dientes están conformados por diferentes tejidos: esmalte, dentina, pulpa y cemento. El esmalte es un tejido mineralizado constituido por 95% de materia inorgánica (hidroxiapatita). La dentina es un tejido mineralizado con un 70% de materia inorgánica. La pulpa es el único tejido blando del órgano dentario muy vascularizado e innervado por diferentes células.²

1.1.2 Características del esmalte dental

Es el tejido más duro del cuerpo humano, representa la parte más externa del diente. Proviene embriológicamente del ectodermo por proliferación localizada del epitelio bucal.¹⁻³

1.1.2.1 Propiedades físicas

Presenta una alta dureza, lo cual le confiere una alta resistencia a la deformación. Posee una elasticidad escasa, por lo tanto, es frágil y puede tener microfracturas.² El esmalte dental presenta un color translúcido de blanco amarillento a blanco grisáceo dependiendo de las estructuras cercanas como la dentina y la pulpa.^{2,4} En el adulto, la permeabilidad del esmalte es menor debido a la obstrucción de vías orgánicas, sin embargo en el esmalte joven la permeabilidad es mayor debido a su alto grado de mineralización y es radiopaco.^{2,5}

1.1.2.2 Propiedades químicas

Posee una matriz orgánica de 0.36-2% constituida por diferentes proteínas como amelogeninas, enamelinas, amelinas, tuftelina, parvalbúmina, las cuales ejercen funciones de unión y crecimiento de primas.^{2,3} El 95% compuesto por calcio, fosfato y carbonato se depositan en el esmalte originando cristales de hidroxiapatita. El agua se encuentra en la periferia proporcionando una capa de hidratación.²

1.2 Características del esmalte temporal

La capa aprismática se observa con mayor frecuencia en los dientes temporales, donde el ancho de la zona es mayor en comparación con los dientes permanentes. El 60% de los dientes temporales tienen una zona de superficie aprismática de 16 a 45 μm de espesor, mientras que la mitad de los dientes permanentes tienen una zona aprismática de $<5 \mu\text{m}$.⁶

El contenido químico del esmalte depende de la presencia de oligoelementos ambientales y a la presencia de calcio y fósforo. Los bebés prematuros presentan diferentes concentraciones químicas en el esmalte en comparación con los bebés a término,⁷ otra de las características que hacen diferente al esmalte temporal incluso dependiendo de ciertas circunstancias durante el proceso de formación dental.

Los dientes temporales presentan un esmalte más fino que sus sucesores permanentes. El grado de mineralización del esmalte temporal es menor que el de los permanentes; por lo tanto, la absorción del contenido de agua del primero es mayor.⁸

Por otro lado, los hábitos alimentarios, las enfermedades en la primera infancia, la alteración en la amelogénesis, la maduración del esmalte, las medidas inadecuadas de higiene bucal, la falta de conocimiento sobre el valor de la dentición temporal por parte de los padres y la falta de disponibilidad de personal dental capacitado en salud bucal infantil, pueden contribuir a la mayor prevalencia de caries en dentición temporal.⁷

1.3 Caries Dental

La caries es una enfermedad multifactorial que resulta de un desequilibrio entre los factores patológicos y protectores.^{9,10,11} El desequilibrio impide el proceso fisiológico y equilibrado de remineralización y desmineralización, favoreciendo la última. Este proceso ocurre diariamente varias veces al día.^{9,12} En la desmineralización, las bacterias productoras segregan ácidos sobre la superficie del esmalte a partir del metabolismo de los carbohidratos. Cuando el ácido alcanza zonas susceptibles se disuelven los minerales y la exposición continua de ácido sobre la superficie del esmalte producirá una cavidad.¹²⁻¹⁵ Por otro lado, el proceso de remineralización es natural para las lesiones de caries no cavitadas, los iones de calcio y fosfato se dispersan en el diente, provenientes de diferentes fuentes como la saliva o fluoruros tópicos, que repararán los cristales dañados.¹³⁻¹⁵

Se ha identificado al *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) como la bacteria más importante en el inicio de la lesión por caries. Sin embargo, otras bacterias pueden estar implicadas en dicho proceso. Se ha observado que el *Streptococcus mutans* tiene una capacidad para adherirse a la superficie del esmalte, debido a una estructura llamada fimbrias en la cual se encuentran adhesinas que favorecen la unión al diente.^{12,16} El inicio de la lesión puede ser reversible implementando medidas de prevención como los fluoruros, los cuales depositan calcio, fosfato o fluoruro sobre la superficie del esmalte.^{12,14,16,17}

1.3.1 Desarrollo de las lesiones

Cuando el proceso patológico sobrepasa el equilibrio entre la desmineralización y remineralización surge la caries dental, iniciando con una lesión de mancha blanca. Existen amplias evidencias que la caries en sus etapas tempranas causa un daño mínimo a la superficie exterior del diente, aunque sí provoca una desmineralización considerable debajo de la superficie de este.^{14,16,17}

Las características histológicas de la pequeña lesión cariosa en el esmalte dental humano pueden ser descritas en varias zonas cuando las secciones del terreno longitudinal son examinadas bajo el microscopio de luz, por lo que Silverstone subdividió a la pequeña lesión para fines didácticos en 4 zonas, basándose en la apariencia bajo el microscopio de luz. Darling clasifica cuatro zonas de alteraciones patológicas en el esmalte:

1. Zona superficial
2. Cuerpo de la lesión
3. Zona obscura
4. Zona translúcida

1. Zona Superficial

Esta es la primera zona de la lesión incipiente, tiene un grosor de 20 a 100 μm , una de las características importantes es que los grandes grados de desmineralización ocurren a nivel de la subsuperficie, así que la pequeña lesión queda cubierta por una capa superficial relativamente infectada por el ataque.^{18,19}

2. Cuerpo de la lesión

El cuerpo de la lesión es la porción más grande del esmalte cariado está situada por debajo de la zona superficial. El cuerpo de la lesión tiene una superficie reactiva, profunda frente a la zona de superficie intacta. Este es un sistema balanceado, donde la velocidad de precipitación es igual a la velocidad en que los iones minerales se pierden a través de la placa hacia la saliva. La ruptura de este balance que ocurre durante el progreso de la caries determina la aparición de la cavidad, que se hace evidente debido al aumento de la profundidad de la lesión, y a la ruptura del equilibrio entre la entrada y salida de calcio y fosfato.¹⁹

3. Zona obscura

La zona obscura es la tercera zona de alteración del esmalte, se encuentra por debajo del cuerpo de la lesión y superficialmente con respecto a la zona translúcida y se presenta en el 95% de las lesiones.

Un enigma respecto a la zona obscura es por qué los poros son más pequeños que los que se observaron en la zona traslúcida y en el cuerpo de la lesión, si debiera ser al contrario, ya que

conforme avanza la lesión los poros van siendo más y más grandes debido a la desmineralización.¹⁶

En experimentos realizados sobre la remineralización, un área identificada como cuerpo de la lesión se remineraliza, adquiriendo las características histológicas de la zona oscura, donde los poros relativamente grandes del cuerpo de la lesión pudieron, en efecto convertirse en diminutos; por tanto, la zona oscura no es una etapa como consecuencia de la degradación del tejido, sino que los microporos más pequeños pueden ser formados por remineralización. De este modo, el soporte es proporcionado por el concepto de que el proceso de caries en esmalte es una dinámica con fases de desmineralización, alternándose con fases de remineralización, más que un simple proceso de disolución continua.¹⁹

4. Zona Translúcida

Esta zona es la cuarta zona de alteración del esmalte, su extensión puede variar desde 5 a 100 μm , se observa en el 50% de las lesiones aproximadamente.

En estudios realizados con microscopio polarizado, cuando una sección del terreno de esmalte cariado es examinada en aire estéril usando luz polarizada, se encontró que la zona translúcida contenía aproximadamente 1% de espacios, esta cantidad de espacios representan un incremento significativo en el volumen del poro comparado con el esmalte sano, que contiene 0.1% de espacios.

La alteración del esmalte en esta zona resulta en espacios o poros en los sitios de unión como los bordes del prisma y estrías-transversales que al ser llenados con un medio aclarante las marcas estructurales no son visibles, dando como resultado una zona esencialmente translúcida sin estructura.^{6,18,19}

En los estudios químicos se encontró una pérdida de mineral de 1.2% por volumen de unidad, hay pérdida de magnesio, el contenido de fluoruro aumenta relativamente, no se manifiesta pérdida de proteínas. Estudios de microdissección revelaron que con base a su peso la zona translúcida del esmalte tiene un bajo contenido de carbonato relativo a esmalte sano. La proporción fosfato-magnesio es aproximadamente 14% más bajo que el esmalte sano.^{18,19}

1.3.2 Modelos de desmineralización

El proceso de desmineralización se puede realizar mediante diferentes modelos: *in vitro*, *in situ* en animales o ensayos clínicos aleatorios controlados.

Las lesiones artificiales en órganos dentarios humanos y bovinos son una herramienta importante para analizar las estrategias de prevención y tratamiento de las lesiones cariosas. Por lo tanto, los modelos de desmineralización han presentado un papel fundamental en la investigación de la caries, ayudando a establecer la etiología multifactorial y a definir el impacto de numerosos factores que contribuyen a la formación de caries. Respecto a la prevención los modelos de desmineralización han ayudado a evaluar agentes preventivos de caries, por ejemplo: el flúor, productos naturales o la aplicación de láser.

Los modelos experimentales *in vitro* son los métodos más aplicados, se pueden emplear en un periodo corto y requieren menos personal que los estudios *in situ*. Algunas de las ventajas son las siguientes: menos costoso, relativamente rápido y pueden realizarse experimentos con una sola variable en condiciones muy controladas, son más sensibles, precisos y, por último, es el mejor método para seleccionar un gran número de agentes y determinar el modo de acción. Sin embargo, los modelos *in vitro* tienen limitaciones significativas, principalmente relacionadas con su incapacidad para simular los complejos procesos biológicos implicados en la caries.²⁰

1.4 Microtomografía computarizada (μ -CT)

Desde el surgimiento de los Rayos X por Roentgen en 1895 ha evolucionado el diagnóstico en medicina con la finalidad de ser menos invasivo. La imagen de tomografía computarizada por rayos X fue desarrollado en 1970 y dio pauta para tomar diferentes imágenes y reproducirlas en tercera dimensión, fue entonces, que en 1980 surgió la microtomografía computarizada por rayos X.²¹

La μ -CT crea un conjunto de datos tridimensionales que representan radiopacidad en cada punto dentro de la muestra tomando una serie de imágenes de rayos X del espécimen, girándolo de lado a lado y analizando cada sección para reconstruir datos volumétricos.²² Es un método de atenuación de rayos X que brinda alta resolución tridimensional de la estructura interna de los tejidos duros o materiales. Permite obtener una distribución espacial de los coeficientes de atenuación dentro del objeto sin la superposición de estructuras. El alto nivel

de sensibilidad y especificidad de la μ -CT en relación con el estándar de oro de la micrografía e histología transversa han sido confirmados por estudios correlativos.²³

