



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Remineralización Dental: una Intervención
Dirigida a Niños de Alto
Riesgo para la Prevención de la Caries**

D^a Andrea Poza Pascual

2021



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Remineralización dental:
una intervención dirigida a niños de alto
riesgo para la prevención de la caries.

Director:

Dr. Antonio José Ortiz Ruiz

D^a. Andrea Poza Pascual

2021



D. Antonio José Ortiz Ruiz, Profesor Titular de Universidad del Área de Estomatología en el Departamento de Dermatología, Estomatología, Radiología y Medicina Física, **AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Remineralización dental. Una intervención dirigida a niños de alto riesgo para la prevención de la caries**”, realizada por **D^a Andrea Poza Pascual**, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 27 de octubre de 2020.

Antonio José Ortiz Ruiz

(Firmado digitalmente al margen)



MOD: T-20

Código seguro de verificación: RUXFMmaW-Q49BllwQ-qtzvmJ97-b571+BPp

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <http://sede.um.es/validador/>



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. Aníbal Nieto Díaz, Catedrático de Universidad del Área de
Obstetricia y Ginecología y
Presidente Comisión Académica programa doctorado * en Ciencias
de la Salud, INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento
establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la
Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral
titulada "Remineralización dental: una intervención dirigida a niños de
alto riesgo para la prevención de la caries.", realizada por D^a Andrea
Poza Pascual, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. Antonio
José Ortiz Ruiz, esta Comisión Académica, en sesión celebrada en
fecha 10 de noviembre de 2020, ha dado su autorización para su
presentación ante la Comisión General de Doctorado.

Murcia, a 10 de noviembre de 2020

Firmado con certificado electrónico reconocido.
La información sobre el firmante, la fecha de firma y
el código de verificación del documento se encuentra
disponible en los márgenes izquierdo e inferior

Doctorando: D^a. Andrea Poza Pascual

**Informe del Departamento para alumnos del RD 778/1998.*

**Informe de La Comisión Académica del Programa para alumnos del RD 56/2005 y RD 1393/2007.*



Mod: T-40

Código seguro de verificación: RUXFMslo-cWm6mLRc-otC+tKFG-Htr2w+ko

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <https://sede.um.es/validador/>

AGRADECIMIENTOS

El primer nombre que me viene a la cabeza en este apartado es el del Dr. Antonio Ortiz. Gracias por orientarme siempre desde el cariño y con esa forma tan humana que te caracteriza. Gracias por el apoyo en todos los aspectos: desde acogerme en la Universidad de Murcia, donde puedo desarrollar mi faceta investigadora, hasta tu visión pausada que ha dado sentido a muchos quebraderos de cabeza profesionales y personales. Ojalá Bilbao estuviera en Albacete...

A mi tribu. Gracias Imanol por tu ayuda informática, por ser el mejor compañero de vida, por tu soporte y por sacar lo mejor de mí siempre. A Harriet, por poner luz y risas en este camino que te ha quitado tanto tiempo, ¡onena zara! Jare, te esperamos pronto. Asko Maite Zaituztet.

A mi familia, mis padres, José Ramón y Mari Luz, y mi hermana, Sara, por estar siempre al pie del cañón de manera incondicional.

A mi familia murciana, Magdalena, Pedro, Luis, Manuela y Martina. Y especialmente a Clara, por acogerme y servirme de guía en nuestra filosofía de vida.

A la “Odontokuadrilla”, en especial a Irati y a Janire, por llenarme de energía positiva y darme esas quedadas que dan la vida. A Ainhara, con la que me lío en unas cuantas aventuras por el bien de nuestra profesión, y por hacerme un hueco en Oreka. A Carol y Esther, mis hermanas de corazón. Al equipo norteño. A mis compañeras del día de Dental Amezola, Aixerrota y Oreka.

A la Dra. Yolanda Martínez Beneyto por sus consejos que valen oro y a la Dra. Amparo Pérez Silva. A todos los alumnos del Máster de Odontología Infantil Integrada, así como al personal e instalaciones empleadas de la Clínica Odontológica Universitaria de la Universidad de Murcia. Charo, gracias por tu paciencia gestionando agendas.

A mis compañeras Odontopediatras y profesoras del HSR, por asentar las bases de la odontopediatría y esos lazos que, aunque pase el tiempo, siempre unen.

A mis amigos, a Achilipú, a Gorbea y a Villa por estar siempre ahí y hacer que desconectara un ratito de la tesis.

A Ana e Idoia por ser mi guía en momentos de oscuridad.

A todos los niños y “no tan niños”, que participaron en los estudios, porque sin ellos nada hubiera sido posible.

Gracias a todos y todas.

A Imanol, Harriet y Jare.

ABREVIATURAS

ACP: Fosfato de calcio amorfo.

CPP: Fosfopéptido de caseína.

HCO⁻: Bicarbonato.

B-TCP: Beta-fosfato tricálcico.

Ca: Calcio.

Ca²⁺: Ion Calcio.

Ca₃(PO₄)₂: Fosfato de calcio.

CaF₂: Fluoruro cálcico.

CAMBRA: *Caries Management by Risk Assessment.*

CAOS: Superficies de dientes permanentes careados, ausentes por caries u obturados.

caos: Superficies de dientes temporales careados, ausentes por caries u obturados.

CPP-ACP: Fosfato de calcio amorfo estabilizado con fosfopéptido de caseína.

Cu: Cobre.

F⁻: Ion flúor.

FA: Fluorapatita.

FHA: Fluorhidroxiapatita.

H⁺: Ion hidrógeno, protones.

HA: Hidroxiapatita.

ICP-MS: Espectrometría de masas acoplado inductivamente con plasma de Argón.

IMAP: Índice de madurez y acidez de la placa.

Índice Turesky QH PI: Índice de Placa de Quigley y Hein modificado por Turesky.

Mg: Magnesio.

NaF: Fluoruro de sodio.

OH⁻: Ion hidroxilo.

P: Fósforo.

Pi: Fósforo inorgánico.

PO₄³⁻: Ion fosfato.

ppb: Partícula por billón.

ppm: Partícula por millón.

TCP: Fosfato tricálcico.

α -TCP: Alfa-fosfato tricálcico.

β -TCP: Fosfato tricálcico

fTCP: Fosfato tricálcico funcionalizado.

μ L: Microlitro.

Zn: Zinc.

SIMBOLOS DE LAS PRUEBAS ESTADISTICAS CONTENIDOS EN LAS TABLAS.

¶:	T de Student pareada.
+	Test de Wilcoxon.
†:	Test de Kruskal-Wallis.
*:	Test de varianza simple de medidas repetidas.
#:	Test de Mann-Whitney.
ç:	T de Student.
@:	Test de varianza simple.
&:	Test de varianza simple sobre rangos de medidas repetidas.
\$:	Test Chi-cuadrado.
a:	$p < 0,05$ respecto del valor basal (T0).
b:	vs T1.
c:	vs T4.
d:	vs T3.
e:	vs T2.
α :	vs grupo control.

ÍNDICE

1.1.	RESUMEN	1
1.2.	ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN		6
2.1. CARIES DENTAL		6
2.1.1.	GENERALIDADES	6
2.1.2.	DEFINICIÓN DE CARIES DENTAL	7
2.1.3.	ETIOPATOGENIA DE LA CARIES	8
2.2. BALANCE DE CARIES		12
2.2.1.	FACTORES DE RIESGO	14
2.2.2.	FACTORES PROTECTORES	19
2.2.3.	PROCESO DE DESMINERALIZACIÓN	22
2.2.4.	PROCESO DE REMINERALIZACIÓN	24
2.3. AGENTES REMINERALIZANTES BASADOS EN LOS SISTEMAS DE CALCIO Y FOSFATO		29
2.3.1.	FOSFATO DE CALCIO AMORFO INESTABLE	29
2.3.2.	FOSFATO DE CALCIO AMORFO ESTABILIZADO	30
2.3.3.	FOSFATO TRICALCICO	34
2.4. ODONTOLOGÍA DE MÍNIMA INTERVENCIÓN BASADA EN EL RIESGO DE CARIES.		37
2.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO		39
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS		40
3.1. HIPÓTESIS		40
3.2. OBJETIVOS		41
3.2.1.	OBJETIVO GENERAL	41
3.2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
MATERIAL Y MÉTODO		42
4.1. MATERIAL		42
4.1.1.	MUESTRA	42
4.1.2.	MATERIAL EMPLEADO EN CLÍNICA	44
4.1.3.	MATERIAL EMPLEADO EN LABORATORIO	48

4.2. MÉTODO	50
4.2.1. INTERVENCIONES	50
4.2.2. PROTOCOLO DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 1: ÍNDICE DE CARIES	54
4.2.3. PROTOCOLO DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 2: INDICE DE HIGIENE	56
4.2.4. PROTOCOLO DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 3: pH	59
4.2.5. PROTOCOLO DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 4: ÁCIDO LÁCTICO	59
4.2.6. PROTOCOLO DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 5: ELEMENTOS TRAZA	60
4.2.7. PROTOCOLO DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 6: RECUENTO BACTERIANO	61
4.2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	63
RESULTADOS	66
5.1. MUESTRA	66
5.1.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS.	67
5.2. RESULTADOS	68
5.2.1. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 1: ÍNDICE DE CARIES	68
5.2.2. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 2: ÍNDICES DE HIGIENE	70
5.2.3. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 3: pH	71
5.2.4. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 4: ÁCIDO LÁCTICO	72
5.2.5. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 5: ELEMENTOS TRAZA	73
5.2.6. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 6: RECUENTO BACTERIANO	81
5.2.7. CORRELACION DE LOS ELEMENTOS ESTUDIADOS	82
DISCUSIÓN	83
6.1. DISCUSIÓN DEL MÉTODO	84
6.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	88
CONCLUSIONES	97
BIBLIOGRAFÍA	99
ANEXOS	124
<i>Anexo 1. Informe de la Comisión de Ética de Investigación.</i>	125
<i>Anexo 2. Informe de Comité de Bioseguridad en Experimentación.</i>	126
<i>Anexo 3. Historia clínica.</i>	127
<i>Anexo 4. Consentimiento informado.</i>	133
<i>Anexo 5. Instrucciones de higiene oral y dietéticas para padres.</i>	135
<i>Anexo 6. Instrucciones de higiene oral para niños.</i>	136
<i>Anexo 7. Registro de toma de saliva e índice de higiene.</i>	137
<i>Anexo 8. Instrucciones que los pacientes recibieron tras la aplicación de los barnices de flúor.</i>	138
<i>Anexo 9. Correlación estadística de los elementos estudiados</i>	139

1

RESUMEN

1.1. RESUMEN

Introducción

Cuando la placa dental no se elimina regularmente, las bacterias descomponen los azúcares en la dieta formando ácidos como subproductos, siendo el ácido láctico el principal ácido involucrado en la aparición de caries. A medida que los ácidos se acumulan en la superficie del diente se genera un desequilibrio en la desmineralización / remineralización que favorece la pérdida de calcio y fósforo. La saliva contiene los microelementos más importantes para la remineralización y maduración del tejido dental y juega un papel crucial en el mantenimiento del entorno oral.

El fluoruro es el agente por excelencia para prevenir y detener las caries evitando la desmineralización y promoviendo la remineralización. La remineralización puede verse obstaculizada por niveles limitados de calcio y fosfato, habiéndose desarrollado nuevos productos para garantizar un suministro constante de estos iones. Dos de los productos más utilizados son el fosfato de calcio amorfo estabilizado con fosfopéptido de caseína (CPP-ACP) y el fosfato tricálcico modificado por ácido fumárico (fTCP).

Objetivos

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto del recubrimiento con CPP-ACP (MI Varnish™) y fTCP (Clinpro™ White Varnish), aplicado trimestralmente a niños con alto riesgo de caries, durante 12 meses, mediante la evaluación del índice de caries, índice de placa y parámetros salivales relacionados con la caries.

Método

Realizamos un ensayo clínico controlado y aleatorizado sobre el efecto de la aplicación de dos barnices, MI Varnish™ (CPP-ACP con fluoruro de sodio al 5%) y Clinpro™ White Varnish (fTCP con fluoruro de sodio al 5%), aplicados cada tres meses en niños con alto riesgo de caries, durante 12 meses. Se incluyeron 58 niños de 4 a 12 años, distribuidos en grupo control (placebo), grupo Clinpro y grupo MI. Evaluamos los cambios a nivel salival en el pH, la concentración de ácido láctico, elementos traza y el recuento bacteriano. Además, medimos el índice de caries (caos/CAOS), el índice de higiene mediante índice de placa de Quigley-Hein modificado por Turesky y el índice de madurez y acidez en placa (IMAP). Registro ISRCTN13681286.

Resultados

A los 12 meses, todos los grupos mostraron un aumento no significativo en los niveles de pH y una reducción en caos/CAOS, ácido láctico y recuento bacteriano total. Hubo una reducción significativa en los niveles de ^{24}Mg , ^{31}P y ^{66}Zn en el grupo placebo ($p < 0.05$), pero no en los otros elementos estudiados: ^{23}Na , ^{27}Al , ^{39}K , ^{44}Ca , ^{52}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{59}Co , ^{63}Cu , ^{75}As , ^{111}Cd , ^{137}Ba , ^{208}Pb y ^{19}F . Además, hubo diferencias estadísticas de los índices de higiene con una mayor reducción de placa en ambos grupos de intervención. El grupo Clinpro ha demostrado estar asociado con mayores reducciones en el índice Turesky QH

PI 2,59 veces (160%) y el índice IMAP 1,54 veces (54%) en comparación con el grupo control.

Conclusiones

Los resultados de este estudio indican que ni el caos/ CAOS, el pH, las concentraciones de ácido láctico, recuento bacteriano o la mayoría de los elementos traza salivales no fueron útiles para monitorear el efecto de MI VarnishTM y ClinproTM White Varnish después de una aplicación trimestral durante 12 meses. Los barnices de fluoruro que contienen CPP-ACP o *f*TCP fueron más efectivos para reducir los niveles de placa en niños con riesgo alto o extremo de caries.

1.2. ABSTRACT

Background

When dental plaque is not regularly removed, bacteria break down sugars in the diet forming acids as by-products. Lactic acid is the main acid involved in caries. As acids accumulate minerals are lost from the surface layer of the tooth. The imbalance in demineralization/remineralization favours the loss of calcium and phosphate from the teeth. Saliva contains the most important microelements for the remineralization and maturation of dental tissue and plays a crucial role in maintaining the oral environment. Fluoride is the agent par excellence in preventing and detaining cavities. However, remineralization may be hampered by limited levels of calcium and phosphate, and new products have been developed to ensure a constant supply. Two of the most used products are amorphous calcium phosphate stabilized with casein phosphopeptide (CPP-ACP) and tricalcium phosphate modified by fumaric acid (*f*TCP).

Objective

The aim of this study is to analyze the effects of coating with CPP-ACP (MI Varnish™) and *f*TCP (Clinpro™ White Varnish), applied quarterly to children at high risk of cavities for 12 months, on saliva, caries index and plaque index.

Methods

We conducted a controlled, randomized clinical trial of the effect of the application of two varnishes – MI Varnish™ (CPP-ACP with sodium fluoride 5%) and Clinpro™ White Varnish (*f*TCP with sodium fluoride 5%) – applied every three months in children with a high risk of caries, for 12 months. We included 58 children aged 4-12 years, assigned to control (placebo), Clinpro and MI groups. We assessed changes in pH, lactic acid concentrations, trace elements and whole bacteria load in saliva at baseline and three-monthly. Additionally, we measured caries index (DMFS/dmfs) and hygiene index by Turesky modification of the Quigley-Hein plaque index scale and the researcher's developed Plaque Maturity and Acidity Index (PMAI). Trial registration ISRCTN13681286.

Results

At 12 months, all groups showed a nonsignificant increase in pH levels and a reduction in dmfs/DMFS, lactic acid, or whole bacterial load. There was a significant reduction in ^{24}Mg , ^{31}P and ^{66}Zn levels in the placebo group ($p \leq 0.05$), but not in the other elements studied: ^{23}Na , ^{27}Al , ^{39}K , ^{44}Ca , ^{52}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{59}Co , ^{63}Cu , ^{75}As , ^{111}Cd , ^{137}Ba , ^{208}Pb and ^{19}F . Furthermore, there were statistical differences within-group with a greater plaque reduction scores of both varnishes. The Clinpro group has shown to be associated with greater reductions in the Turesky QH PI index 2,59 times (160%) and IMAP index 1,54 times (54%) compared with the control group.

Conclusions

Neither dmfs/DMFS, pH, lactic acid concentrations, whole bacterial load or most salivary trace elements were useful in monitoring the effect of MI VarnishTM and ClinproTM White Varnish after three-monthly application for 12 months. The results of this study indicate that fluoride-varnishes containing CPP-ACP or *f*TCP were more effective in reducing plaque levels in children at high or extreme risk of caries.

2

INTRODUCCIÓN

2.1. CARIES DENTAL

2.1.1. GENERALIDADES

El Informe del Programa de Salud Oral Global de la OMS del 2003, ya estimó que 5.000 millones de personas en el planeta habían sufrido caries dental, aproximadamente el 80% de la población mundial ^{1,2}. En 2010, la caries no tratada en dientes permanentes fue la enfermedad más prevalente en todo el mundo, afectando a 2.400 millones de personas, y la caries no tratada en dientes deciduos fue la décima, dañando a 621 millones de niños en todo el mundo ³. Afecta a los países industrializados y, cada vez con mayor frecuencia, a los países en vías de desarrollo, especialmente, a las comunidades más desfavorecidas ⁴.

En España, aunque la prevalencia de la caries dental ha disminuído drásticamente durante las últimas décadas, persisten niveles significativos de la enfermedad. La última encuesta de Salud Oral en España, publicada en el 2015, establece que uno de cada cuatro niños de 5 a 6 años con dientes temporales presenta caries y, a pesar de que el tratamiento en los dientes temporales es igual de importante que en los dientes definitivos, sólo son tratados uno de cada cinco niños. Por otro lado, entre el 33,3% y el 43,2% de los jóvenes con dentición definitiva tiene un promedio entre 0,71 y 1,34 de dientes con caries. En cuanto a la influencia del nivel social y el entorno, el estudio concluye que en niveles sociales bajos y en el medio rural los índices de caries son mayores cuanto más baja es la clase social. Asimismo, se observa un aumento del porcentaje de caries sin tratar ⁵.

Consecuentemente, existe una necesidad urgente de vigorizar los programas de Salud Pública mediante la aplicación de medidas eficaces de prevención de las enfermedades bucodentales y la promoción de la salud bucodental ^{2,6}.

