

Aplicabilidad del modelo electroquímico al inicio de la caries dental. Estudio in vitro

Applicability of electrochemical model at the onset of tooth decay. An in vitro study

Vera Choloux M*, Stocker Luengo MB*, Gainza Aragonés P**, Barría Pailaquilén RM***, Cabezas Cuevas C****

RESUMEN

Introducción: Se ha establecido que existen fuerzas eléctricas que tienen la capacidad de dañar la estructura dental generando su descalcificación. El objetivo es demostrar que el modelo electroquímico permite explicar el proceso de disolución del esmalte dental, a través de la aplicación de un potencial constante, a fin de registrar corriente eléctrica, liberación de ion Ca^{2+} y evaluar daño superficial del esmalte dental.

Material y métodos: Estudio in vitro en 32 terceros molares sin caries, divididos aleatoriamente en dos grupos sumergidos en solución tampón láctico-lactato. Grupo 1, sometido a potencial de +1,5 V y grupo 2, se dejó evolucionar espontáneamente en el tiempo. Se cuantificó la concentración de Calcio (Ca^{2+}) liberado (mg), a través de un espectrofotómetro de absorción atómica para establecer la concentración media por grupo. Se compararon las medianas mediante el test estadístico Wilcoxon Mann-Whitney usando el programa Stata v.11.2. Además, se realizó evaluación del daño superficial del esmalte dental por técnica de microscopía óptica y electrónica.

Resultados: Se registraron corrientes no nulas en todos los dientes sometidos a potencial +1,5 V. La liberación de Ca^{2+} entre grupos arrojó mayor liberación mediana de Ca^{2+} en el grupo electrólisis (12,3 [RIC= 4,5-18,2] vs. 6,5 [RIC= 3,7-15,4]) y al observar bajo lupa estereoscópica y microscopio electrónico de barrido, se visualiza una mayor destrucción en el grupo 1.

Discusión: Los resultados permiten verificar la hipótesis en cuanto a haber encontrado evidencia empírica respecto al comportamiento electroquímico del proceso de degradación del esmalte dental.

Palabras clave: Caries dental, electrólisis, electroquímica.

SUMMARY

Introduction: It has been established that there are electrical forces that have the capacity to damage the tooth structure generating decalcification. The aim is to demonstrate that the electrochemical model can explain the dissolution of tooth enamel, through the application of a constant potential, in order to register electric current, liberation from Ca^{2+} and to evaluate surface damage tooth enamel.

Material and method: In vitro study on 32 third molars without caries, randomly divided into two groups immersed in a buffer of lactic-lactate solution. Group 1 underwent +1.5 V potential and Group 2 was allowed to evolve spontaneously over time. Ca^{2+} released (mg) was quantified through an atomic absorption

* Escuela de Odontología. Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.

** Profesor Responsable. Biomateriales. Instituto de Odontoestomatología. Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.

*** Profesor Auxiliar. Director Oficina de Salud Basada en Evidencia (OSBE). Facultad de Medicina. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.

**** Profesor Titular Instituto de Ciencias Químicas. Facultad de Ciencias. Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile.

spectrophotometer to set the average concentration per group. Means were compared using Wilcoxon statistical test Mann-Whitney using the Stata v. 11.2 program. Also an evaluation of surface damage tooth enamel technique optical and electron microscopy was performed.

Results: We recorded non-zero current on all teeth undergoing potential +1.5 V. The release of Ca^{2+} between groups showed higher median liberation from Ca^{2+} in the Electrolysis group (12.3 [IQR = 4.5 to 18.2] vs. 6.5 [IQR = 3.7 to 15.4]) and observed under stereomicroscope and scanning electron microscope, further destruction is displayed in group 1.

Discussion: The results allow to bear out the hypothesis, it has been found an empirical evidence regarding the electrochemical behavior of the degradation process of tooth enamel.

Key words: Dental caries, electrolysis, electrochemistry.

Fecha de recepción: 7 de septiembre de 2016.

Aceptado para publicación: 15 de septiembre de 2016.

