

**PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA LA OBTENCIÓN DE SECCIONES
HISTOLÓGICAS CON FINES DE INVESTIGACIÓN EN CARIES ASOCIADA A
RESTAURACIONES Y SELLANTES - CARS**

Cristian Toro Jaime

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE ODONTOLOGÍA- FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTÁ DC. - JUNIO 2022**

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Odontología
Título:	Procesamiento de muestras para la obtención de secciones histológicas con fines de investigación en cars
Grupo de Investigación	Unidad de investigación en Caries UNICA
Línea de investigación:	Diagnóstico
Tipo de investigación:	Pregrado/grupo
Estudiantes:	Cristian Toro Jaime
Director	Dra. Margarita Úsuga Vacca
Codirector	Dra. Andrea Cortés Páez
Asesor metodológico	Dr. Luis Fernando Gamboa Martínez

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

OTTO BAUTISTA GAMBOA	Presidente del Claustro
JUAN CARLOS LÓPEZ TRUJILLO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL G.	Rectora
NATHALIA RUIZ RODGERS	Vicerrectora Académico
RICARDO ENRÍQUEZ GUTIÉRREZ MARÍN	Vicerrector Administrativo
GUSTAVO SILVA CARRERO	Vicerrectoría de Investigaciones.
CRISTINA MATIZ MEJÍA	Secretaria General
JUAN CARLOS SÁNCHEZ PARÍS	División Postgrados
MARIA ROSA BUENAHORA	Decana Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GÓMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA MARIA ESCOBAR JIMÉNEZ	Directora Área Bioclínica
ALEJANDRO PERDOMO RUBIO	Director Área comunitaria
JUAN GUILLERMO AVILA ALCALÁ	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DÍAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
IVAN ARMANDO SANTACRUZ CHAVES	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético de este en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”

Dedicatoria

A mis padres, Héctor y Mariela, y a mi hermana Andrea; ¡Son mi mayor admiración!

Agradecimientos

A mi directora, Margarita Úsuga y a mis codirectores Dres. Andrea Cortes y Luis Fernando Gamboa por las largas jornadas de trabajo, la paciencia y la dedicación.

GUIA DE CONTENIDO

RESUMEN	
ABSTRACT	
1. INTRODUCCIÓN	11
2. MARCO TEÓRICO	2
Caries asociada a restauraciones y sellantes - CARS	2
Histología como Gold estándar y valoración histológica	4
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
3.1 Descripción del problema:	7
3.2 Pregunta de investigación	7
4. JUSTIFICACIÓN	8
5. SITUACIÓN ACTUAL EN EL ÁREA DE INVESTIGACIÓN	9
6. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
7. METODOLOGÍA PARA EL DESARROLLO DE LA REVISIÓN	13
7.1 Tipo de estudio:	13
7.2 Población de muestra:	13
7.3 Métodos y técnicas para la recolección de la información	13
Selección de artículos:	14
8. CONSIDERACIONES ÉTICAS	15
9. RESULTADOS	16
10. DISCUSIÓN	18
Proceso de obtención, recolección de las muestras dentales y Limpieza, desinfección, almacenamiento de las muestras	18
Diagnóstico visual de CARS en las superficies de las muestras y Obtención de secciones de las muestras	19
Estudio de CARS	20
11. CONCLUSIONES	22
12. NOVEDAD Y TRANSFERENCIA	23
13. ASPECTOS ADMINISTRATIVOS	24
13.1 Cronograma de Actividades:	24
13.2 Presupuesto:	25
13.3 Posibles dificultades técnicas / metodológicas- plan de contingencia:	26
14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

RESUMEN

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA LA OBTENCIÓN DE SECCIONES HISTOLÓGICAS CON FINES DE INVESTIGACIÓN EN CARIES ASOCIADA A RESTAURACIONES Y SELLANTES - CARS

Antecedentes: Las CARS es una lesión que se desarrolla de novo alrededor de una restauración o sellante. Este tipo de lesión puede ser una lesión externa o de pared. Las CARS se localizan con mayor frecuencia en los márgenes gingivales de restauraciones clase II, III, IV y V, típicamente en áreas retentivas de placa, como la interfaz diente-restauración y los sobre contornos o los subcontornos marginales.

Objetivo: Establecer los procesos para la obtención de secciones dentales destinadas al desarrollo del estudio histológico (gold estándar) de Caries Asociada a Restauraciones y Sellantes - CARS.

Metodología: Se realizó una búsqueda de Artículos científicos relacionados con la detección de CARS mediante pruebas histológicas (gold estándar). Se definieron las variables: Caries asociada a restauraciones y sellantes (CARS) y Examen histológico de CARS. Se consultaron las siguientes bases de datos: Pubmed, Science direct Embase y Google scholar. Se buscaron los siguientes tipos de estudios: Metaanálisis, ensayos clínicos aleatorizados y controlados, estudios de casos y control, estudios de cohorte. Resultados: Se describió un protocolo estructurado basado en la literatura, donde se muestra el paso a paso a realizar para la obtención de cortes dentales con CARS para estudio histológico. **Conclusiones:** Existe incertidumbre con respecto al diagnóstico clínico de caries recurrente. Una revisión de la literatura demuestra marcadas desviaciones en este diagnóstico entre los investigadores Las encuestas han mostrado grandes variaciones o falta de criterios definidos para caracterizar estas lesiones. Dientes con márgenes manchados de restauraciones del color del diente y márgenes abandonados en los que el explorador tiende a clavarse con frecuencia son mal diagnosticados con caries recurrente. Parece que sólo las lesiones cariosas francamente cavitadas adyacentes a las restauraciones indican verdaderas lesiones cariosas recurrentes.