La OMS expone en el Informe Mundial sobre Salud Bucodental de 2003 las políticas y acciones necesarias para una mejora de la misma. La estrategia propuesta es que la prevención de las enfermedades bucodentales y la promoción de la salud oral deben integrarse en el sistema tal y como se lleva a cabo con la prevención de enfermedades crónicas y la promoción de la salud general ¹, ya que constituyen un riesgo para la salubridad general y la calidad de vida ⁷. A pesar de las grandes mejoras conseguidas de la salud oral, siguen siendo un problema de sanidad en numerosos países ^{4,8}.

2.1.2. DEFINICIÓN DE CARIES DENTAL

La caries dental es una enfermedad dinámica, multifactorial, no transmisible, mediada por una biopelícula cariogénico y modulada por la dieta, que resulta en una pérdida de minerales de los tejidos duros dentales determinados por factores biológicos, factores conductuales, factores psicosociales y factores ambientales. Como consecuencia de este proceso, se desarrolla una lesión de caries ⁹.

La caries es una de las enfermedades prevenibles más comunes, reconocida como la causa primaria del dolor oral y de la pérdida de dientes ¹⁰. Dificulta el logro y el mantenimiento de la salud oral en todos los grupos de edad ⁷ y las personas son susceptibles de padecerla

a lo largo de toda la vida ¹¹⁻¹³ pudiendo afectar de manera sustancial a las actividades sociales de los que la padecen. Asimismo, puede interferir en un óptimo crecimiento y desarrollo de los niños ¹⁴.

Los términos caries dental o caries se suelen utilizar para identificar tanto la enfermedad de caries como la lesión cariosa (cavitada o no cavitada) ^{15,16}. En la práctica diaria, los odontólogos, el personal sanitario y los pacientes a menudo se refieren a la caries como una lesión establecida, es decir, una cavidad en el diente. La cavidad, o superficie deteriorada, es la secuela del proceso de la enfermedad y es un signo de enfermedad bastante avanzada ^{9,17}.

La caries además, es una enfermedad crónica que progresa y destruye los dientes lentamente en la mayoría de las personas. No es autolimitada y puede evolucionar hasta producir lesiones con compromiso dentinario, pudiendo llegar a destruir el diente ^{10,12,15,16,18}. No obstante, puede ser detenida o revertida en sus primeras etapas, incluso cuando se observa una cavitación, siempre que se pueda eliminar suficiente biopelícula ¹².

Actualmente se utilizan diferentes criterios diagnósticos de la caries dental (ICDAS, OMS, etc) que van a determinar las decisiones de tratamientos de los profesionales ^{10,19}.

2.1.3. ETIOPATOGENIA DE LA CARIES

La caries dental es el resultado de las interacciones a lo largo del tiempo entre las bacterias que producen ácido, un sustrato que la bacteria puede metabolizar, y muchos factores del huésped que incluyen los dientes y la saliva. La relación normal entre la microbiota residente y el huésped es dinámica y sinérgica y puede alterarse por cambios en el estilo de vida o variaciones en la biología de la boca ²⁰. La caries dental es, por tanto, la consecuencia de un desequilibrio ecológico dentro del equilibrio fisiológico entre los minerales del diente y la biopelícula microbiana oral ¹⁰.

Las superficies dentales están cubiertas por una película adquirida (película acondicionadora de proteínas y glicoproteínas que derivan principalmente de la saliva), que proporciona una zona de unión para la adherencia de las primeras bacterias colonizadoras de la superficie del diente. La microbiota oral crece en las superficies

dentales formando comunidades de especies que interactúan entre sí, organizadas estructural y funcionalmente; es lo que se denomina placa dental ^{21,22}. La placa dental es un ejemplo de biopelícula, cuya formación implica varias etapas ²³. La formación de esta biopelícula es un proceso natural y es un paso esencial para la formación de caries, ya que actúa como una barrera física que impide la difusión de ácidos ^{19,20}. Una vez constituida la biopelícula su composición difiere según la superficie del diente debido a las diferencias en las condiciones ambientales locales ²⁴, tanto en estado de salud como en estado patológico ¹⁰.

Las especies colonizadoras secundarias se adhieren a los primeros colonizadores (co-adhesión), y la complejidad de la biopelícula aumenta. La biopelícula madura y se producen numerosas interacciones microbianas sinérgicas y antagónicas ²⁴. Se forma una matriz orgánica de polisacáridos, que está compuesta de exopolímeros bacterianos (polímeros secretados en el medio externo), que incluyen polisacáridos derivados del metabolismo del azúcar, proteínas y ADN secretado por las células ²⁵. Esta matriz ayuda a retener la biopelícula en la superficie dental y puede influir en la penetración y el movimiento de las moléculas dentro de la biopelícula ^{24,26}. Además, la biopelícula proporciona protección contra la desecación, las defensas del huésped y los depredadores, proveyendo a las bacterias de mayor resistencia a los agentes antimicrobianos.

La presencia de biopelícula en la superficie de un diente no es en sí misma una indicación de que la enfermedad esté presente ^{19,20}. La composición microbiana de la placa es estable a menos que ocurran "alteraciones ambientales" que puedan afectar la homeostasis microbiana y conducir a la disbiosis ^{19,27}. Así, los microorganismos asociados a caries pueden estar presentes en la biopelícula sobre esmalte sano, pero a un nivel o actividad que es demasiado bajo para ser clínicamente relevante ^{20,28,29}.

Los microorganismos de la biopelícula dental [*Streptococcus mutans* en gran medida (*Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*) y *Lactobacillus* spp] producen ácidos orgánicos débiles como un subproducto del metabolismo de los carbohidratos fermentables (azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa) ^{10,30,31}. Los ácidos más frecuentes son el láctico, el acético, el fórmico y el propiónico, los cuales disuelven fácilmente el mineral del esmalte y la dentina. El ácido láctico es el producto final predominante del metabolismo del azúcar y se considera que es el principal ácido involucrado en la formación de caries ²⁰.

A medida que se acumulan los ácidos en la fase fluida de la biopelícula, la actividad de los microorganismos promueve una variación en el ecosistema ¹⁰, provocan un cambio ecológico que produce y mantiene un pH bajo en la superficie del diente ^{31,32}. El pH desciende hasta el punto en que las condiciones en la interfaz biopelícula-esmalte se saturan, y el ácido desmineraliza parcialmente la capa superficial del diente. La pérdida de mineral provoca una mayor porosidad, ensanchamiento de los espacios entre los cristales de esmalte y ablandamiento de la superficie, lo que permite que los ácidos se difundan más profundamente en el diente y se desmineralice el mineral debajo de la superficie (desmineralización subsuperficial) ^{20,33}. Una vez que los azúcares se eliminan de la boca por deglución y por dilución salival, los ácidos de la biopelícula pueden neutralizarse mediante la acción amortiguadora de la saliva ²⁰.

El signo y síntoma de una lesión cariosa, o la desmineralización, se observa macroscópicamente en los tejidos dentales duros. Se puede detectar en la corona (caries coronales) y la raíz (caries de la raíz) de dientes primarios y permanentes, tanto en superficies lisas como en fosas y fisuras. Puede afectar al esmalte (revestimiento exterior de la corona), a la dentina (tejido debajo del esmalte y del cemento) y al cemento (la capa más externa de la raíz) ¹⁰.

La interacción y el desequilibrio entre la desmineralización y la remineralización es determinante para dar lugar a la lesión inicial de caries. Estas implican variaciones subsuperficiales y subclínicas a nivel molecular ^{10,15,16,18}, aunque estos cambios tempranos del esmalte no se detectan con métodos clínicos ni radiográficos tradicionales ¹⁷.

El sistema Internacional de Detección y Valoración de Caries (ICDAS) categoriza las lesiones según hallazgos visuales con una alta correlación histológica, de acuerdo con la gravedad o profundidad de la lesión (**Figura 1**) ^{34,35}.

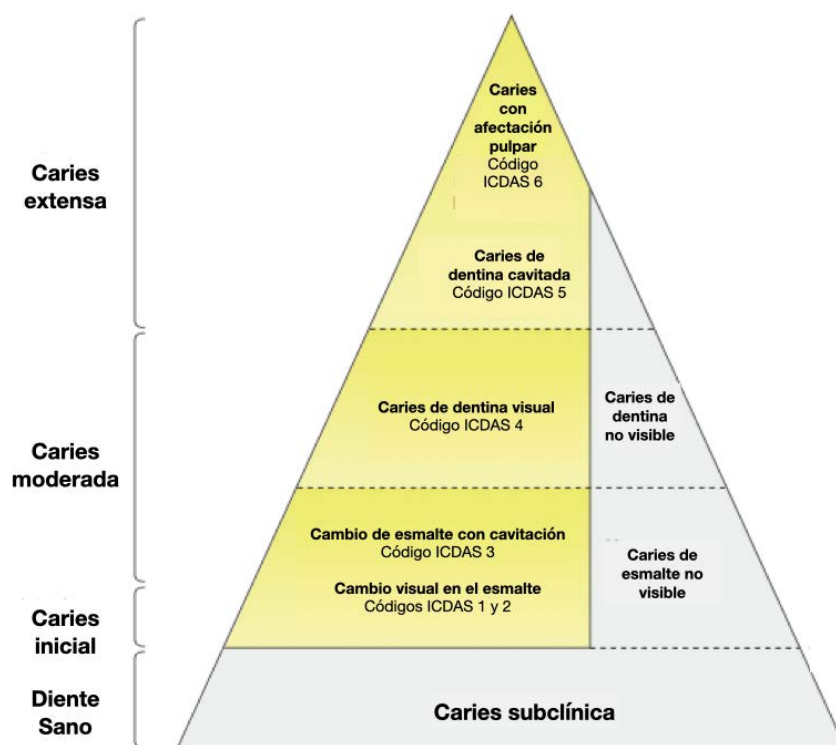


Figura 1. Diagrama de la metáfora del iceberg para la identificación de caries dental. El código ICDAS se utiliza para el diagnóstico de diferentes umbrales de caries. Adaptado de Pitts y colab. 2017.²⁰

Inicialmente la caries dental se observa como lesiones de manchas blancas en el esmalte, que son pequeñas áreas de desmineralización subsuperficial debajo de la placa dental (código ICDAS 1 y 2)^{34,35}. Preservar las zonas de esmalte alterado intacta tiene un tremendo valor clínico para mantener el potencial de detener y revertir las lesiones^{31,32}.

Las lesiones de caries cavitadas se desarrollan cuando la biopelícula oral se deja madurar y permanece durante un período de tiempo en contacto con los dientes³¹, lo que conduce a una pérdida continua de calcio, fósforo y carbonato del diente^{10,33}. Si se permite que se desarrolle una cavidad, se proporciona un nicho ecológico en el que los organismos de la placa se adaptan gradualmente a un pH bajo. La formación de una lesión cavitada (ICDAS 3,4,5 o 6) protege la biopelícula y, a menos que el paciente pueda limpiar este área, el proceso carioso continuará¹⁰ hasta tal punto que puede conducir a una inflamación crónica de la pulpa y a etapas irreversibles de necrosis pulpar y periodontitis apical^{17,36}.

2.2. BALANCE DE CARIES

La caries dental es el resultado de un proceso en el que la estructura mineral cristalina del diente se desmineraliza con ácidos orgánicos producidos por las bacterias de la biopelícula tras el metabolismo de carbohidratos fermentables de la dieta, principalmente azúcares ²⁰.

El componente mineral del esmalte es muy similar a la Hidroxiapatita (HA), un ortofosfato de calcio que se encuentra en la naturaleza. Los cristales de esmalte están constituidos por calcio, fosfato y grupos hidroxilo ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$), en una relación estequiométrica 10:6:2. Sin embargo, pueden presentar sustituciones de iones como magnesio, sodio, cloro, potasio, carbonato, flúor y otros iones que no se encuentran en la HA ideal.

En una situación estable, hay suficientes iones de calcio (Ca^{2+}), fosfato (PO_4^{3-}) y flúor (F) en los alrededores de los cristales para mantener un equilibrio con el fluido que lo rodea (**Figura 2**). Las concentraciones de estos iones determinan el grado de saturación de la solución, de manera que la HA puede disolverse en situaciones de baja saturación de estos minerales y en situaciones de sobresaturación, depositarse minerales en los alrededores del esmalte ^{37,38}.

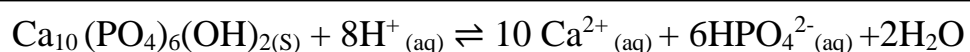


Figura 2. Fórmula equilibrio iónico del esmalte. ³⁸

El progreso, detención o reversión de la caries depende del balance entre la desmineralización y la remineralización ^{17,20,31,32}, la cual se determina por el equilibrio entre los factores de protección y los factores de riesgo o patológicos ^{10,39}. Featherstone describe esto como el “Balance de Caries” ³³ (**Figura 3**).

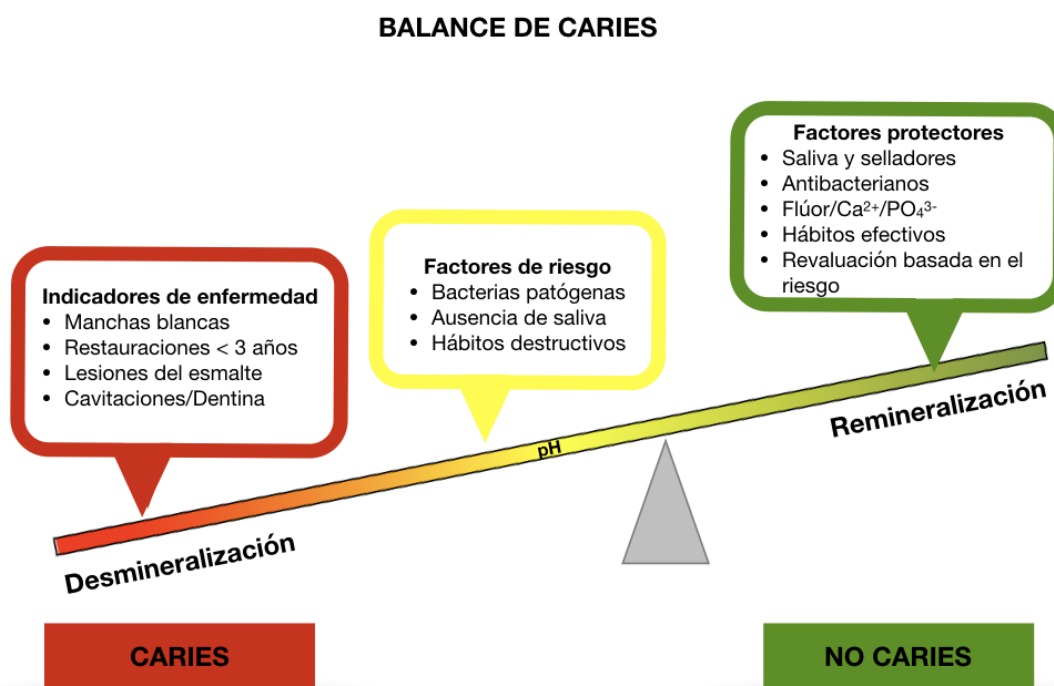


Figura 3. Balance de caries. Modificado de Young y Featherstone, 2013 ²⁰.

Los factores de protección promueven la remineralización y la detención de la lesión, con lo que un enfoque en la optimización de los factores de protección cambiará el equilibrio dinámico del proceso de caries en dirección a la salud o detención de la caries. Mientras que si no se mitigan los efectos de los factores patológicos se promoverá la desmineralización y cambiará el equilibrio dinámico hacia el inicio y progresión de la enfermedad ²⁰.

El proceso de desmineralización y remineralización es dinámico y se lleva a cabo con frecuencia durante el día en la mayoría de las personas ¹⁰.

2.2.1. FACTORES DE RIESGO

La caries dental es una enfermedad multifactorial y compleja que involucra factores personales y/o ambientales, biológicos y aquellos que afectan directamente a la caries, tal y como se representa en la **Figura 4**^{40,41}.

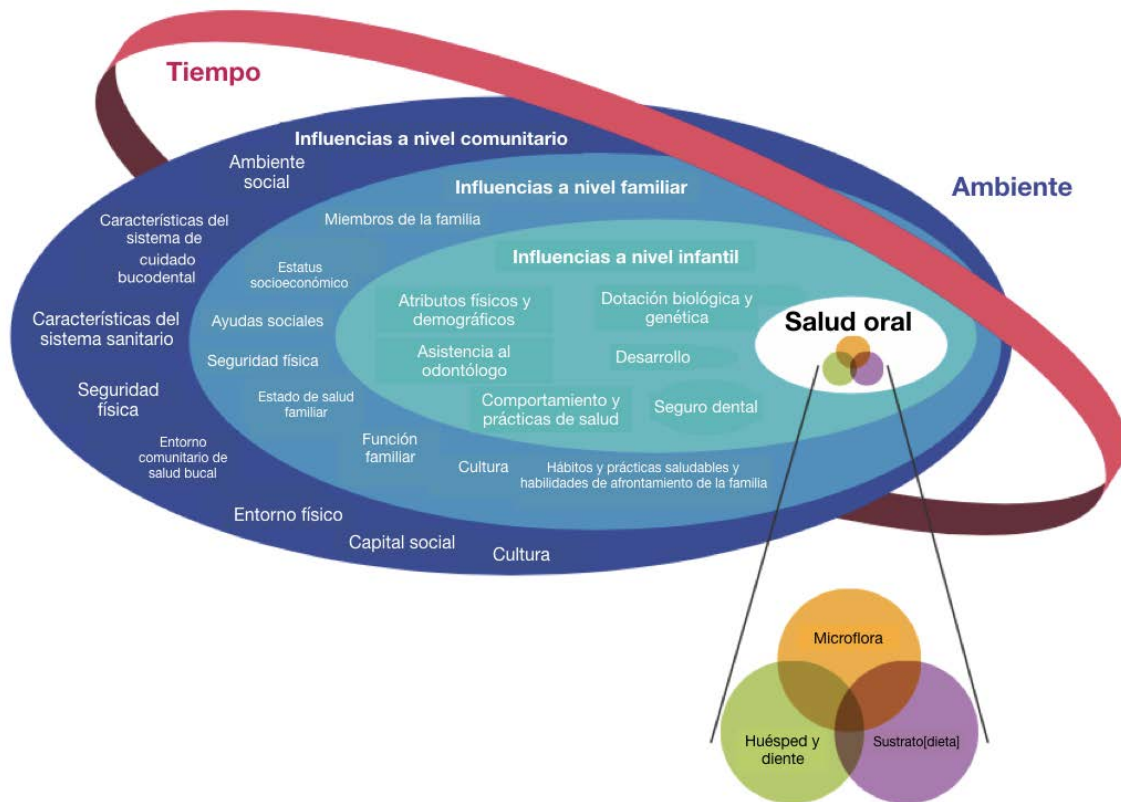


Figura 4. Ilustración de los factores involucrados en el desarrollo de caries. Fuente: Fischer-Owens SA y colab. 2007⁴².