Vera Choloux M, Stocker Luengo MB, Gaínza Aragonés P, Barría Pailaquilén RM, Cabezas Cuevas C. Aplicabilidad del modelo electroquímico al inicio de la caries dental. Estudio in vitro. *Av. Odontoestomatol* 2016; 32 (6): 301-308.

INTRODUCCIÓN

El componente mineral del esmalte dental se forma principalmente por cristales de hidroxiapatita, cuya fórmula general es: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (1).

Según la actual teoría de la caries, el biofilm dental producto del metabolismo de azúcares de bajo peso molecular, produce ácidos orgánicos, como el ácido láctico, que generan la disminución del pH de la cavidad bucal, que al bajar de un valor 5,5 provocan la disolución iónica del cristal de hidroxiapatita (2) generando la destrucción localizada de los tejidos por desmineralización de la superficie de los dientes (3). Si bien, la superficie oclusal corresponde al 12,5% del diente, acumula el 50% de las lesiones cariosas (4), siendo las fosas y fisuras de las piezas dentarias las áreas más susceptibles al proceso de caries (2).

Investigaciones en el área odontológica y otras disciplinas sobre corrosión de materiales, han establecido que existen fuerzas eléctricas que tienen la capacidad de dañar la estructura dental generando su descalcificación (5). De esta forma surge la opción de usar el modelo electroquímico, para explicar cómo la interacción de un sólido con el medio que lo rodea, causa deterioro en sus propiedades tanto físicas como químicas (6).

La corrosión metálica es un proceso de naturaleza electroquímica, que involucra la generación y activación de microceldas, proporcionando energía suficiente como para producir transformaciones químicas. Aquella microzona donde espontáneamente se acumulan electrones, se denomina cátodo, mientras que donde se produce déficit de electrones, ánodo. El flujo de iones en una disolución y electrones en un sólido, constituye un circuito eléctrico por donde circula la corriente eléctrica propia de los procesos corrosivos, operando como una micro celda electroquímica de generación de energía (6).

Se ha observado que los metales, al igual que el esmalte dental, en ambientes húmedos, se recubren por una biopelícula heterogénea, con zonas anódicas (anaeróbicas) y catódicas (aeróbicas), que forman celdas de aireación diferencial, que favorecen el ataque localizado de la superficie del metal. Estas celdas, también son generadas por la disposición estructural de las depresiones que van a generar cargas positivas en el exterior y negativas en el interior (7).

Se ha observado que “la oxidación de las zonas positivas de la celda electrolítica, podría promover la desmineralización dental y la formación de caries como cavidades profundas en la dentina y esmalte expuesto, mientras que la reducción de las zonas negativas, podría inhibir la desmineralización” (8).

Si bien la reducción del pH y producción de ácidos por actividad bacteriana es la causa principal de la caries, se reconoce que existen fuerzas eléctricas que tienen la capacidad de dañar la estructura dental y que bajo la aplicación artificial de pequeñas tensiones en condiciones fisiológicas generan una descalcificación de la estructura (5).

Considerando las semejanzas entre la corrosión metálica por picado y la morfología de una caries dental, en que ocurre la degradación del esmalte por difusión del ion calcio (Ca^{2+}) generando una superficie electrificada activa, nuestro objetivo es demostrar que el modelo electroquímico permite explicar el proceso de disolución del esmalte dental, a través de la aplicación de un potencial constante, a fin de registrar corriente eléctrica y liberación de ion Ca^{2+} detectado por espectroscopía de absorción atómica y evaluación del daño superficial del esmalte dental por técnica de microscopía óptica y electrónica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio cuantitativo experimental *in vitro* del comportamiento de piezas dentales en una disolución tampón láctico-lactato, simulando el medio electrolítico generado por el desarrollo de un biofilm bucal. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Austral de Chile en Valdivia, Región de los Ríos.