En los últimos años, la μ -CT ha sido utilizada en el área odontológica para la evaluación de minerales, patrones de densidad del hueso y dental, así como para la microestructura de los biomateriales dentales.^{23,24} Algunas de las ventajas en la μ -CT comparada con otros métodos como la luz polarizada, microscopía electrónica de barrido y micro-radiografía transversa es que no requiere que se seccione la muestra para el análisis.²³

1.5 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El SEM es un microscopio electrónico que produce una imagen de una muestra escaneándola con un haz de electrones enfocado. Los electrones interactúan con los átomos de la muestra, que emiten electrones secundarios que contienen información sobre la topografía y la composición de la superficie. La muestra es escaneada por el haz de electrones punto por punto, hasta que se forma una imagen de la superficie. Desde su invención en 1942, las capacidades del SEM se han vuelto primordiales en el descubrimiento y la comprensión del mundo nanométrico, hoy en día se utilizan ampliamente tanto para la investigación como en la industria. El SEM puede lograr una resolución mejor que un nanómetro. Sin embargo, para muchas aplicaciones, trabajar con una resolución sub-nanométrica implica una cantidad excesivamente grande de puntos de escaneo.²⁵

Hoy en día, se cuenta con un mayor acceso a la tecnología SEM, realizando de manera ágil el procesamiento de imágenes, con mayor magnificación, así como la capacidad de almacenar imágenes digitalmente, abriendo un nuevo camino para el procesamiento digital en tiempo real. Además, permite obtener imágenes de la superficie de las muestras desde varias perspectivas simultáneamente.²⁵

1.5.1 Programa ImageJ

ImageJ es un software para el procesamiento de imágenes de dominio público; la base-Java fue desarrollada en el National Institutes of Health (NIH) (<http://imagej.nih.gov/ij/>) para medir el volumen de tejido. El procesamiento para la evaluación del volumen contaba con tres pasos. El primero calcular el número de píxeles por unidad de área (1 cm^2). El segundo paso es medir el área de región de interés (ROI) usando la proporción del número de píxeles

por unidad de área. El paso final es calcular el volumen usando con los datos anteriores integrados.²⁶

La binarización de imágenes es uno de los pasos de preprocesamiento más relevantes que conduce a una disminución significativa en la cantidad de información sujeta a análisis adicionales y permite un aumento de su velocidad. Esta operación se aplica típicamente en muchos sistemas que utilizan principalmente métodos de reconocimiento de formas y no requieren el análisis de color o textura.²⁷ De los algoritmos de binarización de imágenes, probablemente el método de umbral de imagen más popular fue propuesto en 1979, quien entregó la idea de minimizar la suma de las varianzas intraclase de dos grupos de píxeles clasificados como primer plano y fondo, asumiendo el histograma bimodal de la intensidad de los píxeles de la imagen.²⁸ Por lo tanto, este enfoque conduce a la maximización de la varianza entre clases y por ello, se logra una buena separación de dos clases de píxeles, representados finalmente en blanco y negro.²⁷

2. Planteamiento del problema

La caries es una enfermedad multifactorial que mientras los factores protectores y patológicos están en equilibrio no se desarrollan las lesiones, sin embargo cuando se rompe este equilibrio surge la caries dental, que es la más común y prevenible de las patologías en la infancia.^{9,17,29} El proceso es atribuido a las bacterias, que utilizan los carbohidratos de la dieta para producir ácidos, originando cambios en el pH y con ello se inicia la pérdida de minerales o desmineralización, que al no interrumpirse se desarrollará una lesión incipiente inicialmente para posteriormente cavitarse.^{13,14}

Existen diferentes modelos *in vitro* para poder reproducir el proceso de desmineralización y lesión incipiente o de mancha blanca sobre la superficie del órgano dentario y de esta forma comprobar la efectividad de diferentes medidas de prevención. Los modelos han sido aplicados en dentición permanente o en tejidos de origen bovino,^{30,31} sin existir un modelo específico para la dentición temporal.

Por otra parte, el esmalte temporal en comparación con el permanente presenta diferentes características entre las que se encuentran: menor grosor, mayor coeficiente de difusión de iones y mayor número de zonas aprismáticas por lo tanto, no es conveniente aplicar los modelos de desmineralización en dentición temporal para el desarrollo de lesiones incipientes con el fin de evaluar diversas medidas preventivas.³²⁻³⁴

La luz polarizada, microscopía transversa y más actualmente la tecnología μ -CT han sido utilizadas para la evaluación y análisis de la lesión.³⁵⁻³⁹ Por otra parte el SEM nos permite la caracterización morfológica del esmalte dental y el programa ImageJ para obtener la porosidad de la superficie del esmalte.⁴⁰ El surgimiento de la μ -CT ha ayudado a visualizar y observar estructuras metálicas o tejidos dentales en 3D obteniendo datos más precisos sobre el comportamiento de diversos fenómenos como el proceso de desmineralización en esmalte temporal cuyos reportes son muy escasos,^{38,39} probablemente debido al tiempo prolongado de escaneo y análisis de las muestras, así como a la poca disponibilidad de equipos y elevado costo de la técnica.

Como se mencionó anteriormente los modelos para el desarrollo de lesiones incipientes no son aplicables a la dentición temporal, por lo cual este trabajo pretende responder a la pregunta ¿cuál es el modelo de desmineralización *in vitro* en el esmalte temporal más adecuado para el desarrollo de lesiones incipientes bajo diferentes períodos de inmersión, a través de la profundidad de la lesión, morfología y porosidad?

3. Justificación

La caries es la enfermedad bucal de mayor prevalencia en México, afecta a la gran mayoría de los niños y puede ser tan severa como la caries de la infancia temprana, la cual involucra los incisivos superiores, iniciando con una desmineralización en la subsuperficie del esmalte manteniéndose intacta la superficie. A la lesión inicial se le denomina lesión incipiente o mancha blanca, sin embargo, si la desmineralización permanece por tiempos prolongados, la lesión se vuelve yesosa y se cavita. Por lo cual, es muy importante evitar y tratar esta lesión inicial con protocolos de remineralización.

Se ha observado que el proceso de desmineralización en dentición temporal es diferente debido al menor grosor del esmalte y mayor difusión de iones entre otros y la mayoría de los modelos de desmineralización han sido desarrollados para la dentición permanente. Por lo tanto, este proyecto pretende desarrollar un modelo apropiado para dientes temporales empleando nuevas tecnologías como la μ -CT que nos ayuda a observar el órgano dentario en 3D, en la actualidad no existen reportes de un modelo de desmineralización específico para dentición temporal bajo diferentes períodos de inmersión evaluados con μ -CT, complementado con SEM para caracterizar la superficie dental y con el análisis de la porosidad a través del software ImageJ poco utilizada en el área odontológica.

Los resultados del presente estudio aportarán un modelo *in vitro* de desmineralización adecuado y específico para el esmalte temporal que podrá ser utilizado para la evaluación de estrategias preventivas de remineralización entre otras aplicaciones.

4. Hipótesis

Hipótesis

La progresión de la lesión y porosidad será mayor en el modelo de desmineralización con 4 días de inmersión comparado con el de 2 días de inmersión.

Hipótesis Nula

La progresión de la lesión y porosidad será menor en el modelo de desmineralización con 4 días de inmersión comparado con el de 2 días de inmersión.

5. Objetivo General y específicos

Objetivo general:

Evaluar un modelo de desmineralización *in vitro* en el esmalte temporal bajo diferentes períodos de inmersión, a través de la profundidad de la lesión, morfología y porosidad determinadas por μ -CT, SEM e ImageJ.

Objetivos específicos:

- Fase I: Determinar la profundidad de la lesión y morfología mediante un modelo de desmineralización con diferentes períodos de inmersión en dentición temporal.
 - Evaluar la superficie del esmalte temporal mediante μ -CT y SEM antes del proceso de desmineralización.
 - Evaluar la superficie del esmalte temporal mediante μ -CT y SEM después del proceso de desmineralización.
 - Comparar los diferentes protocolos de desmineralización.

- Fase II: Determinar la morfología y porosidad mediante un modelo con diferentes períodos de inmersión en dentición temporal.
 - Evaluar la superficie del esmalte temporal mediante SEM y el programa ImageJ antes del proceso de desmineralización.
 - Evaluar la superficie del esmalte temporal mediante SEM e ImageJ después del proceso de desmineralización.
 - Comparar los diferentes protocolos de desmineralización.

6. Diseño metodológico

6.1 Diseño del estudio

Tipo de estudio: Experimental, longitudinal, descriptivo, comparativo, prospectivo, y prolectivo. (Ver fig. 1)

6.2 Universo y muestra

Se seleccionaron 25 órganos dentarios temporales.

6.3 Criterios inclusión/exclusión

Criterios de inclusión

- Incisivos temporales superiores e inferiores sanos.
- Incisivos temporales caninos superiores e inferiores sanos.
- Incisivos temporales próximos por exfoliar.
- Incisivos temporales extraídos por razones terapéuticas.

Criterios de exclusión

- Incisivos temporales superiores o inferiores:
 - Con fracturas.
 - Hipoplasia de esmalte.
 - Con caries.

Criterios de eliminación

- Incisivos temporales que se contaminaron durante su manipulación.
- Incisivos temporales que sufrieron algún daño en el proceso o preparación.

6.4 Variables de Estudio

- Dependientes:
 - Morfología
 - Profundidad de la lesión
 - Porosidad
- Independientes:
 - Solución desmineralizante

