



**ANALISIS *IN VITRO* DE LA VARIACIÓN MINERAL DEL ESMALTE
HUMANO PRODUCIDA POR UN CLAREADOR DE PEROXIDO DE
HIDROGENO AL 35% ASOCIADO A FLUORURO DE SODIO AL 5%**

Trabajo de investigación
requisito para optar al
Título de Cirujano Dentista

Alumnos : Camila Leiva Rivera
María Fernanda Zamora López

Docente Guía: Prof. Dr. Jaime Sarmiento Cornejo
Catedra Operatoria Dental

Valparaíso – Chile

2014

DEDICATORIAS

Quiero dedicar esta tesis en primer lugar a mis Papás, Gilberto y Adriana, que son increíbles y me han dado todo en esta vida para lograr lo que me he propuesto.

También a mis hermanos y a mi familia, que siempre me han apoyado, me entregaron un abrazo incondicional y un consejo siempre que lo necesite.

Al mismo tiempo quiero dedicarla a mi pololo, José Antonio, que ha sido mi apoyo, mi guía y compañero en este camino, por haber estado siempre a mi lado, aconsejarme y contenerme.

No puedo olvidar a mi Tata, Gilberto Leiva, que es una inspiración para cualquier odontólogo, por el gran amor que siente por esta profesión.

La dedico también a mis amigas, que siempre pude contar con ellas para celebrar o cuando las cosas se ponían cuesta arriba.

A mi compañera de tesis Fernanda, que a pesar de todo el estrés siempre logramos salir adelante.

Y finalmente dedicarla a todas las grandes personas que he conocido en mi vida y que de una u otra forma me han ayudado a llegar aquí.

Camila Leiva

A mis padres, por todo el amor y apoyo incondicional que me entregan, no solo en esta carrera si no que en mi vida, dando lo mejor de cada uno, y por supuesto, por haberme permitido llegar al final de esta etapa.

A mi abuelita, por sus rezos y su constante preocupación.

A Cristian por su paciencia y amor.

A mi compañera de tesis Camila, por su infinita paciencia y templanza en los momentos de estrés.

A mi familia, amigos y a todas las personas que de una u otra forma me alentaron para que llegara a estas instancias.

Fernanda Zamora

AGRADECIMIENTOS

- A Nuestro docente guía, el Dr. Jaime Sarmiento por darnos una idea y motivarnos a desarrollarla, por fomentar en nosotras el desarrollo de una investigación, por escucharnos siempre que lo necesitamos y ayudarnos a buscar soluciones para las dificultades que tuvimos.
- A nuestro docente informante, Dr. Miguel Muñoz por entregarnos una nueva visión del área de investigación, por exigirnos mucho más, para sacar lo mejor de nosotras y alejarnos de lo fácil y sencillo.
- Al Dr. Alejandro Oyarzun, quien nos recibió en su laboratorio de la Universidad Finis Terrae, y nos guio en la parte experimental, y metodológica de nuestra tesis, realizando ensayo y error hasta encontrar la mejor técnica.
- A nuestros Padres por apoyarnos en todo lo que implico nuestra tesis de forma incondicional.
- A Miguel quien realizó los cortes y preparo cada muestra lo más rápido posible.
- A Nicole Roldán que dedicó parte de su tiempo libre para aclararnos la química y bioquímica que necesitamos para desarrollar este tema.
- A Carolina Vega, Scarlet Voss, José Antonio Rojas, Cristian Gisseleire, Gabriela Quintana y todos los que nos ayudaron a recolectar la importante muestra de dientes que necesitábamos para realizar nuestra tesis.
- A Marcos Chávez y Verónica Alvarado que nos ayudaron a encontrar hasta el paper más difícil, utilizando todos los recursos que tienen y mucho más.
- Al Dr. Jaime Jamett, que nos permitió realizar la experimentación en la clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso, y nos entregó la calma en momentos difíciles.
- También queremos agradecer a todos los docentes de la Escuela de Odontología que en distintos momentos del desarrollo de esta tesis, nos aclararon dudas o nos aconsejaron.

- Y por último agradecemos a todas las personas que durante el desarrollo de nuestra tesis, nos ayudaron de una u otra forma.

INDICE

1	INTRODUCCIÓN	i
2	MARCO TEÓRICO	3
2.1	HISTOLOGIA DEL TEJIDO DENTARIO DURO	3
2.1.1	Esmalte	3
2.1.1.1	Generalidades	3
2.1.1.2	Composición Química	3
2.1.1.3	Estructura histológica del esmalte	4
2.2	CLAREAMIENTO DENTAL	7
2.2.1	Definición	7
2.2.2	Historia	8
2.2.3	Técnicas de Clareamiento	9
2.2.4	Sistemas de clareamiento	9
2.2.4.1	Clareamiento en el hogar o at-home	9
2.2.4.2	Clareamiento en la clínica o in-office	10
2.2.4.3	Sistema combinado	10
2.2.4.4	Clareamiento con productos de venta en el mostrador	10
2.2.5	Factores que influyen en el clareamiento	11
2.2.5.1	Tipo de clareadores	11
2.2.5.2	El pH acidez	11
2.2.5.3	Concentración y tiempo	12
2.2.5.4	Calor y luz	13
2.2.5.5	Otros factores	13
2.2.6	Peróxido de hidrógeno	13
2.2.6.1	Mecanismo de Acción	14
2.2.6.2	Indicaciones y contraindicaciones	16
2.2.6.3	Efectos adversos:	17
2.2.6.3.1	Alteración del esmalte	17
2.2.6.3.2	Sensibilidad dentaria	19
2.2.6.3.3	Irritación de la mucosa	19

2.2.6.3.4	Efectos en restauraciones.....	19
2.2.7	Aditivos	20
2.3	FLÚOR	20
2.3.1	Mecanismo de acción	21
2.3.2	Productos en el mercado.....	23
2.3.2.1	Tratamientos en la consulta	23
2.3.2.1.1	Geles fluorados	23
2.3.2.1.2	Soluciones de fluoruros:.....	24
2.3.2.1.3	Barnices fluorados:	24
2.3.2.2	Tratamientos en casa.....	24
2.3.2.2.1	Colutorios fluorados	24
2.3.2.2.2	Pastas dentales.....	24
2.3.3	El flúor en el clareamiento dental.....	24
2.4	MODELOS <i>IN VITRO</i> PARA EL CLAREAMIENTO DENTAL	26
2.5	MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (MOLP).....	27
2.6	CÁMARA DIGITAL ENFRIADA.....	29
2.7	BIRREFRINGENCIA ÓPTICA DEL ESMALTE	29
2.8	ANÁLISIS DE IMÁGENES	31
2.8.1	Imagen digital	32
2.8.2	Densitometría Óptica	32
2.8.2.1	Calibración en densitometría óptica.....	34
3	HIPÓTESIS.....	36
4	OBJETIVOS	37
4.1	OBJETIVOS GENERAL	37
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
5	MATERIALES Y METODOS	38
5.1	DISEÑO INVESTIGACIÓN	38
5.2	UNIVERSO Y MUESTRA.....	38
5.2.1	Universo	38
5.2.2	Muestra.....	38
5.2.2.1	Unidad de muestra.....	38

5.2.2.2	Criterios de exclusión	38
5.2.2.3	Criterios de inclusión	38
5.2.2.4	Muestreo	38
5.2.2.5	Tamaño de la muestra	39
5.2.3	Consideraciones bioéticas	39
5.3	VARIABLES	39
5.3.1	Independientes	39
5.3.1.1	Definiciones operacionales	39
5.3.2	Dependientes.....	40
5.3.2.1	Según Análisis Morfométrico.....	40
5.3.2.1.1	Definiciones Operacionales	40
5.3.2.2	Según Análisis Densitométrico.....	41
5.3.2.2.1	Definiciones Operacionales	42
5.4	METODOLOGÍA DE TRABAJO:	42
5.4.1	Recolección y Almacenamiento de especímenes.....	42
5.4.2	Selección de especímenes.....	43
5.4.3	Distribución de grupos	44
5.4.4	Dosificación y materiales:	44
5.4.4.1	Recursos materiales para experimentación	44
5.4.4.2	Preparación materiales pre-experimentación.....	45
5.4.5	Experimentación	46
5.4.5.1	Protocolo de aplicación de tratamiento	46
5.4.6	Preparación de especímenes	49
5.4.7	Imágenes histológicas	51
5.4.8	Análisis Morfométrico	52
5.4.8.1	Mediciones de profundidad	53
5.4.8.2	Base de datos de profundidad	54
5.4.9	Análisis densitométrico	54
5.4.9.1	Base de datos densitometría.....	55
5.5	MÉTODOS ESTADÍSTICOS UTILIZADOS	55
6	RESULTADOS	57

6.1	ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA.....	57
6.2	ANÁLISIS DE COMPARACIÓN.....	58
6.2.1	Desmineralización.....	58
6.2.2	Mineralización.....	59
6.2.3	Densitometría.....	59
6.3	DESCRIPCIÓN DE IMÁGENES.....	61
7	DISCUSIÓN.....	61
8	CONCLUSIONES.....	67
9	SUGERENCIAS.....	68
10	RESUMEN.....	69
11	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

•

1 INTRODUCCIÓN

Hoy en día los tratamientos dentales más cotizados por los pacientes son los relacionados con la estética, entre ellos el clareamiento dental. Por otro lado estos han sido potenciados por el marketing, logrando convencer al usuario de la relación que existe entre el clareamiento con la belleza (Alves et al., 2007). Debido a esto se ha aumentado el desarrollo y mejora de las técnicas de clareamiento.

En los sistemas de clareamiento extrínseco existen disponibles diferentes concentraciones de estos agentes clareadores. Las concentraciones más altas se deben usar bajo supervisión profesional, mientras que los productos que contienen entre 0,1 y 6% de peróxido de hidrógeno están permitidos para uso en el hogar con la supervisión del profesional. El peróxido de hidrógeno es el principal ingrediente activo de los agentes de clareamiento y el efecto de clareamiento que produce es debido a su bajo peso molecular y su capacidad de penetrar a través del esmalte y la dentina (Baratieri et al., 1994). El proceso por el que actúa consiste en la oxidación de las moléculas de pigmentación o cromóforos (Joiner, 2006).

Actualmente, se ha demostrado la eficacia clínica que presentan los diferentes tipos de clareamientos externos en la consulta del odontólogo (Joiner, 2006); sin embargo los efectos secundarios que estos producen, tales como la hipersensibilidad (Ferreira et al., 2011) y la alteración morfológica en el esmalte por la pérdida de minerales (Minoux & Serfaty, 2008), aún se debaten en la literatura. El nivel en el que se producen los posibles efectos negativos durante el clareamiento de los dientes podría estar asociado con el valor de pH, efecto oxidativo y composiciones de agentes de clareadores (Cavalli et al., 2004 B; Joiner, 2007).

Como sabemos, los fluoruros intervienen en el proceso de desmineralización, disminuyendo la solubilidad del esmalte expuesto, y favoreciendo la remineralización (Gómez, 2010). Cavalli et al. en el año 2011 demostró en un estudio que agregando concentraciones bajas de flúor en peróxido de carbamida en consistencia gel, se logró minimizar el avance de la desmineralización, tanto superficial como subsuperficial del esmalte. También existe evidencia que al agregar agentes remineralizantes, como el flúor al peróxido de hidrógeno en gel, no se ve afectada la eficacia y eficiencia del agente clareador. (Borges et al., 2012 A).

El efecto positivo de las altas concentraciones de fluoruro relacionados con la prevención de caries (Bansal et al., 2010) y la inhibición de la erosión (Borges et al., 2012 B) está bien documentada, por el contrario, la evidencia científica sobre la influencia que tiene el clareador asociado a fluoruro sobre el esmalte, es mínima y las investigaciones realizadas utilizaron bajas concentraciones de fluoruros.

Por lo tanto, ya son conocidos los mecanismos individuales de acción del agente clareador, como el peróxido de hidrógeno, y del fluoruro, es la combinación de estos productos y la reacción que producen en conjunto sobre el esmalte lo que aún no es está del todo claro (Tanizawa, 2005)

A partir de esto podemos inferir que el uso de clareamiento en la consulta del odontólogo asociado a agentes remineralizantes como el flúor, podría evitar los efectos secundarios antes nombrados. Por esta razón es necesario realizar esta investigación debido al número limitado de estudios sobre el clareamiento dentario asociado a agentes remineralizantes y por la beneficiosa implicancia clínica que estos tratamientos podrían tener a futuro si se logra disminuir los efectos adversos.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 HISTOLOGIA DEL TEJIDO DENTARIO DURO (Figún y Garino, 2002; Gómez de Ferrari, 2004)

2.1.1 Esmalte

2.1.1.1 Generalidades

El esmalte o tejido adamantino cubre a manera de casquete la dentina en su porción coronaria ofreciendo protección al tejido conectivo subyacente integrado en el sistema dentino-pulpar.

Su principal característica es que es el tejido más duro del organismo ya que estructuralmente está constituido por prismas altamente mineralizados que lo recorren en todo su espesor, desde la conexión amelodentinaria (CAD) a la superficie externa o libre en contacto con el medio bucal.

El esmalte debido a su translucidez permite percibir el color de la dentina, por lo cual aparece de tonalidad blanco amarillento. Su superficie es lisa y brillante. El espesor del esmalte de los dientes permanentes varía dependiendo de las distintas zonas. En la cúspide o bordes incisales, el espesor es de, aproximadamente 2 mm en los incisivos; 2,4 mm en los caninos y 3 mm en premolares y molares, reduciéndose, progresivamente en las caras libres y proximales hasta llegar a 0 o 0,5 mm en la unión amelocementaria.

El espesor del tejido adamantino en los surcos y fosas es mínimo y, ocasionalmente, puede faltar a nivel de las microfisuras, lo que hace a estas áreas susceptibles a la aparición de caries.

2.1.1.2 Composición Química

El esmalte está constituido químicamente por una matriz orgánica (1-2%), una matriz inorgánica (95%) y agua (3-5%).

El componente orgánico más importante, es de naturaleza proteica, y constituye un complejo sistema de multiagregados polipéptidos. Entre las proteínas presentes en la matriz orgánica, destacan, las amelogeninas, enamelinas, ameloblastinas, tuftelina y parvaalbúmina. Además de estas proteínas específicas existen proteínas séricas, enzimas y pequeños porcentajes de condroitin 4-sulfato, condroitin 6-sulfato, y lípidos.

La matriz inorgánica (95%), está constituida por sales minerales cálcicas básicamente de fosfato y carbonato. Estas sales, se depositan en la matriz del esmalte, dando origen a un proceso de cristalización que transforma la masa mineral en cristales de hidroxiapatita. A diferencia del tejido óseo y la dentina, no existe fosfato de calcio amorfo. Existen otros minerales tales como calcio, carbonatos y sulfatos, y oligoelementos como potasio, magnesio, hierro flúor, manganeso, cobre, etc. Los iones de flúor pueden sustituir a los grupos hidroxilos en el cristal de

hidroxiapatita y convertirlo en cristal de fluorhidroxiapatita que lo vuelve menos soluble a la acción de los ácidos y por ende más resistente a las caries.

El tercer componente del esmalte, es el agua, se localiza en la periferia del cristal constituyendo la capa de hidratación. El porcentaje de agua en el esmalte disminuye progresivamente con la edad.

2.1.1.3 Estructura histológica del esmalte

Esta estructura está constituida por la unidad estructural básica que es el prisma del esmalte y por la denominada unidad estructural secundaria que se origina a partir de la anterior.

Unidad estructural básica del esmalte

Los prismas de esmalte están compuestas por cristales de hidroxiapatita, los que conjunto forman el esmalte prismático que constituyen la mayor parte de esta matriz extracelular mineralizada. En la periferia de la corona y en la CAD existe el denominado esmalte aprismático en el que la sustancia adamantina mineralizada no constituye ni configura prismas.

- *Esmalte prismático*

Los prismas son estructuras longitudinales de 4 μm de espesor promedio, que se dirigen de la CAD hasta la superficie del esmalte. El diámetro de los prismas varía de 4-10 μm dependiendo si se encuentra cercano al CAD o en la superficie del esmalte, éste va aumentando gradualmente. El número de prismas varía en relación al tamaño de la corona de 5 a 12 millones.

Al microscopio óptico (MO) se observan como bandas delgadas o varillas adamantinas irregularmente paralelas en cortes longitudinales y se observan como secciones irregulares hexagonales, ovoides o en escamas de pescados en cortes transversales. Al microscopio electrónico de barrido (MEB) se observan como bastones irregulares paralelos en cortes longitudinales y con una morfología de ojo de cerradura de llave antigua en cortes transversales. Esto permite ver dos regiones: la cabeza o cuerpo, en forma de cúpula esférica seguida de un cuello estrecho y la cola como terminación irregular. La cabeza de los prismas se encuentra siempre ubicadas entre las colas de los prismas suprayacentes y las colas de cada prisma ubicado entre las cabezas de los prismas subyacentes. Este sistema de engranaje permite una mayor resistencia, ya que la cabeza soporta las fuerzas masticatorias y las colas las disipan.

El material orgánico es muy escaso y se distribuye básicamente en la periferia de los prismas rodeando la estructura de ojo de cerradura. Este material es insoluble y corresponde a la denominada *vaina de los prismas*.

Los prismas no siguen una trayectoria rectilínea a través del esmalte si no que tienen un recorrido sinuoso. En los dientes permanentes las hileras de los prismas de la región cervical, se desvían de la horizontal y se inclinan hacia apical. En la región cuspídea éstas presentan una orientación vertical o perpendicular.

- *Esmalte aprismático*

Es el material que carece de prismas. Se ubica en la superficie externa del esmalte prismático y puede tener un espesor de 30 a 100 μm . Este esmalte se encuentra en un 70% en los dientes permanentes, principalmente en las regiones cervicales y en zonas de fisuras y microfisuras y en menor medida en las superficies cuspídeas. En este esmalte los cristales de hidroxiapatita se encuentran paralelos entre si y perpendicular a la superficie externa.

Unidades estructurales secundarias del esmalte

Se definen como las estructuras o variaciones estructurales que se originan a partir de las unidades estructurales primarias como resultado de varios mecanismos: el diferente grado de mineralización (Estrías de Retzius y penachos de Linderer); el cambio en el recorrido de los prismas (Las Bandas de Hunter-Schreger y el Esmalte nudoso); y la interrelación entre el esmalte y la dentina subyacente o la periferia medioambiental (la conexión amelodentinaria, los husos adamantinos, las periquematías, las líneas de imbricación de Pickerill y las fisuras o surcos del esmalte). Dentro de ellas destacamos:

- *Estrías de Retzius*

Son líneas que marcan la sucesiva aposición de capas de tejido durante la formación de la corona, por ello también reciben la denominación de líneas incrementales. Estas líneas se relacionan con los periodos de reposo en la mineralización y, por tanto, indicarían zonas menos mineralizadas. Distintas alteraciones metabólicas parecen afectar a estas estrías con el consiguiente ensanchamiento de estas y el alargamiento. A nivel de estas estrías los prismas sufren variaciones de tamaño y forma. La disposición de las estrías es diferente en las distintas regiones del diente: en las cúspides y bordes incisales se extienden de CAD a CAD del lado opuesto describiendo una curva (Figura 1). En las caras laterales de la corona tiene un recorrido oblicuo (Figura 2) desde CAD hacia la superficie externa, pero con una incurvación hacia oclusal o incisal de manera que ofrecen el aspecto de casquetes en las cúspides y de anillos en las caras laterales. En cortes transversales aparecen como anillos concéntricos paralelos a la superficie externa e interna del esmalte. Es decir, que las estrías de Retzius se observan siempre, ya sea en cortes longitudinales o transversales siendo más frecuentes en la zona cervical de la corona.

- *Penachos Adamantinos o de Linderer*

Son similares a las microfisuras del esmalte y se extienden desde el CAD en forma de arbusto observados en cortes transversales en MO. Están formados por tejido poco mineralizado, amorfo o granular, rico en proteínas del esmalte.

- *Bandas de Hunter-Schreger*

Son un fenómeno óptico ocasionado únicamente por cambios en la dirección de las varillas. Se ven más claramente en cortes longitudinales por desgaste observados con luz reflejadas. Aparecen como bandas claras y oscuras de anchura

variable y límites imprecisos, que se observan en el esmalte ocupando las cuatro quintas partes más internas del mismo.

- *Husos adamantinos*

Son estructuras con aspecto de clavav irregulares que se encuentran a nivel de la CAD. Corresponden a formaciones tubulares con fondo ciego que alojan en su interior a las prolongaciones de los odontoblastos que discurren por los túbulos dentinarios. Su orientación es similar a la del proceso odontoblástico del que provienen y no guardan relación con los prismas vecinos, son perpendiculares a la CAD y oblicuos respecto a los prismas.

- *Laminillas o microfisuras del esmalte*

Son formaciones finas y delgadas, que se extienden de forma rectilínea desde la superficie del esmalte hasta la dentina e incluso puede penetrar en ella. Están constituidas por tejido poco o nada mineralizado.

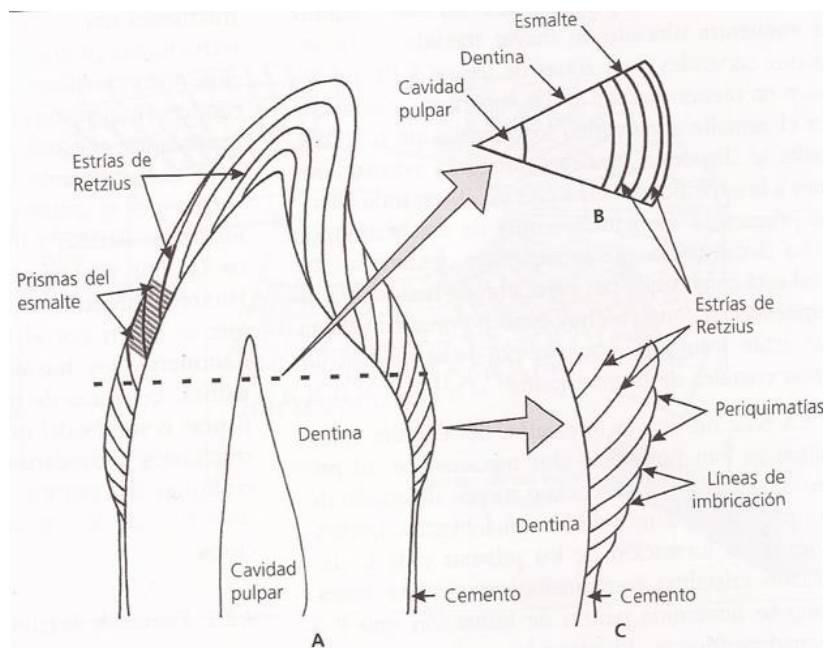


Figura 1. A: Disposición de las estrías de Retzius en las distintas zonas del esmalte, vistas en un corte longitudinal. B: Estrías de Retzius vistas en un corte transversal. C: Periquimatías y línea de imbricación en la superficie del esmalte.

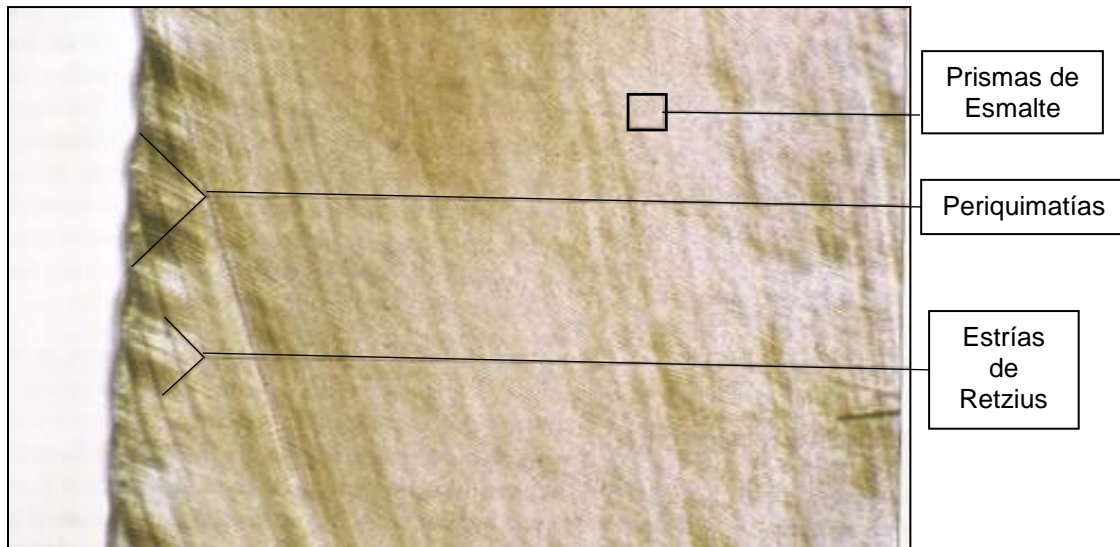


Figura 2. Corte de superficie libre de esmalte. Se destacan las estrías de Retzius y periquimatías. 60X.

2.2 CLAREAMIENTO DENTAL

2.2.1 Definición

Según la Asociación Dental Americana (ADA) en el año 2013 definió el clareamiento dental como un procedimiento dental cosmético para clarear los dientes usando una solución clareadora (ADA 2005-2013).

El clareamiento dental consiste en aclarar el mismo color que poseen los dientes, modificando el valor, o sea se reduce el componente gris en la apariencia estética de los dientes (Moncada et al., 1999).

El clareamiento con un agente químico oxidante inestable, ha sido por mucho tiempo una alternativa de tratamiento conservador para recuperar la estética en dientes vitales y desvitalizados oscurecidos o manchados (Baratieri et al., 1996).