A) Tamaño muestral

Se realizó el cálculo del tamaño muestral óptimo mediante el programa Epidat 4.1, considerando los siguientes criterios y supuestos: Valor conocido de liberación de Calcio en una solución tampón láctico-lactato, obtenido en un estudio piloto previo de $41,67 \pm 9,6$ mg, con una potencia estadística de 80%, un nivel de confianza del 95% y una diferencia esperada de 10 mg (aumento de la liberación de calcio en 24%), obteniéndose como resultado una muestra de 32 dientes, divididos en 2 grupos, los cuales se distribuyeron por medio de aleatorización en bloques de 8 piezas. Grupo 1, sometido a perturbación mediante aplicación de un potencial constante y gru-

po 2, no intervenido, cumpliendo el rol de grupo control, para evaluar la evolución espontánea del diente en la solución tampón, midiéndose en ambos casos la liberación de Calcio luego de 60 min.

Se incluyeron en el estudio 32 terceros molares sin caries al examen visual, extraídos en la clínica Odontológica de la Universidad Austral de Chile y donados por pacientes entre 18 y 25 años bajo consentimiento informado, los cuales se analizaron mediante lupa estereoscópica a un aumento $1,5\times$ y $4,5\times$ (Olympus SZJ61-Japón). Se excluyeron molares con caries o sospecha de ellas (mancha blanca o fosas y fisuras profundas o teñidas).

Una vez recolectados todos los molares, se sometieron a un método de profilaxis estandarizado, realizado manualmente con Jackette (Hu-Friedy® 30/33-USA) en toda la superficie coronaria para luego utilizar Contra Angulo (NSK PanaMax Plus-Japón) y escobilla de profilaxis de nylon con agua, escobillando por 10 segundos cada superficie oclusal. Se conservaron en formalina hasta el momento de su uso por un máximo de cuatro semanas desde la exodoncia.

B) Preparación y montaje de las muestras

Cada molar fue cortado transversalmente en su parte cervical por un solo operador con una fresa troncocónica punta plana (KG SORENSEN #3069 ISO 806.315.172,018) y turbina (NSK PanaMax Plus-Japón) bajo abundante irrigación, luego se eliminó parcialmente la dentina de la corona con una fresa redonda (KG SORENSEN #1015 ISO 806.314.001.514.016) hasta dejar una línea delgada de dentina en la cara oclusal, tratando de dejar principalmente el esmalte. A cada muestra se le insertó un cable de cobre de 10 cm de largo y 4 mm de diámetro, en su parte interna y se selló con sistema adhesivo (Adper™ Single Bond 2-3M® ESPE-USA) y resina compuesta (Filtek™ Z350 XT-3M® ESPE-USA). Posteriormente se introdujo en un cilindro de 10 mm cortado de una jeringa de plástico desechable de 10 cc, rellena en un material elastomérico para impresiones de precisión a base de silicona por adición en consistencia masilla (Panasil® Putty Soft) dejando sólo la cara oclusal disponible para ser sumergida en la solución tampón.

C) Solución tampón

Como solución agresiva, se preparó una solución reguladora 0,1 M y pH 4,4 de láctico-lactato, a partir de ácido láctico ($C_3H_6O_3$) e hidróxido de sodio (NaOH) ajustando el pH. Este electrolito simula las condiciones generadas por las bacterias productoras de caries dentales que producen ácido láctico a un pH entre 3,0 y 5,0 (9).

D) Control y perturbación de las muestras

Durante 60 min, a una temperatura de 37° C, una muestra de cada grupo fue sumergida en la solución tampón descrita.

Las muestras del grupo 1, transformadas en el electrodo de trabajo, junto a un electrodo auxiliar de grafito y electrodo de referencia de plata-cloruro de plata (Ag/AgCl), fueron conectadas a un analizador electroquímico Epsilon. A continuación se aplicó un potencial de +1,5 V durante 60 min. Las muestras del grupo 2 se dejaron evolucionar espontáneamente durante el mismo tiempo.

E) Forma de recolección de información

La medición de la liberación de Ca^{2+} se realizó con un espectrofotómetro de absorción atómica (Thermo Spectrometer S series AA) y la observación de la superficie, con y sin perturbación mediante lupa estereoscópica y microscopio electrónico de barrido (Zeiss Leo 420).