El estudio fue dividido en dos fases como se muestra en la Fig. 1

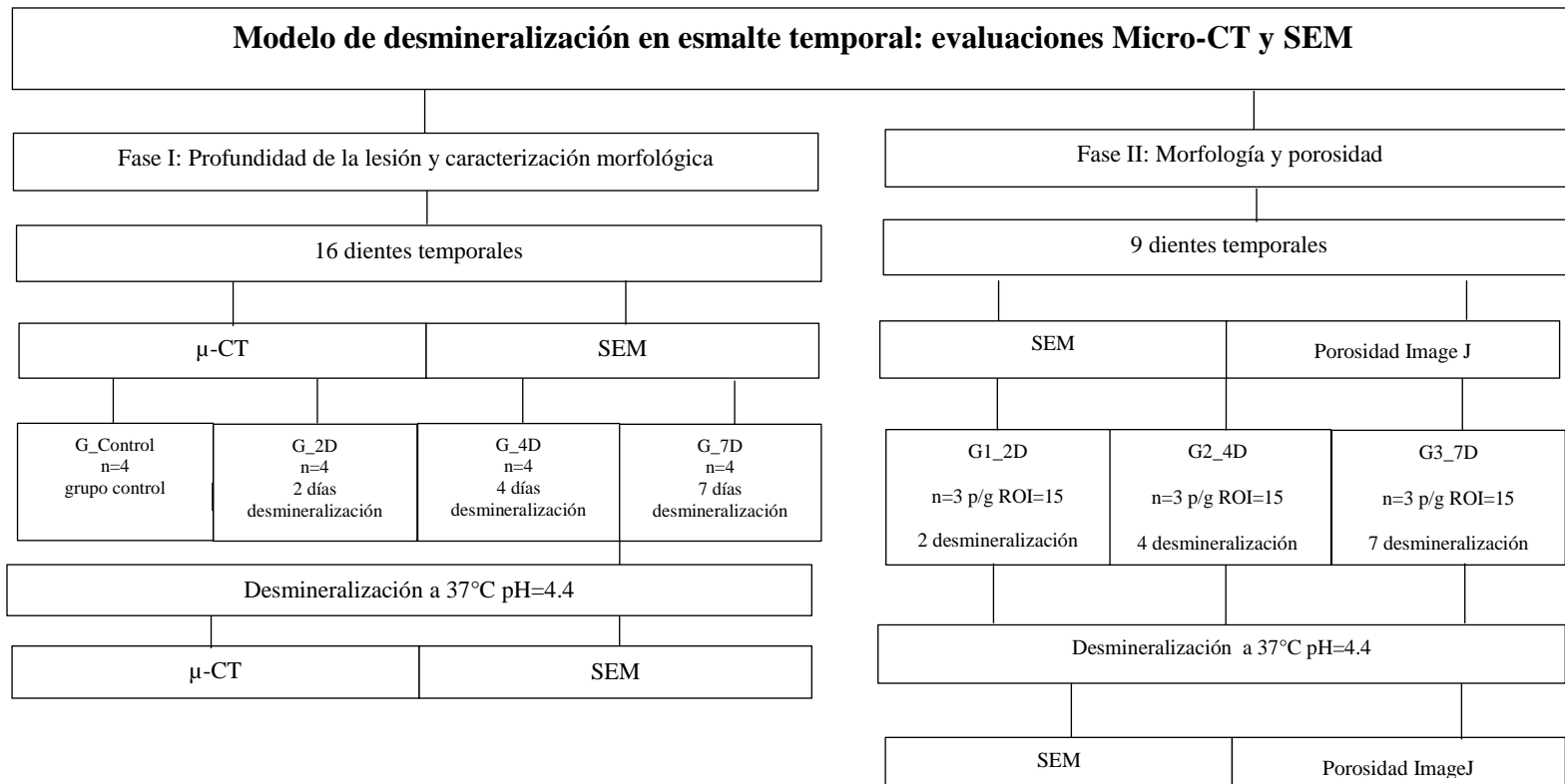


Figura. 1 Diagrama del Diseño de Estudio

Tabla 1. Definición Operacional y Conceptual de Variables

Variables Dependientes				
Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición
Morfología	Descripción de las propiedades de la forma en la superficie del esmalte.	Observación en SEM. Superficie lisa: aquella con escasas depresiones y hendiduras debidas al desgaste dental natural. Microporosidades: conjunto de diminutos intersticios irregulares existentes en el esmalte dental. Cráter: depresión pronunciada en la superficie del esmalte dental. Prismas expuestos: prismas que han cambiado su morfología natural debido a la eliminación de materia intra y/o interprismática.	Cualitativa	Nominal
Profundidad de la lesión	Distribución de minerales en tejidos calcificados.	Profundidad de la lesión: zona radiolúcida en mm constituida por la pérdida de minerales del esmalte, parámetro estándar para la determinación de la progresión de la caries.	Cuantitativa Continua	Razón
Porosidad	Fración de huecos o espacios vacíos en un material o superficie dental.	Área ocupada por poros en μm^2 determinada por la cantidad de poros.	Cuantitativa Continua	Razón
Variables independientes				
Solución desmineralizante	Mezcla homogénea de dos o más sustancias.	Concentración de compuestos determinada en mM por cloruro de calcio, dihidrógeno fosfato de potasio, ácido acético e hidróxido de potasio.	Cualitativa	Nominal

6.5 Procedimiento

Selección de los dientes y preparación de la muestra

En fase I y II, se seleccionaron incisivos temporales acorde con los criterios de inclusión. Los dientes se almacenaron en un frasco con timol al 0.2% sin ser enjuagados para posteriormente ser llevados al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología “Dr. Keisaburo Miyata”. Se recolectaron en consultorios dentales particulares previo consentimiento de los padres o tutores y asentimiento informado por parte del menor de edad ver anexo 9.

Una vez recolectados y almacenados en el laboratorio, los especímenes fueron lavados con agua desionizada y se removieron con una hoja bisturí los tejidos blandos, eliminando restos de sangre. Los órganos dentarios que presentaron raíz se eliminaron con un disco de carburo del micromotor dental. Las coronas fueron cepilladas gentilmente con un cepillo suave (Sulcus, Oral-B, México) y nuevamente se enjuagaron con agua desionizada.

Las muestras se almacenaron en una solución de timol al 0.2% a 4°C hasta la realización de los análisis.

(Fig. 2)



Fuente: Propia

Fig. 2 Recolección de dientes temporales timol al 0.2%

Preparación de muestras

Posteriormente, los órganos dentarios sanos se limpiaron durante 15 min en un contenedor con agua desionizada en un baño ultrasónico (Quantrex Q140, L&R Ultrasonics, N.J., EUA) y después se dejaron secar al aire. Finalmente fueron distribuidos aleatoriamente para las diferentes fases. (Fig. 3 y 4)



Fig. 3 Tina ultrasónica



Fig. 4 Separados individualmente para su análisis

Fase I

Dieciséis órganos dentarios temporales se utilizaron para establecer el protocolo del proceso de desmineralización, se manipularon y dividieron en 4 grupos (n=4/grupo) de la siguiente manera:

G1: Sin tratamiento (agua desionizada).

G1: Solución desmineralizante pH 4.4 2 días.

G2: Solución desmineralizante pH 4.4 4 días.

G3: Solución desmineralizante pH 4.4 7 días.

Fase II

Los nueve órganos dentarios temporales se utilizaron para establecer el protocolo del proceso de desmineralización, se manipularon y dividieron en 3 grupos (n=3/grupo) de la siguiente manera:

G1: Solución desmineralizante pH 4.4 2 días.

G2: Solución desmineralizante pH 4.4 4 días.

G3: Solución desmineralizante pH 4.4 7 días.

Se emplearon las siguientes técnicas para el análisis de las muestras:

μ -CT

La μ -CT se empleó únicamente en la fase I para evaluar la profundidad de la lesión en 16 muestras sometidas a un sistema de microtomografía computarizada de rayos X (InspeXIO smx-100 CT; Shimadzu, Kyoto, Japan). Cada muestra fue montada en un ordenador que controló una mesa giratoria con una superficie dentada en posición perpendicular, en el haz de rayos X se colocó un rodillo húmedo en la parte superior de la muestra evitando deshidratación de esta durante el escaneo. Se utilizó un filtro de latón de 0,2 mm de espesor para reducir el efecto de endurecimiento del haz.

El voltaje del tubo fue de 100 kV a una corriente de 70 μ A. La distancia entre la fuente de rayos X y la muestra fue de 50 mm, por último la distancia entre la muestra y el detector de fuente de rayos X utilizado fue de 300 mm. La muestra fue rotada 360° en segmentos de 0.3°. Una serie de sombras minerales (Phantoms; Ratoc System Engineering, Tokyo, Japan) fueron escaneadas antes para obtener un promedio de calibración.

Cada espécimen fue escaneado mediante la μ -CT antes y después del proceso de desmineralización. Se obtuvieron 1,200 imágenes por grupo en cada etapa, resultando un total de 9,600 imágenes, posteriormente fueron transformadas a formato DICOM. La evaluación de la imagen fue observada en el programa RadiAnt DICOM Viewer (<https://www.radiantviewer.com>) para crear un modelo en 3D y realizar reconstrucciones multiplanares. El análisis de las imágenes consistió en los niveles de escala de

grises: gris claro esmalte sano, gris oscuro esmalte desmineralizado.^{41,42} Una vez detectadas fueron trazadas y delimitadas con una línea negra, la zonas con mayor profundidad fueron medida en μm . (Fig. 8)



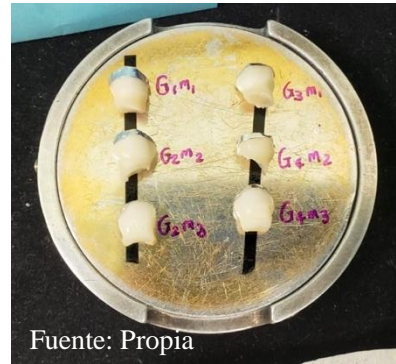
Fig. 8 Microtomógrafo en 3D

SEM

En fase I y fase II los especímenes se analizaron mediante SEM. Las muestras fueron fijadas a un portamuestras de aluminio con cinta adhesiva de carbón (SPI Supplies, EUA). El análisis se realizó usando un microscopio electrónico de barrido (JEOL, JSM6510LV, Japón) en el modo de bajo vacío a 10 Pa de presión en la cámara, con un voltaje de aceleración de los electrones de 20 kV y detectando electrones retrodispersados. La morfología de la superficie del esmalte fue observada a una magnificación 500x, 1,000x y 1,500x para la fase I y en la fase II se empleó una magnificación de 200x. La herramienta scaler del software de imagen (INCA, Oxford Instruments, Oxfordshire, Reino Unido) fue utilizada para trazar una cruz de las esquinas de la muestra cuadrada y el centro exacto de la cruz fue examinado. Con la intención de asegurar la reproducibilidad entre examinadores en cuanto a los hallazgos morfológicos, tres examinadores fueron calibrados con imágenes de SEM de esmalte seleccionadas de nuestros archivos de investigación previo al inicio del análisis de SEM (Kappa 0.95). (Fig. 5,6 y 7)



Fuente: Propia
Fig. 5 Preparación de la platina para el montaje de las muestras



Fuente: Propia
Fig. 6 Muestras montadas en la platina



Fuente: Propia
Fig. 7 Microscopio Electrónico de Barrido

Porosidad

La evaluación de la porosidad se realizó en la fase II, realizando un conteo de poros de forma cuantitativa, mediante las imágenes de SEM con una magnificación de 200x y se analizaron en el programa de ImageJ (Rasand WS, ImageJ; Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, EE. UU.). El primer paso fue calibrar cada imagen con la barra de referencia a 100 μm . Obteniendo un total de 15 áreas de interés (ROI) en cada micrografía (108x108 μm) antes y después de desmineralizar, convirtiéndolas en imágenes de 8 bits escala de grises y luego, en imágenes binarias de acuerdo con el principio del algoritmo. Este análisis, utilizó la herramienta de umbral para separar los objetos de la parte posterior de la fotomicrografía. La porosidad se calculó utilizando imágenes binarias, considerando los orificios de los poros como se describe y el número total de contornos y la superficie total de los poros en cada micrografía se calcularon en μm .