A. FACTORES PERSONALES Y/O AMBIENTALES

Son aquellos factores relacionados con la vida de una persona y su estilo de vida y no forman parte de una condición o estado de salud. Entre estos encontramos:

- Nivel socioeconómico:
 - Ingresos.
 - Actividad Laboral.
- Nivel sociodemográfico:
 - Vivienda.
 - Habitantes por vivienda.
- Educación:
 - Nivel de educación alcanzado.
 - Nivel de conocimientos específicos, concretamente, de la salud oral.
- Sistema de Atención Sanitario:
 - Cobertura de salud.
 - Acceso a Servicios de Salud.
- Factores conductuales (estilo de vida y comportamiento):
 - Higiene oral deficiente.
 - Malos hábitos dietéticos, es decir, consumo frecuente de carbohidratos refinados (picoteo).
 - Uso frecuente de medicamentos orales que contienen azúcar.

B. FACTORES BIOLÓGICOS

Estos factores incluyen:

- Microbiota:
 - Presencia de biopelícula/placa dental.
 - Presencia de microorganismos con significación biológica.
- Consumo de carbohidratos:
 - Frecuencia diaria de consumo de carbohidratos.
 - Características de los carbohidratos consumidos.

- Estado dentario:
 - Presencia y actividad de lesiones de caries.
 - Presencia de zonas de mayor susceptibilidad a la desmineralización.
 - Zonas de retención a nivel dental.
 - Historia pasada de caries.
- Saliva:
 - Cantidad de saliva.
 - Características de la saliva.
 - Enfermedades sistémicas o tratamientos.

Las últimas investigaciones están ayudando a plantear el tratamiento de la caries desde un punto de vista biológico y poder así brindar prevención y atención, tanto a nivel poblacional como a nivel individual ²⁰.

C. FACTORES ÍNTIMAMENTE RELACIONADOS CON LA CARIES DENTAL

a. Microbiota

La boca, al igual que otras superficies del cuerpo, está colonizada desde el nacimiento por una gran variedad de microorganismos, conocidos colectivamente como la microbiota oral ⁴³. El grupo más común de microorganismos son las bacterias, pero pueden estar presentes levaduras, virus, micoplasmas, protozoos y arqueas. La microbiota oral tiene una relación simbiótica o mutualista con el huésped ⁴⁴.

La saliva tiene un papel crucial en el mantenimiento de esta microbiota al mantener el ambiente bucal en un pH neutro, que es óptimo para el crecimiento y el metabolismo de la mayor parte de la microbiota oral, al tiempo que proporciona proteínas y glicoproteínas como nutrientes ²⁰.

En los últimos años, el uso de técnicas de secuenciación de segunda generación y metagenómica han descubierto un ecosistema extraordinariamente diverso en el que el *S. mutans* representa sólo el 0,1% de la comunidad bacteriana en la placa dental y el 0,7-1,6% en las lesiones cariosas ²⁹.

El ecosistema oral en sí no es estable. A lo largo de la vida un individuo sufre múltiples cambios fisiológicos mientras progresa a través de la infancia, la niñez, la adolescencia, la adultez y la vejez ^{45,46}.

La dieta (principalmente azúcares libres), la higiene bucal y los factores salivales son los factores que contribuyen a la disbiosis, lo que lleva a un cambio en la microbiota hacia microorganismos acidógenos y acidúricos ^{19,47}. Este riesgo disminuye en aquellas personas con un nivel apropiado de saliva, higiene oral y exposición al flúor ²⁰.

Por ello, actualmente el gran desafío en la investigación de caries es lograr un cambio en la biopelícula dental en el que de un estado de disbiosis se pase a un estado de simbiosis constituyendo una nueva herramienta preventiva ^{27,47-50}.

b. Dieta

No habrá presencia de caries en ausencia de una biopelícula dental cariogénica (es decir, patógena) y una exposición frecuente a carbohidratos en la dieta, principalmente azúcares libres (fundamentalmente sacarosa⁵¹) ^{19,52,53}. Por lo tanto la caries puede considerarse una enfermedad dietética-microbiana ⁵⁴.

La sacarosa (azúcar común) juega un papel muy importante ya que es el único sustrato de las glucosiltransferasas (enzimas bacterianas) implicadas en la síntesis de glucano extracelular, que es un importante factor de virulencia microbiana ⁵⁴. El producto final predominante del metabolismo de los azúcares es el ácido láctico, que se considera el principal ácido involucrado en la formación de caries ²⁰.

La cariogenicidad de los almidones en comparación con la de los azúcares es controvertida ⁵⁵. Los alimentos altamente procesados que contienen almidón tienen el potencial de ser cariogénicos especialmente cuando se combinan con azúcares, ya que pueden prolongar la retención de alimentos en las superficies de los dientes ⁵⁶. La prevalencia de caries derivada del consumo de carbohidratos fermentables de la dieta depende de los patrones de consumo de azúcar, la consistencia, el tipo, la cantidad y la frecuencia ⁵⁷, del mismo modo que de los hábitos después de su ingestión (higiene bucal, uso de fluoruros) ⁵⁴.

Aunque puede haber diferencias sexuales o étnicas, tienen menor significación en comparación con factores como el consumo de azúcar. Esta situación se ha vuelto más compleja debido a la velocidad del desarrollo económico y los rápidos cambios en los hábitos y la dieta en muchos países ²⁰.

La efectividad de las medidas dietéticas para controlar la caries es limitada porque las dietas modernas son complejas y contienen muchos azúcares naturales, azúcares refinados y sustitutos del azúcar. Sin embargo, reducir la cantidad y la frecuencia del consumo de azúcar, incluidos los "azúcares ocultos" en muchos alimentos procesados, es importante para las personas con alto riesgo de sufrir caries ⁵⁸.

Existe una amplia gama de sustitutos del azúcar que tienen un potencial cariogénico bajo o nulo, por ejemplo, la sucralosa (edulcorante no cariogénico de alta intensidad) y el xilitol. Existen autores que defienden las propiedades anticariogénicas del xilitol ⁵⁹, sin embargo, otros recogen que su efecto anticaries es controvertido ^{60,61}.

c. Huésped

Componentes genéticos

Se ha demostrado que las características genéticas del huésped influyen en las propiedades del tejido duro dental ⁶², así como en la saliva ^{45,63} y en el sistema inmune ⁶⁴ e incluso el comportamiento del individuo, como por ejemplo en sus preferencias gustativas ⁶⁵.

Los componentes genéticos influyen en la calidad y cantidad del esmalte que podría intervenir tanto en la adherencia bacteriana como en la resistencia del esmalte al pH ácido, modulando así, la susceptibilidad de las superficies a la caries dental ⁶⁶.

La respuesta inmune se asocia a la inhibición y colonización de microorganismos y, por consiguiente, la resistencia o susceptibilidad de un individuo a la caries varía en función del genotipo de los elementos inmunes que aparecen en la saliva ⁶⁶.

Las preferencias dietéticas se modulan genéticamente y los genes implicados pueden desempeñar un papel en el desarrollo de los hábitos alimenticios. Además, la cultura puede influir significativamente en la percepción del gusto y los pocos estudios que

informan sobre la heredabilidad de la preferencia dulce en los niños han estudiado poblaciones culturalmente diferentes ⁶⁶.

El diente

La particularidad de las condiciones ambientales que existen en cada zona del diente explica la localización de la caries dental en determinadas regiones. Se puede observar caries en una superficie de un diente y no en la superficie adyacente, incluso cuando ambas parecen estar cubiertas por la misma biopelícula. Además existen factores que afectan a la solubilidad del diente (composición dental, estructura...) así como características del propio diente que alteran el espesor de la biopelícula (morfología de los dientes, malposiciones...) y pueden conducir a una mayor disolución del mineral a pH bajo y/o acumulación de placa que aumentaría el riesgo de caries ^{20,23}.

2.2.2. FACTORES PROTECTORES

Son factores biológicos, o medidas terapéuticas, que compensan los factores de riesgo de caries. Es decir, son aquellos que favorecen la salud de los dientes (**Figura 4**) ²⁰.

Cuanto más severos sean los factores de riesgo, mayor intensidad se requerirá de los factores protectores para mantener el balance o revertir el proceso de caries. Estos factores incluyen una variedad de productos e intervenciones:

- Aplicación de antibacterianos.
- Selladores.
- El flúor.
- Productos con fosfatos de calcio, aislados o en combinación con el flúor.
- Saliva.
- Hábitos de vida efectivos contra la caries.
- Reevaluaciones de riesgo de caries.

Todo ello ayuda a mantener al paciente en equilibrio y a favorecer la remineralización, lo que permite que se lleve a cabo el proceso de reparación natural del diente ante lesiones cariosas tempranas ^{67,68}.

A. LA SALIVA

La saliva es un fluido corporal complejo, esencial para la salud de la cavidad oral. Se origina principalmente en tres pares de glándulas salivales mayores (glándulas parótidas, submandibulares y sublinguales) y en numerosas glándulas salivales menores situadas en la submucosa oral. Se compone principalmente de 99,5% de agua, 0,3% de sustancias orgánicas (proteínas, vitaminas, lípidos, sustancias similares a las hormonas, aminoácidos libres, urea, microbios, células descamadas del epitelio oral, sustancias antimicrobianas, restos de expectoración bronquial y restos de comida) y 0,2% de trazas y sustancias inorgánicas (cloruro, sodio, fósforo, calcio, potasio, nitrógeno, oxígeno, bicarbonato, dióxido de carbono disuelto y oligoelementos) ⁶⁹. Además se mezcla con el líquido crevicular gingival ⁶⁹.

La saliva es uno de los sistemas de defensa innatos del cuerpo humano que protege los dientes ^{69,70,71}. Sus constituyentes y propiedades juegan un papel esencial para evitar la aparición y progresión de la caries dental ⁷⁰. Esta protección puede realizarse a través de varios mecanismos, como la eliminación de residuos de alimentos y el azúcar, la agregación y la eliminación de microorganismos, la capacidad de amortiguación para neutralizar el ácido, mantenimiento de la sobresaturación de iones Ca^{+2} y PO_4^{3-} , ayuda a la formación de la biopelícula del esmalte y la defensa antimicrobiana ⁷². Cada función protectora puede incluir varios componentes salivales, y algunos componentes salivales contribuyen a más de una función protectora ^{70,71}.

Además, es la fuente más importante de iones alrededor de los dientes ²⁰ y es el agente remineralizante natural por excelencia ⁷³. En el proceso de remineralización ayuda a mantener la sobresaturación de los minerales, inhibiendo, así, la desmineralización de los dientes durante períodos de pH bajo, y favoreciendo la remineralización del diente descalcificado ⁷⁴.

Las glicoproteínas que se adhieren al esmalte para formar la biopelícula temprana atraen iones Ca^{+2} , y las fosfoproteínas regulan la saturación del Ca^{+2} , uniendo y estabilizando el

Ca^{2+} y el Fósforo (P). Las proteínas ácidas ricas en prolina (PRP) se unen fuertemente a la HA y a iones Ca^{2+} y son capaces de permitir la formación de nuevos cristales ⁷⁵. Las estaterinas poseen afinidad a las superficies minerales e inhiben la precipitación espontánea de las sales de Ca^{2+} , evitando la formación de sialolitos ^{70,76}. Por lo tanto, el fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) no se precipita en la saliva, debido a la presencia de dichas proteínas salivales aunque sí permiten que se precipite sobre el esmalte de forma controlada efectuando la remineralización de la lesión por parte de la saliva ⁷⁷. Las histatinas, las cistatinas y las mucinas también pueden participar en estos mecanismos, pero en menor medida ⁷⁰.

La saliva, además, aporta iones bicarbonato (HCO^-) y PO_4^{-3} que al capturar el exceso de protones (H^+) ejerce una función buffer y evita la caída del pH del medio bucal, jugando un papel crucial en el mantenimiento del equilibrio de la microbiota ⁷⁸. A pH fisiológico, la saliva está sobresaturada de minerales y es capaz de suministrar iones Ca^{+2} y PO_4^{-3} biodisponibles al diente ⁷⁷. El $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y las glicoproteínas forman un complejo denominado precipitina salival que se incorpora fácilmente en la placa dental. Este $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ asociado a las proteínas salivales presenta una solubilidad entre ocho a diez veces superior a la del fosfato de calcio del diente y se disuelve preferentemente antes que el mineral del diente, reduciendo la desmineralización ⁷⁴.

La saliva representa el medio inicial en el que se liberan el fluoruro y el resto de iones ⁷⁹. Contiene, por lo tanto, los microelementos más importantes para la remineralización y maduración del tejido dentario como calcio, sodio, magnesio, zinc y flúor ^{77,80,81}. Por ello ha sido ampliamente estudiada como un posible indicador de susceptibilidad a la caries ^{80,82}.

Transfiere constantemente fluoruro a la superficie del diente para prevenir la desmineralización de los dientes y mejorar la remineralización ⁷⁴. Por lo tanto, la saliva es un vehículo clave para fomentar la remineralización del esmalte permitiendo una importante difusión iónica y favoreciendo el proceso de remineralización ⁸³. No obstante, hay evidencia limitada de estudios en humanos que respaldan el efecto anti-caries al que contribuyen los electrolitos salivales naturales ⁷⁰. La remineralización conseguida es poca y lenta, alcanzándose una mayor remineralización en la superficie de la lesión y menos en el interior de la misma al existir un menor gradiente de concentración ^{76, 77}. Además

esta remineralización de superficie no mejora la estética ni mejora las propiedades estructurales de la lesión subsuperficial ⁷⁷.

B. FLÚOR

El descubrimiento del fluoruro como agente que podía prevenir la caries dental fue uno de los hitos más importantes en odontología ^{84,85}. Más de 50 años de investigación han demostrado consistentemente la seguridad y efectividad de los compuestos fluorados en la prevención de la caries dental. La acción principal del flúor es prevenir la desmineralización del tejido dental durante la bajada del pH salival enlenteciendo la progresión de la lesión de caries. Esto lo consigue incrementando el umbral de la desmineralización. Además, favorece el depósito de minerales (remineralización) durante el periodo de pH neutro. Esta base conceptual implica la necesidad de aplicar compuestos fluorados con regularidad a lo largo del día, siendo el uso de la pasta dental fluorada la única forma que ha demostrado efectividad ⁸⁶.

2.2.3. PROCESO DE DESMINERALIZACIÓN

La desmineralización es el proceso de disolución de los cristales de HA con la eliminación de los iones que la componen. Esto sucede a un pH bajo ($\pm 5,5$), cuando el medio ambiente oral presenta una baja saturación de iones en relación al contenido mineral del diente ⁷⁴.

La desmineralización sucede en la interfase diente/biopelícula. En primer lugar, las bacterias metabolizan carbohidratos fermentables produciendo ácidos orgánicos como ácido láctico, acético, propiónico, butírico y succínico. Estos ácidos, que condicionan un medio con pH bajo, son capaces de liberar H^+ que se difunden entre los cristales de HA del diente, preferentemente en las zonas susceptibles o defectuosas de la superficie del esmalte ¹⁰. El grado de disolución del esmalte será proporcional a la concentración de H^+ ⁸⁷. Durante el ataque ácido, los H^+ liberados reaccionan con los iones PO_4^{3-} y los grupos hidroxilo (OH^-) de la HA para formar fosfatos primarios (HPO_4^{2-}), fosfatos secundarios ($H_2PO_4^-$), ácido fosfórico y agua. Todo ello provoca una disminución de la concentración de los iones PO_4^{3-} y OH^- , creando un estado de subsaturación de estos iones que favorece que se sigan perdiendo más fosfatos. Este proceso finalmente conduce a la pérdida de Ca^{+2} del diente y provoca una mayor porosidad en la superficie y un ensanchamiento de

los espacios intercrystalinos, lo que permite que los ácidos se difundan profundamente y se desmineralice el mineral debajo de la superficie (**Figura 5**)³⁷.

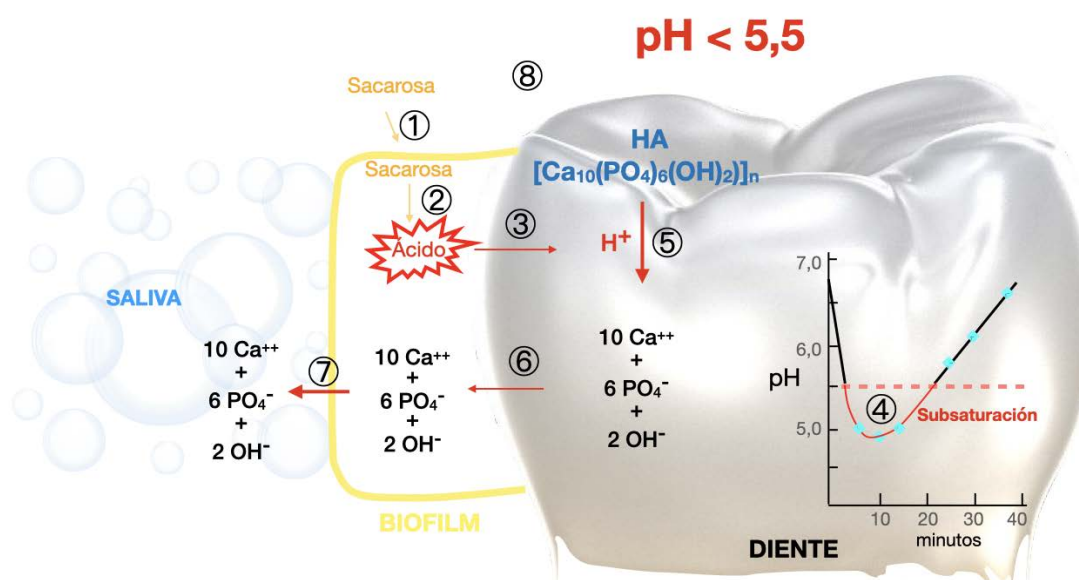


Figura 5. Desmineralización del esmalte por la biopelícula: ingestión de azúcar (1); transformación de azúcar en ácido (2); difusión de ácido (3); el pH baja hasta 5,5 (4) y disolución de HA (5,6,7). (Imagen cedida por Tenuta & Cury, 2005).

Los cristales que se desmineralizan en la subsuperficie pueden aportar iones suficientes para crear una solución supersaturada que conduzca a la remineralización de la superficie. De esta forma, coexiste una zona superficial mineralizada con una zona subsuperficial desmineralizada. Es lo que se denomina “*desmineralización subsuperficial*”²⁰. Esta es la primera etapa de desmineralización que se produce a nivel atómico, mucho antes de que pueda ser visualizada como una lesión de mancha blanca³³.