El éxito del tratamiento clareador depende de un correcto diagnóstico del tipo, intensidad y localización de la tinción en el diente. Las moléculas que producen la tinción en el diente son llamados también cromóforos (Joiner, 2006). Las alteraciones de color pueden estar localizadas sobre el diente (manchas extrínsecas) o dentro de la estructura dental (manchas intrínsecas) (Baratieri et al., 2011). Se debe determinar si es una tinción extrínseca, asociada a la absorción de materiales como el té, vino tinto, medicamentos, clorhexidina, tabaco y comidas en la superficie del esmalte y la película protectora, o intrínseca, que se refiere al color del diente que está asociado a la dispersión de la luz y propiedades absorbentes del esmalte y dentina, en pacientes con amelogénesis y dentinogénesis imperfecta, hipoplasia y eritroblastosis fetal (Kihn, 2007). Generalmente las manchas extrínsecas son obtenidas después de la

erupción del diente en cambio la intrínsecas pueden ser por factores pre y post erupción (Baratieri et al., 2011).

2.2.2 Historia

En nuestra sociedad se suele desvalorar los dientes amarillos, característicos de la edad o por tinciones extrínsecas, que se producen a lo largo de la vida, enalteciendo los dientes blancos, de aquí viene la importancia que se le ha dado hoy a los clareamientos en la odontología estética. La estética es un concepto subjetivo que varía según la edad, la cultura y la época. En nuestra cultura occidental, en que la apariencia es de suma importancia, las personas desean o necesitan, por distintas razones, una sonrisa estética (Kihn, 2007).

En el pasado, las coronas, prótesis fija o incluso prótesis removibles eran la única opción para tratar dientes seriamente oscurecidos, implicando la destrucción parcial o total de los dientes sustituidos. Con la aparición de la adhesión, y las primeras restauraciones con estos materiales en la década de 1950, se logró un avance en el tratamiento de dientes pigmentados, pero igual se debía realizar un desgaste en la estructura dental. De esta forma el clareamiento dental toma un importante papel en la odontología estética siendo un tratamiento de fácil acceso y de técnica relativamente simple para el profesional (Alves et al., 2003).

Existe evidencia de que los clareamientos no son una técnica nueva en odontología, ya que hay reportes de más de un siglo atrás. En 1916, Adams (Adams 1987, citado en Kihn, 2007) reportó el uso de ácido clorhídrico para tratar fluorosis. En 1937 Ames reportó una técnica usando una mezcla de peróxido de hidrógeno y éter etílico sobre algodón, calentado con un instrumento metálico por 30 minutos, y aplicado entre 5 a 25 sesiones para tratar esmalte moteado. Younger usó esta técnica en 1942 en 40 niños con fluorosis dental. Está y otras técnicas similares usando altas concentraciones de peróxido de hidrógeno y calor han sido tratamientos aceptados desde 1930 (Li, 1996, citado en Kihn, 2007).

Los estudios anteriores al de Cohen y Parkins solo se concentraban en remover tinciones extrínsecas. En 1976 Nutting y Poe introdujeron la técnica de clareamiento "ambulatorio", con peróxido de hidrógeno al 35% y perborato de sodio para dientes no vitales. Las técnicas de clareamiento usadas desde principios de los años 1990, se modificaron de forma importante en 1991 con el uso de gel con peróxido de hidrógeno activado por luz (Kihn, 2007).

Como cualquier tratamiento presenta riesgos y beneficios, ya que existen dudas sobre su mecanismo de acción y su efecto sobre la estructura dental, pudiendo causar daños, por lo que se debe tener mucho criterio al evaluar a cada paciente antes de indicar el tipo de tratamiento que necesita (Joiner, 2007; Kihn, 2007).

2.2.3 Técnicas de Clareamiento

Las técnicas de clareamiento dental son alternativas conservadoras que deben ser consideradas como primera opción para el tratamiento estético de dientes con alteración de color. Cabe destacar que el paciente sometido a estos tratamientos estéticos debe estar en excelentes condiciones de salud bucal (Baratieri et al., 2011).

Estas técnicas pueden ser externas o internas dependiendo si se aplica el agente clareador por la porción vestibular o la cámara del diente. La aplicación en la parte vestibular se conoce como externa y si se realiza vía cameral se conoce como interna (Rodríguez, 2007).

Actualmente, existen muchas formas de abordar el clareamiento externo de los dientes vitales oscurecidos o manchados. En general cada tipo de oscurecimiento, mancha o cromóforo debe ser tratado con un agente clareador y una técnica específica (Baratieri et al., 2011).

En comparación con los tratamientos de restauraciones, el clareamiento externo es el tratamiento más conservador para los dientes descoloridos (Kihn et al., 2007).

La mayoría de los estudios contemporáneos dentales implica el uso de peróxido de hidrógeno o peróxido de carbamida. Este último material en contacto con agua se descompone en urea y peróxido de hidrógeno (Sfreddo & Mason, 2005).

2.2.4 Sistemas de clareamiento

Las aplicaciones de clareamiento más aceptables son las técnicas in-office o en la clínica, sistemas at-home o para llevar a casa con supervisión del odontólogo, o una combinación de ambos (Rodríguez, 2007).

2.2.4.1 Clareamiento en el hogar o at-home, supervisado por el odontólogo

El régimen más común es el uso en el hogar de un agente clareador durante 2 a 6 semanas, en función del color de los dientes en el inicio del tratamiento (Kihn et al., 2007). Con estos sistemas, se fabrica una cubeta de plástico blando a partir de un modelo de los dientes del paciente, que puede o no contener depósitos para sostener el gel clareador en contacto con los dientes. Esta cubeta generalmente se carga con el gel de peróxido de carbamida y se asienta sobre los dientes aproximadamente entre 30 minutos a 2 horas. Las concentraciones más comúnmente prescritas son 10% a 22% de peróxido de carbamida. La mayoría de los productos también ofrecen la alternativa de las aplicaciones durante la noche, entregándole múltiples alternativas de aplicación al paciente (Haywood et al., 1989 citado en Kihn et al., 2007).

La ventaja de los sistemas para llevar a casa es el costo reducido en comparación con el sistema en la clínica. Las principales desventajas asociadas con los sistemas para llevar a casa es que requieren que el paciente respete el protocolo de aplicación entregado por el profesional, que por lo general consiste en 1

a 2 horas, dos veces al día o en la noche, y todo el tratamiento generalmente toma por lo menos 4 semanas (Kugel & Ferreira, 2005).

2.2.4.2 Clareamiento por el odontólogo en la clínica o in-office

El clareamiento in-office generalmente se usan altos niveles de agentes clareadores por periodos cortos de tiempo (Joiner, 2006). Las técnicas de clareamiento en la clínica generalmente utilizan concentraciones de 15%, 30% o 35% de peróxido de hidrógeno. El gel de clareamiento se aplica a los dientes después de la protección de los tejidos blandos y el peróxido de hidrógeno se puede activar adicionalmente mediante calor o luz (Kugel & Ferreira, 2005).

Este sistema será el tratamiento de elección, en los casos de una pieza que haya cambiado de color por necrosis pulpar o por presencia de materiales endodónticos en la cámara pulpar. También es indicado en pacientes que no puedan resistir en boca cubetas de clareamiento casero o que no tengan la voluntad para usarlas y en quienes se sientan más seguros al ser atendidos por un profesional. El tratamiento in-office puede dar lugar a importantes clareamientos después de una sola sesión de tratamiento, pero este no predice buenos resultados a largo plazo, por esto se requieren más sesiones de tratamiento (Vélez y Delgado, 2006).

Las ventajas del procedimiento in-office son que requiere un mínimo de cumplimiento del paciente y ofrece resultados inmediatos. Las desventajas de este tratamiento son el tiempo de consulta requerido y el costo para el paciente (Kugel & Ferreira, 2005).

En el caso de no realizar bien la técnica, esta puede provocar mayor sensibilidad dentinaria en el paciente (Vélez & Delgado, 2006).

2.2.4.3 Sistema combinado

La combinación de las dos técnicas (in-office y at-home) se traduce en una reducción en la cantidad de tiempo requerido y la necesidad de repetidas visitas a la clínica, así como el gasto asociado con el clareamiento en la clínica. Al mismo tiempo, la técnica combinada aumenta el éxito general y la satisfacción del paciente. Este procedimiento implica el uso de una alta concentración de peróxido de hidrógeno (35%) entregado en la clínica durante dos sesiones, seguido de un tratamiento para llevar a casa de 3 a 4 noches. Esto a menudo es seguido por aplicaciones adicionales. Este sistema también puede estar o no activado por luz (Kugel & Ferreira, 2005; Vélez & Delgado, 2006).

2.2.4.4 Clareamiento con productos de venta en el mostrador

Los productos para venta en el mostrador o over the counter (OVT), se comenzaron a comercializar en Estados Unidos a principios del año 2000, como una alternativa de bajo costo a los clareamientos en la consulta o en casa guiados y prescritos por un odontólogo. Según la FDA (Federación Dental Americana) estos productos disminuirían la inequidad en el acceso a los sistemas de salud. Tienen en su composición peróxido de carbamida o peróxido de hidrógeno en bajas concentraciones o agentes abrasivos que remueven tinciones superficiales. Se encuentran disponibles en farmacias, supermercados o en internet, y sus

presentaciones son geles, colutorios, goma de mascar, pastas dentales, tiras clareadoras o barnices. Sin embargo existe evidencia de que estos tratamientos no son efectivos como uno realizado bajo la supervisión del odontólogo y también pueden ser dañinos para los pacientes (Demarco et al., 2009).

2.2.5 Factores que influyen en el clareamiento

2.2.5.1 Tipo de clareadores

Existen diversos tipos de clareadores, actualmente el más usado es el peróxido de carbamida y el peróxido de hidrógeno. En general, la eficacia del peróxido de hidrógeno es aproximadamente la misma que con el peróxido de carbamida conteniendo productos con equivalente o similar contenido de peróxido de hidrógeno y entregando un similar formato y formulaciones (Joiner, 2006).

2.2.5.2 El pH acidez

El peróxido de hidrógeno tiene potencial de afectar el esmalte dental, debido al pH ácido que posee, el cual varía en diferentes presentaciones comerciales. En general cuando el peróxido se disocia, produce una disminución de pH en el medio en el que se encuentra, de forma inmediata. Este efecto sobre el esmalte y sobre la dentina, potencialmente, da lugar a un patrón de grabado ácido, que aumenta la permeabilidad y permite la difusión del peróxido de hidrógeno por la estructura dentaria gracias a su bajo peso molecular. La profundidad y características variarán en función del pH, concentración del producto, y tiempo de contacto (Pugh, et al., 2005).

Según Eimar et al. en el 2012 realizó un estudio donde informó que a pH neutral no se produce desmineralización en comparación con el pH ácido en la superficie del esmalte. En un estudio *in vitro* donde compararon dos clareamiento in-office con similar concentración pero diferente pH (4 y 7), resultó que el clareador in-office con bajos valores de pH induce a alteraciones en la morfología del esmalte, por el contrario el clareador con pH neutral no se registraron alteraciones. En otro estudio *in vitro* que se realizó con peróxido de hidrógeno al 35% para clareamiento a una exposición máxima total de 30 minutos a un pH neutral, no se presentó ninguna evidencia de efectos perjudiciales sobre el esmalte o la dentina. (Suliman et al., 2004 A). Sin embargo en un estudio *in vitro*, realizado con peróxido de carbamida al 10% con pH 7,82 por un tiempo de 8 horas por 14 días, sí se observaron cambios estructurales en el esmalte (Justino, Tames & Demarco, 2004).

A mayor concentración, más ácido es el pH del clareador y a menor pH, mayor es la desmineralización que producen principalmente los clareadores con pH ácido, ya que se ha informado anteriormente de que la desmineralización del esmalte puede ocurrir a un pH inferior a 5.2 a 5.8 (Price et al., 2000). Según Lopes et al. (2002) solo con valores de pH bajo los 6.4 se produce la remoción de minerales en la superficie del diente en condiciones *in vitro* (Ferreira et al., 2011).

Según Schulte et al. (1995), si el pH es demasiado alto, esto lleva a la descomposición de peróxido de hidrógeno sin la formación de radicales libres lo que conllevaría a la no decoloración del diente.

Según Robert et al. (1994), informaron que la degradación que se produce del peróxido de carbamida en peróxido de hidrógeno y urea, este a su vez, se descompone en oxígeno y agua, y la urea se degrada en amoníaco y dióxido de carbono, esta liberación de amoníaco y dióxido de carbono eleva el pH del agente clareador en la cavidad oral, dentro de 15 minutos (Price et al., 2000).

En un estudio, donde compararon dos soluciones de clareamiento de peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes pH, 7,0 y 3,6, demostró que en ambos pH el resultado fue similar con respecto a la medición del color (Sun et al., 2011).

2.2.5.3 Concentración y tiempo

Los factores más importantes en la eficacia de cualquier tratamiento de clareamiento son la concentración del producto y la duración del tiempo de exposición. En general, las concentraciones más altas son más rápidas que las concentraciones más bajas. Sin embargo, concentraciones más bajas pueden acercarse a la eficacia de las concentraciones más altas con tiempos de aplicación mayores (Joiner, 2006; Baratieri et al., 2011).

El resultado del clareamiento dental, independiente de la técnica, depende en particular de la concentración del clareador y el tiempo de aplicación del material. Cuanto más elevada es la concentración del clareador y cuanto más frecuente es el contacto del mismo con la estructura dental, más rápido será el clareamiento. Entretanto, el aumento de la dosis y el tiempo de uso pueden elevar considerablemente la posibilidad de aparición de efectos secundarios y secuelas en los dientes y tejidos blandos. Por lo tanto esta relación de dosis/tiempo debe ser establecida de manera criteriosa por el odontólogo (Baratieri et al., 2011)

Efeoglu et al. (2007), recomiendan que en la aplicación de altas concentraciones en los tratamientos clareadores (peróxido de carbamida al 35%), se debe ser más cuidadoso al momento de indicarlo, principalmente en los pacientes susceptibles al desgaste de los dientes.

A mayor concentración del clareador, se promueve una mayor alteración de la estructura dental que favorece la difusión del peróxido de hidrógeno al esmalte y la dentina. En comparación de un peróxido de carbamida de 10% con 16%, este último causa cambios morfológicos más intensos en la superficie de esmalte y reduce en mayor grado la microdureza. Estas alteraciones se correlaciona con la acción oxidativa que produce el peróxido hidrógeno en la fase orgánica del tejido duro (Soares et al., 2013).

El resultado del procedimiento de clareamiento depende principalmente de la concentración del agente clareador, la capacidad del agente para llegar a los cromóforos, y la duración y el número de veces que el agente está en contacto con estos cromóforos (Dahl, 2003).

2.2.5.4 Calor y luz

Históricamente se han descrito el calor en instrumentos dentales para calentar el peróxido y acelerar el clareamiento dental. El uso de la luz de alta intensidad para elevar la temperatura del peróxido de hidrógeno y la aceleración de la tasa de clareamiento químico de los dientes se informó por Abbot en 1981 (Greenwall, 2001 citado en Joiner, 2006).

Distintos tipos de lámparas de polimerización se utilizan para activar el gel clareador o acelerar el efecto clareador. Inicialmente se utilizaron lámparas de polimerización convencionales, pero éstas se cambiaron rápidamente por las lámparas de arco de plasma y láser (Sulieman, 2005). Actualmente el láser de argón ha demostrado ser la fuente de energía más valiosa para poder realizar el tratamiento de clareamiento de los dientes (Sun, 2000).

De acuerdo con la activación de la luz al agente clareador, no parece ser beneficiosa en comparación al clareamiento sin la activación de luz, con respecto a la estabilidad del color que dura aproximadamente 3 meses después del clareamiento y también con respecto a la temperatura que toma la pulpa durante el tratamiento (Hahn et al., 2012).

En un estudio *in vitro* de clareamiento con diferentes materiales y lámparas, donde fueron controladas la temperatura externa del esmalte e interna de la dentina dio como resultado que la aplicación de la luz mejoró significativamente la eficacia del de algunos materiales de clareamiento pero provocó un aumento de la temperatura en las superficies externas e internas de los dientes. Según este mismo estudio las luces de láser infrarrojo y de dióxido de carbono (CO₂) causó el mayor aumento de temperatura del diente (Luk et al., 2004).

La eficacia de los sistemas activados por la luz frente a los controles activados sin luz en los estudios clínicos es limitada y contradictoria (Joiner, 2006).

2.2.5.5 Otros factores

Otros factores que pueden influir en el resultado del clareamiento de dientes incluyen el tipo de mancha, el color del diente inicial y la edad del sujeto (Joiner, 2006).

2.2.6 Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno es el agente clareador utilizado en la mayoría de las técnicas de clareamiento. El peróxido de hidrógeno puede ser utilizado en varias concentraciones, tanto para clarear dientes vitales como no vitales. Sin embargo es más utilizado en altas concentraciones, 30% y 35% (Baratieri et al., 1994). El peróxido de hidrógeno al 35% produce el mayor y más rápido clareamiento en comparación con menores concentraciones de agentes clareadores (Sulieman, 2004 B). Este compuesto debería ser aplicado en la clínica o in-office bajo la supervisión de un odontólogo (Ernst et al., 1996).

Como el esmalte y la dentina son permeables a los peróxidos, incluso en virtud del hecho que el esmalte presenta en su superficie microporos que se prolongan en los espacios interprismáticos, se obtiene una rápida penetración de estas sustancias (Sfreddo & Mason, 2005). La permeabilidad del esmalte y la dentina más el bajo peso molecular de los peróxidos (30 g/mol) permiten el libre flujo del agente clareador en su interior y aclaran las sustancias pigmentadas (Baratieri et al., 1994; Moncada et al., 1999)

2.2.6.1 Mecanismo de Acción

El desarrollo del mecanismo de acción del peróxido de hidrógeno depende de diferentes factores como la temperatura, el pH, luz ultravioleta y la presencia de algunos iones. Básicamente consiste en un proceso de oxidación con la liberación de las moléculas de la pigmentación (Joiner, 2006).

En presencia de condiciones alcalinas el clareamiento con peróxido de hidrógeno transcurre generalmente a través del anión perhidróxilo (HO_2^-) (Figura 3, ecuación 4), este anión puede por él solo activar las especies en el proceso del clareamiento como también puede donar un electrón para iniciar la formación de los radicales libres (Figura 3, ecuación 5) (Korytowski, 1990; Joiner, 2006). En condiciones donde la reacción se presenta a altas temperaturas y con luz ultravioleta, el peróxido de hidrógeno genera poderosos agentes oxidantes, los cuales son llamado radicales hidroxilos (HO^\bullet) (Figura 3, ecuación 1) (Kashima-Tanaka et al., 2003; Poole, 2004). Una cadena de reacciones forman nuevos radicales libres de oxígenos, el perhidróxilo (HO_2^\bullet) y el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Figura 3, ecuación 2 y 3) (Poole, 2004; Valko et al., 2004).

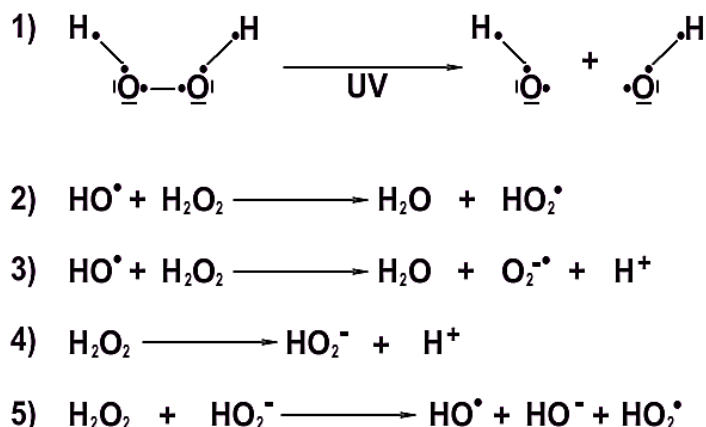


Figura 3. Mecanismo de acción del peróxido de hidrógeno. Ecuación 1, 2 y 3. Reacción en presencia de calor y luz ultravioleta. Ecuación 4 y 5 representa la reacción en condiciones alcalinas. (H) hidrógeno; (O) Oxígeno; (HO^\bullet) Radical hidroxilo; (HO_2^\bullet) Radical perhidróxilo; ($\text{O}_2^{\bullet-}$) Anión superóxido. El punto negro representa el electrón no pareado de los radicales libres (Minoux & Serfaty, 2008).

Los radicales libres son altamente inestables porque ellos tienen 1 o más electrones no apareados en su orbital atómico, para estabilizar esta estructura

molecular, ellos tienen la tendencia a obtener un electrón desde el compuesto adyacente. Esta acción posiciona a los radicales libres como un fuerte agente oxidante. Estos radicales libres rompen cadenas simples o doble enlace las cuales son esenciales para las moléculas orgánicas que generan color, llamadas cromóforos. Este proceso de interrupción de cadenas de enlace produce el clareamiento o decoloración de los cromóforos (Figura 4) (Joiner, 2006; Minoux & Serfaty, 2008). La moléculas de los cromóforos localizados es todavía desconocida, por lo tanto solo una extrapolación del mecanismo general de la acción del peróxido de hidrógeno se puede hacer en tales moléculas cromatogénicas. Por otra parte, lo que también se desconoce es el grado de degradación de los cromóforos de los dientes con respecto a las condiciones de clareamiento, así como en qué medida esta reacción de oxidación puede revertirse (Minoux & Serfaty, 2008).

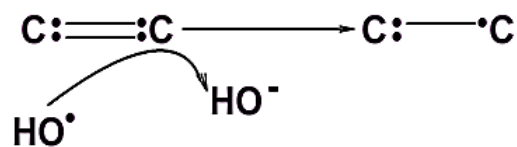


Figura 4. Interrupción de los dobles enlaces por los radicales libres. Para estabilizar estas estructuras molecular, los radicales libres obtienen un electrón desde el conjugado doble enlace. El resultado de esta interrupción de doble enlace conduce a la producción de menos moléculas de cromóforos (Minoux & Serfaty, 2008).

La oxidación de los pigmentos en el esmalte o dentina, producida por el peróxido, es a través de la descomposición y arrastre total o parcial de los pigmentos. El arrastre total fuera del diente es la consecuencia de la completa oxidación y descomposición de la estructura molecular en agua (H₂O), CO₂, O₂ y otros elementos de menor tamaño. Adicionalmente es posible considerar la degradación sin arrastre de la molécula pigmentadora, con degradación parcial y pérdida reversible de pigmentos (Moncada et al., 1999).

Al clarear se alcanza un punto en que solo la estructura del diente no cambia, solo se altera su color, este punto es llamado punto de saturación. El proceso es sumamente lento en esta fase, pero si el proceso de clareamiento sobrepasa este punto, el clareamiento disminuye considerablemente y el proceso clareador empieza a abrir los enlaces de carbono de proteínas, incluyendo aquellos de la matriz de esmalte, y otros compuestos con carbono. En este punto existe una rápida pérdida de esmalte, siendo este convertido en CO₂ y H₂O, con la consiguiente pérdida de tejido dentario. Por lo tanto, es crítico detener el proceso antes del punto de saturación. Si no, la pérdida de material generará un diente quebradizo y de porosidad aumentada (Baratieri et al., 1994).

Se realizó un estudio para comprender mejor el mecanismo de acción del peróxido de hidrógeno, esto se hizo utilizando diferentes soluciones: desproteinizante, desmineralizante y oxidante sobre esmalte de dientes humanos. Con el fin de determinar qué componente se oxidó (orgánico o inorgánico) se

realizaron experimentos adicionales donde a los dientes sometidos a soluciones desmineralizantes y desproteinizantes se les agregó soluciones oxidantes. Las observaciones indicaron que el peróxido de hidrógeno clarea a los dientes mediante la oxidación de sus estructuras orgánicas, ya que se observó la ausencia de cambios en el esmalte en el contenido orgánico e inorgánico de los dientes después de las oxidaciones y los dientes desproteinizados no consiguieron ser oxidados (Eimar et al., 2012).

En resumen podemos decir que el peróxido de hidrógeno convierte materiales de color en materiales no pigmentados oxidando los compuestos orgánicos dentro del esmalte y la dentina. El peróxido de hidrógeno se descompone en radicales libres. Estos radicales libres funcionan entonces rompiendo los dobles enlaces carbono: carbono que se encuentran en las manchas orgánicas de doble enlace en los dientes. Cuando se rompen estos enlaces se produce la decoloración de las moléculas hasta que pierden su color, normalmente a lo largo de unas horas o semanas, dependiendo de las instrucciones del fabricante (Margeas, 2008).

2.2.6.2 Indicaciones y contraindicaciones

Para lograr un tratamiento clareador exitoso es fundamental seleccionar los pacientes que cumplan con las condiciones de mejor pronóstico.

Indicaciones

- Tinciones amarillas que no sean causadas por alteraciones sistémicas o del desarrollo (alimentos, envejecimiento, tinciones y cigarro entre otros) (Baratieri et al., 2011).
- Leve oscurecimiento causado por trauma (Reinhart et al., 1993 y Russell et al., 1996 citado por Strassler, 2006).
- Dientes manchados por fluorosis asociado a microabrasión (Baratieri et al., 2011).
- Fluorosis leve (Reinhart et al., 1993 y Russell et al., 1996 citado por Strassler, 2006).
- Fluorosis moderada (Vélez & Delgado, 2006).
- Leve tinción causada por tetraciclina (Reinhart et al., 1993 y Russell et al., 1996 citado por Strassler, 2006).
- Decoloración uniforme y leve (Vélez & Delgado, 2006).

Contraindicaciones

- Pérdida importante del esmalte (Vélez & Delgado, 2006).
- Grietas o fisuras (Vélez & Delgado, 2006).
- Presencia de caries o restauraciones mal adaptadas (Sfreddo & Mason, 2005)
- Mujeres embarazadas o en periodos de lactancia (Vélez & Delgado, 2006).
- Pacientes con extrema sensibilidad (fuera de control del operador) (Vélez & Delgado, 2006).
- Pacientes con reflejos nauseosos (Vélez & Delgado, 2006).

2.2.6.3 Efectos adversos:

Son reacciones adversas a medicamento (RAM): todo efecto de un medicamento que es perjudicial o no deseado, y que ocurre con dosis usadas con fines terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico. Se debe informar a los pacientes sobre estos, ya que pueden influir en el resultado del tratamiento y la duración de éste (OMS, 2004).