F) Análisis estadístico

Se realizó análisis descriptivo para caracterizar la liberación de calcio por grupos y de manera global usando medidas de tendencia central (media y mediana) y de dispersión (desviación estándar [DE] y rango intercuartílico [RIC]). Para evaluar diferencias estadísticamente significativas en la liberación de calcio entre los grupos, se aplicó el test Wilcoxon Mann-Whitney dado que la variable no se ajustó a la normalidad tanto en su evaluación gráfica (histograma) como al aplicar el test de Shapiro Wilk ($p=0,00050$).

RESULTADOS

Degradación del esmalte y liberación de Ca^{2+}

La liberación de Ca^{2+} global del total de las muestras mostró una media de 10,6 mg/l (DE= 6,6) y una mediana de 10,9 (RIC= 3,8-16,9). Al comparar entre grupos (Fig. 1), se observó una marcada diferencia aunque no significativa ($p=0,1416$) de mayor liberación mediana de calcio en el grupo electrólisis (12,3 [RIC= 4,5-18,2] vs. 6,5 [RIC= 3,7-15,4]).

Observación del cambio de la morfología superficial

Al comparar las muestras 1 (Fig. 2) y 2 (Fig. 3) mediante lupa estereoscópica, se observa una mayor destrucción en el grupo 1 con inicio de cavidades en la cara oclusal. Sin embargo, las muestras control también muestran degradación, confirmando que existe degradación complementaria por efecto químico, situación observada en la cantidad de Ca^{2+} detectada para ambos tipos de muestras.

Las imágenes entregadas por el microscopio electrónico de barrido, muestran una mayor degradación con formación de grietas en la pieza sometida a perturbación electroquímica (Fig. 4), mientras que

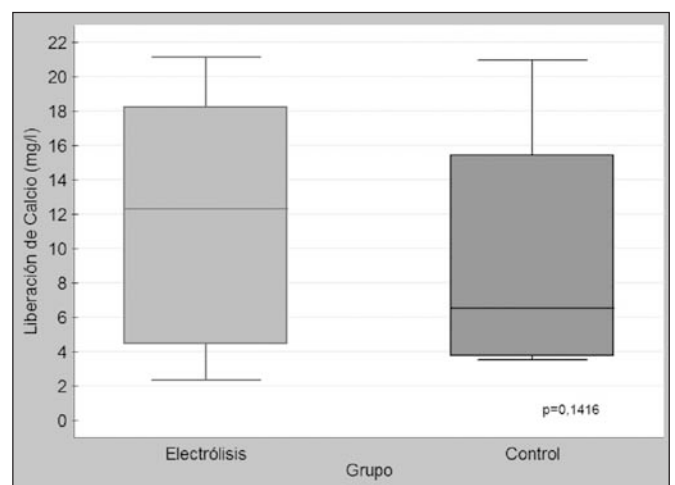


Fig. 1. Comparación de liberación de Ca^{2+} entre los grupos en estudio.

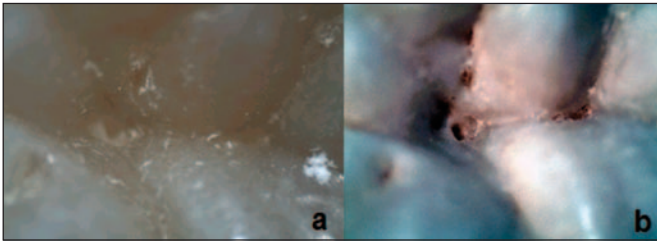


Fig. 2. Imagen de lupa estereoscópica 4,5x. a) Diente sin intervención. b) Diente sometido a perturbación electroquímica y solución tampón por 60 min.

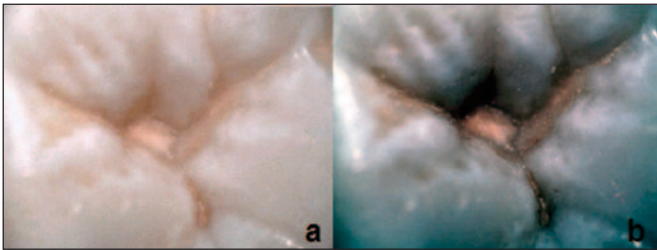


Fig. 3. Imagen de lupa estereoscópica 4,5x. a) Diente sin intervención. b) Diente en solución tampón por 60 min.