Palabras clave: examen histológico, prueba histológica, caries dental asociada a la restauración, caries asociada a la restauración, caries secundaria, caries dental recurrente, caries recurrente, también conocida como caries secundaria.

ABSTRACT

PROCESSING OF SAMPLES TO OBTAIN HISTOLOGICAL SECTIONS FOR RESEARCH PURPOSES IN CARIES ASSOCIATED WITH RESTORATIONS AND SEALANTS - CARS

Background: CARS are lesions which develop around a restoration or sealant, located most frequently along gingival margins of class II, III, IV and V restorations. These are plaque-retentive areas, such as the tooth-restoration interface and marginal profiles. **Objective:** to establish the process for obtaining dental sections to develop a histological study (gold standard) on Caries Associated with Restorations and Sealants CARS. **Methodology:** a search for articles was carried out related to CARS detection by means of histological tests (gold standard), definition of the variables: Caries Associated with Sealants and Restorations (CARS) and CARS histological exam, search in Pubmed, Science direct Embase and Google Scholar databases, studies such as meta-analyses, randomized and controlled clinical trials, case and control studies and cohort studies. **Results:** a structured protocol was structured based on literature, showing how to obtain step-by-step dental sections with CARS for histological study. **Conclusions:** There is uncertainty regarding recurrent caries diagnosis. A literature review shows noticeable differences among researchers and surveys have shown variations or lack of defined criteria of said lesions. Teeth with stained margins of tooth-coloured restorations and disregarded margins in which a probe sinks are frequently misdiagnosed as recurrent caries. It seems that only cavitated lesions adjacent to restorations indicate real recurrent caries. **Key words:** histological exam, histological test, dental caries associated with restoration, caries associated with restoration, secondary caries, recurrent dental caries, recurrent, caries, also known as secondary caries.

1. INTRODUCCIÓN

La Caries Asociada a Restauraciones y sellantes – CARS, comúnmente llamada caries secundaria se define como una lesión que se desarrolla en vecindad a restauraciones o sellantes. Factores, como la presencia y el tamaño de los espacios de restauración, el riesgo de caries del paciente o la experiencia del operador, ya que si este no identifica si ya realizó la remoción completa de la caries y realiza la obturación esto tendrá un papel importante en la formación de la CARS (1).

Si las condiciones de la biopelícula alrededor de una restauración se vuelven ácidas, la superficie dental se someterá a procesos desmineralización. A medida que la lesión progresa, la capa superficial se rompe y aparecerá una lesión cavitada adyacente a la restauración (1).

Las restauraciones en mal estado se pueden reemplazar o, si están parcialmente defectuosas, también se puede considerar su reparación o resellado para aumentar la longevidad de la restauración. En general, hay pocos datos sobre la naturaleza de las CARS, su detección y manejo ya que diversos estudios mencionan que no es una entidad bien definida, ni clínica ni histopatológicamente (2).

Los métodos actuales de detección de caries secundarias están escasamente validados y probablemente son propensos al riesgo de sobre detección (2). En la literatura se proponen diferentes tipos de detección de caries sin embargo no es claro el protocolo que se debe llevar a cabo en la detección histológica por lo tanto se considera la importancia de realizar una revisión narrativa para establecer los procesos para la obtención de secciones dentales destinadas al desarrollo del estudio histológico (gold estándar) de CARS.

2. MARCO TEÓRICO

Caries asociada a restauraciones y sellantes - CARS

La caries asociada a restauraciones y sellantes - CARS, es un tipo de caries que se desarrolla vecina a los márgenes de una restauración (3) y constituye una de las razones más frecuentes por las cuales se realiza el reemplazo de una restauración, sin embargo, no es una entidad bien definida, ni clínica ni histopatológicamente (4).

Este tipo de lesión puede ser una lesión externa o de pared. La lesión externa tiene los rasgos característicos de la caries primaria: es decir en su estadio inicial es una lesión de mancha blanca, incluida la opacidad del esmalte. La lesión externa temprana progresará a través de las etapas histológicas características. Por su parte, para la lesión de pared se plantean dos hipótesis de formación, la primera sugiere una microfiltración de bacterias, iones de hidrógeno o fluidos en la interfaz diente-material de restauración, la segunda plantea que es una progresión de la lesión externa (4).

Las CARS se localizan con mayor frecuencia en los márgenes gingivales de restauraciones clase II, III, IV y V, típicamente en áreas retentivas de biopelícula, como la interfaz diente-restauración y los sobre contornos o los subcontornos marginales (4). En los márgenes oclusales de las restauraciones es raro observar este tipo de lesiones, debido a que en estos márgenes existe acceso al control de placa dental (4).

De acuerdo con la literatura existen tres factores que pueden predisponer al desarrollo de CARS en el margen gingival de las restauraciones: el control de la placa por parte del paciente, la técnica restauradora y las propiedades del material restaurador (4).

La detección temprana de CARS puede permitir la provisión de opciones de tratamiento menos invasivas como volver a sellar o reparar en lugar de la remoción y reemplazo completos de las restauraciones. Esta detección puede ser altamente sensible, detectando casi todas las lesiones, pero con un alto riesgo concomitante de diagnósticos falsos positivos, o altamente específica (4).

Según Mjör & Toffenetti, 2000, el primer estudio histopatológico *in vitro* de CARS se realizó en dientes con restauraciones de amalgama, bajo microscopía de luz polarizada, el cual reveló 2 zonas: una lesión externa y una lesión de la pared que se unían en el margen cavo superficial de las cavidades. Este estudio *in vitro* ha confirmado la presencia de estas 2 zonas de las lesiones cariosas asociadas con restauración y sellantes (4).