El peróxido de hidrógeno utilizado como agente clareador puede tener distintos tipos de efectos adversos, tanto en el esmalte, la dentina, la pulpa o los materiales restauradores (Minoux & Serfaty, 2008). Los efectos adversos que se presenten van a depender de la capacidad del peróxido de hidrógeno de afectar la estructura mineral del esmalte, lo que va a permitir la difusión de este a las estructuras internas (Soares et al., 2013).

El efecto oxidativo, el pH y la composición de los agente clareadores son señalados por producir posibles efectos secundarios durante el clareamiento de los dientes (Cavalli et al., 2004 B).

2.2.6.3.1 Alteración del esmalte

Al comparar la superficie de esmalte tratada con agentes clareadores con la de control, se observaron ligeras alteraciones estructurales. Dientes que fueron clareados con peróxido de carbamida al 35% (30 minutos por día por 14 días) perdieron la capa de esmalte aprismática y el daño se reparó 90 días después (Bitter, 1998, citado por Dahl & Pallesen, 2003). El daño observado es menor al que se obtiene al realizar el grabado ácido (Emst et al., 1996 citado por Dahl & Pallesen, 2003).

La ocurrencia de efectos adversos en el esmalte es un tema controversial, pero muchos autores reportan cambios estructurales, como aumento de la rugosidad, disminución de la microdureza y de la fuerza del esmalte (Cavalli et al., 2011). En una investigación al MEB cualitativa demostró que los agentes de clareamiento in-office afectan a la morfología del esmalte humano, produciendo porosidades, depresiones, incremento de la profundidad de los surcos del esmalte, y la eliminación parcial de los prismas del esmalte (Miranda, 2005).

Se ha demostrado que los radicales libres, pueden degradar lípidos y proteínas, estos dos son los principales componentes de la matriz orgánica del esmalte. (Minoux & Serfaty, 2008). Con una resonancia nuclear magnética se demostró que en presencia de peróxido de hidrógeno, la prolina se degrada completamente, la alanina parcialmente y la glicina prácticamente no se ve afectada, a partir de esto se sugiere que el peróxido afecta los componentes orgánicos de la dentina y el ion OH^- (ion hidroxilo) tiene el rol principal en el clareamiento con peróxido de hidrógeno (Kawamoto & Tsujimoto, 2004).

Como el efecto oxidativo no es específico, los agentes de clareamiento no sólo oxidan a los cromóforos sino que también la materia orgánica de los dientes, se produce la degradación o desnaturalización de las proteínas de la matriz del esmalte producto de esta reacción oxidativa, esto probablemente sea la causa de la pérdida de la microdureza del esmalte (Jiang et al., 2008; Elfallah & Swain, 2013). Según

Hegedüs et al. (1999) el peróxido puede penetrar la estructura dental, debido a su bajo peso molecular, es por esto que el peróxido puede extender su nivel oxidativo también a la subsuperficie del esmalte donde el contenido orgánico es mayor.

La desmineralización en el esmalte se produce cuando el ácido está en contacto con el esmalte, este disuelve los cristales de apatita, liberando iones calcio, fosfato y flúor (Echeverría, 2002). La desmineralización del esmalte por agentes clareadores según Cavalli et al. (2011) se puede atribuir a los componentes de los clareadores y sus mecanismos de oxidación. La química del peróxido estaba basada en la habilidad de generar radicales libres que son altamente reactivos, inespecíficos e inestables y pueden descomponer la matriz del esmalte tanto orgánica como inorgánica hasta alcanzar estabilidad. A partir de esto se esperan cambios en la química y en la morfología de la estructura del esmalte.

El peróxido de hidrógeno al 35% reduce significativamente la microdureza de la superficie y subsuperficie del esmalte. Este efecto fue atribuido principalmente al bajo pH del gel de clareamiento (Sulieman et al., 2004 A). El pH ácido puede ser una de las causas principales de la desmineralización de los dientes (Joiner, 2007), por otro lado Smidt et al. en 1998 sugirieron que la viscosidad del gel de los agentes clareadores es otro factor aparte del pH, que podría provocar la desmineralización del esmalte (Justino, Tames & Demarco, 2004). Otro factor que también afecta la estructura del esmalte son las diferentes concentraciones de los peróxidos, ya que independiente de que sus pH estén cerca de pH neutro éstos también son capaces de causar alteraciones de la superficie del esmalte (Cavalli et al., 2004 A).

En un estudio se demostró que la combinación de peróxido de hidrógeno y de hidroxiapatita (HA) fue eficaz en el clareamiento de los dientes. La HA podría reducir significativamente la pérdida de microdureza del esmalte causado por el 30% de peróxido de hidrógeno y hacer pocos cambios en la morfología de la superficie del esmalte. Uno de los posibles mecanismos es que la HA es una sal alcalina, lo que puede aumentar el valor del pH de la solución de peróxido de hidrógeno y hacer menos ácido. La otra es que partículas de HA se adhieren de manera uniforme a la superficie del esmalte y forman una capa protectora para el esmalte subyacente, que disminuye el contacto directo de peróxido de hidrógeno con la superficie del esmalte. Sobre la base de los resultados del estudio anterior, por lo tanto, se planteó la hipótesis de que los potenciales efectos adversos del peróxido de hidrógeno ácido podrían reducirse al mínimo ajustando directamente el valor del pH de la solución de peróxido de hidrógeno (Jiang et al., 2008).

Según Haywood & Heymann (1991) la acidez de los agentes clareadores siempre han sido asociados con el esmalte desmineralizado. Sin embargo, el aumento de pH del peróxido de hidrógeno puede reducir el efecto de desmineralización que este tiene y facilitar el procedimiento de clareamiento (Dahl & Pallensen, 2003). En un estudio, donde compararon dos soluciones de clareamiento de peróxido de hidrógeno al 30% a diferentes pH, 7,0 y 3,6, demostró que a pH neutral el peróxido de hidrógeno al 30% mostró menos efectos negativos sobre la superficie del esmalte que los de pH ácido (Sun et al., 2011).

2.2.6.3.2 Sensibilidad dentaria

Es la respuesta dolorosa de la dentina ante estímulos normales físicos, químicos, térmicos y táctiles. Presenta dos causas principales, la pérdida de esmalte y la recesión gingival (Tortolini, 2003).

Es el efecto adverso más común luego de tratamientos de clareamiento externo, se evidencia con mayor frecuencia al utilizar clareadores con altas concentraciones (Dahl & Pallesen, 2003). La mayoría de las veces es transitorio, durante la primera hora después del tratamiento, o en las primeras aplicaciones, y pasa al poco tiempo de aplicado el tratamiento (Moncada et al., 1999).

Una alta incidencia de sensibilidad (67 a 78%) se reportó después del clareamiento con peróxido de hidrógeno en combinación con calor (Cohen y Chase, 1979; Nathanson y Parra, 1987, citados por Dahl & Pallesen, 2003).

Por la permeabilidad del peróxido, puede traducirse en sensibilidad pulpar transitoria (Moncada et al., 1999). Numerosos estudios han demostrado que la reacción del tejido pulpar a los agentes clareadores es reversible (Cohen, 1979; Robertson & Melfi, 1980, citado por Auschil, 2005).

Si el paciente presenta sensibilidad en los primeros días se debe suspender el tratamiento por uno o dos días para que ocurra el restablecimiento del órgano pulpar. En estos casos se indican antiinflamatorios durante la primera semana para disminuir la reacción pulpar (Alves et al., 2003).

El mecanismo por el que se produce la sensibilidad aún no está totalmente aclarado, sin embargo en estudios *in vitro* se ha demostrado que el peróxido difunde a través del esmalte y dentina llegando hasta la cámara pulpar (Thitinthapan et al., 1999, citado por Dahl & Pallesen, 2003), y esta difusión es mayor en dientes restaurados que en dientes sanos (Gökay et al., 2000).

2.2.6.3.3 Irritación de la mucosa

Se describen en algunos casos ulceraciones e irritaciones transitorias de la encía, como quemaduras, y generalmente está asociado a estados de enfermedad previa. Ante estos efectos se debe disminuir la dosis y en caso de persistir, suspender el tratamiento (Moncada et al., 1999). Las irritaciones encontradas pueden estar asociadas tanto al ajuste de la cubeta, como ser una irritación química por el producto (Moncada et al., 1999).

El agente clareador en base a peróxido de hidrógeno al 35% tiene un efecto cáustico y generalmente un pH ácido generalmente, por lo que se debe proteger la mucosa, utilizando aislamiento absoluto con goma dique en el tratamiento. También se indican el uso de barreras gingivales, que vienen en presentación de gel (Alves et al., 2003).

2.2.6.3.4 Efectos en restauraciones

En estudios experimentales se observó un aumento en la liberación de mercurio desde la amalgama expuestas por 8 horas a peróxido de carbamida durante 14 a 28 días (Hummert et al., 1993; Rotstein et al., 1997, citado por Dahl & Pallesen, 2003). También se piensa que el clareamiento puede aumentar la

reabsorción del ionómero de vidrio y otros cementos (Swift & Perdigão, 1998, citado por Dahl & Pallesen, 2003).

Después del clareamiento, los residuos del peróxido de hidrógeno en el esmalte inhiben la polimerización de materiales con base de resina y reducen las fuerzas de adhesión (Lai et al., 2002, citado por Dahl & Pallesen, 2003). Por esto no se recomienda el uso de clareamientos previos a realizar restauraciones en base a resinas (Alves et al., 2003).

Lo que no se ha observado son cambios significativos en la coloración, textura y dureza de restauraciones como amalgamas, incrustaciones metálicas, resinas, coronas de porcelana u otros materiales estéticos (Moncada et al., 1999). Debido a esto, después del clareamiento es necesario cambiar restauraciones estéticas, ya que no cambian de color con el clareamiento (Alves et al., 2003).

2.2.7 Aditivos

A pesar de que ya este probado la seguridad de los clareamientos dentales, los pacientes continúan preocupados sobre los efectos perjudiciales que estos tratamiento tienen, tales como la sensibilidad dentaria (Chen et al., 2008).

Las estrategias para el manejo de la sensibilidad dentaria asociada por el clareamiento dental como las que existen en la actualidad incluyen las realizadas previas al clareamiento: reducción/eliminación de hipersensibilidad preexistente y en relación con el proceso de clareamiento: aditivos “desensibilizantes” a geles clareadores y productos desensibilizantes de uso casero coadyuvante (Hewlett, 2007).

Los compuestos más utilizados como desensibilizantes durante el clareamiento dental han sido el fluoruro de sodio y nitratos de potasio, combinados o solos en algunos productos. Estos productos tienen una historia de éxito en el tratamiento contra los efectos adversos como lo es la sensibilidad dentinaria (Haywood et al., 2001).

Estos eventos generalmente son leves y se resuelven durante o al finalizar el tratamiento. Sin embargo, en algunos casos, la sensibilidad dental es responsable de la retirada de los pacientes del tratamiento (Tay et al., 2009). Schulte et al. (1994), informaron que la sensibilidad relacionada con el clareamiento dental era lo suficientemente grave como para obligar a un 14% de los participantes a retirarse de su estudio.

2.3 FLÚOR

Es un elemento químico de la familia de los halógenos, de estos es el de menor número y peso atómico. Es el elemento más electronegativo y el elemento no metálico más reactivo químicamente (Gómez et al., 2010).

En 1886, Moissan logra mediante métodos electrolíticos liberar por primera vez el flúor gaseoso, como elemento puro. Pero el elemento es muy inestable por el pequeño radio de su átomo, por esta razón no se encuentra libre, sino combinado con sales fluoruro, siendo los más comunes para fines de uso odontológico, el fluoruro de sodio (NaF) y de mono flúor fosfato de sodio (NaFPO₃). La concentración se expresa de distintas formas como partes por millón (ppm), miligramos (mg), gramos (g), porcentaje de ion fluoruro (% ion F), porcentaje de sal (% NaF) o micromoles por litro (μmol/l), lo que lleva a confusión a los clínicos (Gómez et al., 2010).

Su uso terapéutico se inició en el siglo XVIII, y actualmente su uso preventivo se reconoce como un hito en la odontología contemporánea (Jones et al., 2005). Las evidencias sugieren que el efecto cariostático de los fluoruros se ejerce más por su acción tópica que por su acción sistémica (Featherstone, 1999).

2.3.1 Mecanismo de acción

En la cavidad oral existe un mecanismo biológico natural, con características físico-químicas, mediante el cual la integridad de los tejidos duros del diente es mantenida por medio de la inclusión de minerales procedentes de la saliva, especialmente en aquellas áreas afectadas por desmineralización. Esto se conoce como el proceso de remineralización (Gómez et al., 2001).

Los expertos han definido al proceso de remineralización como cualquier modificación de las estructuras duras del diente por inclusión de minerales en su interior, cuando previamente han sido desmineralizados (Gómez et al., 2001).

El ion fluoruro (F⁻) actúa de dos formas, interfiere con la disolución del esmalte y favorece la remineralización en zonas desmineralizadas. Para que ocurra la remineralización se incorpora el F⁻ a la hidroxiapatita (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂), mediante distintos tipos de reacciones como: adsorción, intercambio, recristalización y precipitación. La recristalización y la precipitación son los procesos encargados de la remineralización principalmente (Gómez et al., 2010).

Para el éxito de la remineralización la clave es la presencia del fluoruro disuelto. La fuente de este fluoruro en el diente puede ser la fluorhidroxiapatita (Ca₁₀(PO₄)₆F₂) o el fluoruro de calcio (CaF₂) precipitado, que se forma en la superficie del diente al aplicar fluoruros de forma tópica (Rosin-Grget & Lincir, 2001).

El esmalte dental puede disolverse según los grados de insaturación de fluorhidroxiapatita e hidroxiapatita. Si el pH es ácido y presenta una insaturación en el medio, se produce la desmineralización del esmalte. Por el contrario, al subir el pH cercano a neutro y con una sobresaturación en el medio, se espera una reprecipitación de los iones en el esmalte previamente desmineralizado, reestructurando la hidroxiapatita. Si se presenta una concentración constante de flúor en el medio, a pesar de que el pH baje, la fluorhidroxiapatita permanece sobresaturada, lo que favorece la remineralización. Este efecto aumenta a medida

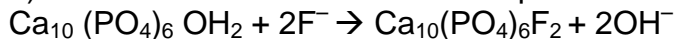
que aumenta la concentración de flúor en el medio. La acción del flúor en estos procesos es doble, inhibe la desmineralización y acelera la remineralización (Echeverria, 2002; Gómez et al., 2010).

Al aplicar el fluoruro en el esmalte tópicamente a altas concentraciones y a pH neutro, se logra un depósito mayor de F^- en la superficie del esmalte que reacciona con el calcio y la saliva, formando fluoruro de calcio. Para que esto se produzca es importante que los fluoruros estén sobresaturados en los fluidos que rodean los dientes (Gómez et al., 2010).

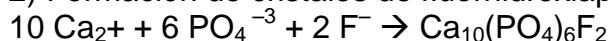
El precipitado de fluoruro de calcio no se disuelve rápido, la liberación del ion fluoruro desde el fluoruro de calcio es dependiente del pH. Ya que a pH neutro es estable, y a pH ácido aumenta la disolución del fluoruro de calcio, liberando el ion flúor (Rosin-Grget & Lincir, 2001). A partir de la liberación del ion fluoruro se produce un intercambio constante del F^- con la hidroxiapatita, donde por diversos mecanismos de intercambio, previamente dichos, los hidroxilos (OH^-) son reemplazados por el ion flúor, formándose fluorhidroxiapatita, compuesto estable y permanente; lo cual aumenta significativamente la resistencia del esmalte a la desmineralización (Gómez et al., 2010). Si el flúor tópico es aplicado a baja concentración, no forma un precipitado de fluoruro cálcico, sino que se incorpora directamente en forma de fluorhidroxiapatita, este proceso se llama precipitación, por el depósito o decantación de los iones sobre la superficie. Actualmente se sabe que la presencia continua de flúor en el medioambiente oral, a bajas concentraciones actúa inhibiendo el proceso de desmineralización (García-Godoy & Hicks, 2008).

Existen tres formas principales en que el ion fluoruro reacciona con la hidroxiapatita:

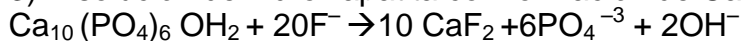
1) Intercambio isoioico entre el OH^- por F^- en la hidroxiapatita.



2) Formación de cristales de fluorhidroxiapatita desde soluciones supersaturadas



3) Disolución de hidroxiapatita con formación de CaF_2 .



Las reacciones 1 y 2 ocurren en exposiciones a bajas concentraciones de fluoruros (0.01 a 10 ppm F) por largos periodos de tiempo. El resultado de estas reacciones es la incorporación del fluoruro de forma estable por la unión a la estructura de la apatita. La tercera reacción ocurre con el aumento de la concentración del fluoruro (100 a 10,000 ppm F), formando cantidades significativas de fluoruro de calcio (Rosin-Grget & Lincir, 2001).

En el caso de las altas concentraciones de fluoruro en un pH ácido, se produce una recristalización inmediata de hidroxiapatita a fluorhidroxiapatita y también la formación del fluoruro de calcio (Gómez et al., 2010).

Si el flúor tópico es aplicado a baja concentración y a pH ácido, no forma un

precipitado de fluoruro cálcico, sino que se incorpora directamente en forma de fluorhidroxiapatita. Actualmente se sabe que la presencia continua de flúor en el medioambiente oral, a bajas concentraciones actúa inhibiendo el proceso de desmineralización (García-Godoy y Hicks, 2008).

2.3.2 Productos en el mercado

En la actualidad existe evidencia de que el mecanismo por el que ocurre la remineralización y se evita la solubilidad del esmalte se produce al aplicar el fluoruro de forma tópica (Yamazaki et al., 2007). Los fluoruros para aplicación tópica vienen en distintos formatos, consistencia y concentraciones (Gómez et al., 2010).

Existen tratamientos con fluoruros para la consulta y para llevar a casa, adicionales al uso de pasta dental fluorada. El tratamiento se determina según las necesidades del paciente (Procter & Gamble, 2007).

2.3.2.1 Tratamientos en la consulta:

2.3.2.1.1 Geles fluorados

Se indican en pacientes con alto riesgo cariogénico. Los más utilizados son los tixotrópicos acidulados con pH ácido, de 3 o 4 y una concentración del 1,23% (12300 ppm). Al ser ácidos producen una desmineralización superficial que va a favorecer el proceso de recristalización (Gómez et al., 2010). Y por su consistencia favorecen una sobresaturación de fluoruro de calcio en el medio bucal, que va a favorecer una liberación lenta de iones fluoruros. Sin embargo la aplicación reiterada de este tipo de geles puede alterar la estética de las restauraciones de cerámica y las obturaciones de composite es por esto que debe tenerse cierta precaución cuando el paciente presenta este tipo de restauración. Es por esto que para evitar este inconveniente se han elaborado geles de NaF al 2% con un pH neutro, pero la ausencia de acidez parece reducir la absorción de flúor (Gómez et al., 2001).

Según Delbem y Cury, el 2002 demostró que el gel de fluoruro acidulado formó más deposición de fluoruro en el esmalte y era también más eficaz en la reducción de la desmineralización en los bloques de esmalte sometidos a un desafío cariogénico, que el gel de fluoruro neutro. Se encontró que el tiempo de aplicación fue significativo en términos de absorción de fluoruro, pero no hacen el esmalte más resistente a la desmineralización. Por otro lado y en contraste a estos resultados, en un estudio *in vitro* se aplicó peróxido de hidrógeno al 35% como clareador sobre la superficie del esmalte posteriormente se aplicaron agentes remineralizantes a altas concentraciones (gel de fluoruro acidulado al 1,23% y del de fluoruro al 2%). Se demostró con MEB que el peróxido de hidrógeno al 35% afectó la morfología del esmalte dental humano produciendo porosidades, depresiones e irregularidades superficiales en diferentes grados. Estas alteraciones morfológicas fueron mayores después de la aplicación de gel de fluoruro acidulado al 1,23%. Por lo tanto el empeoramiento en la morfología de esmalte clareado después de la aplicación del fluoruro acidulado al 1,23% podría ser explicado por su bajo pH (3,0-4,0) en comparación con el gel de fluoruro neutro 2% (6.0-7.0) (Ferreira et al., 2011).

2.3.2.1.2 Soluciones de fluoruros:

Las más comúnmente utilizadas son el fluoruro de sodio al 2% (9200 ppm) y el fluoruro estañoso (19400 ppm). Actualmente ha disminuido su uso clínico, tiene una efectividad del 29 % y requiere mayor tiempo clínico para su aplicación que el barniz de flúor. Para su aplicación se debe realizar aislamiento relativo de la zona, y se aplica por cuadrantes (Gómez et al., 2010).

2.3.2.1.3 Barnices fluorados:

Los con mayor evidencia científica son el fluoruro de silano y el de fluoruro de sodio. La aplicación de los barnices se realiza por cuadrantes, en superficies limpias y secas. La efectividad descrita para los barnices es alrededor del 40%. Luego de su aplicación se debe indicar al paciente no ingerir alimentos por 4 horas y cepillar sus dientes después de 24 horas con un cepillo nuevo (Gómez et al., 2010).

2.3.2.2 *Tratamientos en casa*

2.3.2.2.1 Colutorios fluorados

Su uso se ha dado principalmente en zonas donde no es posible fluorar el agua. Su eficacia es alrededor del 30%. Es de fácil aplicación y económico. Viene en presentación de solución de fluoruro de sodio al 0,2% (910 ppm) o al 0,05% (226 ppm) (Gómez et al., 2010).

2.3.2.2.2 Pastas dentales

Vienen en concentraciones desde 400 ppm a 5000 ppm. Su capacidad para controlar la caries dental, ha sido altamente documentada. Se considera el método más simple en el control de la caries dental en todas las edades. Su objetivo terapéutico es mantener una sobresaturación de iones fluoruros en el medio, para evitar la solubilidad del esmalte y favorecer la remineralización. Su eficacia clínica comprobada va desde un 25% a un 40% en la reducción de la incidencia de caries (Gómez et al., 2010).

2.3.3 El flúor en el clareamiento dental

Para contrarrestar los efectos adversos del clareamiento dental los fabricantes han adicionado agentes fluorados y desensibilizantes (Alves, 2003).

La adición de fluoruro podría proporcionar propiedades de remineralización para el clareamiento en gel (Gladwell et al., 2006), así como también el uso de un tratamiento de fluoruro después del clareamiento también puede ser útil remineralizando la superficie del diente. Sin embargo, son necesarios más estudios para evaluar el comportamiento clínico de la aplicación de flúor en el clareamiento (Bizhang et al., 2006). Attin et al. (2006) creen que el clareamiento podría hacer que los poros en el esmalte permitan un aumento en la absorción de fluoruro, similar a la que se produce en esmalte desmineralizado por caries.

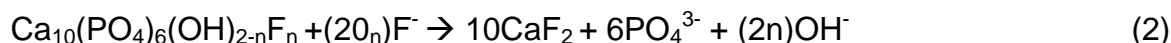
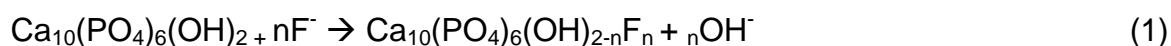
El anión fluoruro es conocido por los expertos en la técnica como un factor de desestabilización, por su potencial de reacción al estar de forma independiente. En principios incorporaron el fluoruro de sodio en una pasta de bicarbonato y en otro

compartimento separado el gel de peróxido. Luego se demostró que los compuestos de estaño, especialmente los iones estañosos, pueden estabilizar el peróxido de hidrógeno en presencia de fluoruro, desafortunadamente estos compuestos producen un sabor metálico. Finalmente se ha descubierto que los compuestos de zinc tienen la capacidad inesperada para estabilizar el peróxido de hidrógeno en presencia de un compuesto de fluoruro tal como fluoruro de sodio. Las sales de zinc se adicionan en una cantidad de 0,01 a aproximadamente 10% pero se prefiere entre un 0,1 y 5% y el fluoruro de sodio se debe adicionar entre 0.01 a 5% aproximadamente pero se prefiere entre el 0,1 a 2,5% en peso de la composición del gel clareador. El fluoruro de sodio a bajas concentraciones (NaF 0,24%) sin estabilizadores es altamente inestable. Hay una pérdida de la concentración del peróxido que se ve disminuida al someterse a situaciones de estrés como las altas temperaturas (Barrows, Ryles & Williams, 1994)

Existe la posibilidad de combinar la sal del fluoruro de sodio con un elemento o compuesto químico para disminuir su potencial reductor y de esta forma, ambos compuestos interactuarían. Si este fuese el caso, la acción clareadora del peróxido de hidrógeno disminuiría o se anularía según sea su concentración, debido a su consumo en la reacción con el fluoruro (Rubinson & Rubinson, 2001).

Por la acción de los agentes clareadores se produce una desmineralización del esmalte que disminuye las concentraciones de los iones calcio, fosfato y F^- , lo que provoca una insaturación en la superficie, entonces para llegar a un equilibrio se produce la absorción del F^- en el esmalte, lo que justifica la aplicación del agente clareador en conjunto con el F^- . En vista de la modulación de la absorción por el equilibrio iónico entre la superficie del esmalte y gel clareador, según estudio de Cavalli et al., en el año 2011 sugirió agregar una mayor cantidad de F^- , mayor a 0.2%, en el agente clareador puede ser necesario para saturar el esmalte superficial ya que según los autores, mayor es la absorción de flúor en el esmalte cuando hay altas concentraciones de flúor en el agente clareador, esto pareciera controlar la pérdida mineral durante el clareamiento (Cavalli et al., 2011).

Tanizawa en el 2005 realizó un estudio donde aplicaban fluoruro de sodio más peróxido de hidrógeno en solución sobre muestras de hidroxiapatita donde concluyó que la fluorhidroxiapatita y el fluoruro de calcio eran producidos dependiendo de la concentración del fluoruro y la concentración de peróxido de hidrógeno. En este estudio se demostró que a altas concentraciones (10000 ppm) de NaF^- con peróxido de hidrógeno se producía mayor cantidad de CaF_2 (Reacción 1) por el contrario a bajas concentraciones de NaF^- (1000 ppm), este se intercambiaba con la hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) formando parcialmente a fluorhidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_{2-n}F_n$) (Reacción 2) (Tanizawa, 2005).