La desmineralización es un proceso reversible en sus primeras etapas si se produce un aporte de calcio y fosfato para crear soluciones supersaturadas de estos iones en la fase líquida de la biopelícula; y es un proceso prevenible si se produce un aporte de fluoruro que creará fluorapatita cuyo punto crítico de disolución es inferior a 5,5^{10,74}.

2.2.4. PROCESO DE REMINERALIZACIÓN

La remineralización dental es el proceso de reparación natural mediante el cual se llevan minerales del ambiente circundante (saliva, biopelícula) a las estructuras dentales parcialmente desmineralizadas ^{74,88}.

Una vez que los azúcares se eliminan de la boca por deglución y por dilución salival, los ácidos de la biopelícula pueden neutralizarse mediante la acción amortiguadora de la saliva, que actúa como tampón, y el pH del fluido de la biopelícula vuelve a la neutralidad ²⁰.

Durante la remineralización se produce una precipitación de minerales sobre la superficie del esmalte, que provienen de iones liberados a partir de soluciones sobresaturadas ^{77,89,90}. Cuando el pH aumenta (baja la concentración de H⁺), los iones PO₄³⁻, OH⁻ y Ca⁺² quedan disponibles para reconstruir los prismas que han perdido iones. El Ca⁺² y el PO₄³⁻, provienen principalmente de la saliva que mantiene siempre los iones en estado de supersaturación unidos a pequeñas proteínas salivales. También pueden proceder de otras fuentes tópicas como barnices o pastas dentales. El Ca⁺² y el PO₄³⁻ se difunden hacia la biopelícula y desde ahí hacia el diente y se precipitan en los restos de cristal existentes, en lugar de formar nuevos cristales (**Figura 6**) ³³.

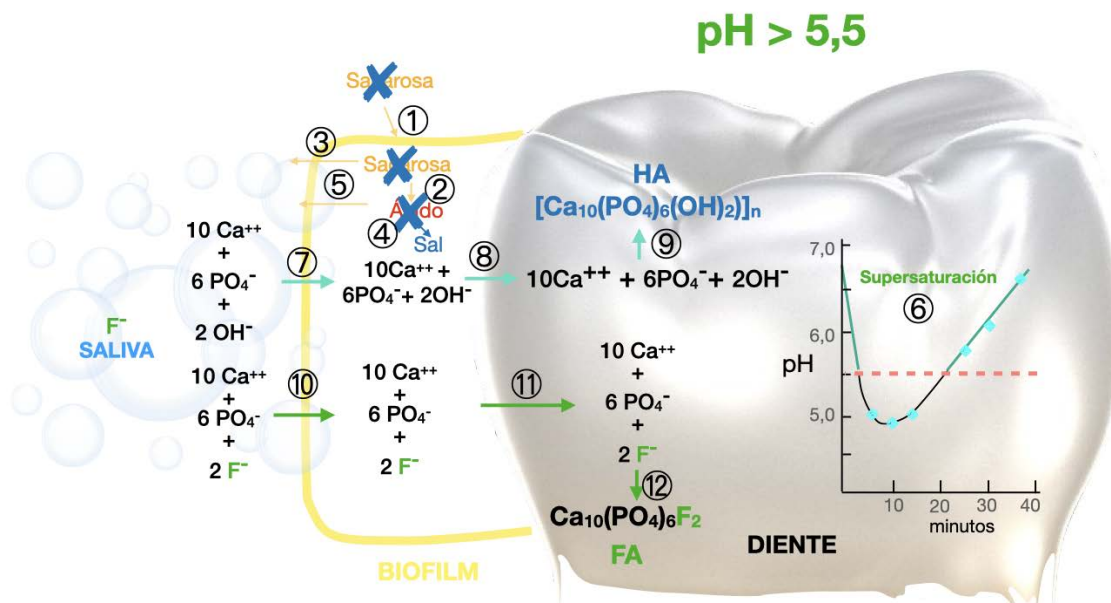


Figura 6. Remineralización de esmalte bajo la presencia de iones de fluor en la biopelícula y/o saliva: interrupción de la ingestión de azúcar (1); detención de formación de ácido (2); dilución y neutralización de los ácidos (3,4,5); vuelta del pH a la normalidad (6); supersaturación del medio en relación a HA (7,8);

precipitación de HA (9); supersaturación del medio en relación a FA (10,11) con precipitación de FA (12). (Imagen cedida por Tenuta & Cury, 2005).

El proceso de remineralización deposita el mineral de forma diferente a como ocurre durante la mineralización y maduración del esmalte en desarrollo, rehaciendo una estructura prismática con una forma diferente a la original. Por las características de microporosidad del esmalte y su intensa cinética de intercambio de iones con el medio, la hidroxiapatita del esmalte puede reemplazar los fosfatos por iones de carbonato, el calcio por iones de sodio y los hidroxilos por iones fluoruro, y da como resultado apatitas de mayor complejidad y con propiedades físicas y químicas diferentes ⁷⁷.

Las áreas remineralizadas tienen una mayor concentración de fluoruro y una estructura de esmalte microporosa menor que la estructura dental original ¹⁰. La nueva superficie de cristal, compuesta de hidroxiapatita fluorada y fluorapatita [FA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$)], es mucho menos soluble y más resistente al ataque ácido que la estructura original; consecuentemente, el esmalte es más resistente a la desmineralización ³³.

A. FLÚOR

El fluoruro sigue siendo el material “gold standard” para detener las lesiones de caries. Se han publicado múltiples revisiones sistemáticas que confirman el papel exclusivo de los productos de fluoruro en la prevención de la caries dental ⁹¹⁻⁹⁷. Funciona principalmente a través de mecanismos tópicos ^{98,99} y, para ello, debe encontrarse presente en el lugar correcto y en el momento adecuado para interferir con los procesos de desmineralización y favorecer la remineralización ¹⁰⁰.

El flúor oral está presente como flúor estructural incorporado en los cristales de fluorapatita, como flúor lábil unido de forma laxa a la apatita de la superficie del esmalte y como ión que forma parte de los depósitos de fluoruro cálcico (CaF_2) que se crean tras los tratamientos con altas concentraciones de flúor ^{37,76}.

El ion fluoruro también posee propiedades antimicrobianas y puede inhibir la síntesis de glucano de las bacterias cariogénicas. La acción antibacteriana se debe a la acidificación del citoplasma bacteriano a través de la formación de iones H^+ y F^- a partir del fluoruro de hidrógeno y la alteración de su metabolismo. Las concentraciones necesarias para tener un efecto antibacteriano significativo son mucho mayores que las necesarias para reducir

la solubilidad del esmalte ¹⁰¹ y no está claro cuánto contribuyen los mecanismos antimicrobianos del fluoruro a sus efectos preventivos ^{102,103}.

El flúor se puede emplear de forma sistémica y tópica. El fluoruro administrado por vía sistémica se incorpora al esmalte durante el periodo de maduración cristalina favoreciendo la formación de cristales de FA y fluorhidroxiapatita {FHA, $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OHxFy})]}$ ¹⁰⁴. El flúor tópico, tiene su aplicación en el periodo posteruptivo favoreciendo la maduración posteruptiva del esmalte y transformando los cristales de HA a estructuras menos solubles como son la FAy FHA que tienen mayor resistencia a la desmineralización (**Figura 6**) ^{105,106}.

Encontramos diferentes formas de aplicación de flúor: geles, pastas, barnices, enjuagues etcétera. Los barnices de fluoruro aplicados tópicamente se han utilizado ampliamente como prevención de la caries ¹⁰⁷ y este formato se desarrolló para prolongar el tiempo de contacto entre el fluoruro y la superficie del diente ¹⁰⁸.

La facilidad de uso, aceptabilidad y eficacia convierten a los barnices en una herramienta importante en la prevención de la caries dental en grupos de alto riesgo ^{107,109-111}. De hecho, el Consejo de la Asociación Estadounidense de Asuntos Científicos recomienda que el barniz de fluoruro sea el producto de elección de aplicación profesional en pacientes de riesgo moderado a alto de caries en todos los grupos de edad ¹¹².

a. Inhibición de la desmineralización

La incorporación de los fluoruros como componente estructural, formando parte de la fluorapatita o fluorhidroxiapatita, solo reduce ligeramente la solubilidad del esmalte ³⁷. Sin embargo, la presencia de cantidades de flúor en solución alrededor del diente inhibe la desmineralización de manera más efectiva y tiene un potencial anticariogénico mayor ^{37,76}.

Durante la desmineralización hay una entrada de flúor y otros iones, que provienen de la saliva o de la placa, en las zonas porosas del esmalte. Estos iones flúor se encuentran en una fase líquida entre los cristales ¹⁰⁰ y están en un equilibrio dinámico con los iones flúor de las zonas vecinas ¹¹³. Cuando el nivel de flúor en la saliva se reduce, también lo hace en la lesión. Cuando el nivel de flúor es alto, los cristales de la superficie del esmalte que están en contacto con el mismo, absorben el flúor al unirse en los lugares dejados por el

OH^- ¹⁰⁰. La adsorción de F en los cristales ofrece protección directa ante la desmineralización debido a su menor solubilidad ⁷⁵. Este mecanismo fisicoquímico se produce cada vez que el pH cae en el fluido de la biopelícula; si el fluoruro está presente, la cantidad de mineral disuelto se reduce ya que parte del Ca y fósforo inorgánico (Pi) que se pierde de la hidroxiapatita regresa al diente ¹¹⁴. Esta nueva deposición de minerales perdidos dará lugar a la formación de fluorapatita en la superficie del esmalte aunque no en las zonas subsuperficiales ¹⁰⁰ y por lo tanto, este proceso se podría considerar como una reducción de la desmineralización (**Figura 7**) ^{100,114}.

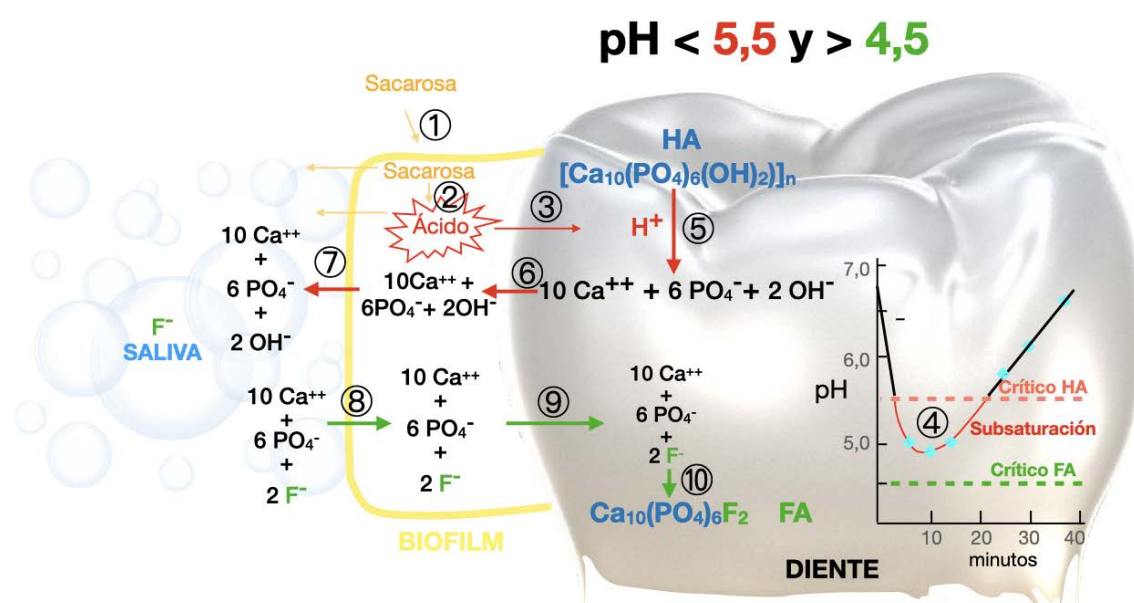


Figura 7. Remineralización de esmalte bajo la presencia de iones de fluor en la biopelícula y/o saliva: ingestión y transformación de azúcar en ácido (1,2); difusión de ácido (3); el pH queda por debajo del valor crítico para HA ($5,5$), aunque por encima del pH crítico (>4,5) para la disolución de FA (4); disolución de HA (5,6,7) y concomitante formación de FA (8,9,10). Imagen cedida por Tenuta & Cury, 2005.

Conjuntamente, la aplicación de productos con flúor crea depósitos de fluoruro intraoral en forma de fluoruro de calcio (CaF_2) que se retienen en el esmalte y en la placa dental y se liberan lentamente para ayudar a inhibir la pérdida mineral durante la desmineralización ^{37,76}. Estos depósitos se mantienen estables y son más resistentes al ácido por la presencia de fosfato y proteínas que lo ligan al diente. Durante el ataque ácido este flúor es más importante que altas concentraciones de fluorapatita en los cristales del esmalte ^{37,76}.

La concentración de fluoruro necesaria para crear los depósitos de CaF_2 se puede alcanzar también después de consumir alimentos que contienen fluor, ya que el contenido de F^- en la saliva aumenta significativamente durante aproximadamente 30 minutos después de su consumo. Se puede deducir que el agua potable fluorada y la sal de mesa también funcionan de acuerdo con este mecanismo ya que la formación de CaF_2 es poco probable a bajas concentraciones de F^- y a pH bajo ³⁷.

b. Acción remineralizante

El flúor acelera el proceso de remineralización, se consume durante la remineralización y forma parte integral de la nueva capa de la superficie del cristal ³³.

A pH de 5,5, las concentraciones de iones calcio y fosfato en la biopelícula no son suficientes para mantener el esmalte en un equilibrio estable y, por tanto, comienza a disolverse. Los cristales que quedan parcialmente desmineralizados sirven como núcleo para la remineralización y el F^- presente en el medio oral, por su alta reactividad, desplaza los OH^- para remineralizar las estructuras cristalinas de la lesión al unirse a los iones de calcio y fosfato tras el ataque ácido. El contenido FA y FHA aumenta a expensas de la hidroxiapatita rica en carbonatos o de la hidroxiapatita pura ^{37,76,100,115,116}. El F^- también puede estimular la transformación de algunas fases de fosfato de calcio, como el fosfato octacálcico o el fosfato dicálcico dihidratado, a FA o FHA ^{115,116}.

Estos cristales, de mayor complejidad y con propiedades físicas y químicas más resistentes, disminuyen la porosidad del esmalte y aumenta su resistencia al ácido (la disolución comenzaría a un pH de 4.5) ^{37,76,116}.

La capacidad remineralizante del flúor depende de la disponibilidad de iones calcio y fosfato ^{20, 77,115,117,118,119}. En consecuencia, una cantidad inadecuada de estos iones pueden limitar la remineralización del esmalte cuando se aplica tópicamente el fluoruro y puede ser un factor limitante en la aplicación de los sistemas remineralizantes a base de flúor ¹²⁰.

El flúor consigue una mayor remineralización de la zona superficial de la lesión, debido a una disminución de la porosidad en la superficie del esmalte tras la remineralización inicial. Para aumentar los gradientes de difusión que favorezcan la remineralización más

rápido y más profundamente, se han desarrollado productos remineralizantes que aportan iones estabilizados de Ca^{+2} y PO_4^{-3} ⁸⁴.

B. SISTEMAS DE CALCIO Y FOSFATO

Desde hace muchos años se ha reconocido que la actividad anticaries de la leche y los productos lácteos se debe a la proteína mayoritaria de la leche (caseína) y a las altas concentraciones de iones solubles de Ca^{+2} y PO_4^{-3} que contienen. Sin embargo el uso clínico de soluciones de fosfato y calcio para la remineralización del esmalte no resultó eficiente pues precipitaban cristales insolubles de fosfato de calcio sin aportar sus iones al esmalte. Por ello, se intentó reproducir el sistema existente en la leche con los complejos de caseína, calcio y fosfato ¹²¹.

Existen diferentes tipos de sistemas remineralizantes cuyo principal inconveniente es su baja solubilidad, especialmente en presencia de los iones flúor. Si se usaran en altas concentraciones para proporcionar una cantidad elevada de iones, se generaría inestabilidad en las soluciones ^{77,122,123}.

Los sistemas de calcio y fosfato se clasifican en: sistemas de calcio amorfo inestable, sistemas de calcio amorfo estabilizado y sistemas de fosfato de calcio cristalino ^{77,124}.

2.3. AGENTES REMINERALIZANTES BASADOS EN LOS SISTEMAS DE CALCIO Y FOSFATO

2.3.1. FOSFATO DE CALCIO AMORFO INESTABLE

El sistema de fosfato de calcio amorfo (ACP) fue descrito por primera vez por Aaron S. Posner a mediados de la década de 1960. Es la fase sólida inicial que precipita de una solución de fosfato cálcico altamente sobresaturada y puede convertirse fácilmente en fases cristalinas estables, como fosfato octacálcico o productos apatíticos. Se ha demostrado que la ACP tiene mejor osteoconductividad in vivo que la hidroxiapatita, mejor biodegradabilidad que el fosfato tricálcico, buena bioactividad y carece de citotoxicidad ¹²¹.

El ACP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), es un precursor de la HA, que exhibe una gran solubilidad y se convierte inmediatamente en HA, lo que lo hace adecuado para ser agente mineralizante. La principal ventaja del ACP es su fácil formulación en fase sólida y su biocompatibilidad con tejidos duros y blandos, que es igual a la de la hidroxiapatita y varios fosfatos di-,tri- y tetracálcico ¹²⁵.

En los sistemas de ACP el mecanismo remineralizante está basado en la liberación de iones de Ca y P tras la disolución de las sales que contienen estos iones. La liberación de estos iones produce uniones entre los mismos que generan de nuevo ACP, que al exceder su solubilidad precipita, y en presencia de iones flúor forma fosfato de calcio amorfo fluorado (ACPF). El inconveniente de las formulaciones remineralizantes que contienen ACP y ACPF es su inestabilidad en el medio oral ya que pueden transformarse en una fase termodinámicamente más estable constituida por cristales de hidroxiapatita y fluorhidroxiapatita (fase cristalina). Antes de esta transformación cristalina los iones deben permanecer disponibles para promover la remineralización de la lesión subsuperficial, y como la transformación ocurre con bastante rapidez se reduce la biodisponibilidad de los iones calcio y fosfato ⁷⁷ dificultando su incorporación a la placa dental y a la superficie del esmalte ¹²⁵. Además, puede promover la formación de cálculo dental ¹²⁴. Por otro lado, su aplicación se limita a bajas concentraciones ya que, si se sobrepasan se vuelve insoluble ¹²⁵. Para superar todas estas dificultades se han desarrollado los sistemas estabilizados ¹²⁴.