Se ha descrito que estas dos lesiones tienen factores causales diferentes: la lesión externa se describe como resultado de la acumulación de placa, de una manera similar al inicio de la lesión primaria, mientras que la lesión de la pared se cree que es el resultado de una "microfiltración" (4).

La lesión externa tiene los rasgos característicos de la caries primaria: es decir, la primera aparición clínica sería una lesión típica de mancha blanca, incluida la opacidad del color blanco de la caries secundaria, pero puede verse afectado por el color o los componentes del material de restauración adyacente, por ejemplo, componentes o productos de degradación de la amalgama dental (4).

Según un estudio sobre la relevancia del espacio marginal y del cambio de color de la dentina por debajo de los márgenes de las restauraciones de amalgama en el que se seleccionaron sitios clínicamente visibles en el margen de dientes/restauración de 175 dientes. El esmalte adyacente a cada sitio se observó como "manchado" (con decoloración gris) o "libre de manchas". 178 sitios estaban clínicamente intactos, 83 sitios tenían hendiduras estrechas (< 0,4 mm) y en 49 sitios, se presentaron hendiduras anchas (>0,4 mm). También se incluyeron veinte sitios con lesiones cariosas francas. La placa muestreada en el margen de restauración dental y en la unión esmalte-dentina el recuento total de microorganismos. Las muestras de placa mostraron que los márgenes con hendiduras amplias (>0,4 mm) albergaban significativamente más bacterias que los márgenes y márgenes clínicamente intactos con hendiduras estrechas (5).

Histología como Gold estándar y valoración histológica







El gold standard, estándar de oro o patrón de oro hace referencia a aquella es la técnica diagnóstica que define la presencia de la condición con la máxima certeza conocida (2). Dulanto Vargas, 2015, se refiere al *gold* estándar histológico para caries, como aquel que nos permite ver la magnitud real del daño y de pérdida del tejido dental y posible variación según el área a observar, este es el método que presenta más exactitud para detectar y valorar lesiones de caries. El estándar histológico utiliza secciones de dientes sobre los cuales se identifican cambios ópticos de tejidos principalmente con ayuda de microscopía (6).

El Sistema Internacional de Detección y Valoración de Caries – ICDAS, propuesto por Ekstrand et al., 1997 para la detección de caries coronal, se ha propuesto para ser usado en CARS, e incluye los criterios clínicos descritos en la tabla “Definición de las categorías combinadas de caries de ICCMS™” con su correspondencia histológica (7–10). Ver tablas 1 y 2.

Tabla 1. Clasificación de CARS (8,10,11).

Código ICDAS	Código ICDAS combinado	Características clínicas	Histología
0	Sano		Ninguna desmineralización del esmalte o una zona opaca superficial estrecha.
1	Inicial	Opacidad (blanca) apenas visible en la superficie húmeda pero claramente visible después del secado con aire	Desmineralización del esmalte limitada a 50% externo (mitad externa) del espesor de esmalte.
1 ^a		Opacidad (marrón) apenas visible en la superficie húmeda, pero claramente visible después del secado al aire.	
2		Opacidad (marrón) claramente visible sin secado con aire.	Desmineralización que afecta al 50% del esmalte (mitad interna) y hasta 1/3 externo de la dentina.
2 ^a		Opacidad (marrón) claramente visible sin secado con aire.	
3	Moderado	Microcavidad en esmalte seco < 0.5mm sin dentina visible	Desmineralización que involucra al 1/3 medio de la dentina.
4		Sombra oscura de dentina vista a través del esmalte húmedo con o sin microcavidad	
5	Severo	Exposición de dentina en cavidad > 0,5mm hasta la mitad de la superficie dental en seco	Desmineralización que afecta al 1/3 interno de la dentina.
6		Exposición de dentina en cavidad mayor a la mitad de la superficie dental	

Tabla 2. Códigos para evaluación histológica ICDAS-combinado CARS (8,11,12).

	Imagen	Valoración ICDAS-CARS histológica
Sano		Sin desmineralización de esmalte asociada a restauración/sellante
Lesión Inicial		Desmineralización del esmalte en la mitad externa asociada a restauración/sellante
		Desmineralización del esmalte que llega a la unión amelo-dentinaria asociada a restauración/sellante
Lesión Moderada		Desmineralización que involucra el tercio medio de la dentina asociada a restauración/sellante
Lesión severa		Desmineralización que involucra el tejido pulpar asociada a restauración/sellante
		Desmineralización que involucra el tejido pulpar asociada a restauración/sellante

Nota: Fotos utilizadas con permiso de la autora Dra. Yaysa Vásquez-grupo UNICA.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

3.1 Descripción del problema:

La CARS es una de las razones más frecuentes por las cuales se realiza un reemplazo de restauración. Kidd et al., 1995 demostró que el porcentaje de reemplazo de restauraciones varía entre el 50% y 80% del total de las realizadas por odontología general y esto es debido a la presencia de CARS. El diagnóstico clínico de este tipo de caries se basa en la presencia de pigmentación y fisura marginal, sin embargo, estos signos no son criterios absolutos para el diagnóstico de CARS (5).

Las CARS son caries adyacentes a las restauraciones o selladores. Aunque CARS es análogo histológicamente a la caries primaria, algunas de sus características pueden conducir a problemas de diagnóstico. El problema principal son las dificultades para diferenciar entre las discrepancias en los márgenes de restauración, la caries secundaria y la caries residual. Si solo hay discrepancias en los márgenes, también es importante registrarlas, ya que estas discrepancias muestran un mayor riesgo de caries (13).