Se puede consultar literatura adicional con respecto a los detalles de los operadores morfológicos matemáticos para la eliminación de ruido y / o para evitar el límite interno de una región como poros.⁴³ (Fig. 9)

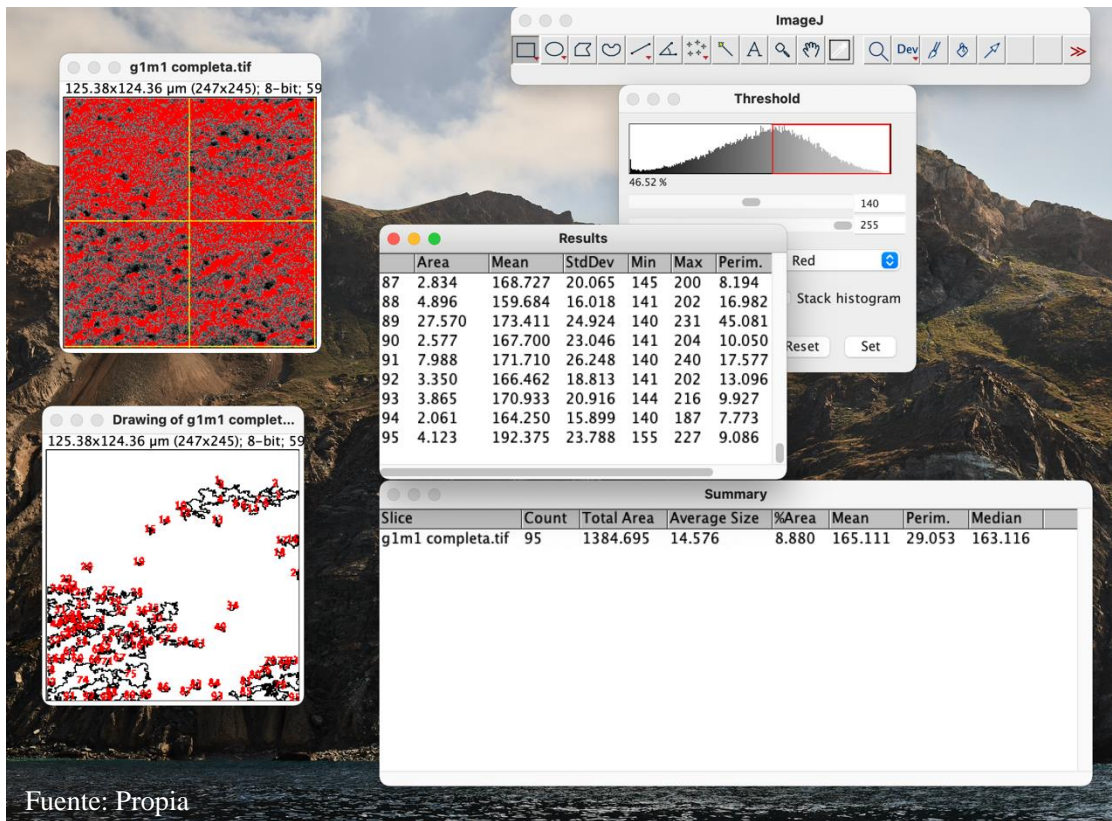


Fig. 9 Análisis de porosidad ImageJ

Proceso de desmineralización

En fase I y II se utilizó un modelo de desmineralización, la solución desmineralizante consistió en 2.2mM cloruro de calcio, 2.2mM dihidrógeno fosfato de potasio, 0.05 M ácido acético and 1 M hidróxido de potasio ajustado a un pH de 4.4 por 2, 4 y 7 días para crear en el esmalte una lesión de caries incipiente.⁴⁴

Una vez que se concluyó el proceso de desmineralización, los especímenes se enjuagaron durante 20 segundos con agua deionizada y se secaron con aire libre de aceite durante 15 segundos. Después, del tratamiento las muestras se evaluaron mediante μ -CT y SEM. (Fig. 10,11 y 12)



Fuente: Propia

Fig. 10 Balanza analítica



Fuente: Propia

Fig. 11 Reactivos para la solución desmineralizante



Fuente: Propia

Fig. 11 Ajuste de pH 4.4

6.6 Análisis Estadístico

Los datos se analizaron con el software SPSS (SPSS IBM, Nueva York, NY, EE. UU.) Versión 25. Las pruebas incluyeron una prueba de Kolmogorov-Smirnov para evaluar la distribución de los datos, para la fase I se empleó la prueba t-student para evaluar la profundidad de la lesión antes-después del tratamiento. Posteriormente, en la fase II se utilizaron las pruebas de t- student, Wilcoxon y el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) para comparar entre grupos. Debido a que la prueba de Levene mostró la misma varianza, se aplicó la prueba post-hoc de Bonferroni. Todas las pruebas se realizaron con un nivel de significancia $p \leq 0.05$.

6.7 Ética del estudio

La presente investigación contempló los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial (64ª Asamblea General de octubre de 2013).^{45,46} Específicamente en el Artículo 7 de este documento se establece que “*la investigación médica está sujeta a normas éticas que sirven para promover y asegurar el respeto a todos los seres humanos y para proteger su salud y sus derechos individuales*”. La donación de los órganos dentarios no representó daño alguno para los sujetos que decidieron participar en la investigación. La extracción de los órganos dentarios se realizó únicamente por indicación terapéutica del odontólogo tratante.

Además, con apego al Artículo 9, se protegió a las personas que participaron en la investigación, velando por su integridad, salud, intimidad y dignidad, resguardando su información personal en calidad de confidencialidad.

La participación fue voluntaria en todos los casos y se brindó la información detallada sobre el proyecto de investigación que se realizó, de acuerdo al Artículo 26. Todas las dudas acerca de los objetivos, métodos, disposición de las muestras, beneficios calculados, entre otros, fueron aclaradas por el investigador o en su caso por el odontólogo tratante hasta asegurar el completo entendimiento de la información Anexo II.

Asimismo, se cumplió con las leyes y reglamentos vigentes en México, destacando las siguientes consideraciones estipuladas en el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Salud.^{47,48}

Según el Artículo 17, la presente investigación se consideró “con riesgo mínimo”, debido a que involucró la obtención de dientes temporales, exfoliados o extraídos por indicación terapéutica.

El paciente menor de edad firmó un escrito de asentimiento informado, conforme a lo establecido en el Artículo 37 y su representante legal y dos testigos firmaron el consentimiento informado que reunió los requisitos enunciados en el Artículo 22, ver Anexo 9.

Además, en todo momento se cuidó la integridad de los investigadores implementando las medidas adecuadas de seguridad en el laboratorio.

En relación al investigador, este siguió las normas de acuerdo al reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud título cuarto, de la bioseguridad de las investigaciones capítulo I, de la investigación con microorganismos patógenos o material biológico que pueda contenerlos, descrito en los artículos 75 y 77.⁴⁸

7. Resultados

7.1 Artículo aceptado

7.1.1 Título del artículo

Enamel demineralization model in primary teeth: Micro-CT and SEM assessments of artificial incipient lesion.

7.1.2 Página frontal del manuscrito

Enamel demineralization model in primary teeth: Micro-CT and SEM assessments of artificial incipient lesion

Short running title: Demineralization model: μ -CT & SEM analysis

¹Arlete González-Sotelo, ¹Rosalía Contreras-Bulnes,* ¹Laura Emma Rodríguez- Vilchis, ²María de los Angeles Moyaho-Bernal ³Efraín Rubio-Rosas, ⁴Jorge Raúl Cerna-Cortez.

¹ Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Odontología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO), Jesus Carranza Esq. Paseo Tollocan, Col. Universidad, Toluca, Estado de México. C.P. 50130, México.

² Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Estomatología, Av. Manuel Espinosa Yglesias 31 Pte. 1304, Col. Los Volcanes, Puebla, C.P, 72570, México.

³ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento, Prolongación de la 24 Sur y Av. San Claudio, Ciudad Universitaria, Col. San Manuel, Puebla, C.P, 72570, México.

⁴ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Ciencias Químicas, Centro Avanzado de Pruebas Analíticas No Destructivas, Blvd Valsequillo y esquina Blvd Municipio libre S/N, Cd Universitaria, Col. San Manuel, Puebla, C.P, 72570, México.

The responsibility of acquisition, analysis, interpretation of data, drafting the work and final approval of the version to be published was to **Arlete González-Sotelo**

The responsibility of design, acquisition, analysis, interpretation of data, drafting the work and final approval of the version to be published was to **Rosalía Contreras-Bulnes**.

The responsibility of design, analysis, interpretation of data, drafting the work and final approval of the version to be published was to **Laura Emma Rodríguez Vilchis**.

The responsibility of analysis, interpretation of data, revising it critically and final approval of the version to be published was to **María de los Angeles Moyaho-Bernal**.

The responsibility of acquisition, analysis of data and final approval of the version to be published was to **Efraín Rubio-Rosas**.

The responsibility of analysis, interpretation of data, revising it critically and final approval of the version to be published was to **Jorge Raúl Cerna-Cortez**

*Send all correspondence to:

Dr. Rosalía Contreras-Bulnes

Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Odontología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología, Paseo Tollocan Esq. Jesús Carranza. Toluca, Estado de México. C.P. 50130, México. Tel: (52)7222124351, Fax: (52)7222126464, e-mail: rcontrerasb@uaemex.mx, or rcb0209@yahoo.com.mx

7.1.3 Carta de aceptación

The screenshot shows a web browser window with the title 'ScholarOne Manuscripts - Google Chrome'. The address bar contains the URL 'mc.manuscriptcentral.com/mrt?PARAMS=xik_SAvSgRuYbVXvqVDJccYZt4c47LY1KYxAioWdA9pvfgnXsqAFUXdXgknH4pNNDzF8kWsuT...'. The main content area features a dark header with the text 'Microscopy Research and Technique'. Below this is a section titled 'Preview (MRT-21-557)' containing an email preview. The email details are as follows:

From: JEMT@wiley.com
To: rcontrerasb@uaemex.mx, rcb0209@yahoo.com.mx
CC:
Subject: Manuscript Accepted - Updates Approved MRT-20-455.R1 [email ref: ENR-AW-1-e]
Body: 19-Jan-2021

Dear Dr. Contreras-Bulnes:

Manuscript id: MRT-20-455.R1

The final files that you submitted for your manuscript have been checked and have been found to be suitable for publication and so will be forwarded to the publisher shortly.

Sincerely,
Microscopy Research and Technique Editorial Office

Date Sent: 19-Jan-2021

At the bottom right of the preview area, there is a 'Close Window' button with a small icon.

7.1.4 Resumen

Numerosos estudios han analizado diferentes modelos de desmineralización sobre la superficie del esmalte, para formar lesiones incipientes artificiales; sin embargo, la mayoría de ellos son complejos, lentos, poco claros y los resultados no se pueden emplear en dientes primarios debido a las diferencias de contenido químico entre permanentes y temporales. Este estudio evaluó un modelo de desmineralización sobre esmalte primario, en tres períodos de incubación; cuantificando la formación de lesiones incipientes artificiales y la profundidad de la lesión mediante μ -CT, complementándolo con SEM para la caracterización morfológica. Se incluyeron en este estudio dieciséis órganos dentarios temporales anteriores sanos extraídos por retención prolongada y razones ortopédicas/ortodónticas, previo consentimiento informado. Las muestras se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos $n = 4$: G_Control, G_2D, G_4D y G_7D. Los análisis de μ -CT y SEM se realizaron en dos etapas: antes de la desmineralización (AD) y después de la desmineralización (DD). En el análisis estadístico se utilizó la prueba t-student para determinar diferencias entre grupos ($p \leq 0.05$). No se observaron lesiones incipientes en el grupo control. La profundidad de la lesión incipiente fue similar entre los grupos experimentales; los valores fueron de $38.16 \pm 05.40 \mu\text{m}$ a $42.61 \pm 04.75 \mu\text{m}$. Se formaron un total de 14 a 17 lesiones incipientes artificiales por grupo, la extensión y distribución fueron diferentes para cada período de incubación. Se formaron cinco lesiones erosivas en G_7D. Todos los grupos experimentales consiguieron formar lesiones artificiales incipientes en el esmalte temporal. La caracterización en SEM mostró cambios más pronunciados en la superficie del esmalte, a medida que aumentaban los días de inmersión en la solución de desmineralización. El período de incubación de 4 días es el más recomendado para el modelo de desmineralización, debido a la formación de lesiones incipientes únicamente y su extensión, lo que facilita su valoración.