2.3.2. FOSFATO DE CALCIO AMORFO ESTABILIZADO

El fosfato de calcio amorfo estabilizado con proteínas derivadas de la caseína de la leche de vaca o Recaldent™ (CPP-ACP) fue desarrollada por Eric Reynolds y colaboradores en la Universidad de Melbourne en 1998. Es una tecnología basada en el empleo de proteínas estabilizantes del calcio y el fosfato. Dentro de las proteínas estabilizantes se incluye la caseína de la leche y las estaterinas salivales que, junto con iones fluoruro de otras fuentes externas, mantienen los iones de calcio y fosfato en una forma biodisponible en la superficie del esmalte desmineralizado durante un período de tiempo gracias a su unión a la película y la placa ¹²⁴.

El fosfopéptido de caseína (CPP) es un biomimético de la saliva y está compuesto por la secuencia del grupo de aminoácidos [-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-] derivados de la caseína de la leche bovina ¹²⁵. La concentración óptima anticariogénica de la caseína en productos alimenticios o de higiene oral causa mal sabor. Dicha dificultad se eliminó rompiendo la caseína en cuatro péptidos más pequeños, que mantuvieron su efecto anticaries ¹²¹. Estos tienen la capacidad de estabilizar el calcio y el fosfato manteniéndolo en una forma amorfa o soluble denominada fosfato cálcico amorfo (ACP) ¹²⁵. La combinación da lugar al fosfato de calcio amorfo estabilizado con fosfopéptido de caseína (CPP-ACP) (**Figura 8**) ¹²⁴.

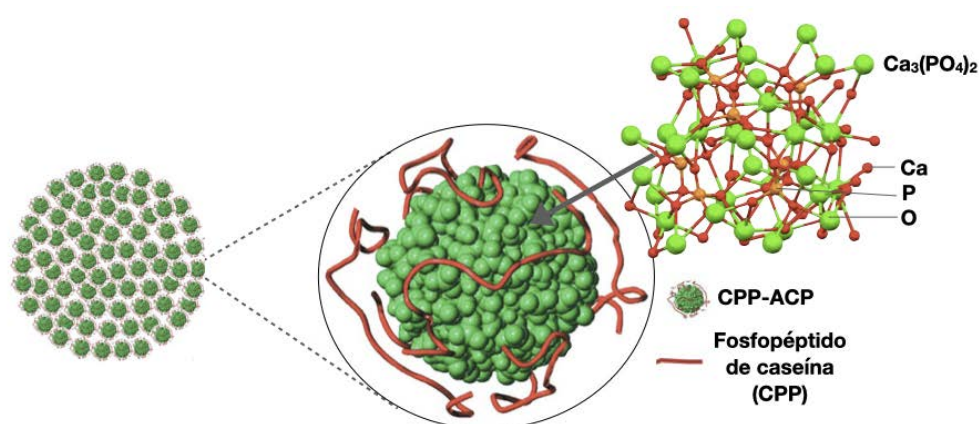


Figura 8. Diagrama del aspecto de un nanocomplejo de fosfopéptidos de caseína y el fosfato de calcio amorfo ¹²⁶.

El efecto anticariogénico del CPP-ACP se ha atribuido al mayor contenido de residuos de fosfoserina, que tiene una capacidad estabilizadora de calcio y fosfato ⁷¹ significativamente mayor que las proteínas salivales ⁸⁴. Parece que los efectos protectores de los componentes salivales y los agentes terapéuticos actúan de manera cooperativa. Un ejemplo sería el papel similar que desempeñan las estaterinas salivales, las fosfoproteínas de la estructura dental y los fosfopéptidos de caseína en Recaldent™, de manera que al producirse la desmineralización de los tejidos duros las fosfoproteínas liberan los iones que actúan remineralizando la estructura ⁷⁶.

El CPP-ACP es insípido y tiene un bajo nivel de antigenicidad ¹²⁴. Son numerosos los estudios, ensayos clínicos y revisiones sistemáticas acerca de las acciones remineralizantes del CPP-ACP ^{115,127,128}. Los nanocomplejos lácteos que contiene promueven la remineralización de la lesión mediante el mantenimiento de un medio

supersaturado de minerales, a la vez que dificulta la colonización bacteriana a las superficies dentales ^{76,77,125} lo cual es muy prometedor para lograr un cambio beneficioso en la ecología microbiana de la placa dental ^{102,129}.

El CPP-ACP se encuentra incorporado en chicles como el Recaldent gum™ y Trident White™ y pastas dentales como el GC Tooth Mousse™ y MI Paste™. La presentación con 900 ppm de flúor es GC ToothMousse Plus™ y GC MI Paste Plus™. También se encuentra en barniz GC MI Varnish™ (5% NaF) y comprimidos (Adams/Cadbury Schweppes, Morris Plains, NJ) Recaldent Pty Ltd, Melbourne, Australia.

A. MECANISMOS DE ACCIÓN

Una de las acciones más destacables del CPP-ACP es la formación del reservorio de fosfato de calcio ⁸⁴. Tras la digestión enzimática de la fosfoproteína (CPP) se liberan los péptidos que contienen la secuencia [-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-] y tienen la capacidad de estabilizar el calcio y el fosfato manteniéndolo en una forma amorfa o soluble denominada fosfato cálcico amorfo (ACP) ¹²⁵, originándose los nanocomplejos de CPP-ACP (**Figura 9**) ¹³⁰.

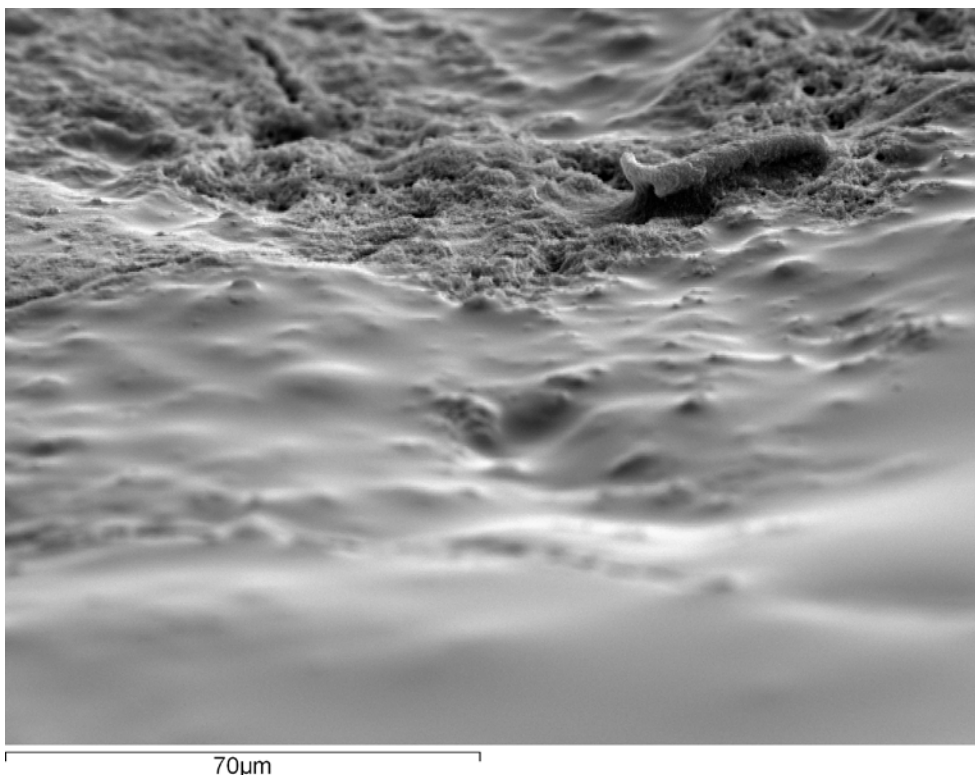


Figura 9. Imagen de MEB (x2000/x5000) que muestra una superficie de esmalte a la que se ha aplicado MI Varnish™ y aparece cubierta por una capa continua y amorfa de barniz. Imagen cedida por la Dra. Yolanda Martínez Beneyto.

La unión entre CPP y ACP depende del pH. Durante condiciones ácidas, que favorecen la liberación de iones PO_4^{-3} , OH^- y Ca^{+2} del esmalte, la unión disminuye y el conjunto CPP-ACP libera iones de calcio y fósforo, manteniendo un ambiente mineral sobresaturado que permite que los iones difundan hacia las lesiones superficiales y subsuperficiales del esmalte mediante gradientes de concentración ¹²⁴, facilitando su transformación en HA⁷⁷. Cuando el pH es más alto previene la nucleación y la transformación de fase ⁷⁷, evitando la precipitación espontánea del fósforo de calcio, en lo que sería una acción antisarro ¹²⁴.

Los procesos de remineralización por este tipo de sistemas ocurren tanto en la superficie del esmalte como en la zona de la lesión subsuperficial. En el proceso de inserción hacia la lesión subsuperficial, es fundamental el gradiente de actividad entre la placa, película y la lesión. Los complejos CPP-ACP que ingresan intactos a la lesión liberan sus iones, ya sea consumiendo protones producidos por la formación de apatita o liberación por competencia, ya que el CPP tiene atracción para unirse a las caras (100) y (010) de los cristales de apatita y formar estructuras termodinámicamente más estables. Se cree que la unión del CPP a estas caras del cristal de apatita en la superficie de la lesión mantiene abiertas las vías de difusión para permitir que los iones penetren más profundamente, lo que da como resultado la remineralización en todo el cuerpo de la lesión en lugar de solo en la capa superficial. Este patrón es ideal ya que puede mejorar la estética y la resistencia de la lesión y deposita minerales resistentes a los ácidos que mejoran la resistencia de esta área a futuros ataques ácidos ^{84,117}.

Otra de las acciones del CPP-ACP es su capacidad de alterar el potencial cariogénico de la placa ^{77,117}. Su acción anticariogénica proviene de su capacidad de asociación entre los péptidos de caseína y las proteínas y péptidos de la película ¹³⁰, puesto que al incorporarse en la placa supragingival uniéndose a las superficies de las células bacterianas puede conducir a la formación de una placa menos cariogénica además de reducir su cantidad. Esto se lleva a cabo mediante ^{77,117}:

- Exclusión competitiva en las zonas de unión de iones de calcio en el esmalte dental a la vez que entre las células, ya que los péptidos de los complejos CPP-ACP pueden interactuar con las proteínas salivales y los péptidos que forman la película del esmalte.

- Elevación de los iones de calcio en la placa inhibiendo la fermentación de la misma y aportando una capacidad tampón mediante las proteínas y el fosfato que suprime el crecimiento de especies acidúricas alrededor del diente.
- Capacidad de remineralizar y disminuir la desmineralización del diente.

El nanocomplejo de CPP-ACP tiene un efecto sinérgico con el Flúor. Este efecto sinérgico debe atribuirse a la formación de nanoaglomerados de iones Ca, F y P (CPP-ACFP), lo que daría como resultado una mayor incorporación de iones fluoruro en la placa junto con el aumento de la concentración de Ca y P biodisponibles. Todo ello favorece la remineralización de la lesión subsuperficial con un aumento en la formación de cristales de fluorapatita y fluorhidroxiapatita, aumentando la resistencia del esmalte a este nivel ¹³¹. Sin embargo, no hay evidencia suficiente para apoyar que agregar F a CPP-ACP aumente su eficacia ^{88,132}.

2.3.3. FOSFATO TRICALCICO

El fosfato tricálcico (TCP) es un fosfato de calcio cristalino cuya fórmula química es $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Existe en dos formas, alfa (α -TCP) y beta (β -TCP). El α -TCP se forma cuando el esmalte humano se calienta a altas temperaturas. Es un material relativamente insoluble en entornos acuosos. El β -TCP es menos soluble que α -TCP y, por lo tanto, en una forma no modificada es menos probable que proporcione calcio biodisponible ¹³³.

En los últimos años se ha empleado en odontología el *f*TCP, resultante del acoplamiento del β -TCP con ingredientes orgánicos y/o inorgánicos (**Figura 10**) ^{133,134}. El *f*TCP es un sistema de liberación de fosfato de calcio a dosis bajas que se incorpora en una única fase acuosa o no acuosa en formulación de fluoruro tópico como dentífrico, gel, enjuague o barniz ¹³⁵.

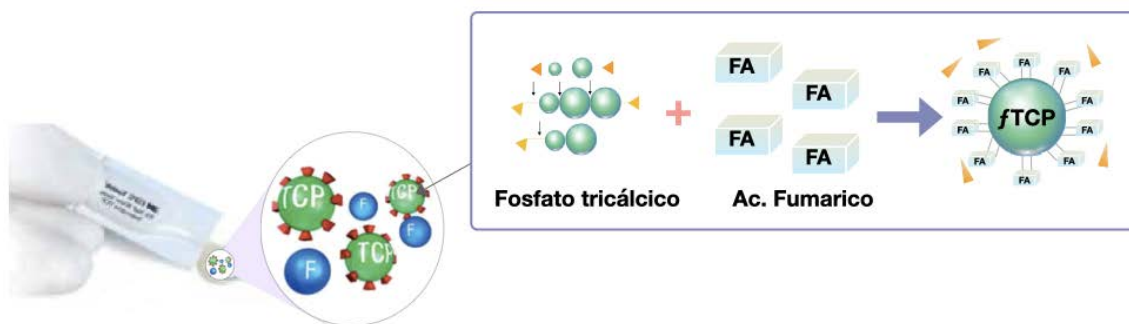


Figura 10. El Fosfato Tricálcico (TCP) se mezcla con ácido fumárico dando como resultado un ingrediente bioactivo: El fosfato tricálcico funcional (Cortesía de 3M ESPE).

El *f*TCP lo encontramos en pasta, 3M ESPE Clinpro™ Tooth Creme con 950 ppm de ión flúor y 3M ESPE Clinpro™ 5000 con 5000ppm de flúor. En barniz 3M ESPE Clinpro™ White Varnish al 5% de ión flúor (22.600ppm). Clinpro utiliza el ácido fumárico en el barniz para estabilizar el TCP y el lauril sulfato de sodio en la pasta (3M ESPE, Saint Paul. MN, USA).

A. MECANISMOS DE ACCIÓN

El β -TCP cristalino puede formarse mediante la combinación de carbonato de calcio y fosfato de calcio hidrogenado calentando la mezcla a más de 1000°C⁷⁵. Presenta dos inconvenientes, una baja solubilidad, en una forma no modificada, que proporciona poco calcio biodisponible¹³³ y en presencia de flúor puede reaccionar fácilmente formando complejos de fosfato de calcio y fluoruro de calcio, lo que reduce también los niveles de calcio biodisponible. Una de las primeras medidas que se tomaron para evitar esa disminución de calcio biodisponible fue la reducción de la concentración de TCP (<1%) y su combinación con una cerámica, como óxido de titanio u otros óxidos metálicos⁷⁵. En la actualidad se recubren las partículas de TCP con tensioactivos [como laurilsulfato de sodio (SLS)], con ácidos carboxílicos (como ácido fumárico), con polímeros o copolímeros. El propósito de funcionalizar el β -TCP tiene dos funciones principales: por un lado crear barreras que eviten interacciones prematuras del F iónico con el calcio mientras el producto está envasado y, por otro lado, proporciona una entrega específica de TCP cuando se aplica a los dientes^{75,133,136}.

El *f*TCP fue diseñado principalmente para aumentar la actividad de iones F en la superficie del diente mediante la remineralización impulsada principalmente por iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} procedentes de la saliva ⁸⁴. La capa protectora que se forma durante el proceso de elaboración del producto separa el calcio funcionalizado y el fluoruro. Sin embargo, cuando el barniz contacta con las superficies de los dientes y al entrar en relación con la saliva, la resina del barniz y el componente orgánico se disuelven para dejar las partículas activas ¹³⁵. Los minerales fluoruro, calcio y fosfato reaccionan y forman precipitados de fluoruro de calcio en la superficie del esmalte que ayudan en la remineralización (**Figura 11**) ¹³⁷.

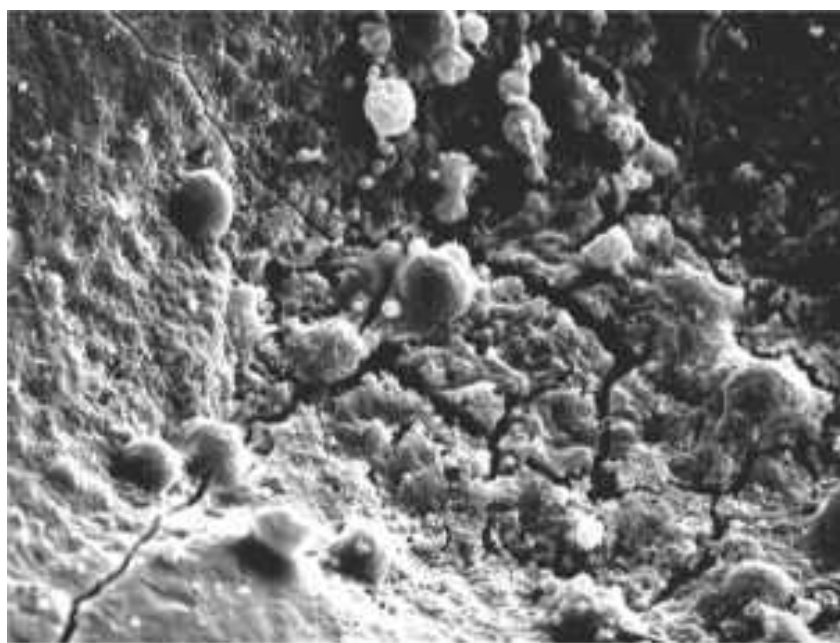


Figura 11. Imagen de MEB que muestra una superficie de esmalte que está totalmente cubierta por una placa de Clinpro™ White Varnish y grandes acúmulos de este en forma globular. (Imagen cedida por el Dr. José Francisco Martínez Marco).

Clinpro™ White Varnish es un barniz remineralizante en el que se utiliza el proceso de molienda de bolas mecanoquímico para modificar el β -fosfato tricálcico utilizando derivados del ácido carboxílico (ácido fumárico) como agentes funcionalizantes ^{133,136}.

A pesar de que el *f*TCP ha demostrado tener efectos remineralizantes en algunos estudios *in vitro* e *in situ* ^{120,138-140}, no hay datos clínicos recientes que evalúen su potencial de remineralización. Sin embargo, hay estudios clínicos en curso registrados que evalúan el *f*TCP incorporado al barniz (NCT02341872) y pastas dentales con F^- de alta concentración (NCT0 2136576) ⁸⁸.

2.4. ODONTOLOGÍA DE MÍNIMA INTERVENCIÓN BASADA EN EL RIESGO DE CARIES.

Para comprender la aplicabilidad de un agente remineralizante es necesario hacer referencia al entendimiento actual de la caries dental, su clasificación diagnóstica y la toma de decisiones en su manejo ¹⁴¹.