El uso de fluoruros sin peróxido de hidrógeno provocó un pequeño incremento en la proporción de calcio/fosfato (Ca/P) y en flúor/calcio (F/Ca). Sin embargo el uso de F⁻ en presencia de peróxido de hidrógeno, induce a un comportamiento totalmente diferente con la ausencia de peróxido de hidrógeno, ya que al aumentar la concentración de fluoruro, el Ca/P y F/Ca drásticamente incrementan, sugiriendo que el CaF₂ es formado sobre la hidroxiapatita y además de la fluorhidroxiapatita (Tanizawa, 2005).

Un gel de clareamiento fluorado puede reducir el tiempo necesario para que el esmalte clareado recupere su dureza, comparado con un gel clareador no fluorado (Attin et al., 2007) por medio de la formación de fluorhidroxiapatita y el fluoruro de calcio, que son favorables para el proceso de remineralización de la superficie del diente (Tanizawa, 2005). En un estudio de Borges et al., (2009) investigan el efecto que produce el gel de peróxido de hidrógeno al 35% con calcio y fluoruro en la microdureza de la superficie y subsuperficie, donde concluyó que los agentes remineralizantes en el clareamiento incrementaba significativamente la microdureza del esmalte.

La adición de fluoruro a un sistema de clareamiento dental no afecta a la eficacia del clareamiento en gel (Chen et al., 2008). Al igual que Borges et al., en el 2012 realizaron un estudio donde agregó calcio y fluoruro a geles que contienen 7,5% o 35% de peróxido de hidrógeno, ambos métodos de clareamiento no se perjudicó su eficacia clareadora.

Chen et al., en el 2008 realizó un estudio donde examinó el efecto en la superficie del esmalte bovino de los agentes clareadores fluorados y la fluoración post-clareamiento, donde los resultados experimentales sugieren que el gel clareador fluorado produce menos cambios de desmineralización tales como la morfología de la erosión y la pérdida de dureza.

Según Cavalli et al., en el 2011 la adición de flúor y calcio en geles elaborados para utilizarlos en tratamiento clareador at-home, en un estudio *in vitro*, fueron capaces de reducir los efectos adversos de peróxido de carbamida sobre la superficie del esmalte y la desmineralización subsuperficial, así como la progresión de la profundidad de ésta.

El añadir agentes fluorados al clareador tiene un efecto positivo en términos de prevenir la pérdida de minerales en el esmalte clareado. Al añadir el flúor se produce una sobresaturación del clareamiento con estos iones, incorporándolos al esmalte incrementando su resistencia a desmineralizaciones (Borges et al., 2012).

2.4 MODELOS *IN VITRO* PARA EL CLAREAMIENTO DENTAL

Los dientes extraídos son comúnmente utilizados en odontología para aprender técnicas, mejorar las habilidades clínicas y probar nuevos productos (Lolayekar et al., 2007). El uso de modelos *in vitro* es a menudo importante para la evaluación inicial de los prototipos y la optimización de las condiciones del tratamiento. Estos modelos

pueden ser usados para ganar información importante sobre la seguridad del producto en términos del efecto que produce en los tejidos duros y proporciona información sobre el mecanismo del proceso del clareamiento. También otros estudios que se describen en la literatura son para evaluar la eficacia del clareamiento dental. La mayoría de estos estudios son usados cortes de dientes humanos o de bovinos (Joiner, 2006).

A partir de esto en los últimos años se han revisado los guidelines de control de infección para evitar la contaminación cruzada desde dientes extraídos. La ADA y el Centro para el control de enfermedades han llamado a remover en profundidad cualquier microorganismo capaz de transmitir una enfermedad (Lolayekar et al., 2007).

Estos dientes deben ser limpiados de la sangre visible y de los residuos de tejido, luego se deben mantener hidratados en un recipiente cerrado y firme, para poder transportarlos. Los recipientes se deben etiquetar con el símbolo de riesgo biológico. Si los dientes serán esterilizados en autoclave, se puede usar agua o suero fisiológico para mantenerlos, también se pueden usar químicos germicidas líquidos, pero estos no siempre desinfectan la superficie externa y la interna, en relación a la pulpa. A pesar de esto para su manipulación se deben seguir las precauciones estándar. Los dientes autoclavados no parecen tener alteraciones en sus propiedades físicas suficientes para comprometer el aprendizaje de técnicas. Sin embargo el autoclavado si afecta la estructura del diente de modo que la relación química y micro química entre materiales dentales y el diente se ve alterada, lo que podría afectar la investigación de los materiales dentales sobre los dientes (Kohn et al., 2003).

Los dientes que se utilizan para estudios se pueden mantener en medios para mantenerlos húmedos y eliminar las bacterias, entre ellos se encuentran los medios buffer con formalina o azida de sodio, que es un compuesto químico sólido de rápido efecto y potencialmente mortal que es de color blanco y no tiene olor. La azida sódica es utilizada como preservativo químico en hospitales y laboratorios (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades, 2003). Como medio de almacenamiento la azida se ha utilizado para inhibir el crecimiento microbiano en los dientes, debido a su mecanismo de acción que involucra iones metálicos complejos y el desplazamiento de enzimas (Komabayashi et al., 2009).

2.5 MICROSCOPIA ÓPTICA DE LUZ POLARIZADA (MOLP)

Es un microscopio de campo claro al cual se le adicionan filtros que modifican la luz (Narváez, 2009). El microscopio debe estar equipado tanto con un polarizador , posicionado en la trayectoria de la luz en algún lugar antes de la muestra y un analizador (un segundo polarizador), colocado en el camino óptico entre la abertura trasera objetivo y los tubos de observación o puerto de la cámara (Olympusmicro, 2013).

La luz proveniente de una fuente estándar de iluminación vibra y se propaga en todas las direcciones, pero al pasar por un filtro polarizador las ondas y su campo eléctrico oscilan todos en un mismo plano. El polarizador es un dispositivo que sólo deja pasar la luz que vibra en un plano determinado denominado eje de polarización (Figura 5) (Narváez, 2009).

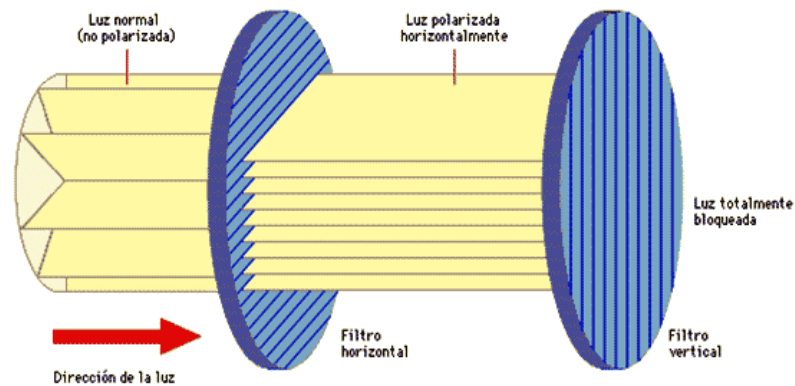


Figura 5. Esquema que muestra el efecto de filtros polarizadores en un rayo de luz. A la izquierda la luz no polarizada se distribuye en todos los planos, pero al pasar por el primer filtro (horizontal) éste sólo deja pasar las ondas que se propagan en un plano horizontal. Si se interpone un filtro polarizador orientado de manera vertical (rotado 90° en relación al horizontal) la luz polarizada no pasa y se detiene (Narváez, 2009).

Muchos materiales tienen sus átomos uniformemente distribuidos en las tres direcciones del espacio y presentan una máxima simetría (cúbica o regular) o por el contrario, en otros materiales sus átomos carecen de organización. Los primeros tienen las mismas propiedades ópticas, independientemente de la dirección en que se midan. Cuando la luz atraviesa sustancias con estas características, la velocidad es la misma en todas las direcciones y gracias a ello se denominan isótropos. Por el contrario, los materiales cuya organización cristalina es diferente (hexagonal, trigonal, tetragonal, rómbico, entre otras) poseen sus constituyentes dispuestos de manera asimétrica y varían según la dirección; en consecuencia el comportamiento de las ondas luminosas también es diferente, denominándose anisótropos. La estructura interna del espécimen determina su comportamiento isótropo o anisótropo (Olympusmicro, 2013).

Cuando se estudia el comportamiento de la luz al atravesar un espécimen, los materiales anisótropos presentan distintos índices de refracción en relación a la dirección del haz de luz; por el contrario, los materiales isótropos presentan un índice de refracción constante. Cuando un rayo de luz incide sobre la superficie de un material anisótropo translucido se presenta el fenómeno de la doble refracción o birrefringencia; esto quiere decir que se producen dos rayos refractados distintos que vibran en planos diferentes que se propagan con diferentes velocidades en el interior del material (Narváez, 2009).

Este microscopio facilita la investigación de las propiedades ópticas de los especímenes y es ideal para observar aquellos elementos que son visibles gracias a la anisotropía, de allí su uso en cristalografía; sin embargo, también se emplea para estudiar el carácter birrefringente de muchas estructuras celulares anisótropas (Narváez, 2009).

El contraste de la imagen se observa gracias a la interacción de la luz polarizada con los elementos birrefringentes del espécimen que producen las dos ondas refractadas, cada una de ellas polarizada en planos perpendiculares. Una vez que las ondas de luz salen del espécimen lo hacen de manera desfasada pero son recombinadas al pasar por otro filtro o filtro analizador. De esta manera, el microscopio de luz polarizada permite el estudio comparativo entre minerales tomando en cuenta la absorción del color e índices de refracción. El 90% de las sustancias sólidas son anisotrópicas (Narváez, 2009).

2.6 CÁMARA DIGITAL ENFRIADA

Son cámaras digitales para obtener imágenes de lo observado en el microscopio en un computador, en tiempo real. Son de alta resolución, en que se observa el campo del objetivo completo. La característica de ser enfriada, permite ser utilizada en aplicaciones de luz baja, como el microscopio de luz polarizada, disminuyendo las alteraciones que puede provocar en las imágenes de las muestras una exposición por periodos largas a temperaturas altas (Qimaging, 2003). Estas cámaras contienen un circuito integrado sensible a la luz que captura una imagen transformando cada uno de los elementos de la misma (denominados pixeles) en una corriente eléctrica cuya intensidad es proporcional al color del pixel (López-Poveda, 2013)

2.7 BIRREFRINGENCIA ÓPTICA DEL ESMALTE

La microscopía de polarización es una de las técnicas utilizadas para analizar el contenido mineral del esmalte dental. El uso de la luz polarizada es la más efectiva en el estudio de muestras ricas en materiales birrefringentes, puesto que mejora de manera incomparable la calidad de la imagen (Sousa et al., 2006).

La birrefringencia observada o la imagen de esmalte en el MOLP, es el resultado de la suma de dos tipos de birrefringencia: La *birrefringencia intrínseca del esmalte* y la *forma de birrefringencia*. La birrefringencia intrínseca, está relacionada con la fase mineral del esmalte y se representa con signo negativo de birrefringencia; y la forma de birrefringencia, se encuentra relacionado con los volúmenes no minerales del esmalte y se representa con signo positivo de birrefringencia. Este último, representa la propiedad óptica alterada por los diferentes medios de inmersión (Sousa et al., 2006).

Según Darling en 1958 el esmalte positivamente birrefringente es opaco y esta es una característica común del esmalte cariado (Sousa et al., 2013).

Desde principio del siglo XIX, se reconoce que la birrefringencia negativa en el diente es proporcional al volumen de material que este tenga. A partir de esto un incremento en el grosor de la capa superficial se reconoce como remineralización según la teoría de Darling (Sousa, 2012). A pesar de esto no se puede considerar siempre la superficie del esmalte como no afectada o como esmalte normal (Sousa, 2013).

En general, los experimentos de Darling realizados en dientes con lesiones o caries incluyen la inmersión en el aire y en las soluciones con bajos (1,33) y altos (1,62) índices de refracción, utilizando tanto los altos y bajos tamaños moleculares en las soluciones, dando por lo menos cinco medios de inmersión en una sola lesión (Darling, 1961). De esta manera, se describieron 4 zonas en las lesiones en función de su aspecto histológico cuando las secciones longitudinales del diente se examinan al MOLP: la zona superficial, el cuerpo de la lesión, la zona oscura y la zona translúcida.

La zona superficial permanece inalterable en comparación. Tiene un espesor aproximado de 20 a 40 μm y en ella se ha perdido el 1-5% del contenido mineral. Esta zona permite que los minerales como el calcio, el fosfato o el fluoruro entren y salgan del esmalte (Brown et al., 1991). Según Silverstone (1973), las lesiones de caries pueden poseer una zona de superficie intacta con una apariencia histológica similar al esmalte sano (Jones et al., 2006; Sousa, 2013). Se ha demostrado que la capa superficial de caries de esmalte de presentar altos niveles de gris en la microrradiografía y birrefringencia negativa en microscopía de luz polarizada. Es bien sabido, sin embargo, que tales características no son universales. Las lesiones o caries de esmalte artificial o natural, pueden presentar una capa superficial cuyo contenido mineral es similar o inferior a la del cuerpo de la lesión. También pueden carecer de birrefringencia negativa. La capa superficial presenta comúnmente una permeabilidad más baja que la del cuerpo de la lesión. Esta permeabilidad inferior se considera como un factor limitante tanto para la remineralización como para la infiltración de resina (Sousa, 2013).

El cuerpo de la lesión es la zona más amplia de toda la lesión inicial y donde se produce la principal desmineralización, en concreto, aproximadamente un 10–25% por unidad de volumen. Ofrece birrefringencia positiva a la luz polarizada. *La zona oscura*: es aquella que se encuentra presente en el 90 al 95% de las lesiones. Posee una pérdida de 2 a 4% por unidad de volumen con birrefringencia positiva a la luz polarizada. Esta zona es consecuencia del proceso de desmineralización y remineralización. Se observa oscura, debido a que al ser la quinolina incapaz de penetrar dentro de los poros muy pequeños que están en esta zona no transmite la luz polarizada. Se piensa que estos poros tan pequeños impenetrables por la quinolina son el resultado de la remineralización dentro de la lesión. El tamaño de la zona oscura pudiera ser un indicio de la cantidad de remineralización, es decir, zonas oscuras muy amplias pudieran representar aquellas zonas muy remineralizadas y seguramente correspondan a la lesión de avance lento o inactivas. *La zona*

translúcida: es el frente de avance de la lesión del esmalte, se encuentra presente en un 50% de las lesiones y tiene un promedio de 40 μm de ancho. Existe una pérdida mineral de 1,2% por unidad de volumen. Su apariencia translúcida se basa en el hecho que la quinolina penetra fácilmente en los poros aumentados por la pérdida mineral y como la quinolina tiene el mismo índice de refracción de los cristales, el resultado será una zona menos estructurada y de apariencia translúcida (Brown et al., 1991; Balda et al., 1999; Fejerskov & Kidd, 2008). Cuando se utiliza quinolina como medio, se observa la zona oscura y la zona translúcida y cuando se utiliza agua como medio de observación, se observa la zona superficial y el cuerpo de la lesión (Brown et al., 1991). Es bien sabido, sin embargo, que tales características no son universales, por lo que muchas lesiones pueden no presentar la zona oscura y las zonas translúcidas (Silverstone, 1973 citado en Sousa et al., 2006), e incluso la capa superficial (Dijkman et al., 1986 citado en Sousa et al., 2006).

La importancia del uso de diversos medios de inmersión se puede ver en una investigación con diferentes medios de inmersión (agua, aire, deshidratación por alcohol etílico y quinolina) aplicados a una lesión vistas en el MOLP, ésta demostró que la deshidratación y la inmersión en quinolina muestran un marcado aumento en la profundidad del esmalte cariado en comparación a la inmersión en agua. Es por esto que la práctica actual difiere de la de Darling, por ser mucho más simplista, descartando inmersión en diversos medios de inmersión. Una suposición general en los estudios actuales es que un solo medio de inmersión produce razonablemente suficiente información para contrastar la caries de esmalte, lo que no es consistente con los primeros estudios realizados por Darling en 1958 (Medeiros et al., 2012).

En la actualidad, la principal aplicación del enfoque de Darling es en la medición de área de la lesión con MOLP usando un solo medio de inmersión, el agua, que se utiliza con frecuencia en el campo de la investigación de las lesiones (Liu et al., 2006; Chu et al., 2007; Paradella et al., 2008; Correa Afonso et al., 2010; Zraikat et al., 2011).

Otras contradicciones que presentaron Medeiros y Darling es con respecto a la teoría no experimental realizada por este último, la cual decía que para que se observe una birrefringencia negativa en el esmalte, en un medio de inmersión de agua, el volumen mineral debe ser mayor a 95%, esto se considera como esmalte normal, por otro lado para observar una birrefringencia positiva debe ser menor a 95% de volumen mineral. En relación a esto Medeiros señala que la pérdida mineral según lo que propone Darling no coincide con las mediciones cuantitativas en microrradiografía realizadas el 2012, es decir que no es necesario que se produzca una pérdida del 95% mineral para observar la birrefringencia positiva (Medeiros et al., 2012).

2.8 ANÁLISIS DE IMÁGENES (López-Poveda, 2013)

El término hace referencia a un conjunto de técnicas destinadas a obtener datos relativos de un sistema objeto de estudio a partir de imágenes de dicho sistema.

2.8.1 Imagen digital

La imagen digital puede describirse como un mosaico de puntos denominados píxeles. Puede ser en color o en escala de grises. En este último caso, cada píxel posee un tono o nivel de gris diferente.

El nivel de gris de cada píxel se expresa mediante un número de N dígitos en sistema binario (o bits). Por ejemplo, en el sistema operativo Windows, cuando la imagen se codifica en 8 bits (8 dígitos) el número binario 00000000 (equivalente al número 0 en el sistema decimal habitual codifica el color negro. Por el contrario, el número binario 11111111 (equivalente al número 255 en el sistema decimal) codifica el color blanco. Cualquier otra combinación de ocho dígitos binarios indica un tono de gris diferente entre el blanco y el negro.

Con 8 bits, pueden conseguirse $2^8=256$ tonos de gris diferentes. Con 16 bits pueden conseguirse $2^{16}=65536$ tonos de gris diferentes. Cuanto mayor sea el número de bits, mayor será la definición de color de la imagen.

La resolución de una imagen digital depende del número de píxeles contenidos en la unidad de superficie (expresada en cm^2 o pulgada^2). Cuanto mayor sea el número de píxeles por cada cm^2 , mayor será la resolución de la imagen, y mayor será su definición espacial. La resolución máxima real de una imagen digital depende de la resolución máxima de la cámara digital.

Las imágenes digitales se almacenan en archivos digitales. El tamaño del archivo es directamente proporcional al tamaño de la imagen original, y a la resolución y al número de bits de la imagen digital.

La imagen digital puede almacenarse en archivos con múltiples formatos. La diferencia entre ellos está en la cantidad de información que guardan sobre la imagen. Los formatos TIFF (*.TIF) y BITMAP (*.BMP) son compatibles con prácticamente cualquier software de análisis de imágenes. Contienen información completa y precisa sobre la imagen digital. Los formatos JPEG (*.JGP) y GIF (*.GIF) son útiles para intercambiar imágenes a través de internet ya que reducen el tamaño del archivo. Su desventaja es que la imagen pierde resolución y definición de color.

2.8.2 Densitometría Óptica

Es una técnica que permite medir la cantidad de luz que absorbe un material. En neurociencias, sirve, por ejemplo, para determinar cuantitativa y objetivamente la presencia de determinadas moléculas como proteínas, neurotransmisoras, moduladoras, etc. Se basa en medir la densidad óptica en cada región de una preparación histológica observada al microscopio.

Se mide mediante un densitómetro. Existen dos tipos de densitómetros: de transmisión y de reflexión. Los de reflexión se utilizan para medir la densidad óptica de una imagen impresa (por ejemplo, una fotografía convencional). Los de

transmisión, en cambio, se utilizan para medir la densidad óptica de una película fotográfica en positivo (por ejemplo, una radiografía). Los densitómetros funcionan haciendo incidir un haz de luz con una intensidad conocida sobre la imagen o la película fotográfica y midiendo la cantidad de luz reflejada o transmitida por la imagen. La medición es rápida y directa.

En neurociencias, lo habitual es que se desee medir la densidad óptica de una preparación histológica vista al microscopio en la que las zonas más oscuras indican zonas de mayor concentración de una determinada molécula. En este caso, la iluminación procede de la lámpara del microscopio, atraviesa la preparación y se capta mediante una cámara fotográfica. Se trata de un problema de absorción de luz por transmisión. La cámara fotográfica puede ser convencional o digital. Si se opta por la primera, la densidad óptica de la preparación puede estimarse indirectamente a partir de la fotografía resultante (en formato papel) mediante un densitómetro de reflexión. Por el contrario, si se opta por utilizar una cámara digital, la densidad óptica de la preparación puede estimarse indirectamente a partir del nivel de gris o del color de la imagen digital resultante.

En una preparación histológica real, la densidad óptica no es homogénea. Por tanto, mucha veces es necesario estimar la densidad óptica de pequeñas regiones de la imagen (Figura 6) (neuronas, por ejemplo). Hacerlo a partir de una fotografía impresa resulta complicado y caro, ya que sería necesario ampliar la región de interés hasta que su tamaño sea comparable con el del detector del densitómetro. En este sentido, el análisis de imágenes digitales resulta mucho más fácil y económico.

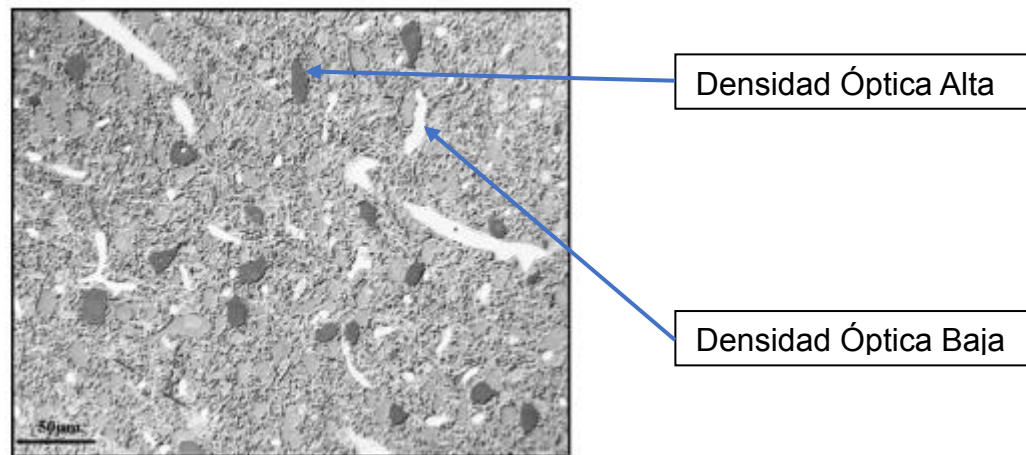


Figura 6. Imagen de corte histológico de tejido nervioso inmunoteñido contra GABA. El nivel de gris indica la concentración del neurotransmisor. Cuanto más oscura aparece una neurona, mayor es la concentración de GABA en su soma.

El sistema microscopio/cámara digital empleado para medir el nivel de gris de la región de interés no mide la relación entre la intensidad de la luz emergente y la incidente en la preparación histológica. Por tanto, no mide la densidad óptica de la preparación. Aunque el nivel de gris medio obtenido depende de la densidad óptica, también depende de la intensidad de la iluminación y de la configuración de la cámara digital. En otras palabras, los resultados obtenidos también dependen de la iluminación del microscopio, del objetivo utilizado, y de la configuración de la cámara. Debido a ello, es difícil obtener valores reales de densidad óptica a partir de los niveles de gris obtenidos de una imagen digital. También es difícil garantizar que los resultados serán idénticos si las mediciones se repiten. Para convertir los niveles de gris medidos en valores de densidad óptica es necesario calibrar la imagen. Para garantizar la reproducibilidad de los resultados es imprescindible tomar ciertas precauciones metodológicas.

2.8.2.1 Calibración en densitometría óptica.

Calibrar consiste en establecer una correspondencia entre los valores de gris de la imagen digital y sus valores correspondientes de densidad óptica (en unidades de densidad óptica). Para calibrar los niveles de gris de una imagen de fotomicroscopía digital es necesario disponer de un filtro neutro de densidad óptica variable. El aspecto de estos filtros es el de un porta objeto de microscopio estándar (tamaño de 3×1 pulgadas), cuya densidad óptica cambia a lo largo del mismo. Existen filtros en los que la densidad óptica cambia de manera gradual y otros en los que cambia “a saltos” (Figura 7). Lo normal es utilizar filtros con densidades ópticas entre un mínimo de 0 y un máximo de 2 (unidades de densidad óptica). Colocando dos filtros superpuestos se aumenta el rango de densidades ópticas disponibles, ya que la densidad óptica resultante es la suma de las dos individuales.

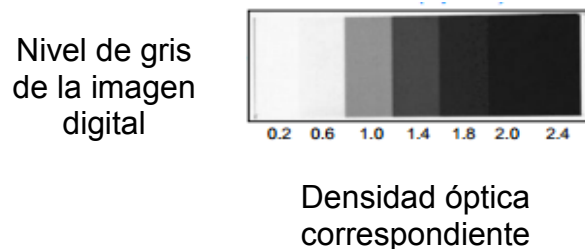


Figura 7. Filtro de densidad óptica variable de 7 pasos.

Para calibrar, debe colocarse el filtro (o los filtros superpuestos) en la platina del microscopio y capturar la imagen digital correspondiente a cada una de las densidades ópticas. De esta forma, es posible establecer una correspondencia entre el nivel de gris medio de la imagen y la densidad óptica correspondiente, tal y como se obtendría si se midiese con un densitómetro. Una cámara digital razonable debe capturar densidades ópticas entre al menos 0.05 y 1.1 cuando está configurada de forma óptima.

Es común que los programas de análisis de imágenes digitales permitan calibrar las medidas con el fin de obtener los resultados en unidades de densidad óptica en lugar de niveles de gris. Para ello, incluyen una opción de calibración.