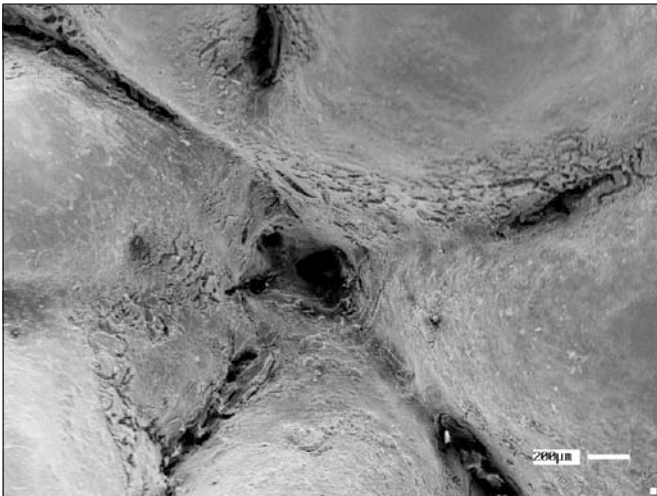


Fig. 4. Imagen de microscopio electrónico de Barrido 200 μm. Diente sometido a perturbación electroquímica y solución tampón por 60 min.



Fig. 5. Imagen de Microscopio Electrónico de Barrido 300 μm. Diente en solución tampón por 60 min.

Ensayos electroquímicos

Al observar las gráficas $I(t)$ obtenidas a potencial constante +1,5 V del grupo 1 ($n=16$), en todas ellas se registra corrientes no nulas, desde el inicio de las polarizaciones impuestas (Fig. 6).

Ensayos electroquímicos preliminares

Para dar mayor fuerza a la evidencia del comportamiento electroquímico de una pieza dental, se

el diente del grupo 2 (Fig. 5), ofrece una superficie más homogénea. El agrietamiento podría iniciarse por ataques localizados convirtiéndose en su crecimiento en grietas, este enfoque no podría aplicarse en el caso de la muestra sin perturbación.

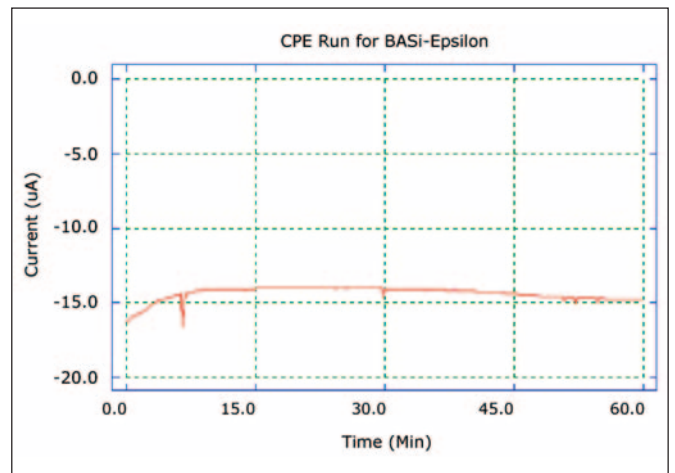


Fig. 6. Gráfico $I(t)$ del diente #9, en condiciones de solución tampón 0,1 M y 37° C.

utilizaron las técnicas de evolución del potencial en el tiempo seguida de una polarización por barrido lineal de sobrepotencial a diferentes velocidades.

En el primer tipo de ensayo se aplicó al electrodo de trabajo +1,5 V durante 24 h observándose un comportamiento oscilatorio en torno a un valor central de aproximadamente -0,090 V respecto al electrodo de referencia Ag/AgCl (Tabla 1) constituyéndose en un pseudopotencial de estabilización, registrándose al mismo tiempo una corriente de 15 μA . Enseguida se polarizó la muestra desde -1,5 V hasta +1,5 V de sobrepotencial respecto al potencial de estabilización, usándose velocidades de barrido de 10 mV/s y 100 mV/s (Fig. 7). Se observa un comportamiento óhmico con una resistencia a la transferencia de carga de 0,01 Ohm.