Son escasos los estudios sobre CARS y que a su vez describan los métodos de preparación de muestras dentales para el estudio de la CAR, tanto para facilitar su estudio como para apoyar el proceso diagnóstico en la clínica, es por esto por lo que cobra importancia revisar la literatura e identificar dentro de las propuestas aisladas, elementos que permitan establecer un protocolo de procesamiento de muestras que sea reproducible y que faciliten el proceso de estudio de la clínica y la histología. Por esta razón surge la necesidad de secciones dentales destinadas al desarrollo del estudio histológico (14).

3.2 Pregunta de investigación

¿Cuál es el protocolo para obtener secciones dentales destinadas al estudio histológico de CARS?

4. JUSTIFICACIÓN

La CARS es un proceso complejo y multifactorial, que combina las causas de caries "convencionales" con las características específicas de la restauración y el material restaurador involucrado. La patogénesis de la CARS sigue el mismo principio de cualquier otra lesión de caries, implica desmineralización y, al involucrar dentina, involucra además proteólisis, pero se modifica por la presencia de una restauración o margen sellante (15).

Con respecto a la restauración defectuosa, los espacios entre la restauración y el diente favorecen el acúmulo de biopelícula y el acceso de los ácidos a la interfaz diente-restauración. No obstante, se requieren los factores conocidos relevantes para el desarrollo de caries (presencia de una biopelícula cariogénica, suministro de carbohidratos fermentables, desequilibrio en la pérdida de minerales y pérdida de tejido dental duro) (16).

El resultado de estas diferentes vías patogénicas puede ser causa de la desmineralización en la superficie del diente, como ocurre típicamente en las lesiones de caries primarias, así como a lo largo de la interfaz (16).

La presencia de espacios en la restauración puede ser el resultado de una colocación inicial imperfecta de la restauración, por ejemplo, por contracción de polimerización no compensada o fotopolimerización insuficiente del material (con un lavado posterior de los componentes no curados). También pueden formarse defectos y espacios a largo plazo por degradación hidrolítica de la capa híbrida y, por lo tanto, de la interfaz en el caso de restauraciones adhesivas (a base de resina) (1).

Existe poca evidencia científica sobre el protocolo que se realiza para lograr la obtención de secciones dentales destinadas al desarrollo del estudio histológico (gold estándar) de Caries Asociada a Restauraciones y Sellantes - CARS. Por lo tanto, surge la necesidad de realizar un estudio basado en la literatura sobre el protocolo que se debe realizar para el procesamiento de muestras dentales destinadas al estudio histológico de CARS.

5. SITUACIÓN ACTUAL EN EL ÁREA DE INVESTIGACIÓN

Los métodos que se han utilizado para el estudio de CARS incluyen evaluaciones visuales-táctiles, radiográficas, luz polarizada, fluorescencia láser y de fluorescencia cuantitativa inducida por luz -QLF (13). La transiluminación de infrarrojo cercano también puede ser útil, pero los datos siguen siendo escasos y con respecto a la QLF, los datos son escasos y poco prometedores (15).

En relación a las evaluaciones visuales-táctiles, el Sistema Internacional de Detección y Validación de Caries (ICDAS) estableció estos criterios para el diagnóstico de CARS y se realizan con el fin de verificar el grado de desmineralización de los márgenes, y para las zonas interproximales se complementa con el método radiográfico el cual ha mostrado ser útil como ayuda diagnóstica, especialmente en lesiones coronales proximales, sin embargo la radiopacidad de los materiales restauradores podría dificultar la detección de estados iniciales de caries (16).

El método QLF, es un sistema óptico que proporciona una representación visual del diente con una evaluación de la lesión basada en la pérdida de una señal de fluorescencia. En este sistema, la disminución de la fluorescencia está relacionada con las propiedades de dispersión del esmalte cariado y, por lo tanto, el sistema puede proporcionar una medida cuantitativa de la gravedad del área afectada y la extensión de la lesión (8).

El método de fluorescencia láser tiene el potencial de detectar caries secundarias en superficies oclusales restauradas con materiales compuestos con limitación en la zona interproximal (9). El método QLF y luz láser, resultan de gran utilidad, pero no han sido validados ni probados en trabajos de campo por lo que se sigue confiando en el examen visual y radiográfico (16).

En un estudio *in vitro* realizado por Haitham Askar y colaboradores se realizó un examen histopatológico de caries secundaria sobre dientes con restauraciones en amalgama. Bajo microscopía de luz polarizada se observaron en estos cortes áreas de caries secundaria, una lesión externa y una lesión en la pared que se unían en el margen

cavosuperficial. Se consideró que la lesión externa estaba causada por la acumulación de biopelícula de una manera similar a la iniciación de la lesión primaria, mientras que se pensó que la lesión de la pared ser el resultado de una "microfiltración" (1).

Es necesario evitar los diagnósticos falsos positivos, que conducen a un sobretratamiento invasivo y costoso. La CARS debe detectarse desde el principio para aumentar las posibilidades de éxito del tratamiento y evitar la destrucción del tejido duro (16).

Para el diagnóstico de las CARS, se pueden utilizar varias técnicas radiográficas diferentes, que incluyen imágenes periapicales, de mordida, oclusales y panorámicas. Para evitar diagnósticos erróneos, el examen radiográfico debe realizarse junto con un examen clínico (16).

Sarmiento Barata y colaboradores realizaron un estudio con tres grupos: el primero eran restaurados con resina compuesta utilizando la técnica adhesiva de grabado ácido total, el segundo restaurados con resina compuesta pero sin grabado ácido y bloques de sonido pretendiendo investigar la influencia de los defectos marginales en el establecimiento de lesiones de caries secundarias, cuando las restauraciones adhesivas se sometieron a un desafío cariogénico (17).