El protocolo CAMBRA (Caries Management by Risk Assessment) es una sistematización para el manejo de la caries dental y sus manifestaciones en función del riesgo de los pacientes. Su objetivo es reducir los factores patológicos implicados en la misma, impulsar o favorecer factores protectores y, finalmente, la aplicación de procedimientos restauradores mínimamente invasivos para el control de la enfermedad junto con pautas de revisiones de mantenimiento ¹⁴². Este tipo de protocolos aporta una mayor probabilidad de éxito y un menor coste/efectividad del tratamiento que otros menos estandarizados. Están basados en la evidencia procedente de literatura revisada por comités de expertos y por la experiencia clínica de profesionales ¹⁴³.

Los protocolos de manejo de la caries facilitan la toma de decisiones respecto a tratamientos individualizados y están basados en niveles de riesgo específicos del paciente. Desde el punto de vista de la mínima intervención resulta fundamental la identificación del riesgo individual. El manejo actual es más conservador, mediante la detección de caries incipientes no cavitadas y su remineralización, de cara a minimizar cualquier acción restauradora posterior ^{39,67,142}. Se distinguen tres niveles de invasividad para clasificar las estrategias de intervención basadas en el grado de eliminación de tejido ¹⁴¹ (**Figura 12**):

1. Estrategias no invasivas: no eliminan el tejido duro dental e involucran, por ejemplo, barnices de fluoruros y otras estrategias químicas para controlar el equilibrio mineral, medidas de control de biopelículas y control dietético.
2. Estrategias microinvasivas: eliminan la superficie del tejido duro dental a nivel de micrómetro, generalmente durante un paso de grabado, como las técnicas de sellado o infiltración.

3. Estrategias invasivas: eliminan el tejido dental con el uso de cucharillas, instrumentos rotatorios u otros dispositivos. En la mayoría de los casos este proceso está asociado con la colocación de restauraciones.

Aquellas lesiones que histológicamente afectan la dentina más allá del tercio externo y son inactivas (lesiones ICDAS 5 y 6), las sombras subyacentes de dentina (ICDAS 4), un porcentaje variable de microcavidades (ICDAS 3), así como las lesiones de caries iniciales activas (ICDAS 1 y 2) son susceptibles de ser manejadas con estrategias no invasivas, como agentes remineralizantes ¹⁴⁰.

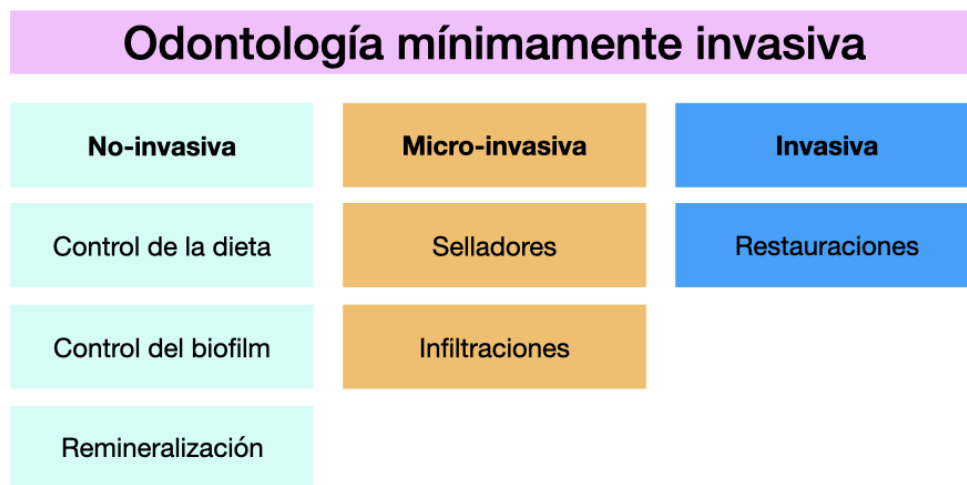


Figura 12. Estrategias de intervención para tratar las lesiones existentes desde el punto de vista de la odontología mínimamente invasiva ¹⁴¹.

2.5. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El concepto actual de caries y su prevención ha obligado a los profesionales a usar nuevos sistemas de diagnóstico integral³⁴ y de manejo de caries dental que les permita reconocer en los pacientes la presencia de lesiones iniciales o lesiones subclínicas⁶. Es determinante aplicar una valoración de riesgo de caries individual para conocer los factores predisponentes de aparición de esta enfermedad¹⁴². La saliva es una de las variables ampliamente estudiada como un posible indicador de susceptibilidad a la caries, buscando parámetros de la fisiología salival, niveles de antioxidantes, proteínas, microelementos y elementos traza que puedan indicar el riesgo de caries⁸⁰.

En la toma de decisiones de manejo de caries dental es determinante realizar tratamientos no-invasivos para interrumpir tempranamente la pérdida de minerales en el tejido dental^{11,141}.

El fluoruro tópico es el agente que tiene la mayor efectividad en la remineralización del esmalte⁹¹⁻⁹⁷. Debido a que la remineralización puede verse obstaculizada por la biodisponibilidad limitada del calcio y el fosfato, se han desarrollado nuevos productos que garantizan un suministro constante de estos iones⁷⁷. En los últimos años, se han propuesto diferentes agentes remineralizantes como alternativa o coadyuvante al tratamiento de flúor^{89,90}. En la literatura se ha demostrado que estos productos remineralizan la caries y la detienen^{84,122,123}, por lo tanto, estos agentes han ganado un espacio importante en el campo del tratamiento de las lesiones subclínicas y las lesiones más leves de mancha blanca⁸⁴. Sin embargo, hasta ahora no existen ensayos clínicos controlados y aleatorizados que hayan monitorizado la eficacia del uso de los barnices de fosfato de calcio a largo plazo en niños con alto riesgo de caries en base a su influencia sobre el pH, la concentración de ácido láctico, los elementos traza y el recuento bacteriano salival.

El uso cada vez más frecuente de estos barnices en los protocolos de remineralización del esmalte o en la prevención de la desmineralización, hace necesario estudiar cómo influyen en la saliva, en el índice de caries y en el índice de placa.

3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

La hipótesis nula de nuestro trabajo fue:

“Los barnices de fosfato de calcio, MI VarnishTM (CPP-ACP con fluoruro de sodio al 5%) y ClinproTM White Varnish (fTCP con fluoruro sódico al 5%), aplicados trimestralmente durante un año, no modifican el pH, las concentraciones de ácido láctico, los elementos traza y el recuento bacteriano en la saliva total no estimulada, así como el caos/CAOS y el índice de placa dental de niños con alto riesgo de caries.”

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto del uso de MI Varnish™ y Clinpro™ White Varnish, usados trimestralmente durante un año, sobre la saliva total no estimulada, índice de placa e índice de caries en niños con alto riesgo de caries.

3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la eficacia de MI Varnish™ y Clinpro™ White Varnish, aplicados trimestralmente durante un año, en la reducción del índice de caries.
2. Estudiar la efectividad de MI Varnish™ y Clinpro™ White Varnish, aplicados trimestralmente durante un año, en la reducción del índice de placa.
3. Evaluar la eficacia de MI Varnish™ y Clinpro™ White Varnish, aplicados trimestralmente durante un año, en el incremento del pH salival.
4. Analizar la influencia de MI Varnish™ y Clinpro™ White Varnish, aplicados trimestralmente durante un año, sobre los niveles de ácido láctico salival.
5. Examinar el efecto de MI Varnish™ y Clinpro™ White Varnish, aplicados trimestralmente durante un año, sobre la concentración de Flúor, Calcio, Fosfato y elementos traza de la saliva.
6. Evaluar el efecto de MI Varnish™ y Clinpro™ White Varnish, aplicados trimestralmente durante un año, sobre el recuento bacteriano total de saliva total no estimulada.

4

MATERIAL Y MÉTODO

4.1. MATERIAL

4.1.1. MUESTRA

La muestra está constituida por 58 niños de edades comprendidas entre 4 y 12 años, que acudieron a la Clínica del Máster en Odontología Infantil Integrada de la Universidad de Murcia en el periodo comprendido entre Junio de 2017 y Diciembre de 2018.

A. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Niños entre 4 y 12 años, que acudieron a la Clínica del Máster en Odontología Infantil Integrada de la Universidad de Murcia independientemente del motivo de consulta (revisión o tratamiento odontológico).
- Niños que presentasen riesgo alto o extremo de caries establecido mediante el método CAMBRA.
- Niños que viviesen en una zona donde el suministro de agua no estuviera fluorada.
- Niños cuyos padres y/o tutores hayan expresado su consentimiento por escrito para participar en el estudio.
- Niños con conocimiento de la lengua española hablada y escrita.

B. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Niños que hubiesen recibido barniz de flúor, o cualquier tratamiento permanente de superficie que contuviese flúor, en los últimos 6 meses.
- Niños portadores de aparatología de ortodoncia.
- Niños que presentasen alergia o sensibilidad probada/sospechada a proteínas lácteas.
- Niños con fluorosis moderada o grave, tanto en dentición temporal como permanente.
- Niños con anomalías morfológicas del desarrollo dental, tanto en dentición temporal como permanente.
- Niños con limitaciones físicas que dificultasen la destreza manual.
- Niños con diagnóstico de trastorno psiquiátrico.

C. TAMAÑO DE LA MUESTRA

El tamaño muestral (n=19 pacientes/grupo) fue calculado realizando un estudio preliminar de las historias clínicas de los pacientes infantiles de la Clínica Odontológica Universitaria de la Universidad de Murcia, aceptando un riesgo alfa de 0,05, un riesgo beta de 0,20 (potencia de 0,8), en un contraste bilateral de medias pareadas para detectar una diferencia mínima de 0,13 entre dos grupos (en la evolución del índice de higiene,

medido a través de la modificación de Turesky del índice de placa de Quigley y Hein), asumiendo que existen 3 grupos, y una desviación estándar de 0,09. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 45%.

a. Aleatorización de la muestra

Los pacientes fueron asignados aleatoriamente utilizando una tabla de números aleatorios que se generó y bloqueó antes del inicio del estudio.

Mientras que los pacientes y los analistas de datos se mantuvieron cegados a la asignación, el odontólogo que realizaba la evaluación y la aplicación de los productos conocía el grupo al que pertenecía el paciente. Por lo tanto, el profesional no pudo ser ciego ya que la forma de presentación comercial y las características de los dos barnices eran diferenciables.

4.1.2. MATERIAL EMPLEADO EN CLÍNICA

- Espejos planos Ø24 mm.
- Sonda de exploración WHO.
- Rollos de algodón con celulosa nº 1–3.
- Eyectores de saliva de plástico desechables.
- Vasos de plástico desechables.
- Material rotatorio (KaVo Dental GmbH, Biberach, Alemania).
- Sillón dental Kavo ESTETICA[®] E30 (Kavo Dental GmbH, Biberach/RiB, Alemania).
- Lámpara dental Kavo MAIA LED[™] con 35.000 Lux (Kavo Dental GmbH, Biberach/RiB, Alemania).
- Aplicador de bolita de fibras no absorbentes desechable, Microbrush[®] (Microbrush International, Waterford, Irlanda).
- Aplicador con forma de pincel de fibras no absorbentes Ultrabrush Plus[®] (Microbrush International, Waterford, Irlanda).
- Cepillos de profilaxis (Dentaflux[®], Madrid, España).
- Separador de mejillas para niños (Hager & Werken, Duisburg, Alemania).

- Retractor labial para niño con doble extremo de acero inoxidable (Mestra, Vizcaya, España).
- Cámara de fotos digital Nikon D3200 (Nikon Corporation, Shinagawa Intercity Tower C, Tokyo, Japan).
- Macro Flash Anular Digital TTL Nissin MF18 Version compatible con Nikon (Nissin Japan Ltd., Tokyo, Japan).
- Pasta dental Lacer Junior (Lacer SA, Barcelona, España).
- Cepillo dental Lacer Junior (Lacer SA, Barcelona, España).
- Frascos 30 ml (25 x 90 mm) de polipropileno con tapón roscado (Dentalab, Barcelona, España).
- Agua destilada (Funiza Laboratories, Malaga, España).
- Tri Plaque ID Gel™ (GC, Leuven, Bélgica).
- Clinpro™ White Varnish (3M ESPE, Saint Paul, MN, EEUU).
- MI Varnish™ (GC, Leuven, Bélgica).
- Ordenador portátil Macbook Air.

A. BARNICES

La composición de los barnices se detalla en la **Tabla I**.

1. **GRUPO CLINPRO:** Clinpro™ White Varnish (3M ESPE, Saint Paul, MN, USA).



Figura 13. Presentación comercial Clinpro™ White Varnish (<https://dentaliberica.com/articulo/clinpro-white-varnish-100-x-05-ml.-aplicadores-3m-12250-23516-226>).

2. GRUPO MI: MI Varnish™ (GC, Leuven, Bélgica).



Figura 14. Presentación comercial MI Varnish™ (<https://goods.com.pe/es/goods-stock-catalogo/319-my-varnish.html>).

Producto	Composición	
Clinpro™ White Varnish	Ester glicerol pentaeritritol de resina colofonia Hexano Etanol Colofonía modificada Fluoruro de sodio Potenciador del sabor Espesante Sabor alimentario Fosfato tricálcico modificado	30-75%* 10-15%* 1-15%* 5%* 1-5%* 1-5%* 1-5%* 1-5%* < 5 %*
MI Varnish™	Fluoruro de sodio Recaldent CPP-ACP (<i>Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate</i>) Polivinil acetato Etanol Colofonía hidrogenada Dióxido de silicio Saborizantes (fresa, menta)	5% (1-8%) 1-5% 30-50% 20-30% 10-30% 1-5%
Fuente MSDS. * La identidad química específica y/o la concentración del producto es secreto comercial.		

Tabla I. Composición barnices

B. REVELADOR DE PLACA

Para teñir la placa dental empleamos el gel revelador de placa de 3 tonos Tri Plaque ID Gel™ (GC, Leuven, Bélgica) cuya composición se especifica en la **Tabla II**.

Producto	Composición	
GC Tri Plaque ID Gel™	Pasta	Glicerina Agua Sorbato de potasio Aceite aromatizante Sacarina Ácido cítrico Sacarosa
	Tintes	Rosa de bengala Azul brillante de Coomassie Azul brillante FCF
Fuente MSDS		

Tabla II. Composición del revelador de placa



Figura 15. Presentación comercial de Tri Plaque ID Gel™ (https://www.researchgate.net/profile/Eraldo_Pesaressi/publication/309397967_Uso_de_GC_Tri-Plaque_para_la_evidenciacion_selectiva_de_placa_bacteriana/links/580e3c3408ae51b863965f93/UsodeGC-Tri-Plaque-para-la-evidenciacion-selectiva-de-placa-bacteriana.pdf).

4.1.3. MATERIAL EMPLEADO EN LABORATORIO

- Reflectómetro RQflex®10 Reflectoquant 10 (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).
- Tiras de ensayo de pH (rango 4,0-9,0) (Reflectoquant™, MERCK®, Darmstadt, Alemania).
- Tiras de ensayo de lactato (intervalo de medida 1,0 - 60,0 mg/l) (Reflectoquant™, MERCK®, Darmstadt, Alemania).
- Pipeta de 2-20 µl (VWR TM International Eurolab, Barcelona, España).
- Puntas de pipeta de aerosol esterilizadas VWR™ (International Eurolab, Barcelona, España).
- Puntas de pipeta de 1000 µl VWR™ (International Eurolab, Barcelona, España).
- Pipeta de 1000 µl (VWR TM International Eurolab, Barcelona, España).
- Tubos de polipropileno de 12 ml con tapón de rosca de polietileno (Dentalab, Barcelona, España).
- Tubos eppendorf 2.0 ml (Dentalab, Barcelona, España).
- Agitador de tubos de ensayo Yellow Line TTS 2 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemania).
- Vibradora, (Classic Vortex Mixer, Velp Scientifica, Italia).
- Neveras de congelación (LG Refrigerator GBB530NSQFE – LG Electronics España, S.A.U, Madrid, España).
- TISAB II (Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, EEUU).
- Electrodo ion-específico de flúor (Orion 9609 BNWP, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, EEUU), acoplado a un analizador de iones (Orion EA-940 Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, EEUU).
- Espectrometría de masas con plasma de Argón inductivamente acoplado (ICP-MS) Agilent modelo 7900, (Agilent Technologies Inc.; CA; EEUU).
- Agua ultrapura (18.2 MΩ) proveniente de un sistema de purificación de agua Milli-Q® Reference A+ (Merck Milipore, Darmstadt, Alemania).
- Ácido nítrico (HNO₃) 65%, Suprapur (Sigald®, Steinheim, Alemania).
- Disolución estándar multielemental ICP (Na, Mg, Al, P, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, As, Cd, Ba y Pb), CertiPUR® (AISBL, Bruelas, Bélgica).

- Disolución multielemental ICP conteniendo Sc, Ga, Ge, Rh e Ir, CertiPUR® (AISBL, Bruelas, Bélgica).
- AS1290 LEV Blood DNA Kit de Maxwell® (Promega Corporation, Madison, EEUU).
- Equipo Maxwell® Cat. #AS3000 (Promega Corporation, Madison, EEUU).
- Quantus™ Fluorímetro (Promega Corporation, Madison, EEUU).
- Sistema QuantiFluor® ONE dsDNA, (Promega Corporation, Madison, EEUU).
- SYBR Premix Ex Taq II TaKara (Takara Bio Europe SAS, Saint-Germain-en-Laye, Francia).
- Sistema de PCR en tiempo real QuantStudio™ 5 para identificación humana (Applied Biosystem, Foster City, California, Estados Unidos).

4.2. MÉTODO

El diseño del estudio fue aprobado por el comité ético de investigación y por el comité de bioseguridad de investigación de la Universidad de Murcia, España [CEI: 1499/2017 (**Anexo 1**); CBE 50/2017 (**Anexo 2**)].

Fue registrado retrospectivamente el 26 de mayo de 2020, <http://www.isrctn.com/ISRCTN13681286>. Registro del estudio: ISRCTN13681286.

4.2.1. INTERVENCIONES

A. SESIÓN 0

La duración de la intervención fue de 45 minutos en los que los padres rellenaban los cuestionarios (15 minutos) y se llevó a cabo el programa de intervención en los niños (30 minutos).

a. Selección de pacientes.

Cuando los niños acudieron al Máster en Odontología Infantil Integrada, a sus padres/tutores se les realizaron varios cuestionarios con los que conformamos la historia clínica del niño:

- Cuestionario de autoinforme con preguntas demográficas, historia médica familiar, historia médica de salud general, aspectos psicológicos del niño y hábitos nutricionales (**Anexo 3**).
- Cuestionario de autoinforme de competencias dentales, hábitos de higiene dental (personales y sobre sus hijos) y terapia con flúor (**Anexo 3**).
- Cuestionario CAMBRA (**Anexo 3**).