La densitometría óptica digital puede aplicarse para investigar la presencia de determinadas moléculas en distintos tejidos. En algunos casos, incluso permite estimar la concentración de dicha molécula en el tejido a partir de la imagen digital. En este tipo de problemas, se supone que la densidad óptica es proporcional a la concentración de la molécula.

En el mejor de los casos, será posible conseguir filtros de calibración que permiten establecer una correspondencia directa entre el nivel de gris y la concentración de la molécula objeto de estudio. Sin embargo, estos filtros no existen para la mayoría de los problemas. En tales casos, una buena solución es comparar la densidad óptica de una muestra del tejido objeto de estudio (tejido caso) con otra procedente de otro tejido que carezca de la molécula en cuestión (control negativo). De esta forma, el problema se reduce a un problema estadístico de comparación de densidades ópticas (o niveles de gris) de dos muestras. Es ideal que ambos tejidos procedan del mismo animal y que se hayan procesado (cortado, teñido, incubado, etc.) de la misma forma. En este tipo de problemas, es habitual además “normalizar” los datos.

3 HIPÓTESIS

H₁: El uso *in vitro* de clareamientos a base de peróxido de hidrógeno al 35% con fluoruro de sodio al 5% disminuye o atenúa la profundidad de desmineralización del esmalte humano en comparación al uso individual de peróxido de hidrógeno al 35%.

H₂: El uso *in vitro* de clareamientos a base de peróxido de hidrógeno al 35% con fluoruro de sodio al 5% aumenta la mineralización superficial, en profundidad y densidad óptica, del esmalte humano en comparación al uso individual de peróxido de hidrógeno al 35%.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GENERAL

- Evaluar *in vitro* la variación mineral producida en el esmalte humano por un clareador de peróxido de hidrógeno al 35% asociado a fluoruro de sodio al 5%.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Comparar cuantitativamente la profundidad de desmineralización (μm) o la birrefringencia positiva del esmalte (microscopia óptica de luz polarizada) entre los grupos en estudio, sin tratamiento, peróxido de hidrógeno al 35% y peróxido de hidrógeno al 35% con fluoruro de sodio al 5%.
2. Comparar cuantitativamente la profundidad de mineralización (μm) o la birrefringencia negativa (microscopia óptica de luz polarizada) entre los grupos tratados con peróxido de hidrógeno 35% con fluoruro de sodio 5% y peróxido de hidrógeno al 35%.
3. Comparar la densidad óptica (niveles de gris) del área de mineralización superficial entre los grupos tratados con peróxido de hidrógeno 35% con fluoruro de sodio 5% y peróxido de hidrógeno al 35%.
4. Identificar y describir las zonas de birrefringencia positiva y negativa presentes en microfotografías de luz polarizada representativas del grupo sin tratamiento, y los grupos de tratamientos, peróxido de hidrógeno al 35% y peróxido de hidrógeno al 35% con fluoruro de sodio al 5%.

5 MATERIALES Y METODOS

5.1 DISEÑO INVESTIGACIÓN

Es un estudio analítico experimental de tipo ensayo controlado, que cuenta con tres grupos de estudio; un grupo control negativo, un grupo control positivo y un grupo experimental.

5.2 UNIVERSO Y MUESTRA

5.2.1 Universo:

Premolares extraídos por indicación de ortodoncia.

5.2.2 Muestra

5.2.2.1 Unidad de muestra

Premolares sanos extraídos por indicación de ortodoncia en consultorios y clínicas privadas de la quinta región de pacientes entre 9 y 20 años de edad, en un periodo de diciembre del 2013 hasta abril del 2014.

5.2.2.2 Criterios de exclusión

- o Premolares con tinciones.
- o Premolares con hipoplasia
- o Premolares con fracturas.
- o Premolares con fluorosis.
- o Premolares con caries.
- o Premolares incluidos.
- o Premolares semierupcionados.
- o Premolares con restauraciones (composite, amalgama).
- o Premolares con sellantes o resinas preventivas.
- o Premolares extraídos posteriormente a tratamiento de ortodoncia fija.

5.2.2.3 Criterios de inclusión

Fueron incluidos todos aquellos dientes premolares extraídos por indicación de ortodoncia de personas entre 9 y 20 años de edad, que entreguen su autorización a través del consentimiento informado y se encuentren fuera de los criterios de exclusión del estudio.

5.2.2.4 Muestreo

De tipo no probabilístico intencional.

5.2.2.5 *Tamaño de la muestra*

Se seleccionaron 30 premolares según criterios de inclusión y exclusión, para esto se utilizó como referencia estudios realizados *in vitro* (De Vasconcellos et al., 2012; Cunha et al., 2012; Cavalli et al., 2012).

5.2.3 Consideraciones bioéticas

Este trabajo fue sometido al Comité Institucional de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso, para llevar a cabo la intervención, ya que trabajamos con desechos biológicos que en este caso corresponden a los dientes extraídos. Para obtener la aprobación, se requiere rellenar el formulario del Comité Institucional de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso basándonos en el Manual de Procedimientos de la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT).

5.3 VARIABLES

5.3.1 Independientes

Dependiendo de la intervención tendremos tres variables independientes (Tabla I):

Tipo	Intervención	Grupo
Primaria	Peróxido de hidrógeno al 35%	PH
Primaria	Peróxido de hidrógeno al 35% con fluoruro de sodio al 5%	PH+F
Secundaria	Control sin tratamiento, agua destilada	ST

Tabla I. Resumen de variables dependientes

5.3.1.1 *Definiciones operacionales*

- : Tratamiento de peróxido de hidrógeno al 35%: Aplicación del producto peróxido de hidrógeno al 35% en base gel, con pH 7, desarrollado en recetario magistral de la Farmacia Ahumada, durante 45 minutos a 37° Celsius (C), sobre la superficie del diente limpio y seco.

- : Tratamiento de peróxido de hidrógeno al 35% con fluoruro de sodio al 5%: Aplicación del producto peróxido de hidrógeno al 35% con fluoruro de sodio al 5% en base gel, con pH 7, desarrollado en recetario magistral de la Farmacia Ahumada, durante 45 minutos a 37° C, sobre la superficie del diente limpio y seco.

5.3.2 Dependientes

5.3.2.1 Según Análisis Morfométrico

Al análisis morfométrico se presentan dos variables: la Mineralización y la Desmineralización (Tabla II).

Nombre	Primaria/Secundaria	Tipo	Escala	Unidad
Mineralización	Primaria	Cuantitativa continua	Numérica	Micrones (µm)
Desmineralización	Primaria	Cuantitativa continua	Numérica	Micrones (µm)

Tabla II. Resumen de variables dependientes según análisis morfométrico.

5.3.2.1.1 Definiciones Operacionales

- : Mineralización: Medida correspondiente al promedio de la distancia que existe entre el límite externo e interno de la birrefringencia negativa del esmalte superficial, que existe en una imagen obtenida por microscopía óptica de luz polarizada, analizada con el software Axiovision 4.8. El promedio se calculó con las medidas tomadas cada 100 µm en la superficie del esmalte dental de cada muestra (Figura 8).
- : Desmineralización: Medida correspondiente al promedio de la distancia que existe entre el límite externo e interno de la birrefringencia positiva del esmalte afectado, que se observa en una imagen obtenida por microscopía óptica de luz polarizada, analizada con el software Axiovision 4.8. El promedio se calculó con las medidas tomadas cada 100 µm en la superficie del esmalte dental de cada muestra (Figura 8)

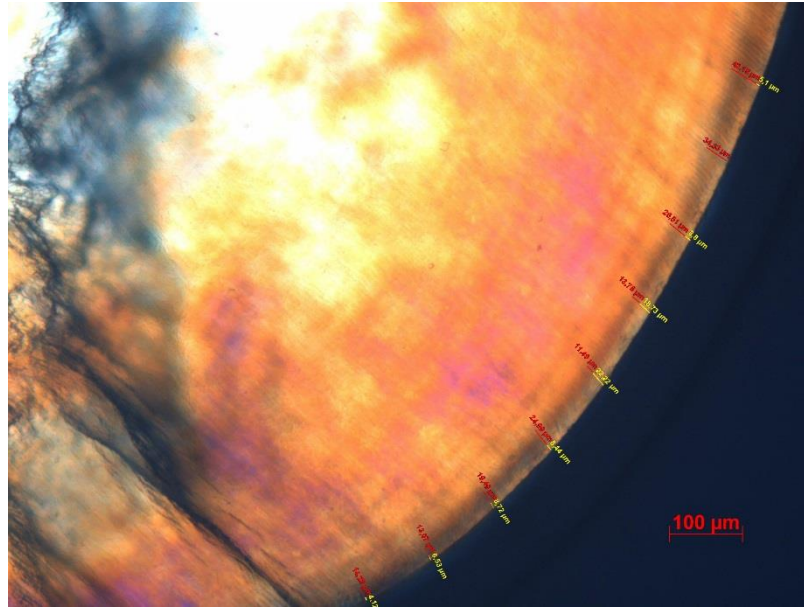


Figura 8. Microfotografía de corte transversal visto en microscopio de luz polarizada 10X. Análisis morfométrico de muestra de grupo PH+F, medición realizada a la birrefringencia negativa (área clara en superficie) marcada con amarillo y la birrefringencia positiva (área oscura) marcada con rojo.

5.3.2.2 Según Análisis Densitométrico

Al análisis densitométrico se presenta la variable densidad óptica definida por los niveles de grises (Tabla III).

Nombre	Primaria/Secundaria	Tipo	Escala	Unidad
Densidad óptica	Dependiente Primaria	Cuantitativa concreta	Numérica	Nivel de Gris (0-255)

Tabla III. Resumen de variables dependientes según análisis densitométrico.

5.3.2.2.1 Definiciones Operacionales

- Densidad óptica: Media del valor máximo del nivel de gris por diente, que se obtuvo trazando una línea desde la superficie del esmalte hasta el límite externo del área afectada de este, o en dientes no afectados una línea de 30 μm de largo aproximadamente desde la superficie del esmalte. El promedio se calculó con los valores de nivel de gris tomados cada 100 μm en la superficie del esmalte dental de cada muestra (Figura 9).

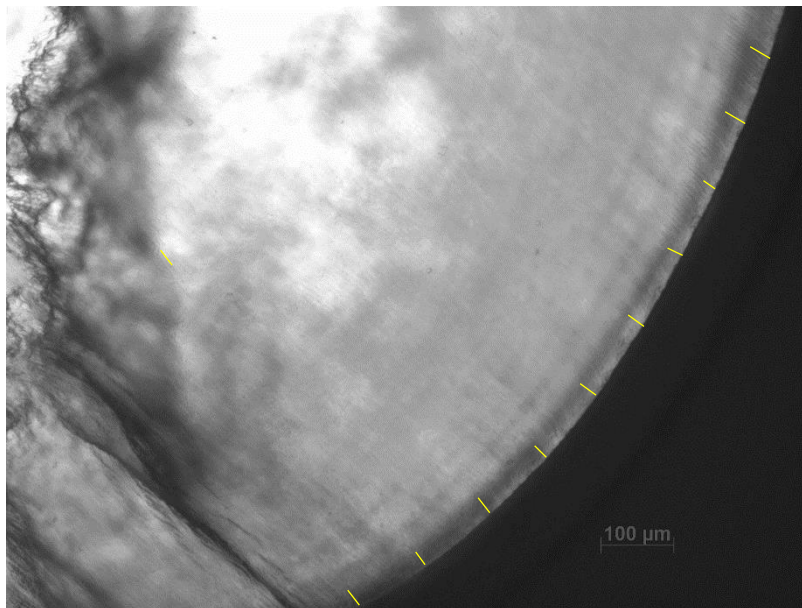


Figura 9. Microfotografía de corte transversal visto en microscopio de luz polarizada 10X transformada en 8 bits. Análisis densitométrico, valor máximo obtenido en línea amarilla desde el esmalte superficial hasta la zona afectada.

5.4 METODOLOGÍA DE TRABAJO:

5.4.1 **Recolección y Almacenamiento de especímenes**

Se repartieron 50 frascos de 50 ml con 30 ml de Buffer de Fosfato de Sodio (PBS) con azida de sodio (Figura 10), en consultorios y clínicas privadas de la V región. Estos frascos estaban rotulados con la fecha de extracción y la edad del paciente. Se le entregó a cada odontólogo encargado, un protocolo de recolección de especímenes (Anexo 1) donde se advierten las precauciones para el manejo de esta sustancia tóxica; y el consentimiento informado para el paciente o apoderado (Anexo 2). También se le indicó, que al momento de la recolección de los dientes dieran aviso lo antes posible para ir en busca de estos.



Figura 10. Frasco de PBS con azida de sodio tabulado para recolección de especímenes con símbolo de desecho biológico y veneno.

A medida que se iban obteniendo los especímenes, estos se llevaron a la sala de Materiales Dentales de la Facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso donde se almacenaron los frascos en cajas con cierre hermético, para mantenerlos durante los 4 meses de recolección.

5.4.2 Selección de especímenes

Al momento de extraer los dientes de los frascos recolectores, estos fueron lavados con agua corriente y limpiados con instrumental manual (Cureta N°5-6, Hu-Friedy, Estados Unidos). Posteriormente cada operador verificó la inexistencia de alteraciones aplicando los criterios de exclusión con una lupa de 3X de aumento (R345, China), observándolos con luz directa. Para la selección de la muestra, a los operadores se les aplicó el índice de Kappa para determinar la concordancia entre los investigadores para la selección de la muestra, el cual fue considerable o sustancial (Índice de Kappa: 0,66).

Así, se seleccionaron 30 premolares, los cuales fueron lavados con agua destilada y posteriormente, almacenados en frascos de tapa rosca con 20 ml de agua destilada (Figura 11).



Figura 11. Frasco de agua destilada para el almacenamiento posterior a la selección de especímenes

5.4.3 Distribución de grupos

Tres grupos serán generados basados en el tipo de tratamiento

- Grupo Control Negativo: Sin tratamiento (ST) en agua destilada
- Grupo Control Positivo: Tratamiento peróxido de hidrógeno al 35% (PH)
- Grupo Experimental: Tratamiento peróxido de hidrógeno al 35% con fluoruro de sodio al 5% (PH+F).

De los 30 dientes almacenados cada uno en un frasco, se realizó una asignación aleatoria de cada frasco, tabulándolos con el número de diente y el nombre del grupo al cual pertenece. Por ejemplo grupo PH+F diente 1 como muestra la Figura 12c. Cada grupo se conforma de 10 dientes.

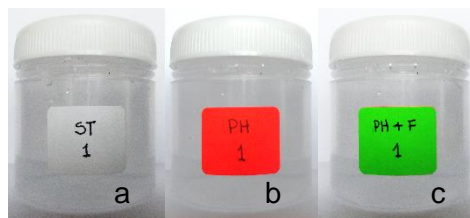


Figura 12. Frasco de agua destilado tabulado con el nombre y número de diente del grupo.
a) ST 1 b) PH 1 c) PH+F 1.

5.4.4 Dosificación y materiales:

5.4.4.1 Recursos materiales para experimentación

- Tubo de 50 ml de peróxido de hidrógeno al 35%, en base de gel, pH 7, formulado por recetario magistral, Farmacia Ahumada.
- Tubo de 50 ml de peróxido de hidrógeno al 35% con fluoruro de sodio al 5%, en base de gel, pH 7, formulado por recetario magistral, Farmacia Ahumada.
- Jeringas de 10 ml (Cramberry, Chile)
- Horno (Cultura Ivoclar Vivadent, Liechtenstein).
- Cronometro.
- Pinza anatómica.
- Pizeta.
- 5 Litros de agua destilada.
- 3 cubeteras de hielo de colores verde, naranja y azul.
- Malla plástica de 20 cm por 6,5 cm.
- 4 apretadores pequeños marca SelloOffice
- 1 pote de 1 kilo de Silicona pesada (Precise SX Denso, Densply, Estados Unidos)
- Pastillero de 28 compartimentos.
- Pastillero de 14 compartimentos.

- Etiquetas autoadhesivas tres colores blanco, naranja y verde (Adetec, 19x23 mm, Chile)
- Lápiz pasta negro (Triplus®, STAEDTLER, Alemania)

5.4.4.2 Preparación materiales pre-experimentación

Para la intervención de los grupos se ocuparon tres cubeteras con diferentes colores, se asignó la cubetera azul para el grupo ST, la naranja para el grupo PH y la verde para el grupo PH+F (Figura 13).

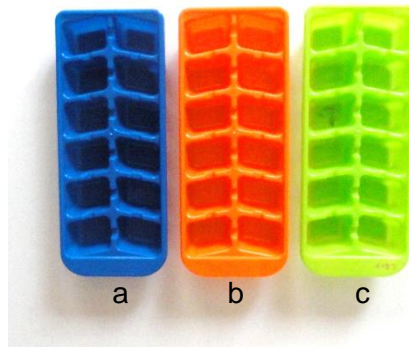


Figura 13. Cubeteras de colores para cada grupo. a) ST b) PH c) PH+F.

Para la realización de la intervención se creó un sistema de cubeteras, este consistió en que en la parte superior de la cubetera se posicionó una malla de plástico blanca fijada con apretadores pequeños en cada esquina. Por la parte inferior de esta malla se posicionaron 10 dientes, uno en cada cubículo, sujetos con silicona pesada por la raíz de estos. El propósito de este sistema fue la aplicación del tratamiento en gel simultáneamente a los 10 dientes de los grupos PH y PH+F (Figura 14).

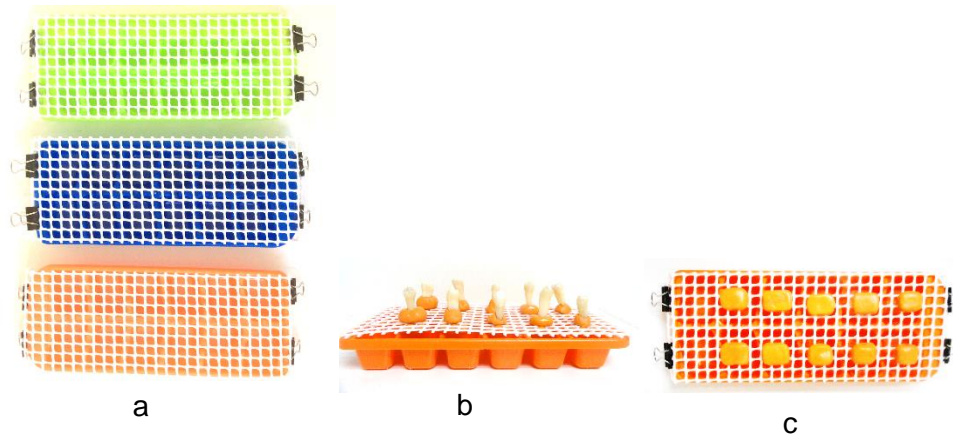


Figura 14. a) Cubeteras con malla posicionada con apretadores. b) Posicionamiento de dientes en silicona pesada c) Visión superior de sistema de cubetera final, con silicona pesada posicionando los dientes en cada cubículo.

Previo al tratamiento a realizar se dejaron los dos tubos de tratamiento (PH y PH+F) en el horno a 37°C por 30 minutos (Figura 15).



Figura 15. Horno a 37° C con tubos de tratamientos (peróxido de hidrógeno al 35% y peróxido de hidrógeno al 35% con fluoruro de sodio al 5%).

5.4.5 Experimentación

5.4.5.1 Protocolo de aplicación de tratamiento

Los dientes fueron retirados de los frascos con agua destilada tomándolo por la raíz con una pinza anatómica y luego se secaron dejándolos sobre papel absorbente a temperatura ambiente.

1. Se cargó una jeringa con 5 ml de peróxido de hidrogeno al 35% o peróxido de hidrogeno al 35% con fluoruro de sodio al 5%, y se agregó a cada cubículo de la cubetera del color según el grupo respectivo (Figura 16).

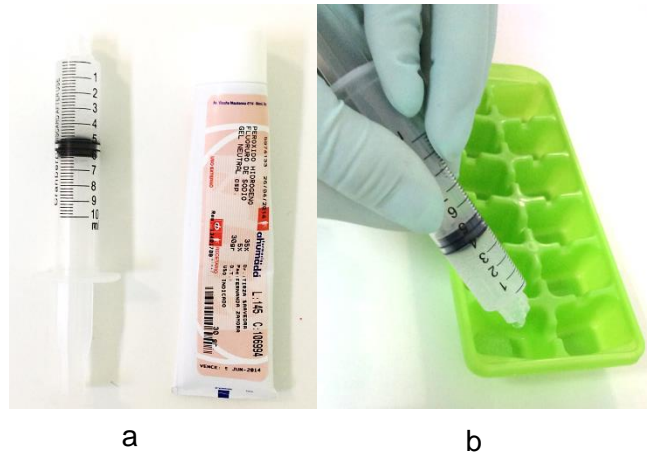


Figura 16. a) Jeringa con 5 ml de gel de tratamiento y tubo con gel de peróxido de hidrógeno al 35% con fluoruro de sodio al 5% b) Aplicación de 5 ml de gel en cada cubículo de la cubetera verde correspondiente al grupo PH+F.

2. Luego de tener ubicados los dientes con silicona en la malla, se procedió a ubicarla sobre la cubetera ajustándola con los apretadores. Simultáneamente se sumergieron las coronas de los dientes en el gel (Figura 17).

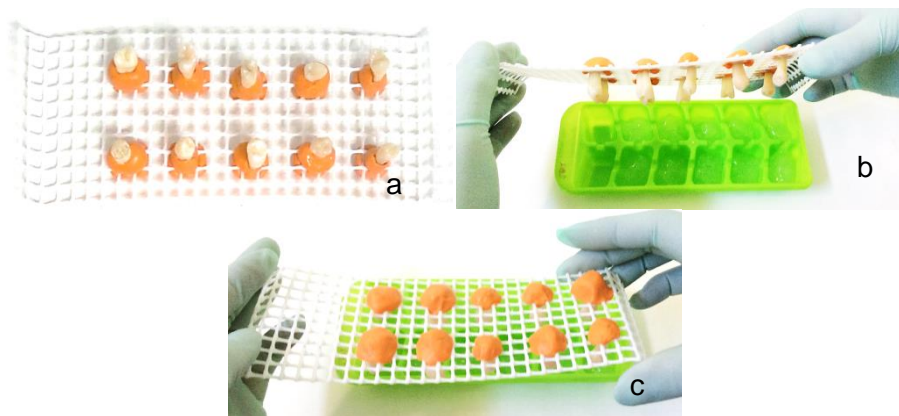


Figura 17. a) Dientes en malla b) Vista previa a ser sumergidos en gel c) Dientes sumergidos simultáneamente en gel.

3. Consecutivamente la cubetera con los dientes fue llevada al horno a 37°C donde se dejó actuar el producto durante 45 minutos (Figura 18).



Figura 18. Sistema de cubeteras en horno a 37°C.

4. Luego se retiró la cubetera del horno.
5. Se realizó un primer lavado manteniendo los dientes en la malla, con spray utilizando una jeringa triple con agua destilada para retirar la mayor parte del gel.
6. Los dientes se retiraron de la malla tomándolos por la raíz con una pinza anatómica, luego se lavó la superficie de los dientes con agua destilada de alta pureza, 10 lavados mínimos utilizando una pizeta (Figura 19).

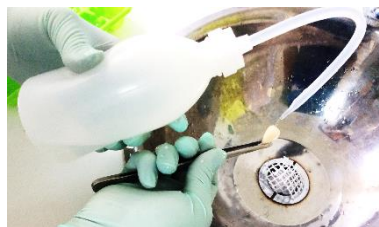


Figura 19. Lavado de dientes con agua destilada de alta pureza.

7. Secar los dientes dejándolos sobre papel absorbente a temperatura ambiente (Figura 20).



Figura 20. Dientes secándose sobre papel absorbente.

8. Finalmente los dientes fueron almacenados en un pastillero limpio y seco (uno por compartimento), indicando número de diente, y el grupo (ST, PH o PH+F) (Figura 21).



Figura 21. Pastillero para almacenar dientes posterior al tratamiento.

El protocolo de aplicación para el grupo PH fue el mismo del grupo PH+F, reemplazando el agente clareador con fluoruro, por el peróxido de hidrógeno al 35%. Con respecto al grupo ST, se aplican todos los pasos a excepción de la aplicación del tratamiento en gel.

5.4.6 Preparación de especímenes

Los dientes fueron lavados profusamente con agua destilada de alta pureza (10 lavados mínimos), utilizando una pizeta y luego fueron secados dejándolos sobre papel absorbente a temperatura ambiente. Cada espécimen se cubrió con una película selladora (Parafilm M®, SPI Supplies, Estados Unidos) (Figura 22) para posteriormente agregar metilmetracrilato para la manipulación de la muestra. Esta película de para film permite proteger las superficies dentales e impedir la infiltración del metilmetacrilato, durante el proceso de polimerización, en las anfractuosidades del esmalte y la dentina, hasta que este polimerice. La infiltración del acrílico de autocurado podría producir artefactos técnicos.

Una vez que el acrílico polimerizó se realizaron cortes transversales de las coronas de los dientes en una máquina cortadora de tejidos mineralizados (IsoMet® 1000, BUEHLER, Estados Unidos) que utiliza un disco de diamante y refrigeración constante. De cada espécimen se obtuvieron cortes de 100 μm de grosor aproximadamente y fueron adheridos a un porta objeto con una resina de montaje (UltraKitt, J.T.Baker®, Estados Unidos) aplicada con una pipeta Pauster de plástico a cada una de los cortes. Las muestras adheridas al porta objetos se colocaron dentro de una estufa (UM 500, MERMETT, Alemania) por 48 horas aproximadamente a 37 °C. Una vez que las muestras estaban secas (Figura 23a), se desgastaron con disco de diamante de 600 grit (grosor) bajo refrigeración constante, hasta obtener un grosor de 60 μm aproximadamente (Figura 23a b).



Figura 22. a) Película para sellado de laboratorio Parafilm M[®], SPI Supplies b) Máquina cortadora IsoMet[®] 1000, BUEHLER c) Resina de montaje UltraKitt, J.T.Baker[®] d) Estufa Universal, UM 500, MERMETT e) Máquina de desgaste.