Dichas muestras se seccionaron perpendicularmente a la superficie con una sierra de diamante (n. 7015, KG Sorensenb) y se examinaron bajo microscopía de luz polarizada para determinar el patrón de desmineralización formado en cada grupo experimental. Los bloques se cubrieron con una malla fijada con resina acrílica (base de gabardina), a una distancia de 0.5 mm de la superficie, para permitir la acumulación de biopelícula (14). Un examinador calibrado, realizó el examen con lupa de 3.5 aumentos bajo luz, después de 5 minutos de secado del bloque. Concluyeron que el desarrollo in situ de lesiones de caries adyacentes al material de restauración no estuvo influenciado por la presencia o ausencia de falla/microfiltración en las restauraciones adhesivas (17).

Por otra parte en un estudio realizado por Rodríguez y colaboradores obtuvieron muestras a las cuales le realizaron tallados longitudinales a los dientes de hasta 1 mm utilizando una máquina pulidora rotatoria (Knuth-Rotor, Struers, Copenhagen,

Dinamarca) con papel de carburo de silicio de tamaño de grano de 60 μm bajo agua del grifo enfriada (17).

Posteriormente limpiaron las superficies cortadas y se deshidrataron en soluciones de alcohol a concentraciones crecientes con la adición de fucsina básica al 0.5% (Inselspital-Apotheke, Berna, Suiza) para teñir el bloque. Eliminaron el alcohol con acetona y los dientes embebidos en metacrilato de metilo. Luego, tiñeron con contraste verde claro en una solución de ácido acético (0.25 % de luz verde disuelto en ácido acético al 0.20 %) durante dos minutos, cortado y molido hasta obtener láminas de 300 μm de espesor. midieron superficies sanas de esmalte y dentina, y los valores de dureza por debajo de 200 KHN en esmalte y por debajo de 70 KNH en dentina se consideraron indicativos de caries (17).

Se tomaron fotografías de las superficies coloreadas cortadas (cámara Leica DC300, Leica, Heerbrugg, Suiza). Dos examinadores evaluaron los sitios (aumento 10x) y las medidas de dureza, y ambos llegaron a un consenso antes de clasificar la lesión. Concluyeron que la fuga en el margen de la restauración compuesta puede conducir a una reducción de la longevidad clínica de una restauración debido al desarrollo de caries secundaria (17).

6. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Objetivo general

Establecer los procesos para la obtención de secciones dentales destinadas al desarrollo del estudio histológico (gold estándar) de Caries Asociada a Restauraciones y Sellantes - CARS.

Objetivos específicos

1. Evaluar a partir de la evidencia científica las características de diferentes procesos de obtención de muestras dentales (secciones) para el estudio histológico de CARS
2. Establecer un protocolo de procesamiento de muestras dentales para la obtención de secciones destinadas al estudio histológico de CARS.

7. METODOLOGÍA PARA EL DESARROLLO DE LA REVISIÓN

7.1 Tipo de estudio:

Revisión narrativa

7.2 Población de muestra:

Artículos científicos relacionados con la detección de CARS mediante pruebas histológicas (gold estándar)

7.3 Métodos y técnicas para la recolección de la información

Resumen de la búsqueda de información

Se definieron las siguientes variables:

- Caries asociada a restauraciones y sellantes (CARS): La caries asociada a restauraciones y sellantes - CARS, es un tipo de caries que se desarrolla vecina a los márgenes de una restauración (3). Los procesos químicos e histológicos involucrados en las "lesiones externas" son los mismos que los de la caries primaria (1).
- Examen histológico de CARS: consiste en la identificación del compromiso de la estructura dental por parte de la lesión, sobre secciones dentales (2).

Se consultaron las siguientes bases de datos: Pubmed, Science direct Embase y Google scholar

Se utilizaron las siguientes palabras clave: histological examination, histological test, tooth decay associated with restoration, restoration associated caries, secondary caries, recurrent tooth decay, recurrent caries, también se conoce como caries secundaria.

Se buscaron los siguientes tipos de estudios: Metaanálisis, ensayos clínicos aleatorizados y controlados, estudios de casos y control, estudios de cohorte.

Se utilizaron las siguientes estrategias de búsquedas:

#1: (histological examination OR histological test)

#2: (tooth decay associated with restoration OR restoration associated caries OR secondary caries OR recurrent tooth decay OR recurrent caries)

#3: #1 AND #2: ((histological examination OR histological test) AND (tooth decay associated with restoration OR restoration associated caries OR secondary caries OR recurrent tooth decay OR recurrent caries))

Selección de artículos:

Criterios de Selección: Se seleccionaron todos los artículos publicados sin restricción en tiempo y período de publicación ni idioma. Se seleccionaron Metaanálisis, ensayos clínicos aleatorizados y controlados, estudios de casos y controles, estudios de cohorte, reportes de caso y revisiones narrativas.

Se encontraron 52 artículos de los cuales se excluyeron 31 artículos ya que no contaban con la suficiente información, también se excluyeron por fecha de publicación ya que se requería artículos con publicación no mayor a 10 años, por último, fueron seleccionados 23 artículos científicos.