A continuación, un dentista experimentado realizó una exploración clínica a los niños usando un espejo oral plano y una sonda WHO. Para la detección clínica de lesiones de caries se utilizaron los criterios del Sistema Internacional de Detección y Evaluación de la Caries (ICDAS II) (**Anexo 3**)⁶. Basándonos en el protocolo CAMBRA^{99,144,145} se determinó el grupo de riesgo al que pertenecía cada paciente: bajo riesgo, moderado

riesgo, alto riesgo y riesgo extremo; incluyendo en nuestro estudio únicamente a los pacientes que presentaban riesgo alto o extremo de caries (**Anexo 3**).

Tanto la historia clínica como los exámenes fueron realizados por una única Odontopediatra con 7 años de experiencia, habiendo realizado tres sesiones de entrenamiento con instrucciones escritas y visuales, estandarización y calibración con participantes in vivo.

A los padres/tutores de los pacientes que cumplían los criterios de inclusión, antes de comenzar el estudio, se les proporcionó toda la información y se les explicó los beneficios previstos y los riesgos potenciales del estudio (**Anexo 4**).

A continuación, si estuvieron de acuerdo, se obtuvo el consentimiento informado por escrito (**Anexo 4**), manteniendo en todo momento la confidencialidad, y anteponiendo la seguridad y salud de los participantes. Las técnicas empleadas fueron procedimientos no invasivos y no estaban contraindicadas para ninguno de los pacientes.

Los pacientes incluidos en el estudio fueron aleatoriamente asignados a uno de los tres grupos experimentales. Todos los participantes y sus padres/tutores recibieron instrucciones de higiene oral estandarizadas, verbales y escritas, centradas en la modificación de hábitos de higiene dental específicas por edad (**Anexo 5** y **Anexo 6**). Adicionalmente se proporcionaron consejos dietéticos a los participantes y al adulto responsable para facilitar y reforzar las medidas preventivas.

Cada participante recibió cada tres meses una pasta dental fluorada de 1450 ppm de fluoruro (Lacer Junior, Lacer SA, Barcelona, España) y un cepillo de dientes manual (Lacer Junior, Lacer SA, Barcelona, España). También se dieron instrucciones para evitar otras fuentes de fluoruro durante el período de estudio (productos ambientales, suplementos, productos profesionales u otros productos dentales).

b. Toma de saliva

Antes del inicio de cada una de las visitas, en la sala de espera, se recogieron 3,5 ml de saliva no estimulada durante 5 minutos en un tubo de polietileno estéril con tapa roscada¹⁴⁶. Las salivas se mantuvieron a -22°C hasta el momento de la medición.

Los pacientes fueron instruidos para que 1 hora antes de la recolección de la muestra no bebiesen agua, ni ingiriesen alimentos ni se cepillasen los dientes (**Anexo 5**). Las condiciones de la toma de muestras de saliva fueron recogidas en una plantilla (**Anexo 7**).

c. Índice de placa

Tras la obtención de la muestra salival evaluamos el índice de placa aplicando el revelador de placa de tres tonos (Tri Plaque ID Gel™) en todas las superficies de los dientes con un aplicador de bolita de fibras. Las superficies de los dientes se lavaron suavemente con una jeringa de aire y agua comprimido durante 30 segundos y se efectuaron registros fotográficos para evaluar el índice de placa. Seguidamente los dientes se limpiaron con un cepillo de profilaxis suave y sin pasta.

d. Grupos experimentales, aplicación de los barnices.

Los grupos experimentales establecidos fueron:

- Grupo Control (placebo).
- Grupo Clinpro: en este grupo se utilizó Clinpro™ White Varnish® (3M ESPE, Saint Paul, MN, EE. UU).
- Grupo MI: en este grupo se utilizó MI Varnish™ (GC, Leuven, Belgium).

Antes de la aplicación de los barnices, los dientes se secaron con aire comprimido seco y se aislaron con rollos de algodón y evector de saliva. Se aplicó 0,25 ml de barniz en la superficie de los dientes (**Figura 16**) y se dejó secar durante 30 segundos. En el grupo Control se aplicó agua destilada con un pincel idéntico al que usamos para aplicar los barnices. Los pacientes recibieron instrucciones de no enjuagarse la boca, de no comer ni beber durante una hora y de no cepillarse hasta 4-6 horas después de la aplicación, de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes (**Anexo 8**).

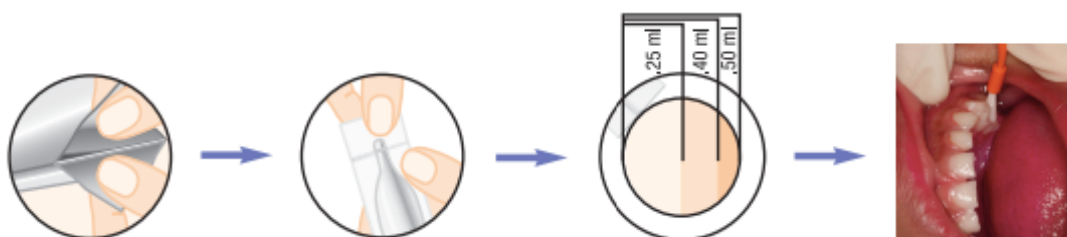


Figura 16. Guía de dosificación de Clinpro™ White Varnish. (Cortesía de 3M ESPE).

B. SESIÓN 1, 2, 3 Y 4: SEGUIMIENTO

Se efectuaron las medidas de seguimiento con las mismas variables e instrumentos anteriormente expuestos y siguiendo el mismo procedimiento. Estas evaluaciones se llevaron a cabo a los tres meses (sesión 1), a los seis meses (sesión 2), a los nueve meses (sesión 3) y a los doce meses (sesión 4) desde la evaluación inicial (**Figura 17**).

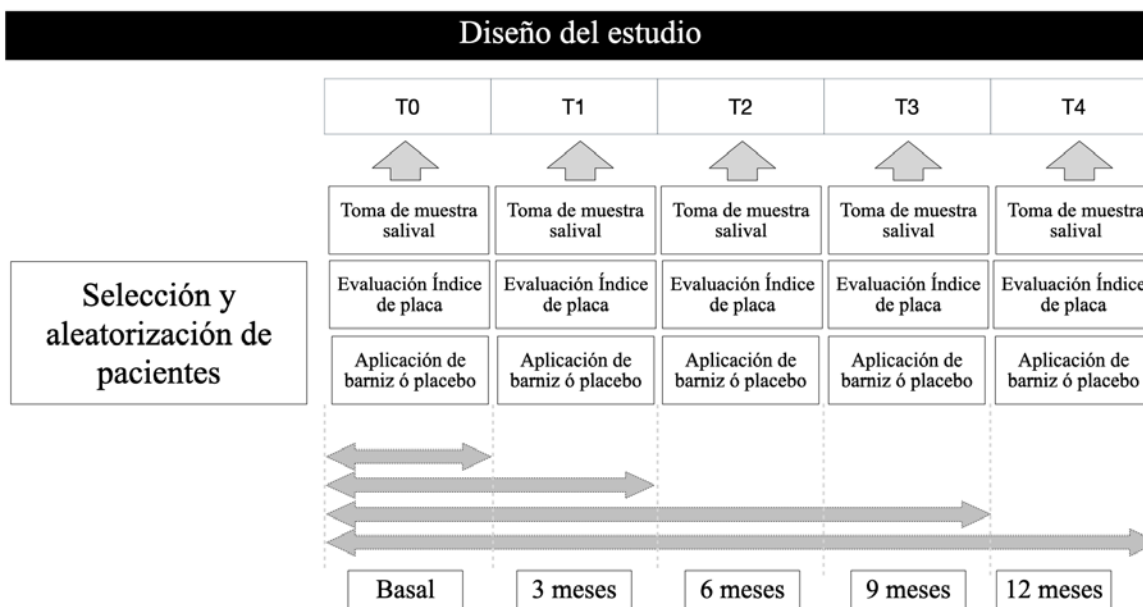


Figura 17. Diagrama de flujo que rastrea el proceso del estudio.

En cada visita de revisión se verificó que se estaban siguiendo las pautas de higiene establecidas, así como el uso de la pasta dentífrica propia del estudio (**Anexo 7**). Por lo que se solicitaba a los sujetos que llevarsen la pasta para controlar el nivel de uso.

Durante los 12 meses del estudio a los pacientes se les fue realizando el tratamiento odontológico necesario (extracciones, obturaciones, tratamientos pulpares, etc.). Para evitar una fuente extra y no controlada de flúor los materiales usados fueron siempre libres de flúor.

4.2.2. PROTOCOLO DE ESTUDIO DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 1

“Determinar la eficacia de MI Varnish™ y Clinpro™ White Varnish, aplicados trimestralmente durante un año, en la reducción del índice de caries.”

Se llevó a cabo una inspección visual de todas las superficies de los dientes, usando como fuente de luz la lámpara del sillón dental, para valorar la presencia de lesiones de mancha blanca y lesiones de caries, primero con las superficies dentales húmedas y después tras 5 segundos de secado con aire. El examen de caries se realizó con un espejo oral simple, sonda WHO, y sólo se realizaron radiografías en caso de que fuese necesario.

El diagnóstico de caries se realizó usando los criterios ICDAS II ^{34,35,147}, que consiste en un sistema de codificación de dos dígitos. La primera línea de dígitos refleja la presencia de selladores o restauraciones (códigos de 0 a 8) y la segunda línea de dígitos, las diversas etapas de progresión de la lesión cariosa (códigos de 0 a 6). Además, existen cuatro códigos especiales de dos dígitos que completan el índice (**Tabla III**).

Códigos del 1º dígito	Descripción	Códigos del 2º dígito	Descripción
0	Sano	0	Sano
1	Sellador, parcial	1	Primeros cambios visuales en esmalte
2	Sellado total	2	Cambio visual distintivo en esmalte
3	Obturaciones con diente decolorado	3	Fractura de esmalte localizada
4	Restauraciones	4	Sombra oscura subyacente de la dentina
5	Coronas preformadas metálicas	5	Cavidad con dentina visible
6	Coronas o carillas de porcelana, oro o PFM	6	Cavidad extensa con dentina visible
7	Obturaciones caídas o fracturadas		
8	Restauraciones temporales		
Códigos especiales	Descripción		
96	No se puede examinar la superficie del diente		
97	Diente ausente por caries		
98	Diente ausente por otras causas		
99	No erupcionado		

Tabla III. Códigos y descripción de ICDAS II.

Los datos registrados con ICDAS fueron transformados a CAOS/caos como medida de la experiencia de caries.

El índice CAO se aplica a la dentición permanente y se expresa como el número total de dientes (D) o superficies (S) que están cariados (C), ausentes (A) u obturados (O) en un individuo. Cuando el índice se aplica sólo a las superficies de los dientes (cinco en

molares y cuatro incisivos y caninos), se denomina índice *CAOS*, y la puntuación por individuo puede variar de 0 a 128 o 148, dependiendo si los terceros molares están incluidos en la puntuación. Cuando se escribe en letras minúsculas, el índice *cao* es una variación que se aplica a la dentición primaria. Los dientes que no se cuentan son dientes no erupcionados, dientes que faltan congénitamente o dientes supernumerarios, dientes extraídos por razones distintas a la caries dental y dientes primarios retenidos en la dentición permanente. El índice *caos* expresa el número de superficies afectadas en la dentición primaria (cinco por diente posterior y cuatro por diente anterior), con un rango de puntuación de 0 a 88 superficies. El recuento total de 88 superficies en dentición temporal y 124 en dentición mixta ¹⁴⁸ puede modificarse según la fase de recambio en la que estén.

Cada lesión de caries se puntuó de 0 a 6 ¹⁴⁹, seleccionando sólo las lesiones marcadas como 3, 4, 5 ó 6 del código ICDAS para representar el “C/c” del CAOS/caos. Los códigos ICDAS con respecto a las restauraciones se consideraron “O/o”, excepto los selladores ¹⁵⁰.

Se eligió el componente “C/c” cuando se registró una lesión valorada entre el 4 y 6 y una obturación en el mismo diente. Sin embargo, cuando la lesión cariada era valorada de 1 a 3 y presentaba una obturación, el diente se calificó como “O/o”.

En nuestro protocolo tuvimos en cuenta los dientes ausentes debido a caries a pesar de la dificultad descrita en la literatura de distinguir entre los dientes extraídos debido a caries y los que se han exfoliado naturalmente ¹⁴⁸. El código 97 constituyó el índice “A/a” ¹⁵⁰. Los dientes ausentes debido a caries recibieron un factor de corrección de 3 superficies. Es decir, un diente perdido por caries se valoró como 3 superficies de “A/a” en el recuento de CAOS/caos ¹⁵¹.

4.2.3. PROTOCOLO DE ESTUDIO DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 2

“Estudiar la efectividad de MI Varnish™ y Clinpro™ White Varnish, aplicados trimestralmente durante un año, en la reducción del índice de placa.”

El índice de placa fue evaluado con el gel revelador de placa Tri Plaque ID Gel™. Su mecanismo de acción se basa en la respuesta selectiva al pH de los diferentes colorantes que contiene: rosa de Bengala, azul brillante de Coomassie y azul brillante FCF.

La placa teñida se muestra en tres tonos:

- Rojo/rosáceo: el caso de la placa nueva ya que la biopelícula es escasa.
- Azul/violeta: placa antigua (más de 48 horas). La biopelícula está madura y su estructura es densa, por lo que los pigmentos azul y rojo quedan atrapados y le da un color más intenso.
- Azul/claro: placa con riesgo alto de caries. La sacarosa que contiene el gel revelador se metaboliza por bacterias acidogénicas dentro de la biopelícula de la placa. El ácido resultante producido reduce el pH de la placa (<pH 4.5) y esto hace que el pigmento rojo desaparezca y le dé un color azul claro.

Hemos utilizado la modificación de Turesky del índice de placa de Quigley y Hein (Turesky QH PI) ¹⁵². Mediante este índice se valora el área cubierta por placa de las superficies vestibular y lingual teñidas y se puntúa de 0 a 5 según el grado de extensión (**Tabla IV; Figura 18**). Para fines de puntuación, cada diente se dividió en seis áreas: tercio cervical, tercio medio y tercio incisal de la parte vestibular y tercio cervical, tercio medio y tercio incisal de la parte lingual. La puntuación se obtuvo sumando los índices de cada diente y dividiendo por el número total de dientes examinados.

Puntuación	Criterios
0	Sin placa.
1	Manchas separadas de placa en el margen cervical del diente.
2	Una delgada banda continua de placa (hasta un mm) en el margen cervical del diente.
3	Una banda de placa más ancha que un mm pero que cubre menos de un tercio de la corona del diente.
4	Placa que cubre al menos un tercio pero menos de dos tercios de la corona del diente.
5	Placa que cubre dos tercios o más de la corona del diente.

Tabla IV. Valoración del Índice Turesky QH PI. <https://www.mah.se/CAPP/Methods-and-Indices/Oral-Hygiene-Indices/Quigely-Hein-Index-modified/>

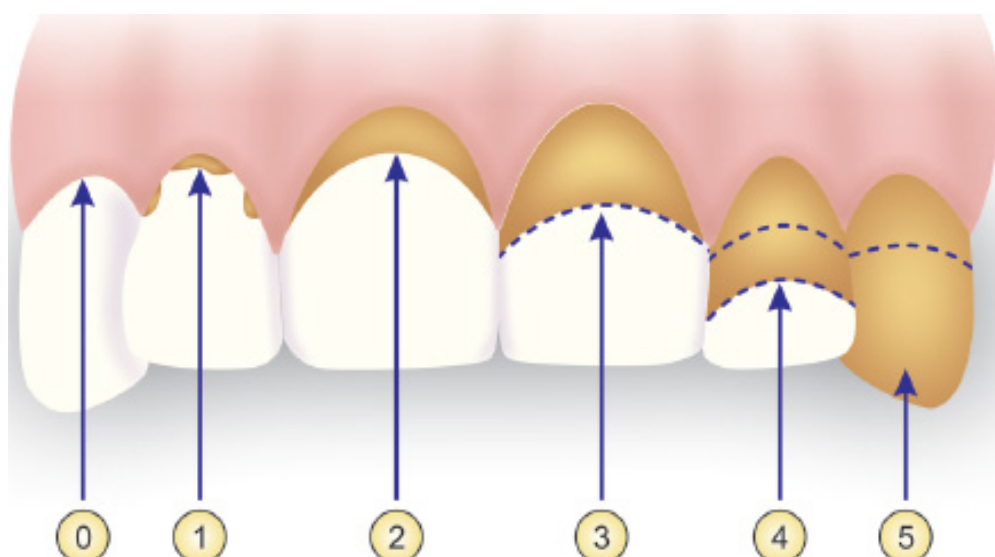


Figura 18. Método de puntuación de la presencia de placa. Fuente: Cugini, Maryann & Thompson, Maureen & Warren, Paul. (2006) ¹⁵³.

Hemos introducido un índice propio que denominamos índice de maduración y acidez de la placa (IMAP). Este método nos permite determinar de forma numérica la placa reciente, madura o ácida y clasificarlo en cuatro grados de 0 a 3 de acuerdo a la coloración que proporciona el Tri Plaque ID Gel™ (Tabla V; Figura 19).

Puntuación	Criterios
0	Sin placa.
1	Placa reciente de color rosa/rojo.
2	Placa madura de color azul/púrpura.
3	Placa ácida de color azul claro.

Tabla V. Escala sugerida para la valoración del IHO.



Figura 19. Valoración de uno de los pacientes mediante el índice IMAP.

En el caso de que hubiese simultáneamente placa madura y placa ácida se cuantificó con la puntuación más alta, es decir, 3.

El IMAP se calculó a través de la suma de los grados de todas las superficies dividido por el número de superficies examinadas.

4.2.4. PROTOCOLO DE ESTUDIO DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 3

“Evaluar la eficacia de MI VarnishTM y ClinproTM White Varnish, aplicados trimestralmente durante un año, en el incremento del pH salival.”

Las muestras se descongelaron, se agitaron con el agitador a 2.350 rpm durante 20 segundos a una temperatura de 20°C (TTS 2 Labword Yellow Line, Bélgica) y se llevaron a tubos Eppendorf codificados. Preparamos el reflectómetro RQflex[®] 10 para medir el pH, se tomaron 20µl, evitando las pequeñas aglomeraciones en suspensión, y lo vertimos en la zona reactiva de las tiras de ensayo de pH (Cód. 1.16996.0001; rango de 4,0–9,0 mg/l). Dejamos que se escurriese cuidadosamente el exceso de líquido sobre un papel absorbente. A continuación se introdujo la tira reactiva en el reflectómetro. El tiempo de reacción fue de 10 segundos.

4.2.5. PROTOCOLO DE ESTUDIO DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 4

“Analizar la influencia de MI VarnishTM y ClinproTM White Varnish, aplicados trimestralmente durante un año, sobre los niveles de ácido láctico salival.”