Figura 23. a) Muestras cortadas secas y adheridas al portaobjetos b) Muestras desgastadas.

5.4.7 Imágenes histológicas

Los operadores se calibraron con un experto en observación de muestras histológicas, el Dr. Alejandro Oyarzun, Cirujano Dentista de la Universidad de Chile. Magíster en Ciencias Biológicas de la Universidad de Chile, Profesor de Cariología e Histología Oral de la Universidad Finis Terrae, en el microscopio óptico de luz polarizada (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Estados Unidos) con aumento de 10X. Se tomaron alrededor de 10 fotografías por muestra, con una cámara digital enfriada de alta velocidad y con visualización en tiempo real (MicroPublisher 3.3, QImaging, Canadá), esta se encontraba conectada a un computador (Figura 24). Las imágenes fueron observadas a través de un software de captura de imágenes digitales llamado QCapture Pro, donde se guardaron como archivos JPG indicando el corte, número de diente y grupo (Figura 25). Este software está incluido con todas las cámaras QImaging, y ofrece una vista previa de alto rendimiento y funcionalidad de captura (QImaging, 2014).

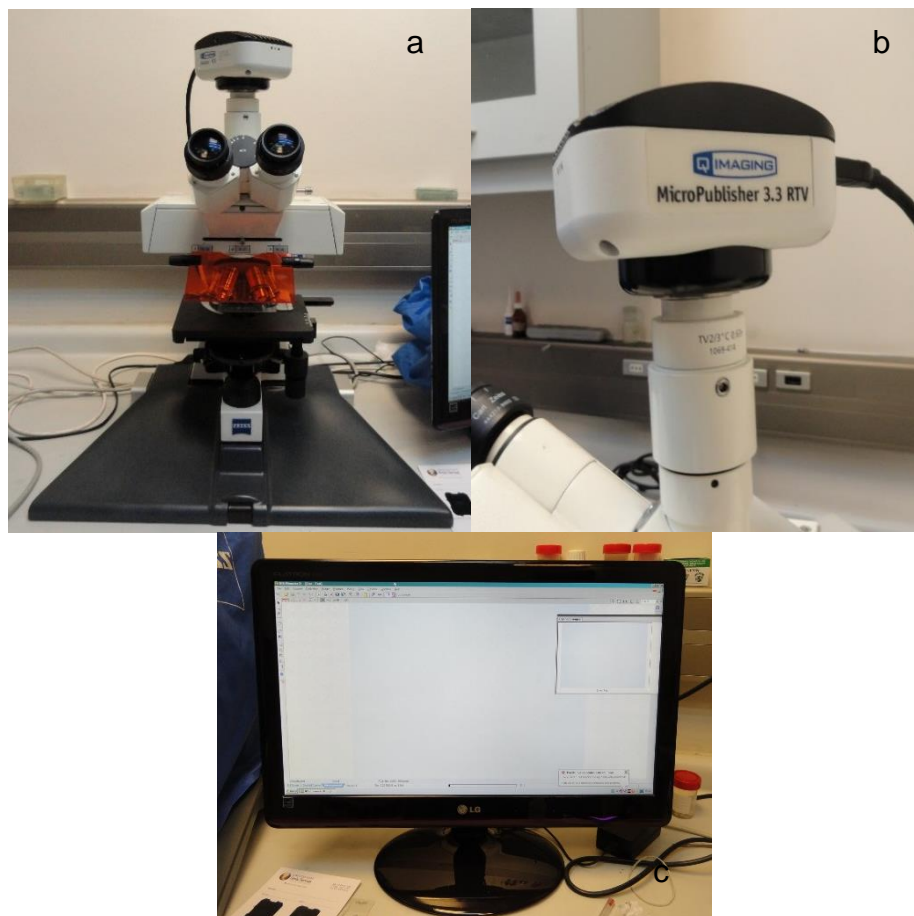


Figura 24. a) Microscopio Óptico de Luz Polarizada, Axiostar plus, Carl Zeiss. b) Cámara digital enfriada MicroPublisher 3.3, QImaging. c) Computador LG conectado al microscopio.

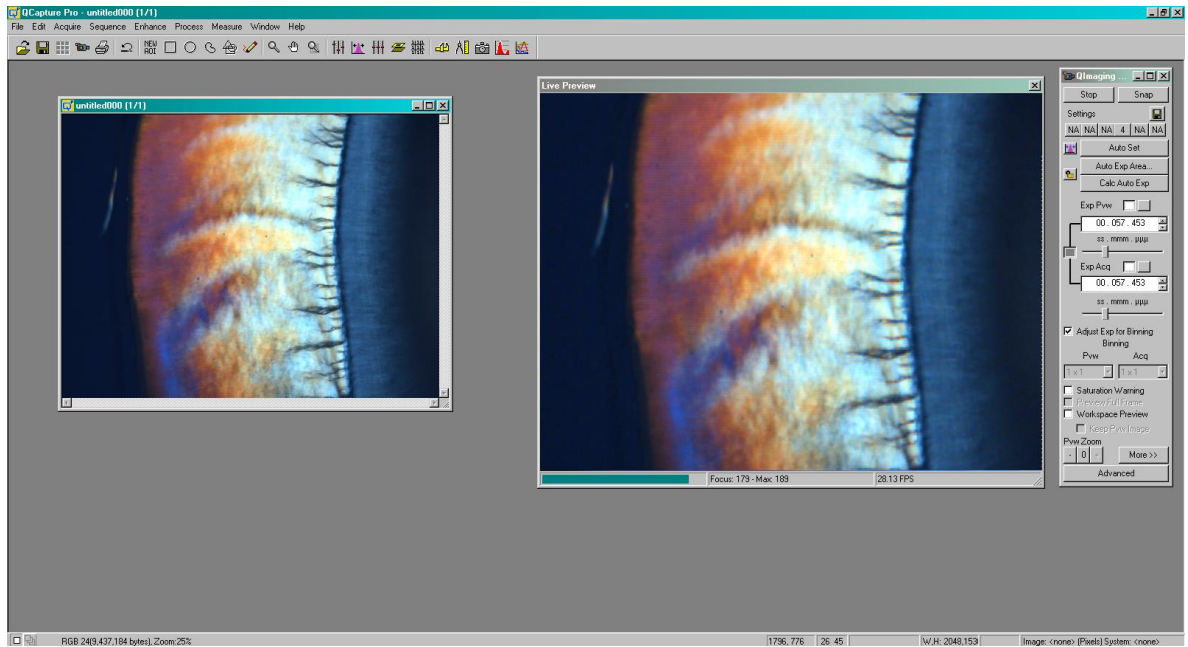


Figura 25. Captura de pantalla de software QCapture Pro

5.4.8 Análisis Morfométrico

Consecutivamente se seleccionaron 5 imágenes por muestra con magnificación estandarizado 10X, para esto se utilizó un sistema tómbola. Cada imagen se midió mediante el software AxioVision 4.8.

Posteriormente se realizó la calibración espacial morfométrica, la cual conlleva a establecer la relación que existe entre un pixel de la imagen y las dimensiones reales de la imagen en la ventana utilizada durante el proceso de digitalización, lo que suele denominarse como campo instantáneo de visión.

Para la calibración de las imágenes en el software AxioVision 4.8 se utilizó una imagen de una planilla con regla micrometrada (Figura 26) obtenida a través del microscopio óptico de luz polarizada (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Estados Unidos) adaptado con un objetivo de 10X. Mediante el software se agregó una escala a través de un método “Single Distance” (una distancia), donde el eje X es igual al Y, luego se asignó una distancia de 20 μm en la imagen real con la regla micrometrada que correspondieron a 0,5405 μm por 1 pixel.

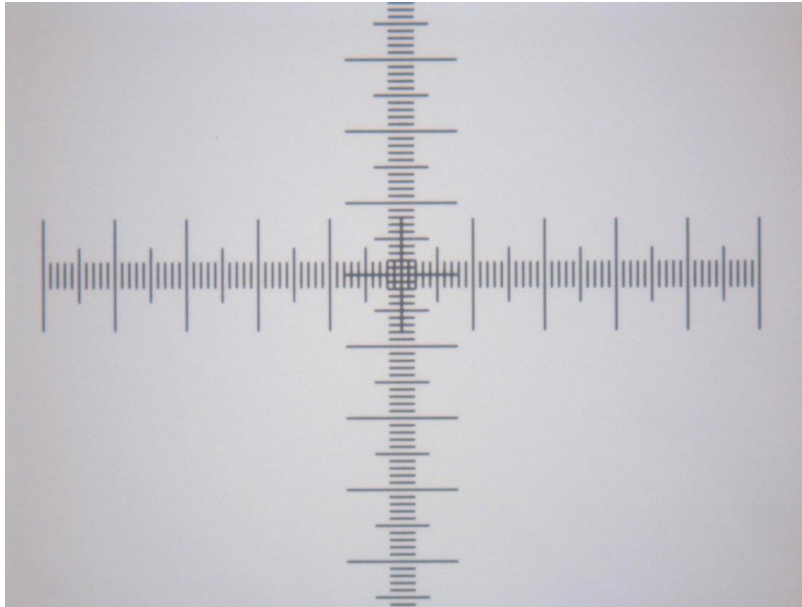


Figura 26. Imagen de planilla con regla micrometrada obtenida a través del microscopio Carl Zeiss modelo Axiostar adaptado con un objetivo de 10X.

5.4.8.1 Mediciones de profundidad

Para la realización de las mediciones los investigadores fueron calibrados por el experto con un Índice de Kappa de 0,66 que presenta una concordancia considerable. Posteriormente se procedió a realizar las mediciones a ciegas por los evaluadores. Las mediciones correspondían en trazar una línea desde el borde externo hasta el borde interno de la zona afectada si es que la había, de manera que el programa de inmediato marca la distancia medida en micrómetros (Figura 27). Esta se realizó cada 100 μm de distancia en la superficie de la muestra (Gladwell et al., 2006).

Para la variable mineralización no se utilizó el grupo ST ya que en este grupo no se distingue el límite de la zona de mineralización superficial, por lo que podría alterar nuestros resultados.

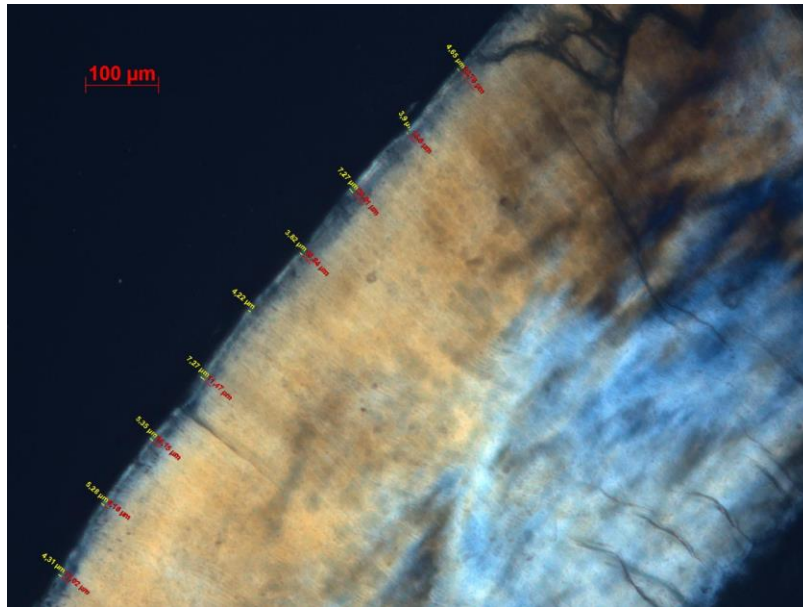


Figura 27. Microfotografía de corte transversal visto en microscopio de luz polarizada 10X con mediciones de profundidad, amarillas (birrefringencia negativa) y rojas (birrefringencia positiva).

5.4.8.2 Base de datos de profundidad

Para la realización de la base de datos se obtuvo el promedio de las mediciones de cada corte y posteriormente el promedio de cada diente, el cual se introdujo en el programa Microsoft Excel para el posterior análisis estadístico.

5.4.9 Análisis densitométrico

Las imágenes previamente seleccionadas y medidas se introdujeron en un software de análisis de imágenes llamado Image J, donde las microfotografías (Figura 28) se convirtieron a imágenes de 8 bits y luego fueron calibradas en micrómetros. Posteriormente se trazó una línea desde la superficie del esmalte hasta el límite interno de la zona afectada. En el caso de no haber zona afectada se midió aproximadamente 30 μm desde la superficie. Esto se realizó cada 100 μm de distancia en toda la superficie de la muestra. Por cada línea se realizó un análisis de niveles de grises, donde se indicaba el valor máximo.

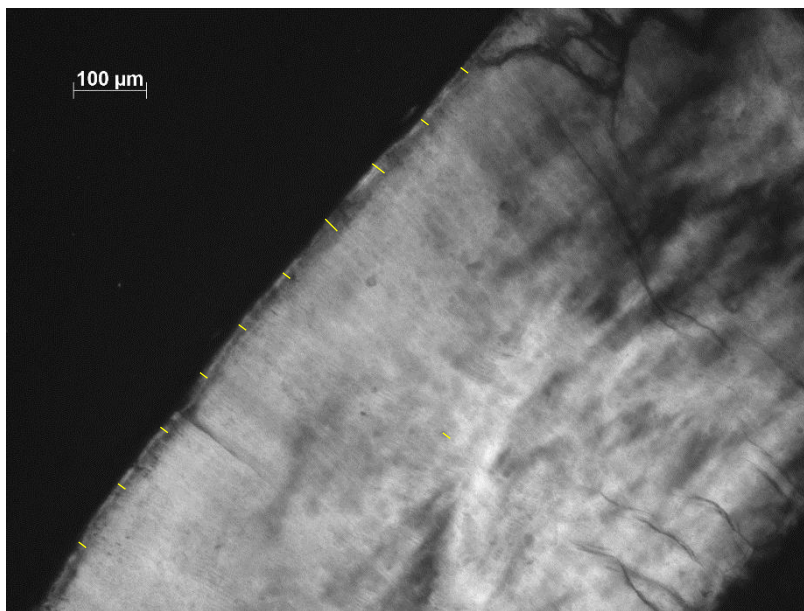


Figura 28. Microfotografía de corte transversal visto en microscopio de luz polarizada 10X transformada en 8 bits.

5.4.9.1 Base de datos densitometría

Para la realización de la base de datos se obtuvo la media de los valores máximos de las imágenes medidas de cada diente, el cual se introdujo en el programa Microsoft Excel para el posterior análisis estadístico.

5.5 MÉTODOS ESTADÍSTICOS UTILIZADOS

El análisis estadístico consistió en realizar inicialmente un análisis exploratorio de datos, entregando algunas estadísticas descriptivas de interés que resuman la información de los dientes analizados.

Posteriormente se procedió a analizar si existen diferencias significativas entre las variables tanto para la desmineralización y la mineralización de los dientes. Para las comparaciones, corresponde verificar si se cumple el supuesto de normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk en cada una de los grupos y variables de este estudio. En la variable desmineralización, se analizaron los tres grupos de estudio, es decir, si se cumple la normalidad de los datos se puede utilizar el test de comparación de ANOVA y Tukey, en caso que los datos no provengan de una distribución normal, se utilizará el test de comparación Kruskal-Wallis. Por otro lado en la variable mineralización, se analizaron dos grupos (PH y PH+F), si no se rechaza la hipótesis de normalidad de los datos se puede aplicar el test t de comparación de medias, si el supuesto de normalidad se rechaza, se optará por realizar el test no paramétrico Mann-Whitney que recomiendan Hollander & Wolfe

(1998) el cual permite realizar la comparación de medias en el caso que las variables a comparar no cumplan el supuesto de normalidad.

Los análisis estadísticos y los gráficos han sido desarrollados en el software estadístico Stata 11.2.

6 RESULTADOS

Las mediciones realizadas tanto de morfometría como densitometría, fueron ordenadas en tablas, para su análisis estadístico.

Se realizaron análisis de estadística descriptiva y de comparación.

6.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Con el fin de conocer cómo se comporta la muestra obtenida, se realizó en una primera instancia, un análisis estadístico descriptivo de la variable desmineralización, separándola en los tres grupos de estudio y la variable mineralización en los dos grupos de estudio en los que se midió (PH y PH+F).

Se observa en la Tabla IV que el promedio de desmineralización más alto fue en el grupo PH, mientras que el grupo ST tuvo el promedio más bajo. Cabe destacar que el rango de los valores de desmineralización del grupo PH fue muy amplio, esto quiere decir que la dispersión de los resultados obtenidos fue mayor, lo que se ve reflejado en el coeficiente de variación que es el más bajo de los tres grupos.

Grupo	Promedio (μm)	Mediana (μm)	Desv. Est. (s) (μm)	Mínimo (μm)	Máximo (μm)	Coef. Var.
PH	132,40	128,15	53,26	34,58	210,16	0,40
PH+F	42,54	46,91	22,47	8,94	73,22	0,53
ST	6,94	10,14	6,58	5,08	27,39	0,95

Tabla IV. Estadística descriptiva de la desmineralización según grupo de estudio

Con relación a la mineralización el promedio es mucho mayor en los dientes del grupo PH+F, comparándolo con el grupo PH. Es importante destacar que el grupo PH+F tiene un mayor grado de dispersión en sus resultados, por lo que su coeficiente de variación es menor (Tabla V).

Grupo	Promedio μm	Mediana μm	Desv. Est. (s) μm	Mínimo μm	Máximo μm	Coef. Var.
PH	2,77	1,71	2,67	0,00	8,23	0,96
PH+F	11,66	10,14	6,58	5,08	27,39	0,56

Tabla V. Estadística descriptiva de la mineralización según grupo de estudio.

6.2 ANÁLISIS DE COMPARACIÓN

Para el análisis de comparación se verificó el supuesto de normalidad con el fin de saber que pruebas estadísticas utilizar. Los resultados obtenidos fue que en la variable desmineralización en los tres grupos se acepta la hipótesis de normalidad y por lo tanto se puede realizar los test paramétricos de ANOVA y Tukey. En la variable de mineralización para el grupo PH+F se rechaza la hipótesis de normalidad por lo tanto se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney.

6.2.1 Desmineralización

A continuación se muestra un gráfico de Box-Plot para los tres grupos de estudio según los resultados de Desmineralización (Figura 29).

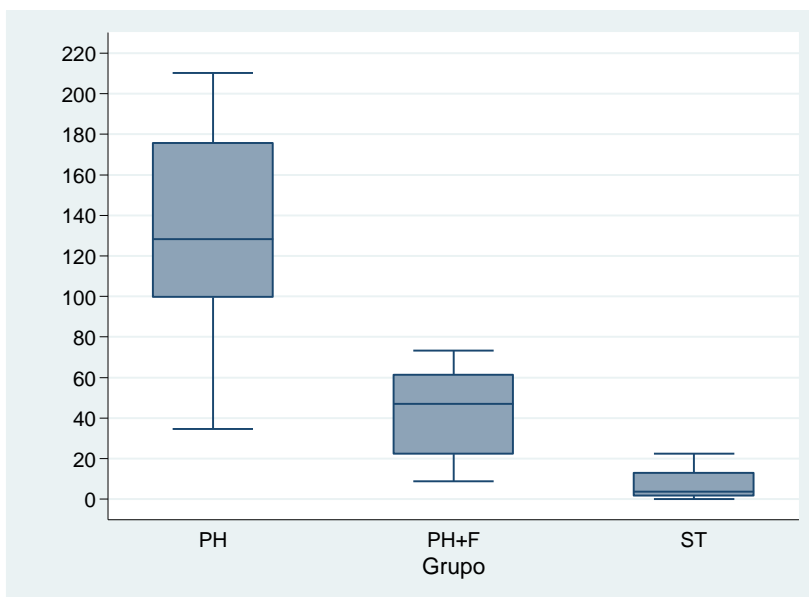


Figura 29. Gráfico Box-Plot de la Desmineralización de los dientes según grupo de estudio.

Al realizar el análisis comparativo de los promedios de los valores medidos de desmineralización mediante el test de ANOVA, se obtuvo que se acepta la hipótesis de trabajo entre los tres grupos de estudio, esto debido a que el valor-p es igual a 0,0000, es decir, existe una diferencia significativa ente los tres grupos, por lo tanto, se realizó el test de Tukey, comparando pares de grupos para conocer donde se produce la diferencia significativa.

Al realizar el test de Tukey se tiene que en los tres pares de grupos analizados se acepta la hipótesis de trabajo de promedios, es decir, ningún grupo tiene resultados igual a otro.

6.2.2 Mineralización

Al igual como se hizo para la desmineralización, se muestra en la Figura 30 los resultados obtenidos para los grupos PH y PH+F, en la variable mineralización.

Al realizar el análisis de comparación de medias mediante el test de Mann-Whitney se obtuvo que se acepta la hipótesis de trabajo entre los dos grupos de estudio analizados, debido a que el valor p es igual a 0,0005, es decir, existe diferencia significativa entre estos dos grupos.

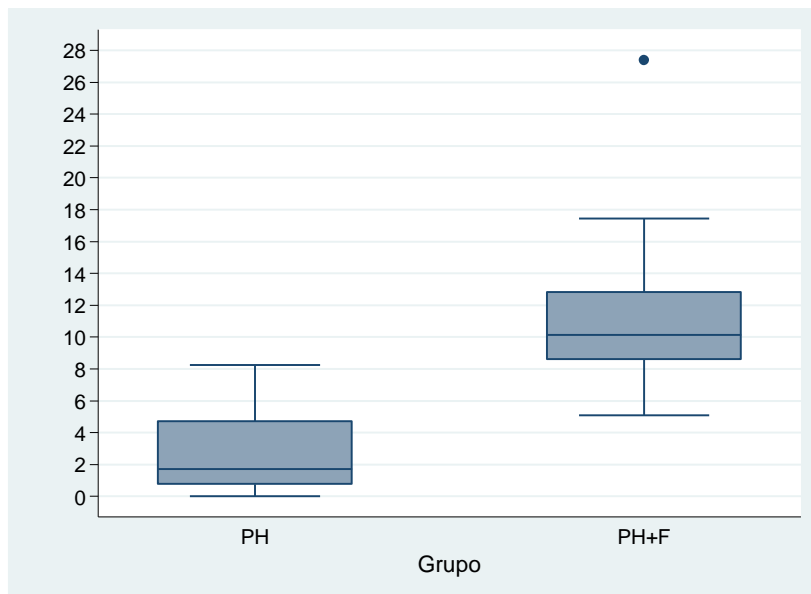


Figura 30. Gráfico Box-Plot de la Mineralización según grupo de estudio

6.2.3 Densitometría

Para realizar este análisis, en un principio se va a utilizar el test de Shapiro-Wilk, para determinar si la variable se distribuye de forma Normal, el resultado fue de un valor- p igual a 0,08099, por ser mayor a 0,05, se acepta la normalidad, y se puede utilizar el test de ANOVA.

A continuación se muestra en la Tabla VI, las estadísticas descriptivas para cada grupo de análisis y se observa que el mayor valor, es decir el más cercano a blanco es en el grupo PH+F.

Grupo	Promedio	Mediana	Desv. Est. (s)	Mínimo	Máximo	Coef. Var.
PH	65,74	61,82	12,37	52,92	95,24	0,19
PH+F	91,10	88,51	15,31	73,37	119,36	0,17
ST	84,00	81,77	24,59	54,31	133,56	0,29

Tabla VI. Estadística descriptiva de la media de los valores máximos de nivel de gris, según grupo de estudio.

En la figura 31, se observa la distribución de los valores para cada grupo, al realizar el análisis de ANOVA se obtuvo que existe diferencia significativa entre los tres grupos, debido a que el valor-p fue de 0,0125, por lo tanto se realizó el test de Tukey para saber dónde se presenta la diferencia significativa.

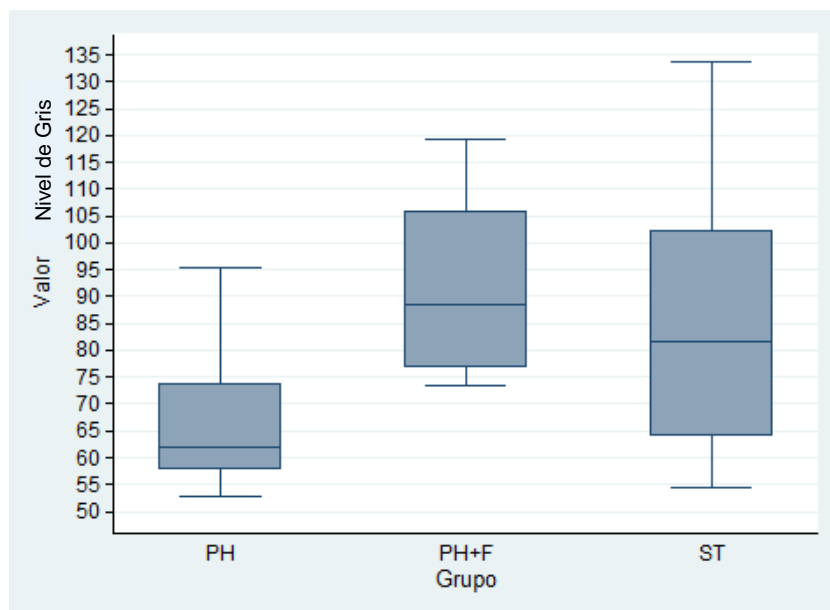


Figura 31. Gráfico Box-Plot de los valores de nivel de gris de los dientes según grupo de estudio.

Al realizar el test de Tukey se obtuvo como resultado que el grupo PH fue el que presentó diferencia significativa con los otros dos grupos, concluyendo así que este grupo fue el que obtuvo resultados significativamente más bajos de los tres grupos, en cambio los grupos PH+F y ST no presentan diferencias significativas entre ellos.

6.3 DESCRIPCIÓN DE IMÁGENES

Las imágenes más representativas de cada grupo, obtenidas con el microscopio óptico de luz polarizada con objetivo 10X, fueron descritas observando las distintas zonas del esmalte e identificando la birrefringencia positiva (zona oscura) y negativa (zona blanquecina), también se observaron unidades estructurales del esmalte como Estrías de Retzius o líneas incrementales (Figura 32).