7.2 Artículo enviado

7.2.1 Título del artículo

Morphological and porosity changes in primary enamel surface after an invitro demineralization model.

7.2.2 Página frontal del manuscrito

¹ Arlete González-Sotelo, ¹Rosalía Contreras-Bulnes, ¹Laura Emma Rodríguez-Vilchis, ²María de los Angeles Moyaho-Bernal
³Efraín Rubio-Rosas, ¹ Bernardo Teutle-Coyotecatl, ¹Irina Mézquita-Rodrigo.

¹ Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Odontología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO), Jesus Carranza Esq. Paseo Tollocan, Col. Universidad, Toluca, Estado de México. C.P. 50130, México.

² Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Facultad de Estomatología, Av. Manuel Espinosa Yglesias 31 Pte. 1304, Col. Los Volcanes, Puebla, C.P, 72570, México.

³ Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento, Prolongación de la 24 Sur y Av. San Claudio, Ciudad Universitaria, Col. San Manuel, Puebla, C.P, 72570, México.

Author contributions

The responsibility of acquisition, analysis, interpretation of data, drafting the work and final approval of the version to be published was to Arlete González-Sotelo. The responsibility of design, acquisition, analysis, interpretation of data, drafting the work and final approval of the version to be published was to Rosalía Contreras-Bulnes.

The responsibility of design, analysis, interpretation of data, drafting the work and final approval of the version to be published was to Laura Emma Rodríguez Vilchis. The responsibility of analysis, interpretation of data, revising it critically and final approval of the version to be published was to María de los Angeles Moyaho-Bernal.

The responsibility of acquisition, analysis of data and final approval of the version to be published was to Efraín Rubio-Rosas. The responsibility of analysis, interpretation of data, revising it critically and final approval of the version to be published was to Bernardo Teutle-Coyotecatl and Irina Mézquita-Rodrigo.

*Send all correspondence to:

Dr. Rosalía Contreras-Bulnes

Universidad Autónoma del Estado de México, Facultad de Odontología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología, Paseo Tollocan Esq. Jesús Carranza. Toluca, Estado de México. C.P. 50130, México. Tel: (52)7222124351, Fax: (52)7222126464, e-mail: rcontrerasb@uaemex.mx, or rcb0209@yahoo.com.mx

Submission Confirmation



Thank you for your submission

Submitted to

Microscopy Research and Technique

Manuscript ID

MRT-21-557

Title

Morphological and porosity changes in primary enamel surface after an in vitro demineralization model

Authors

González-Sotelo, Arlete
Contreras-Bulnes, Rosalía
Rodríguez-Vilchis, Laura
Moyaho-Bernal, María
Rubio-Rosas, Efraín
Teutle-Coyotecatl , Bernardo
Mézcuita-Rodrigo, Irina

Date Submitted

20-Aug-2021

7.1.4 Resumen

Los modelos *in vitro* simulan un fenómeno de interés de la cavidad oral; específicamente en la investigación de odontología preventiva. Desde 1989, se han utilizado diversos métodos para evaluar la desmineralización. Diversos estudios se han realizado para observar y medir la progresión de la caries mediante modelos de desmineralización. Sin embargo, la mayoría de los estudios se centran en dientes permanentes o bovinos, la morfología del esmalte y la profundidad de la lesión de caries. Este estudio evalúa los cambios en la porosidad sobre la superficie del esmalte temporal después de un modelo de desmineralización. Se incluyeron nueve órganos dentarios temporales anteriores sanos extraídos por retención prolongada y razones ortopédicas/ortodóncicas, previo consentimiento informado. Los especímenes se asignaron aleatoriamente a tres grupos $n = 3$: G1_2D, G2_4D y G3_7D. Los análisis SEM se realizaron durante dos etapas: antes de la desmineralización (AD) y después de la desmineralización (DD). Las imágenes SEM se analizaron con el programa ImageJ, posteriormente se determinaron las diferencias entre los grupos con el programa estadístico SPSS versión 25 se utilizó la prueba t-student, Wilcoxon y ANOVA ($p \leq 0.05$).

La caracterización morfológica AD reveló nuevos cráteres y grietas en la superficie del esmalte en los grupos G1_2D y G2_4D. Se observaron áreas de esmalte erosionadas localizadas en G3_7D. El recuento de poros de la superficie del esmalte de los dientes temporales y los valores AD variaron de 64.26 ± 37.62 a 97.93 ± 34.25 , DD oscilaron entre 150.06 ± 64.86 a $256 \pm 58,14$. El análisis estadístico indica diferencias significativas para la porosidad de la superficie del esmalte entre ellos ($p < 0.01$). El recuento de poros de la DD aumentó significativamente en todos los grupos ($p < 0.01$).

Los cambios morfológicos fueron más evidentes a medida que aumentaban los días de desmineralización; Se puede emplear la inmersión de 7 días de desmineralización como modelo erosivo del esmalte.

El recuento de poros aumentó después de la inmersión en el modelo de desmineralización, la porosidad inicial parece ser un factor determinante.

9. Discusión general

Fase I

El presente estudio empleó μ -CT y SEM para evaluar un modelo de desmineralización en esmalte temporal, en tres períodos de incubación (2, 4 y 7 días).

Se han utilizado diversos modelos de desmineralización, la mayoría de ellos se han realizado en esmalte permanente o esmalte bovino,^{6,31,49} sin embargo, existen escasos estudios en dentición temporal. Es necesario un modelo de desmineralización específico para esmalte temporal, debido a las diferencias entre los dientes permanentes y temporales, los últimos tienen un mayor número de zonas aprismáticas en su superficie,^{6,32} y un menor contenido inorgánico lo cual, lo hace más susceptible a caries dental.⁵⁰ Por las razones antes mencionadas con base en la revisión de literatura y los resultados de un estudio piloto, se evaluó un modelo de desmineralización con pH 4.4 bajo tres períodos de incubación para producir lesiones artificiales del esmalte, diferente a los propuestos para dientes permanentes.^{29-31,49} Debido a las diferencias mencionadas anteriormente y al grosor delgado del esmalte temporal,⁵¹ se decidió evaluar los efectos durante el periodo de incubación en la formación y profundidad de las lesiones en un período corto de 2 días (tiempo de incubación propuesto), un período de 4 días para lograr una profundidad únicamente en esmalte⁴⁹ y a los 7 días para producir lesiones más profundas.³¹

La formación de lesiones se examinó visualmente⁹ al final de cada período de incubación; posteriormente, se llevaron a cabo todas las técnicas de análisis anteriormente propuestas.

Este estudio es el primero en utilizar μ -CT para evaluar la formación de lesiones incipientes artificiales mediante un modelo de desmineralización en esmalte temporal, en tres períodos de inmersión. Además, es el primero en reforzar la evaluación mediante el análisis SEM, contrariamente al estudio realizado con incisivos bovinos evaluados por microradiografías previamente reportado.^{30,31,52}

Los estudios comparativos de μ -CT vs el análisis histológico en el diagnóstico de caries, demostraron que los resultados se correlacionan adecuadamente con los cortes histológicos 2D y evaluación de μ -CT.²⁴ Por lo tanto, la μ -CT es una alternativa para evaluar lesiones artificiales especialmente en dientes temporales, debido a la pequeña superficie para el análisis, además, el órgano dentario temporal es más frágil que los dientes permanentes.⁶ También, una ventaja de la

μ -CT es la nula destrucción de la muestra durante el procesamiento de escaneo,³⁸ el análisis piloto con la técnica de SEM causó fracturas en las muestras, razón por la cual, se utilizaron muestras independientes en este estudio.

Existen varios métodos de caracterización para la evaluación de la superficie del esmalte, la mayoría de ellos se han aplicado en dientes permanentes, esmalte bovino y escasos estudios en dientes temporales. Algunos de ellos son: microdureza,^{53,54} luz polarizada,^{44,49,50} microradiografía transversal y microradiografía.^{30,31,49} Sin embargo, el análisis de las muestras mediante estas técnicas requiere seccionarlas en muestras muy delgadas antes de evaluar la superficie o antes y después de ciertos procedimientos.⁵⁵ Los métodos con técnicas destructivas, provocan muestras aún más frágiles³⁸ y no reutilizables durante las evaluaciones de seguimiento de los protocolos. Por otro lado, en los últimos 5 años, la evaluación de μ -CT se ha utilizado en algunos estudios sobre caries y tratamientos dentales, incluida la terapia con fluoruro de diamino de plata,⁵⁶ el potencial de remineralización de dentífricos,⁵⁷ la eficacia del barniz dental⁵⁸ y los métodos de detección de caries.⁵⁹ La μ -CT ha mostrado ser un método con ventajas en comparación con las técnicas de caracterización tradicionales.

Ozgul et al.,³⁸ reportaron imágenes comparables a este estudio sobre el área desmineralizada mediante μ -CT, revelando una similitud en la profundidad y número de lesiones artificiales formadas por grupo. Sin embargo, fueron menos profundas que las lesiones artificiales en dientes temporales reportadas en el grupo control negativo evaluadas por luz polarizada o μ -CT. Por el contrario, se reportó una menor profundidad de la lesión en los grupos de protocolos preventivos.^{38,54}

Además, la profundidad de la lesión per se no proporciona un análisis completo de los efectos producidos por los diferentes períodos de incubación, ya que cada uno presenta una caracterización morfológica específica de la superficie del esmalte, como lo revelan observaciones adicionales en imágenes μ -CT y SEM. En la μ -CT se detectó la morfología en 3D y localización de lesiones artificiales. A pesar de que toda la superficie del esmalte se sumergió en una solución desmineralizante, se formaron lesiones artificiales en sitios determinados, y también se limitaron a las superficie bucal o palatina de los dientes anteriores, probablemente porque el esmalte no es ni estructural ni químicamente homogéneo.⁶⁰ Además, un estudio anterior encontró variaciones no solo entre diferentes dientes sino entre diferentes sitios en el mismo diente.⁶

Se observaron variaciones según el período de incubación en la solución desmineralizante en relación con la extensión y tipos de lesiones artificiales. Las lesiones artificiales ocurrieron en el modelo de desmineralización corto a 2 días de inmersión, según lo reportado por Wang et al.,³³ quienes concluyeron que el esmalte temporal se disuelve considerablemente más rápido que el esmalte permanente, y podría ser más pronunciado si se establece un período de incubación más largo, como lo revela el análisis de μ -CT. Cada período presentó características específicas como: pequeñas lesiones incipientes después de 2 días de incubación, más grandes asociadas a 4 días y 2 tipos de lesiones artificiales (incipientes y erosivas) formadas a los 7 días, dando como resultado un nuevo modelo de formación de lesiones mixtas, un hallazgo importante no esperado.