DISCUSIÓN

Al comparar la concentración de Ca^{2+} en los grupos 1 y 2, a pesar de no encontrar una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,1416$), se puede observar una marcada tendencia de aumento en la liberación de Ca^{2+} en las muestras sometidas a electrólisis, arrojando en el percentil 50, una diferencia de 12,3 mg de calcio por litro en el grupo 1 v/s 6,5 mg en el grupo 2.

TABLA 1.- RESULTADOS DE LA EVOLUCIÓN DEL POTENCIAL EN EL TIEMPO EN CONDICIONES DE SOLUCIÓN TAMPÓN 0,1 M, 37° C

E	t (s)
0,0997	440
0,0996	590
0,0995	1.000
0,098	1.100
0,0978	1.190
0,0998	1.480

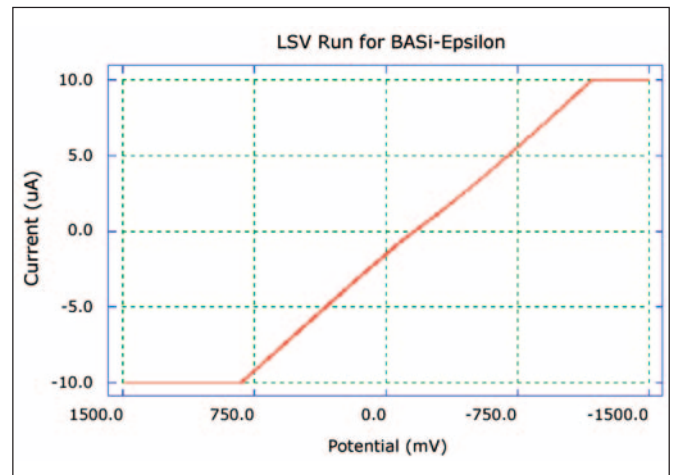


Fig. 7. Gráfico de polarización por barrido lineal con sobrepotencial impuesto -1,5 V a +1,5 V a velocidad 100 mV/s.

Las imágenes de lupa estereoscópica muestran una mayor disolución del esmalte dental en la pieza sometida a electrólisis, sin embargo también se observa desmineralización en el diente control, esto porque la solución tampón está simulando las condiciones bucales en presencia de biofilm dental activo. El microscopio electrónico de barrido muestra la formación de grietas en el diente del grupo 1, en la cual podríamos decir, que si bien en ambos grupos existe liberación de Ca^{2+} , la forma en la que se desprende este ion es diferente, lo cual confirma los resultados respecto a la generación de iones Ca^{2+} en el sentido que no se puede descartar el efecto químico atribuible al medio ácido agresivo producido por la película bacteriana.

Para validar los ensayos electroquímicos, se realizó una simulación previa repitiendo la polarización desde -1,5 V hasta +1,5 V con un electrodo inerte a partir de un microbrush dental, no observándose actividad del electrodo de trabajo, registrándose corriente nula en todo el rango de sobrepotencial impuesto.

Al observar las gráficas I (t) obtenidas a potencial constante, del grupo 1, en todas ellas se registra corrientes no nulas, desde el inicio de las polarizaciones impuestas, atribuibles a un comportamiento electroquímico. Lo mismo ocurre con las gráficas E (t) que registra un comportamiento oscilante respec-

to a un valor central interpretado como pseudopotencial de estabilización igual $-0,090$ V (Ag/AgCl). Este resultado podría interpretarse en términos de un equilibrio desmineralización \leftrightarrow mineralización con una elevada rapidez de reactividad, lo que le daría al sistema una gran estabilidad frente a estos ensayos acelerados de comportamiento electroquímico.

En cuanto a los ensayos electroquímicos preliminares, permiten validar, en principio, la hipótesis de un comportamiento electroquímico en los procesos de degradación del esmalte. Efectivamente los barridos lineales de sobrepotencial informan de un comportamiento óhmico, con una resistencia a la transferencia de carga de $0,01$ Ohm.