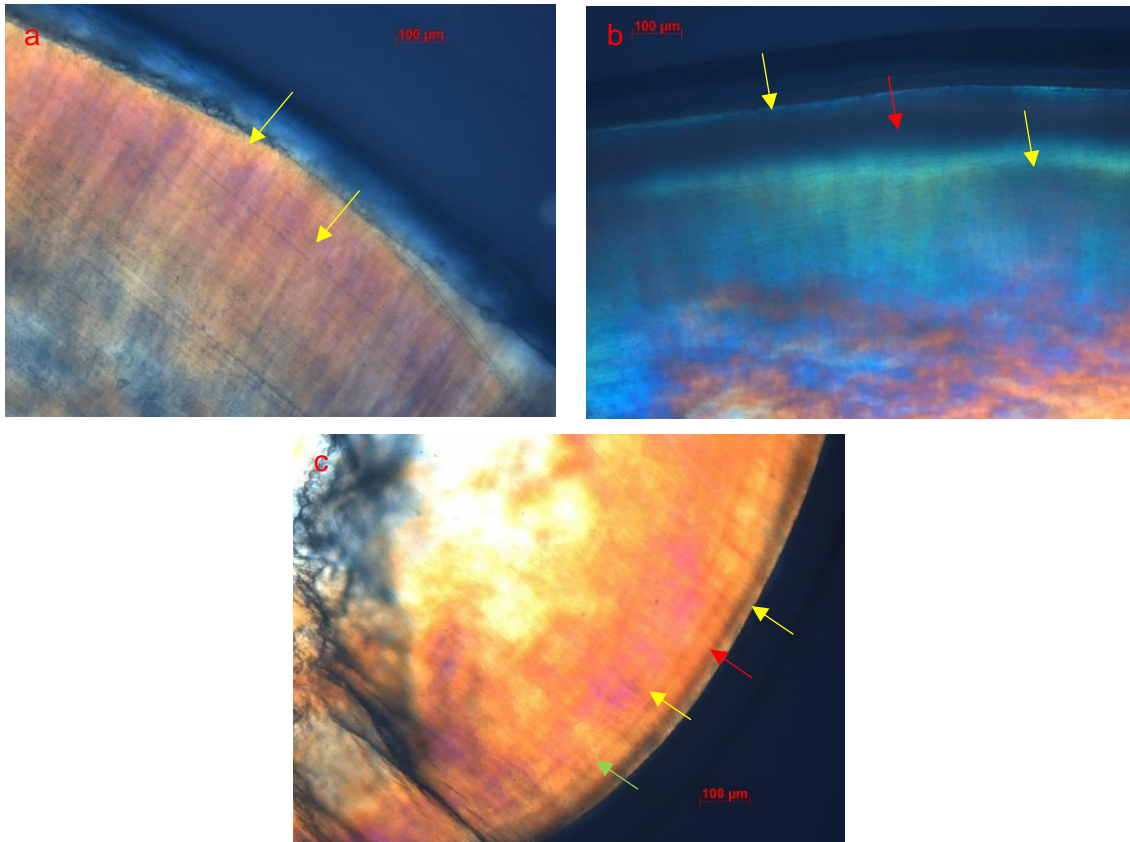


Figura 32. Microfotografías de corte transversal vistas en microscopio de luz polarizada 10X. a) grupo ST, se observa la superficie, subsuperficie y en todo el espesor del esmalte una birrefringencia negativa (flecha amarilla). b) grupo PH, presenta una zona superficial delgada de birrefringencia negativa (flecha amarilla), bajo esta se observa una zona de birrefringencia positiva (flecha roja). Hacia el interior del esmalte se distingue una birrefringencia negativa; c) grupo PH+F, se observa una zona superficial gruesa y de marcada birrefringencia negativa (flecha amarilla), bajo esta se observa una zona delgada de birrefringencia positiva (flecha roja). Hacia el interior del esmalte la birrefringencia vuelve a ser negativa. Se observan las estrías de Retzius o líneas incrementales, en forma paralela a la superficie del esmalte (flecha verde).

7 DISCUSIÓN

Uno de los productos más utilizados como desensibilizantes durante el clareamiento dental es el fluoruro de sodio, con un historial de éxito comprobado para el tratamiento contra los efectos adversos del clareamiento (Haywood et al., 2001; Alves, 2003). La disminución de la desmineralización del esmalte clareado se ha logrado con éxito por medio de la adición de fluoruros a los agentes clareadores (Attin et al., 2003, Chen et al., 2008). Según Gladwell et al. (2006) la adición de fluoruro podría proporcionar propiedades de remineralización para el clareamiento en gel.

En diversos estudios *in vitro* se ha investigado la aplicación de fluoruros antes y después del tratamiento de clareamiento (Bizhang et al., 2006; Da Costa & Mazur, 2007; Tay et al., 2009; Borges et al., 2010; Borges et al., 2012; Martin et al., 2012), pero por otro lado existen pocos estudios en el que se investigue la aplicación de agentes clareadores en conjunto con fluoruros y las investigaciones realizadas hasta el momento se han efectuado comparando bajas concentraciones de flúor (menores de 1000 ppm) (Gladwell et al., 2006; Borges et al., 2009; Cavalli et al., 2011). En el estudio *in vitro* de Chen et al. en el año 2008 encontraron que a mayor concentración del fluoruro en el agente clareador se producía un mayor grado de mineralización, acercándose a la mineralización natural de dientes sanos sin tratamiento. Estos últimos estudios han sugerido la necesidad de evaluar los efectos del gel clareador con flúor a altas concentraciones. Según Borges et al. en el 2012, la sobresaturación de los iones de flúor en el gel permiten su incorporación en la hidroxiapatita del esmalte, aumentando su resistencia a la desmineralización del agente clareador. Por otro lado, Tanizawa en el 2005 comprobó que a mayor concentración de fluoruro de sodio en altas concentraciones de peróxido de hidrógeno, son favorables para el proceso de remineralización de la superficie del diente. Es por esto que en nuestra investigación se aplicó la máxima concentración de flúor aceptada por la patente de estabilizadores de geles de peróxido de hidrógeno que contienen fluoruros en los Estados Unidos de América (Barrows, Ryles & Williams, 1994).

Las investigaciones realizadas han evaluado el contenido mineral a través de microrradiografía y determinación de la microdureza (Attin et al., 1997; Borges et al., 2009), mientras que la pérdida de mineral y profundidad de lesión generalmente se evalúa a través de la microscopía óptica de luz polarizada (Gladwell et al., 2006; Cavalli et al., 2011). Esta última es una técnica sensible para evaluar la desmineralización y la remineralización del esmalte, por lo que se utilizó en este estudio para medir la profundidad de estas variables. En el presente estudio se utilizó fluoruro de sodio al 5% en conjunto con peróxido de hidrógeno al 35% a pH neutro con el mismo protocolo anteriormente descrito. Este grupo PH+F, fue comparado con el grupo PH donde resultó haber una diferencia significativa entre ambos grupos, ya que el grupo PH+F presentó mayor mineralización en el diente en comparación con el grupo PH. Por otro lado la desmineralización disminuyó significativamente en el grupo PH+F en comparación con el grupo PH. Según el estudio de Gladwell et al., en el 2006 se realizó un tratamiento de desmineralización con geles de clareamiento de peróxido de carbamida al 10% en el grupo A, y en el grupo B un tratamiento de

peróxido de carbamida al 10% con fluoruro de sodio al 0,463%, aplicándose cada grupo durante 8 horas diarias. Al comparar el resultado de Gladwell et al. con los de la presente investigación, se observa que en esta última se presenta una profundidad mayor en los dos grupos, lo que puede deberse a que se utilizaron altas concentraciones del agente clareador. Los resultados entre los grupos A y B del estudio de Gladwell et al. no fueron estadísticamente significativos, en contraste con los resultados entre los grupo PH y PH+F, que si fueron significativos.

Por otro lado, en el 2011 Gabasso et al. realizaron un estudio *in vitro* donde inicialmente sometieron a bloques de esmalte de bovino a un ciclo de ataque ácido para posteriormente realizar intervenciones con un gel de peróxido carbamida, y dos geles de peróxido de carbamida fluorados con 0,11% y 0,5% de fluoruro, por 12 días cada 8 horas diarias a 37°C, evaluándose la profundidad de desmineralización a través de muestras observadas en el MOLP. Como resultado obtuvieron profundidades similares de desmineralización en los grupos tratados con o sin flúor, si bien en nuestro estudio resultó que el grupo PH+F presentó menor desmineralización, el estudio con peróxido de carbamida obtuvo una mayor profundidad de desmineralización en las muestras tratadas con peróxido de carbamida con fluoruros. Es importante considerar que el resultado puede deberse a las limitaciones del estudio ya que no usaron dientes humanos y al ataque ácido previo, además debemos considerar que utilizaron concentraciones bajas de fluoruro, mientras que el presente estudio utilizó la máxima concentración.

Los resultados de esta actual investigación concuerdan con lo que señala Borges et al., en el 2012, ya que ambas sugieren que al añadir fluoruros a los geles clareadores de peróxido de hidrógeno disminuye el deterioro del esmalte que normalmente se produce por la aplicación de los agentes clareadores.

En el presente estudio se observó a través del microscopio de luz polarizada las diferentes zonas mencionadas en Medeiros et al. en el 2012, donde se observa en los dientes expuestos a peróxido de hidrógeno al 35% en la zona superficial, una línea de birrefringencia negativa, seguida en profundidad de una desmineralización marcada por una birrefringencia positiva, a diferencia de las muestras expuestas a peróxido de hidrógeno en conjunto con fluoruro de sodio al 5% donde se observa la línea superficial con una birrefringencia negativa más marcada; y la birrefringencia positiva fue menor en profundidad y opacidad que la del grupo PH, lo que coincide con lo señalado por Jones & Fried, en el 2006, donde se obtuvo que la superficie del esmalte se repara quedando similar al esmalte sano al aplicar agentes remineralizantes en esmalte desmineralizado.

Se ha demostrado que la capa superficial de caries de esmalte presenta altos niveles de gris en la microrradiografía y birrefringencia negativa en microscopía de luz polarizada, sin embargo, tales características no son universales, las lesiones o desmineralizaciones de esmalte artificial o natural, pueden presentar una capa superficial cuyo contenido mineral es similar o superior a la del cuerpo de la lesión (Sousa, 2013). Por lo anteriormente expuesto podemos considerar que las observaciones realizadas en esta investigación se asemejan a las lesiones o caries

de esmalte, ya que una de las principales características al utilizar en microscopio de luz polarizada es que se observa esta línea delgada con una birrefringencia negativa, tal como se observa en ciertos estudios, en donde el inicio de la lesión (Figura 33) consiste en la disolución de los cristales superficiales al igual como ocurre cuando se aplican los agentes clareadores. Es así como penetran hacia los estratos más profundo del esmalte, los que son más susceptibles a la desmineralización (Fejerskov & Kidd, 2003; Henostroza et al., 2007). Por otro lado también concordamos con Sousa con respecto a que la birrefringencia negativa no es una característica universal, ya que no se observó en todas las muestras tratadas.

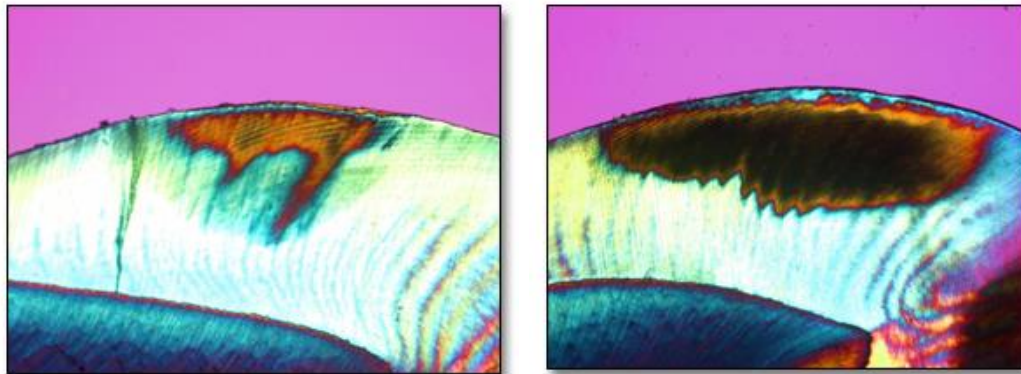


Figura 33. Esquema de progresión de una lesión de esmalte. Se observa la desmineralización de los prismas a lo largo de su trayecto. (Jensen & Faller, 2013).

Según la teoría de Darling se reconoce como remineralización al incremento en el grosor de la capa superficial (Sousa, 2012). Considerando esta teoría en nuestra investigación, podríamos inferir, considerando las condiciones en que se realiza el estudio, que al adicionar el fluoruro de sodio al peróxido de hidrógeno se produce una remineralización superficial.

Estos resultados se sustentan también en las mediciones de densitometría que se realizaron en este estudio. En varias líneas de investigación sobre tejidos mineralizados se ha utilizado la escala de gris para comparar y saber si un tejido está más mineralizado que otro (Youichi, 2010; Mofatto et al., 2011; Blumenthal et al., 2014). A pesar de esto no existe una escala establecida para saber cuánto mineral contiene un tejido según el número que se le asigna en la escala de gris, es por esta razón que se debe utilizar como parámetro para determinar la densidad óptica, el valor de gris de un espécimen que sea control negativo (López-Poveda, 2013).

Según Blumenthal et al., se considera que un valor gris entre 222 y 252 corresponde a una mineralización del 99%. A partir de esto se puede establecer que el grupo PH+F tiene un grado de mineralización mayor que el grupo ST, aunque no significativamente mayor que el grupo PH. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en la medición de profundidad, en cuanto a que tan mineralizados están los dientes, por lo que se reafirma que la aplicación de fluoruro

en conjunto con los agentes clareadores disminuye sus efectos adversos (Gladwell et al., 2006; Chen et al., 2008; Borges et al., 2009; Cavalli et al., 2011).

Los efectos adversos de los clareamientos in-office con peróxido de hidrógeno a altas concentraciones fueron previamente estudiados, y los resultados fueron controversiales. Algunos autores reportaron alteraciones significativas en el esmalte clareado (Attin et al., 2005; Attin et al., 2007; Borges et al., 2009; Soares et al., 2013) pero en otros estudios las alteraciones no lo fueron (Suliaman et al., 2004).

En el presente estudio, el tratamiento de peróxido de hidrógeno al 35% aumenta significativamente la desmineralización del esmalte. Este efecto se ha atribuido principalmente a los geles con pH ácido, debido a que según diferentes autores la acidez es una de las más importantes causas de la desmineralización de los dientes (Haywood & Heymann, 1991; Joiner, 2007). Por lo anteriormente expuesto, en el presente estudio se utilizaron soluciones a pH neutro para minimizar el efecto secundario sobre el esmalte dental. A pesar de esto, se observa una profundidad significativa de desmineralización en las superficies tratadas con un agente clareador de alta concentración en comparación a las superficies sin tratamiento y con fluoruro de sodio al 5%. Diversos estudios han demostrado que el pH neutro en el tratamiento de clareamiento con peróxido de hidrógeno a altas concentraciones disminuye los efectos negativos sobre la superficie del esmalte en comparación al uso de agentes con pH ácido (Dahl & Pallensen, 2003; Suliaman et al., 2004 A; Sun et al., 2011; Eimar et al., 2012). En el estudio *in vitro* de Sun et al. (2011) se encontró que el peróxido de hidrógeno al 30% a pH neutro aplicado por 4 horas tiene la misma eficacia en el clareamiento dental y causa menos efectos adversos en el esmalte, comparándolo al peróxido de hidrógeno al 30% con pH ácido (de 3,6) por el mismo tiempo de aplicación, el cual produjo variación en los componentes químicos, disminución en la microdureza y nanodureza, cambios en la morfología y menor resistencia a la fractura. Por otro lado, Cavalli et al. el año 2013 encontraron que aunque los agentes clareadores tengan pH cercano al neutro, igual son capaces de causar alteraciones en la superficie del esmalte, lo que concuerda con lo obtenido en nuestra investigación.

El mecanismo de acción del peróxido de hidrógeno corresponde a una de las razones por las que en el presente trabajo se produce la desmineralización, ya que este penetra fácilmente por los espacios interprismáticos del esmalte y la dentina por su bajo peso molecular (30 g/mol) permitiendo el libre flujo de este gel aclarante en el interior de la estructura dental provocando la oxidación de los cromóforos. Este proceso es el que produce el clareamiento (Baratieri et al., 1994; Moncada et al., 1999; Sfredo & Mason, 2005; Joiner, 2006; Minoux & Serfaty, 2008). En el clareamiento se alcanza un punto de saturación que si se sobrepasa es crítico, ya que se comienzan a abrir enlaces de carbono de proteínas, incluyendo aquellos de la matriz de esmalte y otros compuestos con carbono. En este punto existe una rápida pérdida de esmalte, que producirá una estructura dental quebradiza y de porosidad aumentada (Baratieri et al., 1994). Este hecho explicaría la desmineralización del esmalte al aplicarse soluciones de peróxido de hidrógeno por tiempos prolongados (45 minutos o más) sobre la superficie del esmalte. En un estudio *in vitro* se aplicó

peróxido de hidrógeno al 35% sobre esmalte 3 veces, a intervalos de 10 minutos a un pH neutral y no se observaron evidencias de efectos adversos sobre el esmalte o la dentina (Suliman et al., 2004 A). Por otro lado, otro estudio *in vitro* realizado con peróxido de carbamida al 10% a pH 7,82 por un tiempo de 8 horas por 14 días, sí produjo cambios estructurales en el esmalte (Justino, Tames & Demarco, 2004), lo que puede deberse al prolongado tiempo de exposición del agente clareador.

Otro factor al que se le puede atribuir este resultado significativamente relevante de desmineralización obtenido en el grupo PH puede deberse a la alta concentración del agente clareador (Cavalli et al., 2011). En una comparación entre el peróxido de carbamida al 10% y al 16%, este último causa cambios morfológicos más intensos en la superficie del esmalte y estas alteraciones se correlacionan con la acción oxidativa que produce el peróxido de hidrógeno en la fase orgánica del tejido duro, por lo tanto, a mayor concentración del agente clareador se promueve una mayor alteración de la estructura del esmalte (Soares et al., 2013).

Las hipótesis de trabajo se confirmaron, ya que el grupo PH+F presentó menor desmineralización en profundidad que el grupo PH, por otro lado si se produjo una variación de mineralización en profundidad y en densidad óptica en el esmalte, al aplicar el tratamiento clareador de peróxido de hidrógeno al 35% en conjunto con fluoruro de sodio al 5%. Esto lo evidenciamos con los resultados estadísticamente significativos entregados respecto a la disminución de la desmineralización y el aumento de mineralización en el grupo experimental comparándolo con el grupo control positivo.

En este estudio se presentaron distintas limitaciones, en relación a las muestras, utilizamos un tamaño pequeño considerando el factor económico relacionado con los cortes, desgastes y observación en el microscopio óptico de luz polarizada. Con respecto a metodología, no se pudo contar con el control del mismo diente por la manipulación y por la probabilidad de que se vieran afectadas las superficies por difusión de los productos. También se puede considerar que el efecto podría variar al aplicar los productos en dientes anteriores por las diferencias estructurales que estos podrían tener. Otro factor limitante es que el espesor de la muestra sea heterogénea en toda la superficie del esmalte, lo que podría influir en la interpretación de los niveles de grises sobre la base de valores de espesor equivocados, ya que la radiopacidad de esmalte es directamente proporcional a su espesor. El espesor de la muestra heterogénea puede ocurrir en la preparación de la muestra, durante el corte y/o desgaste de esta.

Esto con lleva a una interpretación de los niveles de grises sobre la base de valores de espesor equivocadas.

Con respecto a la solución PBS y el agua destilada que fueron usadas para la recolección y mantención respectivamente de los dientes durante la investigación, quizás si hubiésemos ocupado saliva natural o artificial como medio de hidratación esta podría proporcionar minerales y un medio que puede replicar la cavidad oral.

Otra limitación son las burbujas presentes en el gel que podrían resultar en un tratamiento no homogéneo por lo que pueden haber sectores que no fueron tratados. El gel utilizado era de recetario magistral por lo que no contenía los ingredientes de clareamientos comerciales como sales metálicas y saborizantes (Torres et al., 2010).

8 CONCLUSIONES

Dentro de las limitaciones de este estudio se puede concluir que:

- El peróxido de hidrógeno al 35% aplicado en conjunto con fluoruro de sodio al 5% en gel, produce una variación mineral en el esmalte dental aplicado bajo un determinado protocolo propuesto.
1. Al utilizar el peróxido de hidrógeno al 35% con fluoruro de sodio al 5% se evidencia una menor desmineralización en comparación con el grupo tratado con gel de peróxido de hidrógeno al 35%, por 45 minutos a 37°C o bajo el protocolo propuesto.
 2. El peróxido de hidrógeno al 35% con fluoruro de sodio al 5% produce una remineralización superficial durante la aplicación del tratamiento con gel de peróxido de hidrógeno al 35% a pH neutro, por 45 minutos a 37°C o bajo el protocolo propuesto.
 3. El grado de mineralización superficial del grupo tratado con peróxido de hidrógeno al 35% con fluoruro de sodio al 5%, es similar a un diente sano.
 4. Bajo el microscopio óptico de luz polarizada se describe una desmineralización del esmalte a nivel subsuperficial y una línea de mineralización delgada en el esmalte superficial en el grupo peróxido de hidrógeno al 35%. Por otro lado el grupo peróxido de hidrógeno al 35% con fluoruro de sodio al 5% presenta a nivel superficial una mineralización gruesa y marcada; y una menor desmineralización a nivel subsuperficial.

9 SUGERENCIAS

Se sugiere contar con todos los grupos de estudios en la misma muestra y aumentar el número de muestras para obtener resultados más fiables. También se propone realizar un estudio *in vivo* realizando el mismo procedimiento en premolares que posteriormente estarán indicados a extracción por ortodoncia.

Se recomienda evaluar el efecto de mineralización con la aplicación de fluoruros antes, durante y después del clareamiento. Además se podría incluir como método para la recolección y mantención de las muestras, la saliva artificial o natural.

Se propone realizar esta misma investigación con diferentes pH y diferentes concentraciones de fluoruros.

También sería conveniente estandarizar la escala de nivel de gris en densitometría, para determinar el grado de mineralización del diente.

10 RESUMEN

El propósito de este estudio es evaluar *in vitro* la variación mineral producida en el esmalte humano por un clareador de peróxido de hidrógeno al 35% asociado a fluoruro de sodio al 5% (PH+F).

Se seleccionaron 30 premolares sanos extraídos por indicación de ortodoncia de pacientes entre 9 y 20 años de edad. Estos premolares fueron divididos al azar en 3 grupos o intervención: 1) sin tratamiento o con agua destilada (ST); 2) peróxido de hidrógeno al 35% en gel (PH); 3) PH+F en gel. Los tratamientos de base en gel con pH neutro fueron aplicados por 45 minutos a 37° Celsius en las muestras. Posteriormente fueron observados a través del microscopio óptico de luz polarizada (MOLP), las imágenes se analizaron en profundidad y en densidad óptica. Para evaluar la profundidad, la variable desmineralización fue analizada con el test ANOVA y Tukey y la mineralización con el test Mann-Whitney. La medición de densidad óptica se analizó con el test ANOVA y Tukey.

El grupo PH presenta una desmineralización significativamente mayor en comparación con el grupo PH+F y ST. Por el contrario la mineralización fue mayor en el grupo PH+F. Respecto a la densidad óptica de las muestras, el grupo que tuvo una diferencia significativa con los otros grupos fue el grupo PH, ya que tuvo menor valor gris,

Podemos concluir que al aplicar el tratamiento de PH+F se produce una remineralización en el esmalte superficial y una menor desmineralización en profundidad.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES R.J., NOGUEIRA E.A. (2003): Estética dental: nueva generación. Editorial Artes Médicas, Sao Paulo. 344, 384.

ALVES E.A., ALVES F.K.A., CAMPOS E.J., MATHIAS P. (2007): Susceptibility to caries like lesions after dental bleaching with different techniques. Quintessence International. 38 (7): 404-409.

AMERICAN DENTAL ASSOCIATION (2005-2013): Glosario de términos dentales, [en línea] disponible en: <<http://www.ada.org/3340.aspx>> [acceso 22 Octubre 2014].

ATTIN T., ALBRECHT K., BECKER K., HANNIG C., WIEGAND A. (2006): Influence of carbamide peroxide on enamel fluoride uptake. Journal of Dentistry. 34: 668–675.

ATTIN T., BETKE H., SCHIPPAN F., WIEGAND A. (2007): Potential of fluoridated carbamide peroxide gels to support post-bleaching enamel rehardening Journal of Dentistry. 35(9): 755-759.

AUSCHILL T.M., HELLWIG E., SCHMIDALE S., SCULEAN A., ARWEILER N.B. (2005): Efficacy, side- effects and patients acceptance of different bleaching techniques (OTC, in-office, at-home). Journal Operative Dentistry. 30(2): 156-163.

BANSAL K., GAUBA K., TEWARI A., CHAWLA H.S., SAHNI A. (2010): In vivo remineralization of artificial enamel carious lesions using a mineral-enriched mouthrinse and a fluoride dentifrice: A polarized light microscopic comparative evaluation. Journal of Indian society of pedodontics and preventive dentistry. 4(28): 264-270.

BARATIERI L.N., MONTEIRO S., ANDRADA M.A.C, VIEIRA L.C. (1994): Clareamiento Dental. 1era Edición. Editorial Quintessence. Sao Paulo, Brasil, 12 -14, 20, 24.

BARATIERI L.N, MONTEIRO S., ANDRADA M.A.C, VIEIRA L.C. (1996): Clareamiento Dental. 2º Edición. Editorial Quintessence. Sao Paulo, Brasil, 12.

BARATIERI L.N. (2011): Odontología Restauradora, Fundamentos e posibilidades, 5ª edición, edit. Quintessence. Sao Paulo – Brasil, 675 – 680.

BARROWS S., RYLES C., WILLIAMS D. (1994): Stabilized peroxide gels containing fluoride. U.S. Patente 5372802.