Con el fin de nutrir los hallazgos de μ -CT, se empleó SEM para complementar el análisis de superficie del esmalte y proporcionar información adicional valiosa sobre la caracterización morfológica. Es importante notar que no existen reportes previos que complementen los estudios de μ -CT con la caracterización SEM con un modelo de desmineralización para la formación de lesiones artificiales en esmalte temporal. Un estudio de Yu et al.,⁶¹ evaluó el efecto remineralizante en la aplicación de fluoruro de diamino de plata y fluoruro de sodio en lesiones de caries permanentes del esmalte, reportando que las superficies del esmalte tratadas con fluoruros permanecieron relativamente densas e intactas en comparación con las micrografías de otros grupos. Además, las profundidades de las lesiones obtenidas en imágenes de μ -CT variaron de 129 μm a 181 μm (más alto que nuestros resultados), sin diferencias significativas en lesiones profundas entre los grupos experimentales. Cabe destacar que, aunque emplearon μ -CT y SEM para caracterizar los dientes permanentes, no relacionaron ambas técnicas en sus resultados. En comparación con nuestros hallazgos, se reveló una relación entre la superficie del esmalte mediante μ -CT y el aspecto liso del tejido mediante SEM caracterizado por microporosidades y rasguños homogéneos; ambas morfologías descritas son características del esmalte funcional sano, visto previamente antes del modelo de desmineralización para la formación de lesiones artificiales. Aunque los grupos experimentales mostraron múltiples lesiones incipientes a lo largo de la superficie del esmalte en el análisis μ -CT, la apariencia de la superficie varió entre los grupos SEM: G2_D mostró pequeñas lesiones con apariencia rugosa del esmalte, mientras que el grupo G_4D mostró lesiones incipientes y extensas sobre la superficie del esmalte, además se observó un patrón de escamas de pescado. La pérdida de continuidad de la superficie del esmalte en G_7D mediante

μ -CT se caracterizó por una superficie de esmalte erosionado según lo revelado por el análisis SEM.

El patrón de escamas de pescado observado en G_4D fue similar a los resultados reportados por Elkassas y Arafa.,²⁹ donde la formación de lesiones se dio en un período de incubación de 5 días bajo una solución desmineralización diferente.

Los hallazgos de nuestro estudio sugieren que el uso del modelo de incubación de 4 días para la formación de lesiones incipientes artificiales, en las condiciones específicas empleadas, es el mejor ya que, produce un mayor número de lesiones homogéneas, lo que podría incrementar la calidad de la evaluación de futuros protocolos para la prevención o tratamiento de lesiones incipientes. El período de incubación de 7 días podría utilizarse en la evaluación simultánea de protocolos para la prevención o el tratamiento no solo de lesiones incipientes sino también de la erosión del esmalte, además de sentar las bases para el desarrollo de nuevos modelos de erosión en dientes temporales. Si bien no se recomienda el uso del período de incubación de 2 días debido a la formación de pequeñas lesiones artificiales que son más complejas de localizar y evaluar, resalta la susceptibilidad del esmalte deciduo al desarrollo de lesiones de caries incipientes, como se mencionó anteriormente,^{50,52} incluso en períodos cortos de desmineralización, enfatizando la necesidad de prevenir y tratar estas lesiones desde etapas muy tempranas en niños.

Las principales limitaciones de este estudio fue la dificultad en la recolección de muestras (dientes primarios sanos extraídos por motivos terapéuticos), el acceso reducido a equipos de μ -CT (alta demandada por la amplia gama de análisis de materiales que se pueden realizar, debido a la capacidad modular la cantidad de rayos X), el tiempo dedicado al escaneo, reconstrucción y análisis de las imágenes, entre otros. Además, el análisis de la muestra durante dos etapas (antes y después del modelo de desmineralización) duplicó el número de imágenes requeridas. Aunque se redujo el número de muestras por grupo, el análisis μ -CT se realizó en dos fases antes y después de la desmineralización. Se obtuvieron 1,200 imágenes por grupo en cada etapa, resultado un total de 9,600 imágenes analizadas. Sin embargo, se recomiendan estudios adicionales en relación con la densidad mineral y la porosidad de las lesiones artificiales del esmalte.

Aunque este modelo *in vitro* incluyó dientes exfoliados (replicando una desmineralización constante para producir una lesión incipiente del esmalte artificial), no refleja las condiciones exactas de la cavidad bucal. Por tanto, esta variable debe ser considerada en otros estudios *in vitro*

a la hora de evaluar los periodos de incubación en un modelo de desmineralización relacionado con materiales y métodos para la prevención de la caries dental.

Fase II

Los resultados de este estudio mostraron la morfología y porosidad del esmalte temporal, antes y después de un modelo de desmineralización en tres períodos de inmersión, evaluados mediante SEM y el programa ImageJ.

Se han estudiado varios métodos para medir la porosidad; la mayoría de ellos se han realizado en biomateriales o ingeniería.^{40,62,63,64} Sin embargo, ningún artículo ha reportado la evaluación de la porosidad en esmalte temporal. Se necesitan protocolos de desmineralización específicos para esmalte temporal, ya que se han demostrado las diferencias entre los dientes permanentes y temporales lo que da por resultado un esmalte temporal más susceptible a la caries dental.⁶⁵

Por lo tanto, es importante evaluar la porosidad en la superficie del esmalte temporal y evaluar el proceso para producir lesiones artificiales después de un modelo de desmineralización. Shellis⁶⁶ reportó que la zona interprismática y la densidad en promedio era mayor en dientes temporales. Estos resultados apoyan y proporcionan una base para la hipótesis entre las diferencias de órganos dentarios temporales y permanentes o bovinos explicando la porosidad del esmalte y la susceptibilidad al ataque de caries en esmalte temporal.

Además, en odontología el SEM es un poderoso instrumento que se utiliza comúnmente para la caracterización de materiales dentales,^{40,67,68} biológicos o muestras de tejidos vivos;⁶⁹ de ahí el motivo de esta investigación.

Las micrografías SEM AD revelaron microporosidades, ranuras de desgaste y rayones en todos los grupos; sin embargo, cada grupo tenía su patrón específico; G_2D y G_7D mostraron mayor y menor número de rayones, respectivamente. Estas irregularidades pueden ser producidas por factores externos como hábitos alimentarios, higiene bucal inadecuada,⁷⁰ o atribuirse a los procesos naturales de desgaste.⁷¹

Las características morfológicas DD fueron más evidentes que AD; sin embargo, el esmalte erosionado y un aspecto destructivo se observó solo en G_7D, los cambios morfológicos fueron similares comparados con la pérdida de estructura de esmalte observada por μ -CT y reportada por González-Sotelo et al.,³⁹ en las mismas condiciones de desmineralización.

Las micrografías SEM se procesaron con el software ImageJ.^{40,72} Utilizando un método de binarización para separar objetos de la parte posterior de la microfotografía y obtener valores de porosidad considerando los orificios de los poros en cada micrografía registrando el número total de porosidades en un área determinada,^{40,72} aplicado para contar el número de poros en tejido humano como el esmalte dental.

El análisis de ImageJ mostró que el recuento de poros en la superficie del esmalte AD no fue homogéneo en todos los grupos, G_2D mostró un recuento de poros más alto en la superficie del esmalte que los demás; esto podría deberse a la estructura heterogénea de los poros del esmalte humano, consecuencia de la estructura de los tres niveles de cristales, asociados con los cuerpos del prisma, las colas del prisma y las uniones del prisma⁷³ y probablemente debido a las características higiénicas o dietéticas y a factores como la exposición de ácidos en el ambiente oral. Como era de esperar, todos los grupos presentaron un aumento en el recuento de poros DD. La literatura señala que la desmineralización aumenta la porosidad. Dibdin⁷⁴ evaluó la estructura de poros del esmalte dental sano y desmineralizado, descubriendo que se producía un aumento en la porosidad después del tratamiento con soluciones desmineralizantes. La desmineralización del esmalte es significativa debido al ataque de los ácidos, volviendo la superficie rugosa por pérdida de minerales; además, el proceso de desmineralización es heterogéneo y anisotrópico, debido a las estructuras jerárquicas del esmalte dental, ocurriendo más fácilmente en el límite interprisma-prisma y en algunos sitios de los prismas o interprismas.⁷⁵ Todos estos procesos podrían favorecer el aumento de la porosidad del esmalte dental.

Los resultados obtenidos en el grupo G_2D mostraron una elevada cantidad de poros, probablemente debido a una mayor porosidad inicial, lo que aparentemente podría influir en la porosidad final. Es importante señalar que una estructura más porosa permitiría una mayor difusión de iones en ambas direcciones, dentro y fuera de las microestructuras del esmalte;⁷⁶ por lo tanto, las medidas preventivas adecuadas y hábitos alimentarios favorables en los pacientes, también podrían favorecer los procesos de remineralización, fenómeno no evaluado en el presente estudio, pero importante a considerar en futuras investigaciones *in vitro*.

Un análisis de los valores del recuento de poros mostró un incremento de más del doble en la porosidad de todos los grupos; el aumento fue ligeramente mayor en los grupos con períodos de desmineralización más cortos (G_2D y G_4D). Un menor aumento observado en la porosidad de G_7D podría deberse a la erosión en la superficie del esmalte, que expone un área más profunda

con menos prismas del esmalte; por lo tanto, se dispone de menos espacios intra e interprismáticos para la difusión de la solución desmineralizante⁷⁵ y la formación de poros. Asimismo, se ha reportado que en el fenómeno de disolución ácida sobre el esmalte humano se produce una profunda desmineralización y pérdida volumétrica, que aumentan con el tiempo.⁷⁷

Los modelos *in vitro* tienen limitaciones importantes, principalmente relacionadas con su incapacidad para simular los complejos procesos biológicos implicados en la caries. Otros límites incluyen la fragilidad de la muestra cuando se procesa, la facilidad de una muestra para fracturarse cuando se somete al vacío en la técnica SEM y la pequeña superficie para la manipulación experimental.

Finalmente, los resultados de este estudio no se pueden comparar con los hallazgos de otros trabajos científicos, ya que hay pocos estudios sobre el área y ningún análisis por ImageJ; sin embargo, los resultados obtenidos de este grupo de investigación contribuyen a dilucidar los procesos de desmineralización en dientes temporales. La metodología descrita podría emplearse en estudios futuros para evaluar medidas preventivas para el control de la caries, como enjuagues bucales con flúor, gel, barnices, irradiación con láser y procedimientos preventivos combinados.