Finalmente, las observaciones por lupa estereoscópica y microscopía electrónica de barrido, nos informan que existe una diferencia entre las piezas perturbada electroquímicamente de aquellas dejadas evolucionar espontáneamente. En el primer caso, el daño es más localizado generándose avance vertical y en profundidad muy semejante a los procesos de corrosión por picado (6). En el último caso se observa más una disolución iónica generalizada propia de un proceso químico, semejante a la corrosión generalizada.

Estos resultados permiten verificar la hipótesis en cuanto a haber encontrado evidencia empírica respecto al comportamiento electroquímico del proceso de degradación del esmalte de una pieza dental sumergida en una disolución tampón láctico-lactato $0,1$ (mol/L) a pH igual a $4,4$, como ya ha sido demostrado anteriormente (5,8). En principio se registra un comportamiento de carácter óhmico asociado a una resistencia a la transferencia de carga de $0,01$ Ohm, con un pseudopotencial de estabilización de $0,09$ V (Ag/AgCl) y una corriente de $10 \mu\text{A}$ a un sobrepotencial de $1,5$ V aplicado durante 24 h.

Como ocurre en el caso de la validación de hipótesis, es necesario seguir diseñando experimentos para confirmar lo validado, por ello se propone como línea a seguir, generar hipótesis de causalidad con el objetivo de encontrar el mecanismo asociado a este comportamiento electroquímico, enriqueciéndose de este modo el conocimiento del proceso de degrada-

ción (desmineralización \leftrightarrow mineralización) del esmalte en piezas dentales.

Es importante considerar las limitaciones de un estudio in vitro, el cual no permite representar en un 100% las condiciones reales del proceso de caries, pero nos acercan a la generación de un nuevo paradigma.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación está basada en parte de los requerimientos de María Belén Stocker Luengo y Melisa Fernanda Vera Choloux para su titulación de Cirujano-Dentista en la Escuela de Odontología de la Universidad Austral de Chile.

Nuestros agradecimientos a Laboratorio de Química Analítica y Elementos Traza de la Universidad Austral de Chile, Dra. Sandra Orellana Donoso y Sra. Amitza Cárcamo Yáñez, Laboratorio de Electroquímica de Materiales de la Universidad Austral de Chile, Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad Austral de Chile, Ing. Ricardo Silva y a Sra. Cecilia López, técnico académico del Instituto de Ciencias Químicas de la Universidad Austral de Chile, por su colaboración en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Yang W, Xi X, Li J, Cai K. Comparison of Crystal Structure Between Carbonated Hydroxyapatite and Natural Bone Apatite with Theoretical Calculation. *Asian J. Chem* 2013;25(7):3673-8.
2. Ten Cate J. In situ models, Physico-chemical aspects. *Adv Dent Res* 1994;8(2):125-33.
3. Duque de Estrada J, Pérez J, Hidalgo-Gato I. Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Rev Cubana Estomatol* 2006;43(1).
4. Ripa LW. Occlusal sealing: rationale of the technique and historical review. *J Am Soc Prev Dent* 1973;3(1): 32-9.
5. Parker R. Bioelectric Phenomena in Dental Decay. *J Dent Res* 1969;48(5):795-8.
6. Winston R. Corrosion and corrosion control. *An Introduction to Corrosion Science and Engineering*. Hoboken: New Jersey; 2008.

7. Bethencourt M, García de Lomas J, Corzo A, Villahermosa D, Matres V. Efecto de la biopelícula en la corrosión de aceros inoxidable. *Rev Metal* 2010;46: 37-51.
8. Lin T, Lizi H, Youfu, J. The effects of electrochemical factors on dental demineralization. *Journal of Modern Stomatology* 1998;04(1) [Abstract].
9. Castillo A, Rubiano S, Gutiérrez J, Hermoso A, Liebana J. Post-pH effect in oral streptococci. *Clin Microbiol Infect* 1999;6:142-6.

CORRESPONDENCIA

Dr. Pedro Gaínza Aragonés
Instituto de Odontoestomatología
Facultad de Medicina
Universidad Austral de Chile
Rudloff 1640
Valdivia. Chile.

Email: gainzalein@gmail.com