BIZHANG M., SEEMANN R., DUVE G., RÖMHILD G., ALTENBURGER J.M., JAHN K.R., ZIMMER S. (2006): Demineralization effects of two bleaching procedures on enamel surfaces with and without post-treatment fluoride application. Operative Dentistry. 31(6): 705-709.

BLUMENTH S.A., CERLING T.E., CHRITZ K.L., BROMAGE T.G., KOZDON R., VALLEY J.W. (2014): Stable isotope time-series in mammalian teeth: In situ $d^{18}O$ from the innermost enamel layer. *Geochimica et Cosmochimica Acta*.124: 223–236.

BORGES A.B, SAMEZIMA L.Y., FONSECA L.P., YUI K.C., BORGES A.L., TORRES C.R. (2009): Influence of potentially remineralizing agents on bleached enamel microhardness. *Operative Dentistry*. 34(5):593-597.

BORGES A.B., MARQUES R.L., FERRAZ T.M., SOUTO A.L., GOMES C.R. (2012 A): Effect of remineralizing agents on the bleaching efficacy of gels. *Academy of General Dentistry*. 67-71.

BORGES A.B., TORRES C., SOUZA P., CANEPPELE T., SANTOS L., MAGALH A.C. (2012 B): Bleaching Gels Containing Calcium and Fluoride: Effect on Enamel Erosion Susceptibility, Research Article. *International Journal of Dentistry*.ID 347848, 6 pages.

CAVALLI V., ARRAIS C.A., GIANNINI M., AMBROSANO G.M. (2004 A): High concentrated carbamide peroxide bleaching agents effects on enamel surface. *Journal Oral Rehab*. 31:155–159.

CAVALLI V., GIANNINI M., CARVALHO R.M. (2004 B): Effect of carbamide peroxide bleaching agents on tensile strength of human enamel. *Dental Materials*. 20: 733–739.

CAVALLI V., AZEVEDO L.K., PAES-LEME A., SILVA L., MARTIN A., BITTENCOURT S., GIANNINI M. (2011): Effects of the Addition of Fluoride and Calcium to Low-Concentrated Carbamide Peroxide Agents on the Enamel Surface and Subsurface. *Photomedicine and Laser Surgery*. 29: 319–325.

CHEN H.P., CHANG C.H., LIU J.K., CHUANG S.F., YANG J.Y. (2008): Effect of fluoride containing bleaching agents on enamel Surface properties. *Journal of Dentistry*. 36(9): 718-725.

CHU J.P., LI J.Y., HAO Y.Q., ZHOU X.D. (2007): Effect of compounds of *Galla chinensis* on remineralization of initial enamel carious lesions *in vitro*. *Journal of Dentistry* 35: 383–387.

CORREA-AFONSO A., CICONNE-NOGUEIRA J.C, PECORA J.D, PALMA-DIBB R.G. (2010): Influence of the irradiation distance and the use of cooling to increase enamel-acid resistance with Er:YAG laser. *Journal of Dentistry*. 38: 534–540.

DAHL J., y PALLESEN U. (2003): Tooth bleaching – a critical review of the biological aspects. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*.14(4):292-304.

DARLING A.I. (1961): The selective attack of caries on the dental enamel. *Annals of The Royal College of Surgeons of England*. 29: 354–369.

DAVIDSON M.W, ABRAMOWITZ M. (2012): Optical Microscopy. Olympus microscopy. [En línea] disponible en <<http://www.olympusmicro.com/primer/microscopy.pdf>> [acceso 17 Abril 2014].

DELBEM A.C, CURY J.A. (2002): Effect of application time of APF and NaF gels on microhardness and fluoride uptake of *in vitro* enamel caries. American Journal of Dentistry. 15:169–172.

DEMARCO F.F, MEIRELES S.S, MASOTTI A.S. (2009): Over-the-counter whitening agents: a concise review. Brazilian Oral Research. 23 (Spec Iss 1): 64-70.

ECHEVERRÍA J., (2002): El manual de odontología, 4° reimpresión, Editorial Masson, España, 46.

EFEUGLU N., WOOD D.J., EFEUGLU C. (2007): Thirty-five percent carbamide peroxide application causes *in vitro* demineralization of enamel. Dental Materials. ; 23: 900–904.

EIMAR H. SICILIANO R., ABDALLAH M.N., NADER S.A., AMIN W.M., MARTINEZ P.P., CELEMIN A., CERRUTI M., TAMIMI F. (2012): Hydrogen peroxide whitens teeth by oxidizing the organic structure. Journal of Dentistry. 40(2): 25-33.

ELFALLAH H.M., SWAIN M.V. (2013): A review of the effect of vital teeth bleaching on the mechanical properties of tooth enamel. The new Zeland Dental Journal. 109(3): 87-96.

ERNST C.P., MARROQUIN B.B., WILLERSHAUSEN-ZO"NNCHEN B. (1996): Effects of hydrogen peroxide-containing bleaching agents on the morphology of human enamel. Quintessence International. 27: 53–56.

FEATHERSTONE J.D. (1999): Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. Community Dentistry and Oral Epidemiology. 27(1):31-40.

FEJERSKOV O., KIDD E. (2008): Dental Caries: The disease and its clinical management. 2° edición. Editorial Blackwell Munksgaard. Oxford, Inglaterra, 30, 32.

FERREIRA S.D.S, ARAÜJO J.L.N, MORHY O.N, TAPETY C.M.C, YOUSSEF M.N, SOBRAL M.A.P. (2011): The effect of fluoride therapies on the morphology of bleached human dental enamel. Microscopy research and technique. 74: 512–516.

FIGUN M.E, GARIÑO R.R. (2002): Anatomía Odontológica: Funcional y Aplicada. 2da Edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina, 207- 208, 261-263.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) (1999): Office of Premarket Approval, Center for Food Safety and Applied Nutrition Agency response letter GRAS notice no.

GRN 000011.Rockville, Md.: U.S. [En línea] Disponible en: <<http://www.webcitation.org/5SfNOmXWG>>. [Acceso: 15 de septiembre de 2013].

GABASSO S.P., PINTO C.F., CAVALLI V., PAES-LEME A.F, GIANNINI M. (2011): Effect of fluoride-containing bleaching agents on bovine enamel microhardness. *Brazilian Journal of Oral Science*. 10.(1): 22-26.

GARCÍA-GODOY F., HICKS M.J. (2008): Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *Journal of the American Dental Association*. 139: 25-34.

GLADWELL J., SIMMONS D., WRIGHT J.T. (2006): Remineralization potential of a fluoridated carbamide peroxide whitening gel. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry*. 18(4): 206-212.

GÖKAY O., YILMAZ F., AKIN S., TUNÇBİLİK M., ERTAN R. (2000): Penetration of the pulp chamber by bleaching agents in teeth restored with various restorative materials. *Journal of Endodontics*. 26(2): 92-94.

GOMEZ DE FERRARIS M.E, CAMPOS A. (2002): *Histología y Embriología Bucodental*, 2da edición, Editorial Médica Panamericana, Argentina, 271-315.

GÓMEZ S., ARÁNGUIZ V., BACA P., EMILSON C., FERNÁNDEZ O., MARIÑO R., MARTIGNON S., ONETTO J.E, URIBE S., VILLA A., YÉVENES I. (2010): *Fluorterapia en Odontología* 4º edición, editor Santiago Gómez Soler, Chile, 24,26, 85,118 -124, 126 -127, 130 – 132, 144 -148,152 – 155, 182, 184,

GÓMEZ S. (2001): *Fluorterapia en odontología para el niño y el adulto*. 3a. ed. Gómez S. Arancibia Hnos, Santiago-Chile, 140,165.

HAHN P., SCHONDELMAIER N., WOLKEWITZ M., ALTENBURGER M.J, POLYDOROU O. (2013): Efficacy of tooth bleaching with and without light activation and its effect on the pulp temperature: an *in vitro* study. *Odontology*. 101: 67–74.

HAYWOOD V.B., HOUCK V.M., HEYMANN H.O. (1991): Nightguard vital bleaching: effects of various solutions on enamel surface texture and color. *Quintessence International*. 22: 775–82.

HAYWOOD V.B, CAUGHMAN F., FRAZIER K.B, MYERS M.L. (2001): Tray delivery of potassium nitrate-fluoride to reduce bleaching sensitivity. *Quintecense international*. 32 (2): 105-109.

HEGEDÜS C., BISTEY T., FLÓRA-NAGY E., KESZTHELYI G., JENEI A. (1999): An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. *Journal of Dentistry*. 27(7): 509-515.

HENOSTROZA G., ARANA A., BERNABÉ E., BUSSADORI S., CALDERÓN V., DELGADO L., HENOSTROZA N., MÁRQUEZ F., MAS J. (2006): Estética en Odontología Restauradora, 1º edición. Editor G. Henostroza, Editorial médica Ripano. Madrid, España, 39, 41

HEWLETT E.R. (2007): Etiology and management of whitening-induced tooth hypersensitivity. Journal of California Dental Association. 35(7): 499-506.

JENSEN M., FALLER R., (2013): Actualización sobre la desmineralización/remineralización. [En línea] Disponible en: <<http://www.dentalcare.es/educacion-profesionales-odontologicos/desmineralizacion-dental.aspx?ModuleName=coursecontent&PartID=0&SectionID=-1>> [Acceso: 4 de septiembre 2014].

JIANG T., MA X., WANG Z., TONG H., HU J., WANG Y., (2008): Beneficial effects of hydroxyapatite on enamel subjected to 30% hydrogen peroxide. Journal of Dentistry. 36: 907–914.

JOINER A. (2006): The bleaching of teeth: A review of the literature. Journal of Dentistry. 34: 412 - 419.

JOINER A. (2007): Review of the effects of peroxide on enamel and dentine properties. Journal of Dentistry. 35(12):889-896.

JONES S., BURT B.A., PETERSEN P.E., LENNON M.A. (2005): Uso eficaz de fluoruros en la salud pública. Boletín de la OMS. 83: 670-676.

JUSTINO L.M., TAMES D.R., DEMARCO F.F. (2004): In situ and *in vitro* effects of bleaching with carbamide peroxide on human enamel. Operative Dentistry. 29: 219–225.

KASHIMA-TANAKA M., TSUJIMOTO Y., KAWAMOTO K., SENDA N., ITO K., YAMAZAKI M. (2003): Generation of free radicals and/or active oxygen by light or laser irradiation of hydrogen peroxide or sodium hypochlorite. Journal of Endodontics. 29: 141-143.

KAWAMOTO K., TSUJIMOTO Y., (2004): Effects of the hydroxyl radical and hydrogen peroxide on tooth bleaching. Journal of Endodontics. 30(1): 45-50.

KIHN, P. (2007): Vital Tooth Whitening. The Dental Clinics of North America. 51: 319–331.

KORYTOWSKI W., SARNA T. (1990): Bleaching of melanin pigments: Role of copper ion and hydrogen peroxide in autooxidation and photooxidation of synthetic dopa-melanin. The Journal of Biological Chemistry. 265 (21): 12410-12416,

KUGEL G., FERREIRA S. (2005): The art and science of tooth whitening. *Journal of the Massachusetts Dental Society*. 53(4):34-7.

LOLAYEKAR N.V., BHAT V., SS BHAT. (2007): Disinfection Methods of Extracted Human Teeth. *Journal of Oral Health and Community Dentistry*. 1(2):27-29

LOPEZ-POVEDA E. (2013). Análisis de Imágenes. [En línea] Disponible en: <<http://audiolab.usal.es/Documentos/Docencia/Master%20Neurociencias.pdf>>. [Acceso 29 Noviembre 2013].

LIU J., LIU Y., STEPHEN H.Y.C. (2006): Optimal Er:YAG laser energy for preventing enamel demineralization. *Journal of Dentistry*; 34: 62–66.

LUK K., TAM L., HUBERT M. (2004): Effect of light energy on peroxide tooth bleaching. *Journal of the American Dental Association*. 135: 194–201.

MARGEAS, R. (2008): Nuevos Avances en Blanqueamiento Dental y Tecnología de Limpieza Dental. [En línea] Disponible en: <<http://dentegrace.com/courses/1876/PDF/1004CEInatw.pdf>> [Acceso: 9 de septiembre 2013].

MEDEIROS R.C.G. SOARES J.D, SOUSA F.B. (2012): Natural enamel caries in polarized light microscopy: differences in histopathological features derived from a qualitative versus a quantitative approach to interpret enamel birefringence. *Journal of Microscopy*. 246: 177–189

MINOUX M., SERFETY R. (2008): Vital Tooth bleaching: Biologic adverse effects-A review. *Quintessence International*. 39 (5): 645-659.

MIRANDA C.B, PAGANI C., BENETTI A.R, MATUDA F.S. (2005): Evaluation of bleached human enamel by scanning electron microscopy. *Journal of Applied Oral Science*. 13: 204–211.

MOFATTO L., FROZONI M.R.S, ESPÍRITO SANTO A.R., GUIMARÃES G.N., SOUZA A.P., VIDAL B., LINE S.R.P. (2011): Fluoride effect on the secretory-stage enamel organic extracellular matrix of mice. *Connective Tissue Research*, 52(3): 212–217.

MONCADA G., ARÁNGUIZ V., URZÚA I. (1999): *Blanqueamiento en Odontología* 1ª edición, Santiago, Chile. 14-15, 39-40, 46, 49-50,60.

NARVÁEZ D. (2009): La microscopía: técnica para estudiar células y tejidos. Capítulo 6: técnicas especiales de microscopía. Cátedra de Histología, ULA. [En línea] Disponible en: <<http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/MONOWEB/inicio.html>> [Acceso: 6th septiembre 2013].

OLYMPUSMICRO (2013): Microscopy resource center. [En línea] Disponible en: <<http://www.olympusmicro.com/>> [Acceso 6th septiembre 2013].

OMS (2004): Formulario modelo de la OMS. [En línea] Disponible en: <<http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js5422s/4.4.html#Js5422s.4.4>> [Acceso: 7 septiembre 2013]

PARADELLA T.C., KOGA-ITO C.Y., JORGE A.O.C. (2008): Ability of different restorative materials to prevent in situ secondary caries: analysis by polarized light-microscopy and energy-dispersive X-ray. *European Journal of Oral Science*.116: 375–380.

POOLE A.J. (2004): Treatment of biorefractory organic compounds in wool scour effluent by hydroxyl radical oxidation. *Water Research*. 38: 3458-3464

PRICE R.B., SEDAROUS M., HILTZ G.S. (2000): The pH of tooth-whitening products. *Journal of Canadian Dental Association*. 66: 421–426.

PUGH G J.R., ZAIDEL L., LIN N., STRANICK M., BAGLEY D. (2005): High levels of hydrogen peroxide in overnight tooth-whitening formulas: effects on enamel and pulp. *Journal* 17(1): 40-47.

QIMAGING (2003): User Manual MicroPublisher 5.0. [En línea] disponible en: <http://www.qimaging.com/resources/pdfs/MicroPublisherRTVManual.pdf>. [Acceso 10 Septiembre 2013].

RODRÍGUEZ J.M. (2007): Estética: Blanqueamiento Dental. En: Henostroza N. (Ed) *Odontología estética y restauradora*. 1era Edición. Diseño y diagrama Multi-impresos S.A. Lima, Perú, 77.

ROSIN-GRGET K., LINCIR I. (2001): Review Current Concept on the Anticaries Fluoride Mechanism of the Action. *Collegium Antropologicum*. 25 (2): 703–712.

RUBINSON K., RUBINSON, J. (2001): Apéndice IV selección de estándares y potencial formal de electrodo. En *Análisis instrumental*. Rubinson K, y Rubinson J. 1º edición. Editorial Prentice Hall, Madrid – España, 826-831.

SCHULTE J.R., MORRISSETTE D.B., GASIOR E.J., CZAJEWSKI M.V. (1994): The effects of bleaching application time on the dental pulp. *Journal of the American Dental Association*. 125(10): 1330-1335.

SFREDDO M., MASON S. (2005): Evaluación del blanqueamiento dental mediante espectrofotometría y SEM. *Quintessenza Internazionale*. 5: 55-76.

SCHULTE P., BAYER A., KUHN F., LUY T.H., VOLKMER M. (1995): H₂O₂/O₃, H₂O₂/UV and H₂O₂/Fe²⁺ processes for the oxidation of hazardous wastes. *Ozone Science England*. 17: 119–134.

SOARES D.G., BASSO F.G., PONTES E.C.V., GARCIA L.F.R., HEBLING J., COSTA C.A.S. (2013): Effective tooth-bleaching protocols capable of reducing H₂O₂ diffusion through enamel and dentin, *Journal of Dentistry*, Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2013.09.001>

SOUSA F.B., VIANNA S.S., SANTOS-MAGALHÃES N.S. (2006): A new approach for improving the birefringence analysis of dental enamel content using polarizing microscopy. *Journal of Microscopy*. 221, 79–83.

SOUSA F.B. (2012): Polarized light microscopy of dental enamel Histopathology of enamel caries from birefringence: the surface layer according to Darling (1958). [En línea] Disponible en http://polarizedlightenamel.blogspot.com/2012_10_01_archive.html [Acceso 29 Junio 2014].

SOUSA F.B. (2013): Polarized light microscopy of dental enamel, Surface layer of natural enamel caries: PLM features under water and air immersion. [En línea] Disponible en http://polarizedlightenamel.blogspot.com/2013_05_01_archive.html [Acceso 29 Junio 2014]

STRASSLER H. (2006): Vital Tooth Bleaching: An Update. Continuing education, The Baltimore College of Dental Surgery, University of Maryland Dental School.

SULIEMAN M., ADDY M., MACDONALD E., REES J.S. (2004 A): A safety study *in vitro* for the effects of an in office bleaching system on the integrity of enamel and dentine. *Journal of Dentistry*. 32(7): 581-590.

SULIEMAN M., ADDY M., MACDONALD E., REES J.S. (2004 B): The effect of hydrogen peroxide concentration on the outcome of tooth whitening: an *in vitro* study. *Journal of Dentistry*. 32: 295-299.

SULIEMAN M. (2005): An overview of bleaching techniques: 3. Insurgery or power bleaching. *Dental Update*. 32:101-108.

SUN G. (2000): The role of lasers in cosmetic dentistry. *Dental Clinics of North America*. 44: 831–850.

SUN L., LIANG S., SA Y., WANG Z., MA X., JIANG T., WANG Y. (2011): Surface alteration of human tooth enamel subjected to acidic and neutral 30% hydrogen peroxide. *Journal of dentistry*. 39: 686 – 692.

TANIZAWA Y. (2005): Reaction characteristics of a toothbleaching agent containing H₂O₂ and NaF: *in vitro* study of crystal structure change in treated hydroxyapatite and chemical states of incorporated fluorine. *Journal Cosmetic. Science*. 56: 121–134.

TAY L.Y., KOSE C., LOGUERCIO A.D., REIS A. (2009): Assessing the Effect of a Desensitizing Agent Used Before In-office Tooth Bleaching. The Journal of the American Dental Association.140(10): 1245-1251.

TORTOLINI P. (2003): Sensibilidad Dentaria. Avances en Odontoestomatología; 19 (5): 233-237.

VALKO M., IZAKOVIC M., MAZUR M., RHODES C.J., TELSER J. (2004): Role of oxygen radicals in DNA damage and cáncer incidence. Molecular and Cellular Biochemistry. 266: 37-56

VELEZ C., DELGADO L. (2006). Estética en Odontología Restauradora, 1º edición. Editorial medica Ripano. Madrid, España, 110, 121, 126.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2004): Essential Medicines and Health Products information portal, [En línea] Disponible en <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js5422s/>>. [Acceso 10 Octubre 2013].

YAMAZAKI H., LITMAN A., MARGOLIS H.C. (2007): Effect of fluoride on artificial caries lesion progression and repair in human enamel: regulation of mineral deposition and dissolution under in vivo-like conditions. Archives of Oral Biology.52(2):110-120.

YOUICHI I. (2010): Early detection of white spot lesions with digital camera and remineralization Therapy. Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Unit of Social Medicine, Department of Oral Health.

ZRAIKAT H.A., PALAMARA J.E.A., MESSER H.H., BURROW M.F., REYNOLDS E.C. (2011): The incorporation of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate into glass ionomer cement. Dental. Materials. 27: 235–243.

Anexos

ANEXO 1

<p>Protocolo de emergencia en el caso de contacto con la azida de sodio más PBS</p>	<p>PROTOCOLO DE RECOLECCION DE MUESTRAS</p>
<p>Si usted cree que puede haber estado expuesto a este líquido, tan pronto como sea posible, lávese de la piel cualquier residuo de azida sódica con abundante agua y jabón.</p> <p>Si siente quemazón o si tiene la visión borrosa, enjuáguese los ojos con agua pura durante 10 a 15 minutos. Si usa anteojos, lávelos con agua y jabón.</p> <p>Si usted cree que su ropa se expuso al químico, debe quitarse la ropa y bañarse. Después de que se haya lavado, coloque su ropa dentro de una bolsa plástica. Evite tocar las áreas de la ropa que están contaminadas.</p> <p>Cualquier cosa que toque la ropa contaminada también debe ser colocada en la bolsa. Si usa lentes de contacto, también debe colocarlos en la bolsa plástica.</p> <p>Selle la bolsa y luego guarde esa bolsa dentro de una segunda bolsa plástica. Desechar la ropa siguiendo estas recomendaciones lo protegerá a usted y a otras personas contra cualquier químico que este en su ropa.</p>	<p>"Efecto <i>In vitro</i> del peróxido de hidrogeno al 35% aplicado en conjunto con fluoruro de sodio al 5% sobre tejido dentario humano"</p> <p><i>Tesis Nro. 51</i></p> <p>Escuela de Odontología Universidad de Valparaíso 2014</p> <p>Docente guía: Dr. Jaime Sarmiento. Alumnas: Camila Leiva Ma. Fernanda Zamora</p>

<p>Criterios para selección</p>	<p>Manipulación frasco recolector con azida sódica en PBS (buffer de fosfato salino)</p>	<p>Rotulación de la muestra</p>
<p><u>Criterios de inclusión:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Dientes premolares extraídos por indicación de ortodoncia. • En un rango etario entre 9 a 20 años • Premolares con corona sana <p><u>Criterios de exclusión</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Premolares con tinciones. • Premolares con hipoplasia. • Premolares con fracturas. • Premolares con fluorosis. • Premolares con caries. • Premolares incluidos. • Premolares semierupcionados. • Premolares con restauraciones (composite, amalgama). • Premolares con sellantes o resinas preventivas. • Premolares posteriormente a tratamiento de ortodoncia fija. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Previó a la manipulación, colocar guantes, lentes de protección, mascarilla y delantal, ya que el líquido contenido en el frasco es tóxico al contacto e inhalación. 2. Después de tomar las correspondientes medidas de seguridad, abrir el frasco enroscado en una superficie lavable. 3. Antes de almacenar los dientes se deben lavar con agua y eliminar cualquier resto biológico para dejarlos limpios. 4. Seguidamente colocar el o los dientes dentro del frasco con una pinza, intentando que esta no toque el líquido. Posterior a la manipulación debe de inmediato lavar la pinza y esterilizar. 5. Luego se cierra el frasco verificando que quede correctamente cerrado. 6. Finalmente retire los guantes sin tocar la parte expuesta con su piel y junto con su mascarilla introduzca está dentro de una bolsa con cierre hermético y depositela en la basura. 7. Lávese las manos luego del procedimiento con abundante agua y jabón. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. La rotulación del frasco es por paciente 2. Colocar en la etiqueta la fecha correspondiente a la extracción. 3. Colocar la edad del paciente. 4. Introducir el frasco dentro de la bolsa hermética y mantener en un lugar fresco. <p>Una vez realizado el procedimiento favor llamar a las alumnas tesistas +56 9 93095441 Camila Leiva +56 9 91386001 Ma. Fernanda Zamora</p>

ANEXO 2



Facultad de
Odontología
Escuela de Odontología

CONSENTIMIENTO INFORMADO DE DONACIÓN DE DIENTE

Donación al Banco de Muestras de la Cátedra de Operatoria Dental (BM-OP)

La Cátedra de Operatoria Dental, Facultad de Odontología, Universidad de Valparaíso, realiza estudios de investigación y educación de sus alumnos utilizando dientes extraídos íntegros y dañados, con el propósito de alcanzar una mejor comprensión de las propiedades biológicas, físico-mecánicas y estéticas de los tejidos dentarios, así como también, de la ejecución de procedimientos restauradores.

Para estos propósitos, la Cátedra de Operatoria Dental mantiene un BM-OP de dientes extraídos por indicaciones de tratamiento o por patologías y aportados voluntariamente. Todas las muestras (dientes) recibidas requieren del Consentimiento Informado escrito y oral del donante.

Las muestras recibidas en el BM-OP son procesadas en forma anónima, conservando registros de: N° de Muestra, Fecha, Edad y Sexo del Donante. Además de señalar indicaciones de carácter clínico relevante, como sintomatología y diagnóstico consignados por el profesional responsable tratante. Toda la información es confidencial. Las muestras se conservan refrigeradas en agua destilada y forman parte de las actividades descritas anteriormente.

Investigadores Responsables: Camila Leiva Rivera
Ma. Fernanda Zamora
Profesor: Dr. Jaime Sarmiento
Cátedra de Operatoria Dental

Facultad de Odontología, Universidad de Valparaíso. Subida Leopoldo Carvallo 211, Playa Ancha, Valparaíso

(del Paciente)

CONSENTIMIENTO INFORMADO DE DONACIÓN DE DIENTE

Manifiesto haber sido informado y comprendo que el (los) diente (s) que he aceptado donar al banco de muestras de la Cátedra de Operatoria Dental de la Universidad de Valparaíso, será(n) utilizado(s) en estudios que ayudarán a comprender mejor cómo funcionan los tejidos de dientes sanos y dañados. Acepto que se registre mi edad y sexo, entendiéndolo que son datos confidenciales e importantes para la investigación:

Lugar de la atención: _____
Fecha: _____ N° Muestra _____
Diente _____
Edad _____
Información Clínica Relevante _____
Nombre del Donante _____
RUT _____
Firma del donante _____