Adicionalmente, este estudio muestra la posibilidad de aplicar el programa ImageJ, a través de un análisis más profundo de micrografías SEM, para evaluar la porosidad de los tejidos humanos en el campo de las ciencias médicas, y no solo en aquellas ciencias en las que este software se ha utilizado ampliamente para el mismo propósito, como geología, ingeniería, entre otros.

10. Conclusiones generales

Fase I

Dentro de las limitaciones de este estudio, los resultados apoyan que:

Aunque todos los modelos *in vitro* evaluados bajo tres períodos de incubación forman lesiones artificiales incipientes de similar profundidad, se observaron cambios morfológicos más pronunciados a medida que aumentaba el período; sin embargo, la incubación de 4 días es el período más recomendado debido a la formación adecuada de lesiones incipientes y su extensión en el esmalte temporal.

Fase II

En este estudio, los cambios morfológicos fueron más evidentes a medida que aumentaban los días de desmineralización, se podrían emplear 7 días de inmersión como un modelo de erosión en esmalte temporal.

El recuento de poros aumentó después del modelo de desmineralización; sin embargo, la porosidad inicial parece ser un factor determinante para la porosidad final, independientemente del período de inmersión.

11. Bibliohemerografía utilizada

1. Ross MH, Pawlina W. Histología texto y Atlas de color de Biología Molecular y Celular. 5a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.
2. Gómez ME, Campos A. Histología y embriología. 2ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2004.
3. Velayos JL. Anatomía de Cabeza para odontólogos. 4a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2007.
4. Palma A, Sánchez F. Técnicas de ayuda odontológica y estomatológica. 1ª ed. Madrid: Paraninfo; 2007.
5. Barrancos MJ, Barrancos P. Operatoria Dental Integración Clínica. 4a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006.
6. Whittaker DK. Structural variations in the surface zone of human tooth enamel observed by scanning electron microscopy. Arch Oral Biol. 1982;27(5):383-92.
7. Sabel N. Enamel of primary teeth morphological and chemical aspects. Swed Dent J. 2012; Suppl (222):1-77.
8. Kahvecioglu F, Kahraman K, Akman H, et al. Effects of Er:YAG Laser Treatment on the Mineral Content and Morphology of Primary Tooth Enamel. Photomed Laser Surg. 2018;36(12):680-686.
9. Oliveira GM, Ritter AV, Heymann HO, et al. Remineralization effect of CPP-ACP and fluoride for white spot lesions in vitro. J Dent. 2014; 42(12):1592-602.
10. Mathur VP, Dhillon JK. Dental Caries: A Disease Which Needs Attention. Indian J Pediatr. 2018; 85(3):202-206.
11. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, et al. Dental caries. Nat Rev Dis Primers. 2017;3:17030.
12. Harris NO, García- Godoy F. Odontología preventiva primaria. 2a ed. Distrito Federal: Médica Panamericana; 2006.
13. Featherstone JDB. Dental caries: A dynamic disease process. Aust Dent J. 2008;53(3):286-91.
14. Featherstone JDB. The continuum of dental caries evidence for a dynamic disease process. J Dent Res. 2004;83:39-42.
15. Crochrane NJ, Cai F, Huq NL, et al. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. J Dent Res. 2010;89(11):1187-97.
16. Negroni M. Microbiología Estomatológica: Fundamentos y guía práctica. 1ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2004.

17. Selwitz RH, Ismail A, Pitts NR. Dental caries. *Lancet*. 2007; 369:51-9.
18. Silverstone LM. Structure of carious enamel, including the early lesion. *Oral Sci Rev*. 1973;3:100-60.
19. Newbrun E. *Cariología*. Edt. Limusa. Cap. 7 1984. p. 271-280.
20. Cheng Lei, Li Jiyao, Xu Hockin HK, et al. Demineralization and Remineralization. En: Xuedong Z. *Dental Caries: Principles and Management*. Berlin: Springer; 2016. p. 71-80.
21. Michael V. Swain JX. State of the art of micro-CT applications in dental research. *Int J Oral Sci*. 2009; 1(4):77–188.
22. Taylor AM, Satterthwaite JD, Ellwood RP, et al. An automated assessment algorithm for micro-CT images. *Surgeron*. 2010; 8(6):334–40.
23. Shahmoradi M, Swain MV. Quantitative characterization and micro-CT mineral mapping of natural fissural enamel lesions. *J Dent*. 2016; 46:23–29.
24. Boca C, Truyen B, Henin L, et al. Comparison of micro-CT imaging and histology for approximal caries detection. *Sci Rep*. 2017;7(1):6680.
25. Tsiper S, Dicker O, Kaizerman I, et al. Sparsity-Based Super Resolution for SEM Images. *Nano Lett*. 2017;17(9):5437-5445.
26. Rha EY, Kim JM, Yoo G. Volume Measurement of Various Tissues Using the Image J Software. *J Craniofac Surg*. 2015;26(6):e505-6.
27. Michalak H, Okarma K. Improvement of Image Binarization Methods Using Image Preprocessing with Local Entropy Filtering for Alphanumerical Character Recognition Purposes. *Entropy (Basel)*. 2019;21(6):562.
28. Otsu, N. A threshold selection method from gray-level histograms. *IEEE Trans. Syst. Man Cybern*. 1979; 9:62–66.
29. Elkassas D, Arafa A. Remineralizing efficacy of different calcium- phosphate and fluoride based delivery vehicles on artificial like enamel lesions. *J Dent*. 2014; 42(4):466-74.
30. ten Cate JM, Duijsters PP. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res*. 1982; 16(3): 201-10.
31. ten Cate JM, Buijs MJ, Damen JJ. pH-cycling of enamel and dentin lesions in the presence of low concentrations of fluoride. *Eur J Oral Sci*. 1995;103(6): 362-7.
32. Ripa L. The histology of the early carious lesion in primary teeth with special reference to a "prismless" outer layer of primary enamel. *J Dent Res*. 1966; 45(5): p. 5-11.

33. Wang LJ, Tang R, Bonstein T, et al. Enamel demineralization in primary and permanent teeth. *J Dent Res*. 2006;85(4):359-63.
34. Gentile E, Di Stasio D, Santoro R, et al. In vivo microstructural analysis of enamel in permanent and deciduous teeth. *Ultrastruct Pathol*. 2015;39(2):131-4.
35. Shellis RP, Barbour ME, Jones SB, et al. Effects of pH and acid concentration on erosive dissolution of enamel, dentine, and compressed hydroxyapatite. *Eur J Oral Sci*. 2010;118(5):475-82.
36. Arends J, Jongebloed W, Ogaard B, et al. SEM and microradiographic investigation of initial enamel caries. *Scand J Dent Res*. 1987;95(3):193-201.
37. Magalhães AC, Moron BM, Comar LP, et al. Comparison of cross-sectional hardness and transverse microradiography of artificial carious enamel lesions induced by different demineralising solutions and gels. *Caries Res*. 2009;43(6):474-83.
38. Ozgul BM, Orhan K, Oz FT. Micro-computed tomographic analysis of progression of artificial enamel lesions in primary and permanent teeth after resin infiltration. *J Oral Sci* 2015;57(3):177-83.
39. González-Sotelo A, Contreras-Bulnes R, Rodríguez-Vilchis LE, et al. Enamel demineralization model in primary teeth: Micro-CT and SEM assessments of artificial incipient lesion. *Microsc Res Tech*. 2021;84(7):1577-1585.
40. Coldebella CR, Santos-Pinto L, Zuanon AC. Effect of ultrasonic excitation on the porosity of glass ionomer cement: a scanning electron microscope evaluation. *Microsc Res Tech*. 2011;74(1):54-7.
41. Ogawa K, Yamashita Y, Ichijo T, et al. The ultrastructure and hardness of the transparent layer of human carious dentin. *J Dent Res*. 1983;62(1):7-10.
42. Schulte AG, Wittchen A, Stachniss V, et al. Approximal caries diagnosis after data import from different digital radiography systems: interobserver agreement and comparison to histological hard-tissue sections. *Caries Res*. 2008;42(1):57-61.
43. Boissier C, Feidt F, Nordstierna L. Study of pharmaceutical coatings by means of NMR cryoporometry and SEM image analysis. *J Pharm Sci*. 2012;101(7):2512-22.
44. Salman NR, ElTekeya M, Bakry N, et al. Comparison of remineralization by fluoride varnishes with and without casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate in primary teeth. *Acta Odontol Scand*. 2019; 77(1):9-14.

45. World Medical Association [Internet]. Ferney-Voltaire: The Association; c2016-2020 [actualizado 2020 Ene 5; citado 2020 May 12]. WMA Declaration of Helsinki 2013; [3 pantallas aproximadamente]. Disponible en: <https://www.wma.net/what-we-do/medical-ethics/declaration-of-helsinki/>
46. World Medical Association [Internet]. Ferney-Voltaire: The Association; c2016-2020 [actualizado 2018 Jul 9; citado 2020 May 12]. WMA Declaration of Helsinki 2013; [30 pantallas aproximadamente]. Disponible en: <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>
47. Gobierno de México [Internet]. México: Secretaría de Salud; c2018-2020 [actualizado 2019 Jun 11; citado 2020 May 12]. Comisión Nacional de Bioética Normatividad Nacional; [2 pantallas aproximadamente]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/conbioetica/articulos/normatividad-nacional-164543>
48. Gobierno de México [Internet]. México: Secretaría de Salud; c2018-2020 [actualizado 2014 Abr 2; citado 2020 May 12]. Comisión Nacional de Bioética Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud; [62 pantallas aproximadamente]. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/281701/Reg_LGS_MIS.pdf
49. Kumar VL, Itthagarun A, King NM. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on remineralization of artificial caries-like lesions: an in vitro study. *Aust Dent J.* 2008;53(1):34-40.
50. Bajaj M, Poornima P, Praveen S, et al. Comparison of CPP-ACP, Tri-Calcium Phosphate and Hydroxyapatite on Remineralization of Artificial Caries Like Lesions on Primary Enamel -An in vitro Study. *J Clin Pediatr Dent.* 2016;40(5):404-9.
51. De Menezes Oliveira MA, Torres CP, Gomes-Silva JM, et al. Microstructure and mineral composition of dental enamel of permanent and deciduous teeth. *Microsc Res Tech.* 2010;73(5):572-7.
52. Itthagarun A, King NM, Rana R. Effects of child formula dentifrices on artificial caries like lesions using in vitro pH-cycling: preliminary results. *Int Dent J.* 2007;57(5):307-13.
53. Mohd Said SN, Ekambaram M, Yiu CK. Effect of different fluoride varnishes on remineralization of artificial enamel carious lesions. *Int J Paediatr Dent.* 2017;27(3):163-173.