8. CONSIDERACIONES ÉTICAS.

El presente trabajo de grado es una investigación sin riesgo, de acuerdo con la Resolución 8430 (19). No involucra intervención en humanos o especímenes animales, por lo que no requiere aprobación ética

9. RESULTADOS

Obtención de las muestras dentales

Por donación voluntaria luego de ser extraídos por razones diferentes a las del estudio, con firma de un consentimiento informado, o de bancos de dientes con protocolos estandarizados (Rodrigues et al., 2010)



Recolección de la muestra

En medio acuoso que no altere la estructura dental y minimice la posibilidad de infección: se ha propuesto el uso de Cloramina T 0.5% a 4°C, Cloramina T 1%, Timol 13%, (González-Pita et al., 2014)



Limpieza, desinfección, almacenamiento de las muestras

Retiro de restos de ligamento periodontal y de pulpa dental, lavado con agua desionizada y cepillo suave protegiendo de daño (González-Pita et al., 2014)

Para la desinfección y almacenamiento de las muestras se describe la inmersión en Cloramina T 0.5%, Cloramina T 1%, Timol 13%, ácido acético al 0.20 % durante 2 minutos (González-Pita et al., 2014)



Diagnóstico visual de CARS en las superficies de las muestras

Diagnóstico de CARS con criterios ICDAS (Pitts et al., 2014), toma de imágenes de las superficies diagnosticadas con estereomicroscopio (Vásquez Pérez, 2016)



Obtención de secciones de las muestras

Fijación de las muestras con cera pegajosa, corte con micrótomo y discos de diamante (Silva et al., 2010) generando hemisecciones, o de un número mayor de sesiones, de ser necesaria la valoración de otras áreas en la misma muestra. Con frecuencia se opta por el embutido en materiales como el acrílico para conservar la muestra. De ser necesario el adelgazamiento de las muestras, realizar este con lijas de carborundum de diferentes granos para terminar en pulido con felpa y sometimiento a lavado con cepillo suave y ultrasónico para eliminar restos contaminantes.



Estudio de CARS

Se recomienda la separación de las muestras en los grupos de caries coronal y caries radicular. La clasificación histológica se sugiere hacer sobre el corte histológico, conservando su humedad, apoyado por la imagen obtenida con el estereomicroscopio y basado en criterios ICDAS- CARS combinado: sin caries (código 0), caries que se extienden hasta la mitad del esmalte (código 1), caries que se extienden hasta la mitad interna del esmalte (código 2), caries en la dentina (código 3) y caries de dentina profunda (código 4). Para la caries radicular, los sitios se clasificaron de acuerdo con los siguientes criterios: libre de caries (código 0) y con caries radicular (código 1) (Rodrigues et al., 2010). La radiografía es otra opción validada frente al estudio histológico de CARS (Vásquez Pérez, 2016).

10. DISCUSIÓN

En este estudio se buscó describir un protocolo de preparación de muestras para ser usadas en el estudio *in vitro*

de CARS

Proceso de obtención, recolección de las muestras dentales y Limpieza, desinfección, almacenamiento de las muestras

Se plantea la obtención de dientes extraídos por razones diferentes a las de los estudios *in vitro* que se estén realizando tal como lo describe Rodríguez et al., 2010, aduciendo razones periodontales u ortodóncicas (20).

La obtención de dientes post exodoncia se hizo a partir de un consentimiento informado respetando las consideraciones éticas de la Resolución 8430 de 1993 (19).

Para seleccionar el medio de desinfección y almacenamiento adecuados, es necesario tener en cuenta los componentes de las soluciones para evitar alteraciones de la muestra. De acuerdo con lo hallado en la literatura se encuentran diferentes métodos para la desinfección de los dientes que, de acuerdo con su mecanismo de acción, pueden clasificarse en físicos o químicos, o también como medios en solución o medios no acuosos. Estos son algunos de los medios físicos se reportan: autoclave, radiación microondas, radiación UV. Dentro de los medios químicos que son los más usados en *in vitro* en odontología se encuentran Hipoclorito de sodio 5.25%, Cloramina T a concentraciones entre 0.5% y 1%, Timol, Glutaraldehído, Formalina 10%, Óxido de etileno (20). En estudios previos se ha descrito que casi todos los agentes bactericidas como el peróxido de hidrógeno y el hipoclorito de sodio son oxidantes, por lo cual alteran la fracción orgánica, debilitándola, además de afectar el color. Por esa razón, se debe contar con protocolos ajustados a las necesidades del investigador según la variable a estudiar, pues de lo contrario, el tratamiento que tengan las muestras previo al desarrollo de la investigación puede afectar la propiedad que se necesita conservar. Lo anterior tiene efectos negativos sobre los resultados llegando a invalidarse el estudio con el consiguiente efecto: desperdicio de tiempo, dinero, dedicación y demás recursos invertidos en una investigación, pero, además, de publicarse estos datos puede generarse confusión (20).

Diagnóstico visual de CARS en las superficies de las muestras y Obtención de secciones de las muestras.

A partir de la revisión de literatura realizada, sugerimos se seleccione el sentido del corte según el tipo de secciones que se necesite obtener y en relación con el interés del estudio. Así mismo se sugiere usar discos de diamante, con refrigeración (agua) para la realización de los cortes debido a la dureza de este material. La fijación se propone con cera pegajosa que permita luego tener una muestra libre de material para ser valorada. De ser necesario el adelgazamiento de las secciones, este debe realizarse con lijas de carborundum de diferentes granos (600, 1200, por ejemplo), terminando con felpa con micropartículas de diamante, para luego ser sometidas a lavado con cepillo suave y ultrasonido. Este protocolo difiere muy poco de lo descrito en los estudios de:

Rodríguez et al., 2010, quien para el corte de la muestra utilizaron un disco abrasivo de diamante (Isomet, 11-1, 180 Low Speed Saw, Buehler Ltd, Lake Bluff, IL, EE. UU.) y la máquina pulidora (Knuth-Rotor, Struers, Copenhagen, Dinamarca), ayudándose con la medición de dureza de las muestras para la clasificación histológica en caso de duda. Para el pulido se utilizaron lijas de carburo de silicio de tamaño de grano de 60 mm enfriado bajo agua corriente (20).