54. Tuloglu N, Bayrak S, Tunc ES, et al. Effect of fluoride varnish with added casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on the acid resistance of the primary enamel. *BMC Oral Health*. 2016;16(1):103.
55. Mellberg JR, Castrovince LA, Rotsides ID. In vivo remineralization by a monofluorophosphate dentifrice as determined with a thin-section sandwich method. *J Dent Res*. 1986;(8):1078-83.
56. Li Y, Liu Y, Psoter WJ, Nguyen OM, et al. Assessment of the Silver Penetration and Distribution in Carious Lesions of Deciduous Teeth Treated with Silver Diamine Fluoride. *Caries Res*. 2019;53(4):431-440.
57. Bijle MNA, Tung LP, Wong J, et al. Enhancing the Remineralization Potential of Child Formula Dentifrices: An In Vitro Study. *J Clin Pediatr Dent*. 2019;43(5):337-344.
58. Sleibi A, Tappuni AR, Davis GR, et al. Comparison of efficacy of dental varnish containing fluoride either with CPP-ACP or bioglass on root caries: Ex vivo study. *J Dent*. 2018;73:91-96.
59. Ribeiro AA, Purger F, Rodrigues JA, et al. Influence of contact points on the performance of caries detection methods in approximal surfaces of primary molars: an in vivo study. *Caries Res*. 2015;49(2):99-108.
60. Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, et al. The chemistry of enamel caries. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(4):481-95.
61. Yu OY, Mei ML, Zhao IS, et al. Remineralisation of enamel with silver diamine fluoride and sodium fluoride. *Dent Mater*. 2018;34(12):e344-e352
62. Dunn AS, Campbell PG, Marra KG. The influence of polymer blend composition on the degradation of polymer/hydroxyapatite biomaterials. *J Mater Sci Mater Med*. 2001;12(8):673-7.
63. Saghiri MA, Asgar K, Lotfi M, et al. Application of mercury intrusion porosimetry for studying the porosity of mineral trioxide aggregate at two different pH. *Acta Odontol Scand*. 2012;70(1):78-82.
64. Moiduddin K. Microstructure and mechanical properties of porous titanium structures fabricated by electron beam melting for cranial implants. *Proc Inst Mech Eng H*. 2018;232(2):185-199.
65. Borsatto MC, Torres CP, Chinelatti MA, et al. Effect of Er:YAG laser parameters on ablation capacity and morphology of primary enamel. *Photomed Laser Surg*. 2009;27(2):253-60.
66. Shellis RP. Relationship between human enamel structure and the formation of caries-like lesions in vitro. *Arch Oral Biol*. 1984;29(12):975-81.

67. Da Mata M, Santos-Pinto L, Cilense Zuanon AC. Influences of the insertion method in glass ionomer cement porosity. *Microsc Res Tech.* 2012;75(5):667-70.
68. Marti LM, Becci AC, Spolidorio DM, et al. Incorporation of chlorhexidine gluconate or diacetate into a glass-ionomer cement: porosity, surface roughness, and anti-biofilm activity. *Am J Dent.* 2014;27(6):318-22
69. Mehdizadeh KA, Tahermanesh K, Chaichian S, et al. How to prepare biological samples and live tissues for scanning electron microscopy (SEM) (review article). *GMJ.* 2014; 3:63-80.
70. Banda NR, Vanaja Reddy G, Shashikiran ND. Evaluation of primary tooth enamel surface morphology and microhardness after Nd:YAG laser irradiation and APF gel treatment--an in vitro study. *J Clin Pediatr Dent.* 2011;35(4):377-82.
71. Rios D, Honório HM, Magalhães AC, et al. Scanning electron microscopic study of the in situ effect of salivary stimulation on erosion and abrasion in human and bovine enamel. *Braz Oral Res.* 2008;22(2):132-8.
72. Sezgin M, Sankur B. Survey over image thresholding techniques and quantitative performance evaluation. *J. Electron. Imag.* 2004; 13: 146–165.
73. Shellis RP, Barbour ME, Jones SB, et al. Effects of pH and acid concentration on erosive dissolution of enamel, dentine, and compressed hydroxyapatite. *Eur J Oral Sci.* 2010;118(5):475-82.
74. Dibdin GH. The internal surface and pore structure of enamel. *J Dent Res.* 1969;48(5):771-6.
75. Pan H, Tao J, Yu X, et al. Anisotropic demineralization and oriented assembly of hydroxyapatite crystals in enamel: smart structures of biominerals. *J Phys Chem B.* 2008;112(24):7162-5.
76. Ying D, Chuah GK, Hsu CY. Effect of Er:YAG laser and organic matrix on porosity changes in human enamel. *J Dent.* 2004;32(1):41-6.
77. Hayashi O, Chiba T, Shimoda S, et al. Demineralization and remineralization phenomena of human enamel in acid erosion model. *J. Hard Tissue Biol.* 2016;25:27- 34.

9. Anexos

INFORMACIÓN PARA LOS PACIENTES Y CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN LOS PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Título del proyecto: Modelo de desmineralización en esmalte temporal: evaluaciones Micro-CT y SEM.

Justificación de la investigación

La caries dental es la enfermedad bucal con mayor prevalencia en México, afecta a la gran mayoría de los niños. Inicia con una desmineralización de color blanco y si progresa termina en una cavitación.

Diversos estudios han simulado el proceso de desmineralización *in vitro*, sin embargo, la mayoría son poco claros y se han realizado mayormente en dentición permanente o esmalte bovino. Existen diversas metodologías para el análisis del esmalte temporal entre ellas la μ -CT y SEM, la primera para un escaneo en 3D y la segunda para un análisis morfológico.

En este protocolo de investigación se comprobará el efecto sobre la superficie del esmalte temporal al ser sometido en tres periodos de inmersión.

Objetivo de la investigación

Evaluar un modelo de desmineralización *in vitro* en diferentes períodos de inmersión, mediante la morfología, profundidad de la lesión y porosidad del esmalte temporal, determinadas por μ -CT y SEM.

Procedimientos a realizar

Recolección de dientes extraídos por personal capacitado y depositados en frasco de timol al 0.2%.

Molestias o riesgos esperados

Por ser dientes próximos por exfoliar, sin o con una raíz de longitud muy corta y con indicación de extracción, no se esperan molestias posteriores a la misma. El paciente podría experimentar sensación de tracción durante el procedimiento.

Riesgo por omisión del paciente de las indicaciones postratamiento En caso de que el paciente no siga las indicaciones del Odontólogo podría presentar retraso en la reparación tisular.

Los beneficios que se pueden obtener

Se favorece la erupción del diente permanente sucesor y cuando se cuenta con el espacio suficiente en el arco dental, alineación del diente permanente por erupcionar o erupcionado.

Garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta

Absoluta.

Libertad de retirar el consentimiento

En el momento en que el paciente lo decida.

Confidencialidad del paciente

Esta será guardada.

Gastos del estudio

Cubiertos por el financiamiento correspondiente (institucional o externo).

En el cumplimiento de la Ley General de Salud, Ley federal de protección de datos personales en posesión de los particulares, aviso de privacidad de la UAEMex. Reglamento de la Ley General de salud en materia de investigación, art. 13, 3, 14, 16; Código civil federal, art 1803, 1812 en materia de obligaciones del consentimiento informado y la NOM-012-SSA3-2012, art. 11, 12 y 13 que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos. El paciente (en caso de menores o incapacitados consignar el nombre del padre, madre o tutor) _____ con expediente _____ en pleno uso de mis facultades, declaro que el odontólogo (a) me ha explicado ampliamente que en mi situación es conveniente la extracción del diente temporal; con un lenguaje claro y sencillo, me ha explicado toda la intervención quirúrgica en cavidad bucal, aunque de modo infrecuente e incluso impredecible, puede tener riesgos y complicaciones entre las que se incluyen: inflamación, dolor o infección.

También, se me ha mencionado que dichas complicaciones pueden ser derivadas directamente del estado previo del paciente y de los tratamientos que esté recibiendo o de no seguir las indicaciones posoperatorias.

Se me ha explicado que el tratamiento se efectuará bajo anestesia tópica y/o local para poder realizar la intervención sin dolor. Se me ha informado que sentiré una sensación de anestesia que eventualmente se quitará en unas horas. La extracción dental es un procedimiento quirúrgico que consiste en sacar un diente de la encía y del alvéolo (cavidad ósea en cuyo interior se aloja la raíz del órgano dentario).

Se me ha permitido hacer preguntas al respecto, las cuales, me han contestado con claridad. También, se me ha explicado que el diente obtenido durante el tratamiento será utilizado con fines de investigación científica, que en todo momento se guardará la identidad de la persona y que los datos obtenidos pueden ser utilizados en foros de investigación y publicaciones con fines académicos.

Se me ha informado sobre las implicaciones para la realización del proyecto y las posibles aportaciones que podría generar en el ámbito del conocimiento de la Odontología, he comprendido toda la información del presente documento, me han sido aclaradas todas mis dudas sobre el mismo y en cuanto finalice el proyecto tendré derecho a conocer los resultados. Así mismo, doy autorización para que utilice la información de mi participación en la investigación para publicación científica, con la garantía de protección de datos personales.

EL MÉDICO ME HA PERMITIDO REALIZAR LAS OBSERVACIONES Y ME HA ACLARADO TODAS LAS DUDAS QUE LE HE PLANTEADO. POR ELLO MANIFIESTO QUE ESTOY SATISFECHO(A) CON LA INFORMACIÓN RECIBIDA Y QUE COMPRENDO EL ALCANCE Y LOS RIESGOS DEL ACTO MÉDICO Y EN TALES CONDICIONES CONSIENTO QUE SE ME REALICE EL PROCEDIMIENTO Y QUE SE UTILICE EL MATERIAL OBTENIDO CON FINES ACADÉMICOS Y DE INVESTIGACIÓN.

En Toluca, Edo. de México a ____, del mes _____ del año _____.

Nombre y firma del paciente

Nombre y firma del Investigador

Testigos

Nombre y firma

Nombre y firma



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ASENTIMIENTO INFORMADO

Título de proyecto: Modelo de desmineralización en esmalte temporal: evaluaciones Micro-CT y SEM.

Mi nombre es _____ y trabajo en el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados en Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México. Actualmente el investigador Arlete González Sotelo está realizando un estudio para conocer el efecto de la desmineralización en dientes temporales durante tres periodos de inmersión.

El objetivo del estudio es evaluar un modelo de desmineralización *in vitro* en diferentes periodos de inmersión. Tu participación en el estudio consistirá en donar tu diente el cual, será intercambiado por un premio y un ratoncito para que se lo coloques al ratón de los dientes.

Tu donación es voluntaria, es decir aun cuando tus papá o mamá hayan dicho que puedes donarlo, si tú no quieres hacerlo puedes decir que no. Es tu decisión si lo donas o no en el estudio. También, es importante que sepas que si no lo quieres donar no habrá ningún problema.

La información que proporcionas será confidencial. Esto quiere decir que no diremos a nadie tus datos como nombre (O RESULTADOS DE MEDICIONES), sólo lo sabrán las personas que forman parte del equipo de este estudio. Así también, a tus papás se les dio un documento, el cual, menciona cual es el objetivo del estudio y procedimientos.

Si aceptas participar, te pido que por favor pongas una (✓) en el cuadrito de abajo que dice “Sí quiero participar” y escribe tu nombre.

Si no quieres participar, no pongas ninguna (✓), ni escribas tu nombre.

Sí quiero participar

Nombre: _____

Nombre y firma de la persona que obtiene el asentimiento:

Fecha: _____ de _____ de ____.