Lussi & Hellwig, 2006 quienes plantearon el corte longitudinal hasta 1 mm antes del sitio de medición usando una máquina pulidora rotatoria (Knuth-Rotor, Struers, Copenhagen, Dinamarca) con papel de carburo de silicio de tamaño de grano de 60 μ m bajo agua del grifo enfriada (21).

Silva et al., 2010, en su estudio, seccionaron los dientes, separando las coronas de las raíces, utilizando discos diamantados con el motor a baja velocidad y fijación con cera pegajosa sobreutilitaria (Kerr® - Brasil) sobre láminas de acrílico. Para separar las porciones mesial y distal de la corona, se realizó un corte en dirección bucolingual (22).

En el estudio de Diniz et al., 2015, los dientes se seccionaron longitudinalmente, perpendicularmente a las superficies proximales, con un disco de diamante refrigeración con agua (Gillings-Hamco, Hamco Machines Inc, NY, EE. UU.). Además, los dientes se montaron en modelos dentales de plástico (arcos superior e inferior) (Nissin

Dental Products Inc, Kyoto, Japón), utilizando cera base para obtener una superficie de contacto (23).

Las secciones se realizaron con un disco de diamante (Buehler®, número 11-4243, Lake Bluff, IL, EE. UU.), acoplado a una sierra de baja velocidad de 150 rpm (ISOMET™ Low Speed Saw, Buehler®, Lake Bluff, IL, EE. UU.), refrigerando con agua destilada.

Las secciones se adelgazaron a mano (grado 600, 1000 y 1200, suspensión acuosa de alúmina) hasta un espesor de aproximadamente 80 a 100 µm. El espesor de la sección se midió con la ayuda de un calibrador digital (Digimess® – China) (23).

Estudio de CARS

Teniendo en cuenta la revisión realizada, sugerimos que las muestras se separen según el interés del estudio y se sugiere el uso del sistema de clasificación de caries ICDAS para CARS como referente clínico e histológico. El protocolo que planteamos difiere parcialmente de lo reportado en la literatura:

En el estudio realizado por Rodrigues et al., 2010, la muestra se dividió de acuerdo con las evaluaciones histológicas en grupos de "caries de la corona" y "caries de la raíz". Se consideró que las muestras tenían "caries radicular" si no se observaba esmalte y si la restauración alcanzaba al menos la unión cemento-esmalte. Las lesiones de la corona debajo de la restauración se clasificaron de acuerdo con los siguientes criterios: sin caries (0), caries que se extienden hasta la mitad del esmalte (1), caries que se extienden hasta la mitad interna del esmalte (2), caries en la dentina (3) y caries de dentina profunda (4). Para la caries radicular, los sitios se clasificaron de acuerdo con los siguientes criterios: libre de caries (0) y con caries radicular (20).

Silva et al., 2010, en su estudio, valoro CARS utilizando luz polarizada modificada con la edición de dos prismas que permitieran lograr una imagen tridimensional y analizando imágenes fotográficas de secciones (Nikon CoolPix 990, Nikon, Japón) acoplada al microscopio. Las observaciones se realizaron en especímenes húmedos y secos (22).

En el estudio de Rodrigues et al., 2010, cada sección se calificó de forma independiente de acuerdo con los siguientes criterios: 0: sin caries, 1: lesión de caries limitada a la mitad externa del esmalte, 2: caries que se extiende a la mitad interna del esmalte o la mitad externa de la dentina, 3: caries limitada al tercio medio de la dentina, y 4: caries que involucran la mitad interna de la dentina (20).

Con respecto a las radiografías, para ICDAS CARS, Diniz y colaboradores et al., 2016, concluyeron que las radiografías tenían un alto porcentaje de acuerdo con la histología para la identificación de superficies sanas, más no para el estudio de la profundidad histológica de las lesiones. Además, para el estudio de CARS se recomienda la separación de las muestras en los grupos de caries coronal y caries radicular. Para la clasificación histológica se sugiere hacer sobre el corte histológico apoyado por la imagen obtenida con el estereomicroscopio y basado en criterios ICDAS- CARS combinado (23).

11. CONCLUSIONES

La creación de protocolos para desarrollo de estudios in vitro disminuye la probabilidad de alteración de resultados de investigación. Mediante una revisión de literatura nosotros generamos un protocolo para el estudio de CARS.

12. NOVEDAD Y TRANSFERENCIA

El presente estudio permitirá obtener información sobre las técnicas de preparación de secciones dentales para el estudio histológico de CARS. Este podrá ser transferido a la clínica y la academia.

13. ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

13.1 Cronograma de Actividades:

Ver tabla. 3

CRONOGRAMA												
Actividad	Meses											
	1 ^{er} periodo académico				2 ^{do} periodo académico				3 ^{er} periodo académico			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Diseño del estudio	X											
2. Búsqueda de literatura		X										
3. Formulación protocolo de investigación - final			X									
4. Integración Protocolo completo					X							
5. Resumen ejecutivo Protocolo completo						X						
6. Formulación de proyecto de investigación - final								X				

13.2 Presupuesto:

Ver tabla. 4

Rubro	Desembolso nuevo (\$)	Desembolso normal (\$)	Contrapartida otra institución (Si aplica)		Total (\$)
			Contrapartida efectivo (\$)	Contrapartida especie (\$)	
1. Personal	Horas de Tutorías				100.000
2. Equipos especializados					N/A
2.1. Equipos propios	Computador				2.000.000
3. Materiales y reactivos					N/A
4. Salidas de campo					N/A
5. Refrigerios					N/A
6. Servicios técnicos					N/A
7. Capacitaciones					N/A
8. Adquisición o actualización de software	N/A				N/A
9. Evaluación					N/A
10. Otros					N/A
Total					2.100.000

13.3 Posibles dificultades técnicas / metodológicas- plan de contingencia:

Limitación de la información disponible en las búsquedas de estudios de evidencia científica. Existe la posibilidad que la información de búsqueda no sea tan específica teniendo que mi estudio va dirigido hacia el protocolo que se realiza para la obtención de muestras histológicas para obtención de CARS, es decir, que para solucionar esto será necesario realizar una búsqueda exhaustiva de literatura científica relacionando estos artículos hasta llegar a un consenso.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Askar H, Krois J, Göstemeyer G, Bottenberg P, Zero D, Banerjee A, et al. Secondary caries: what is it, and how it can be controlled, detected, and managed? Clin Oral Investig [Internet]. 2020;24(5):1869–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32300980/>
2. Salech F, Mery V, Larrondo F, Rada G. [Studies about diagnostic tests: interpreting the results] - PubMed. Rev Med Chil [Internet]. 2008;136(9):1203–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19030668/>
3. MacHiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR [Internet]. Vol. 54, Caries Research. S. Karger AG; 2020. p. 7–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31590168/>
4. Mjör IA. Clinical diagnosis of recurrent caries. J Am Dent Assoc. 2005 Oct 1;136(10):1426–33.
5. Kidd EAM, Joyston-Bechal S, Beighton D. Marginal ditching and staining as a predictor of secondary caries around amalgam restorations: a clinical and microbiological study. J Dent Res [Internet]. 1995;74(5):1206–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7540634/>
6. Dulanto Vargas J. Validación histológica in-vitro de ICDAS-II y MICRO-CT para la detección de lesiones de caries proximales y oclusales - E-Prints Complutense [Internet]. [Madrid]: Universidad Complutense; 2015. Available from: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/37192/>
7. Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H, et al. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): An integrated system for measuring dental caries: Methods. Community Dent Oral Epidemiol [Internet]. 2007;35(3):170–8. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17518963/>

8. ICDAS Foundation. Homepage [Internet]. 2014. Available from:
<https://www.iccms-web.com/>
9. Pitts NB, Ekstrand KR, ICDAS Foundation. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and its International Caries Classification and Management System (ICCMS) - methods for staging of the caries process and enabling dentists to manage caries. *Community Dent Oral Epidemiol* [Internet]. 2013;41(1):e41-52. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24916677>
10. Pitts NB, Ismail AI, Martignon S, Ekstrand K, A Douglas G V, Longbottom C, et al. ICCMSTTM Guide for Practitioners and Educators [Internet]. 2014. Available from: www.kcl.ac.uk/sspp/kpi/projects/healthpolicy/global-caries-management.aspx.
11. Ekstrand K, Ricketts D, Kidd E. Occlusal caries: pathology, diagnosis and logical management. *Dent Update* [Internet]. 2001;28(8):380–7. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11764611/>
12. Vásquez Pérez YD los reyes. Validación de los criterios visuales y radiográficos de caries asociadas a restauraciones con ICDAS CARS frente a patrón histológico [Internet]. [Bogotá]: Universidad El Bosque; 2021. Available from:
<https://repositorio.unbosque.edu.co/handle/20.500.12495/7012>
13. Pretty IA, Ekstrand KR. Detection and monitoring of early caries lesions: a review. *Eur Arch Paediatr Dent* [Internet]. 2016;17(1):13–25. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26514842/>
14. Dikmen B. ICDAS II Criteria (International Caries Detection and Assessment System). *J Istanbul Univ Fac Dent*. 2015 Oct 21;49(3):63.
15. Signori C, Gimenez T, Mendes FM, Huysmans MCDNJM, Opdam NJM, Cenci MS.

Clinical relevance of studies on the visual and radiographic methods for detecting secondary caries lesions - A systematic review. *J Dent* [Internet]. 2018;75:22–33. Available from:
<https://europepmc.org/article/MED/29857074>

16. McConnaughay KDM, Bazzaz FA. The Relationship Between Gap Size and Performance of Several Colonizing Annuals. *Ecology*. 2016;68(2):411–6.
17. Sarmiento Barata J, Casagrande L, Moreira Pitoni C, Borba de Araujo F, Garcia-Godoy F, Groismann S. Influence of gaps in adhesive restorations in the development of secondary caries lesions: An in situ evaluation. *Am J Dent* [Internet]. 2012;25(4):244–8. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23082391/>
19. Ministerio de Salud. Resolución 8430. 8430 Oct 4, 1993 p. 1–19.
20. Rodrigues J, Neuhaus K, Hug I, Stich H, Seemann R, Lussi A. In vitro detection of secondary caries associated with composite restorations on approximal surfaces using laser fluorescence. *Oper Dent* [Internet]. 2010;35(5):564–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20945748/>
21. Lussi A, Hellwig E. Performance of a new laser fluorescence device for the detection of occlusal caries in vitro. *J Dent* [Internet]. 2006;34(7):467–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16431009/>
22. Silva BB e, Heller D, Maltz M. Características da cárie secundária adjacente a restaurações de resina composta. *Rev da Fac Odontol Porto Alegre* [Internet]. 2010;51(3):23–9. Available from:
<https://seer.ufrgs.br/index.php/RevistadaFaculdadeOdontologia/article/view/21399>
23. Diniz MB, Cordeiro RCL, Ferreira-Zandona AG. Detection of caries around amalgam restorations on approximal surfaces. *Oper Dent*. 2016;41(1):34–43.