Las muestras se descongelaron, se agitaron a 2.350 rpm durante 20 segundos a una temperatura de 20°C (TTS 2 Labword Yellow Line, Bélgica) y se llevaron a tubos Eppendorf codificados. Preparamos el reflectómetro RQflex[®] 10 para medir el lactato, se tomaron 2x20µl, evitando las pequeñas aglomeraciones en suspensión, que se colocaron en las zonas reactivas tira de ensayo de ácido láctico (Cód. 1.16127.0001; rango de 1,0–60,0 mg/l). Dejamos que se escurriese cuidadosamente el exceso de líquido sobre un papel absorbente. A continuación se introdujo la tira reactiva en el reflectómetro. El tiempo de reacción fue de 7 minutos.

Las tiras reactivas se conservaron siempre en recipiente cerrado entre +2 y +8 °C. Las zonas de reacción fueron protegidas de la luz ya que son fotosensibles. Cuando el valor de medición fue superior (en la pantalla aparecía HI) o inferior (en la pantalla aparecía L0) al intervalo de medida el resultado se desechó.

4.2.6. PROTOCOLO DE ESTUDIO DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 5

“Examinar el efecto de MI VarnishTM y ClinproTM White Varnish, aplicados trimestralmente durante un año, sobre la concentración de Flúor, Calcio, Fosfato y elementos traza de la saliva.”

A. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE FLÚOR

La determinación de flúor fue realizada con un electrodo ion-específico (Orion 9609 BNWP, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA), acoplado a un analizador de iones (Orion EA-940 Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA).

El electrodo fue previamente calibrado con soluciones estándar desde 0.125 a 4.0 ppm F, mezclando 1mL de cada solución estándar con 1mL de TISAB II (Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA) (1.0 M acetate buffer pH 5.0, 1.0 M NaCl and 0.4% CDTA). Las muestras de saliva fueron taponadas con una solución de TISAB II al 50% (mezclamos 1mL de cada muestra de saliva con 1mL de TISAB II). Antes de cada una de las lecturas las muestras fueron agitadas con una vibradora (Classic Vortex Mixer, Velp Scientifica, Italia). Los resultados la lectura se recogieron en mV y se convirtieron a mgF/L (ppm F) gracias a la curva de calibración.

B. DETERMINACIÓN DEL ANÁLISIS DE METALES PESADOS: CALCIO, FOSFATO E IONES TRAZA DE LA SALIVA

El análisis de metales pesados se realizó mediante Espectrometría de masas con plasma de Argón inductivamente acoplado (ICP-MS, Agilent modelo 7900, Agilent Technologies Inc.; CA; EEUU). Para la calibración se empleó una disolución estándar multielemental ICP (Na, Mg, Al, P, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, As, Cd, Ba y Pb) CertiPUR® (AISBL, Bruelas, Bélgica) y como estándar interno una disolución multielemental conteniendo Sc, Ga, Ge, Rh e Ir CertiPUR®, (AISBL, Bruelas, Bélgica). Para almacenar los reactivos, disoluciones estándar y muestras se emplearon tubos de polietileno (PE).

Para la preparación de las muestras se tomaron 100 µL de cada muestra de saliva y se diluyeron hasta 1 mL con una disolución de HNO₃ suprapura (Sigald®, Steinheim, Alemania) al 2% en agua ultrapura Milli-Q® Reference A+, (Merck Milipore, Darmstadt,

Alemania). Las muestras fueron llevadas al automuestreador del espectrómetro e introducidas en su interior por el impulso de una bomba peristáltica, donde fueron atomizadas, ionizadas, y los iones generados detectados y cuantificados mediante un espectrómetro de masas.

Los isótopos seleccionados para cada una de las muestras de saliva estudiadas fueron los siguientes: ^{23}Na , ^{24}Mg , ^{27}Al , ^{31}P , ^{39}K , ^{44}Ca , ^{52}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{59}Co , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{75}As , ^{111}Cd , ^{137}Ba y ^{208}Pb .

4.2.7. PROTOCOLO DE ESTUDIO DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 6

“Evaluar el efecto de MI Varnish™ y Clinpro™ White Varnish, aplicados trimestralmente durante un año, sobre el recuento bacteriano total de saliva total no estimulada.”

Las muestras y datos de pacientes incluidos en este estudio fueron proporcionados por el Biobanco en Red de la Región de Murcia (PT13/0010/0018; PT17/0015/0038), integrado en la Red Nacional de Biobancos (B.000859), con la aprobación de sendos Comités Ético y Científico, y han sido procesados siguiendo procedimientos normalizados.

A. EXTRACCIÓN DE ADN

Se centrifugaron 2 ml de muestra de saliva a 4000g durante 20min y el sedimento, junto con 250-500 μL del sobrenadante, que se usaron para un análisis adicional. El ADN se aisló con un equipo Maxwell® Cat. #AS3000, (Promega Corporation, Madison, EEUU), utilizando el kit de aislamiento de AS1290 LEV Blood DNA Kit de Maxwell® (Promega Corporation, Madison, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se leyó por fluorimetría en el equipo Fluorímetro Quantus™ (Promega Corporation, Madison, EEUU) con el Sistema QuantiFluor® ONE dsDNA, (Promega Corporation, Madison, EEUU).

B. ANÁLISIS CUANTITATIVO EN TIEMPO REAL DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (QPCR) Y EL RECUENTO BACTERIANO

Se realizó el análisis cuantitativo del recuento bacteriano en muestras de saliva mediante qPCR usando primers universales sobre el gen ribosómico 16S con alta tasa de cobertura en todas las bacterias. La secuencia de los primers utilizados fueron:

- 16SU515F 5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'
- 16SU789R 5'-GCGTGGACTACCAGGGTATCT-3'

Cada mezcla de reacción de 10,5 µl estaba compuesta por SYBR Premix Ex Taq II TaKara (Takara Bio Europe SAS, Saint-Germain-en-Laye, Francia) en un volumen final de 10 µl, con una concentración de los primers a 450 nM y 0,5 µl de ADN molde usando el equipo QuantStudio™ 5 (Applied Biosystem, Foster City, California, Estados Unidos) con el siguiente protocolo: un paso inicial de 30 segundos a 95°C, y 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 20 segundos a 58°C y 25 segundos a 72°C. Todas las amplificaciones se realizaron por duplicado. La concentración bacteriana en cada muestra se calculó por comparación con los valores de Cp (o Ct) obtenidos de las curvas estándar, según la siguiente ecuación (**Ecuación 1**):

$$\text{Curva estándar} = \frac{(C_p - b)}{-m}$$

Ecuación 1. Cálculo de curva estándar donde C_p o C_t es el ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo, b es “intercept” y $-m$ es la pendiente de la curva estándar.

4.2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de este estudio se llevó a cabo mediante el programa SigmaStat 3.5 statistical software package (Systat Software Inc., Point Richmond, CA, USA). Los valores se expresan como media \pm desviación estándar ($X \pm EE$). Se realizó un test de Kokmogorov-Smirnov para determinar la normalidad y un test de Levene para la igualdad de varianzas.

Hemos realizado una estadística descriptiva de todas las variables en los tres grupos del estudio antes de realizar las pruebas inferencia estadística para estudiar el comportamiento de nuestros grupos experimentales y contrastar nuestra hipótesis. Para determinar la existencia de diferencias entre los tres grupos en el sexo se ha utilizado una Chi-Cuadrado de Pearson y en la edad un test de Análisis de Varianza Simple (ANOVA). Para conocer si hubo diferencias, dentro de cada grupo, en la distribución de la edad según el sexo hemos utilizado un test de Mann-Whitney.

A. ANÁLISIS DE LOS ÍNDICES DE CARIES

Para detectar diferencias en el comportamiento del CAOS y del caos entre los distintos grupos en un mismo tiempo se realizó un test de varianza simple cuando hubo normalidad y homogeneidad de varianzas o un test de Kruskal-Wallis cuando no las hubo.

Para detectar diferencias entre los tiempos T0 y T4 dentro de un mismo grupo se realizó una T de Student pareada cuando hubo una distribución normal y un test de Wilcoxon cuando no la hubo.

La estadística del CAOS sólo se realizó con aquellos pacientes que presentaron dentición permanente en el T0.

B. ANÁLISIS DE LOS ÍNDICES DE HIGIENE ORAL

Para determinar si hubo diferencias en los valores basales de los índices IMAP y Turesky entre los tres grupos de estudio se realizó un test de varianza simple. Para estudiar el efecto que las intervenciones dentro de cada grupo a lo largo del tiempo de seguimiento, cuando hubo normalidad y homogeneidad de varianzas, se realizó un test de varianza simple de medidas repetidas junto con un test de Duncan para detectar las diferencias dos a dos. Cuando no hubo normalidad y homogeneidad de varianzas se realizó un test de varianza de medidas repetidas sobre rangos y un test de Tukey para detectar las diferencias dos a dos. Se establecieron las diferencias significativas para una $p < 0,05$.

C. ANÁLISIS DE pH, ÁCIDO LÁCTICO e IONES

Las diferencias de las concentraciones de los elementos traza, pH y ácido láctico entre los tiempos T0, T1, T2, T3 y T4 se determinaron con un análisis de varianza simple de medidas repetidas. Cuando hubo diferencias entre los tiempos las comparaciones dos a dos se realizaron con el test de Holm–Sidak.

Para detectar si hubo diferencias entre los tres grupos en un mismo tiempo en las concentraciones de fluoruro se utilizó un test de varianza simple. Para analizar la evolución de las concentraciones de flúor entre los tiempos T0 y T4 dentro de un mismo grupo se utilizó una T de Student pareada cuando hubo normalidad y un test de Wilcoxon cuando no la hubo. Se consideró significativa una $p < 0,05$.

D. ANÁLISIS DEL RECUENTO BACTERIANO

Para determinar la influencia de los barnices en el análisis cuantitativo del recuento bacteriano entre los tiempos T0 y T4 dentro de un mismo grupo se utilizó una T de Student pareada cuando hubo normalidad y un test de Wilcoxon cuando no la hubo. Para detectar si hubo diferencias entre los tres grupos en un mismo tiempo se ha utilizado un test de Kruskal-Wallis al no haber normalidad en la muestra. Se consideró significativa una $p < 0,05$.

E. CORRELACION DE LOS ELEMENTOS ESTUDIADOS

Hemos realizado un test de correlación de Pearson entre las siguientes variables del estudio: valores de pH, ácido láctico, valores de caos y CAOS, índices de Turesky e IMAP y recuento bacteriano total, todas ellas en los tiempos 0 y 4.

5

RESULTADOS

5.1. MUESTRA

De los 80 pacientes revisados inicialmente sólo 58 cumplieron los criterios de inclusión (**Figura 20**). Tras la aleatorización 18 fueron asignados al grupo control, 19 al grupo Clinpro y 21 al grupo MI. De estos, un total de 25 niños se perdieron a lo largo del estudio. De los 33 pacientes que finalmente acabaron el estudio pertenecieron 12 al grupo Control, 10 al grupo Clinpro y 11 al grupo MI.

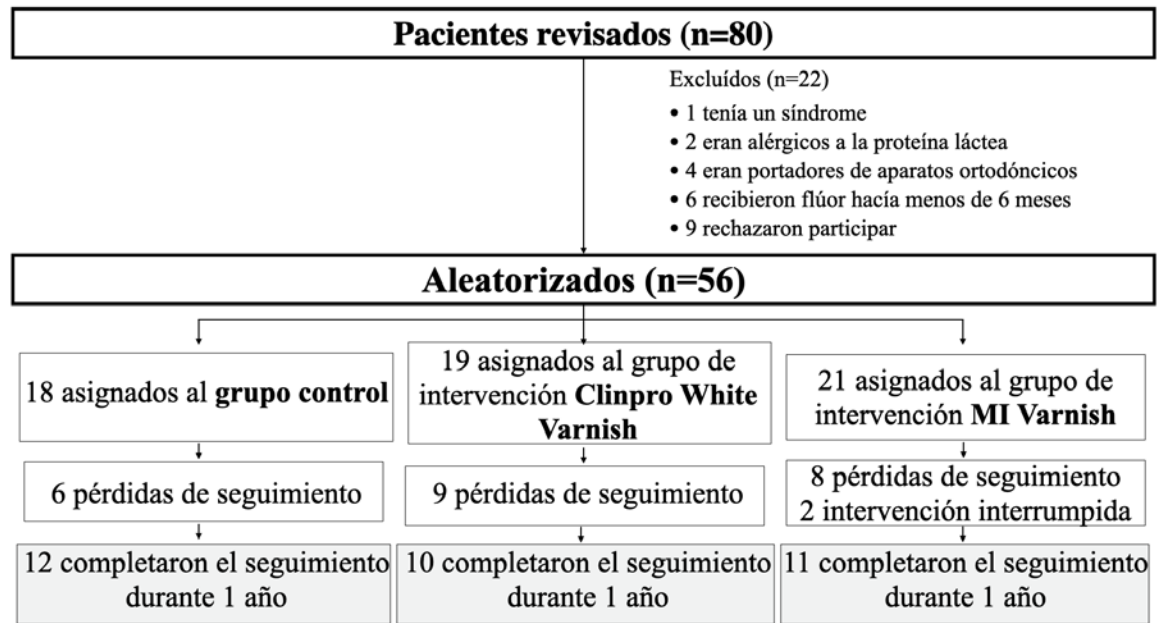


Figura 20. Registro en el estudio y aleatorización

5.1.1. CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS

Las características basales de sexo, edad, edad por sexo y CAOS/caos de los tres grupos fueron similares (**Tabla VI**). La distribución por sexo es equilibrada en el conjunto de la muestra seleccionada para análisis de los cuales 16 fueron niñas y 17 niños con una edad media de 7.09 ± 2.55 (intervalo de edades 4–12 años). El CAOS fue superior en el Grupo Clinpro de manera significativa ($p = 0,039$).

Características	Grupo Control	Grupo Clinpro	Grupo MI	Análisis estadístico
Demográficas				
Edad - años	6,91 \pm 2,59	7.6 \pm 2.36	6.81 \pm 2,63	p=0,766 @
Sexo – Edad				
• Niñas	8 (6,12 \pm 2,36)	4 (6,25 \pm 1,26)	4 (6,00 \pm 2,16)	p=0,283 \$
• Niños	4 (8,50 \pm 3,51) p=0,214 #	6 (8,50 \pm 2,59) p= 0,171 #	7 (7,29 \pm 2,93) p=0,527 #	

Tabla VI. Características demográficas de los pacientes (media \pm DE). @: test de varianza simple. #: test de Mann-Whitney. \$: test Chi-cuadrado.

5.2. RESULTADOS

5.2.1. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 1: ÍNDICE DE CARIES

Los efectos observados de cada uno de los barnices sobre los índices de caries son diferentes y pasamos a describirlos a continuación.

A. caos

La **Tabla VII** y **Figura 21** expresan los índices caos en los diferentes grupos donde se puede observar el elevado número de superficies careadas iniciales que disminuye en el T4 a favor del número de restauraciones realizadas. Un participante en el grupo clinpro fue excluido del análisis debido a la falta de dientes temporales en el T4.

caos									
	Basal (T0)				12 meses (T4)				Análisis estadístico
	Promedio	Car. T0	Aus. T0	Obt. T0	Promedio	Car. T4	Aus. T4	Obt. T4	
Control	18,8 ± 10,8	10,33	0,5	1,33	17,8 ± 21,5	0,75	1,75	9	p=0,765 +
Clinpro	27,6 ± 18,5	14,2	1,8	0,7	37,6 ± 21,6 (α)	0,00	5,33	12,66	p=0,191 +
MI	20,2 ± 15,2	13,45	0,27	0,82	27,2 ± 21,5	6,63	0,81	7,54	p=0,387 ç
Análisis estadístico	p=0,353 @				p=0,032 †				

Tabla VII. caos (media ± desviación estándar) y superficies dentarias careadas, ausentes y obturadas. (media). +: test de Wilcoxon. ç: T de Student pareada. @: test de varianza simple. †: test de Kruskal-Wallis. **α**: vs grupo control.

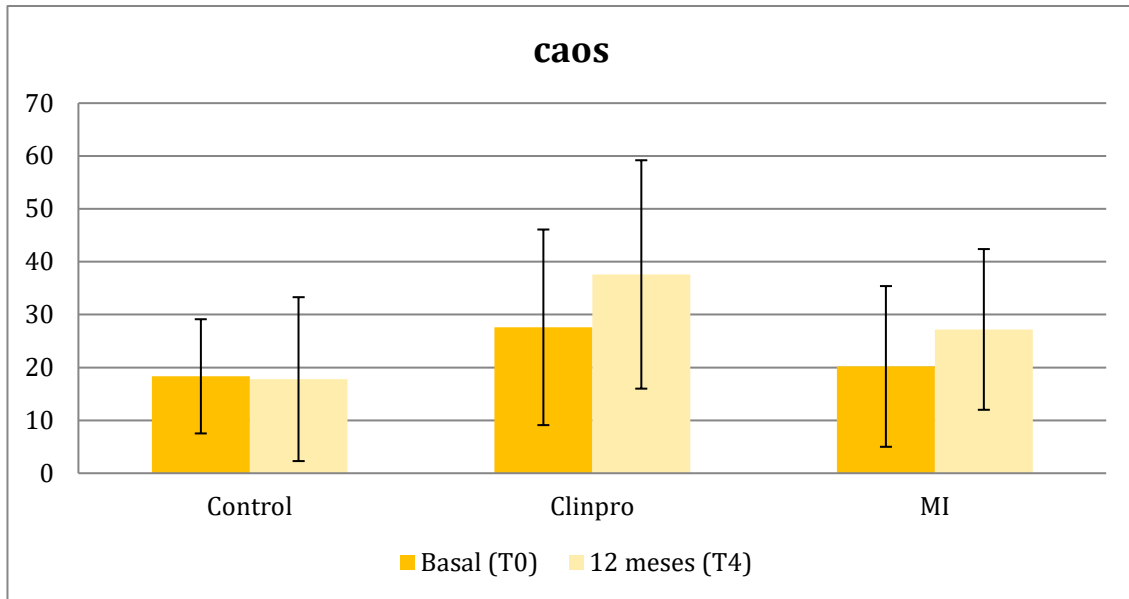


Figura 21. Evolución del caos entre T0 y T4 para cada grupo de barnices.

B. CAOS

La **Tabla VIII** y la **Figura 22** exponen los índices CAOS de nuestra muestra. Tanto en el grupo clinpro como en el grupo MI el CAOS fue más elevado en el T0 que en el T4 mostrando una tendencia decreciente mayor en el grupo Clinpro.

Sin embargo, el grupo control parte de un CAOS $0,37 \pm 1,32$ y, aunque la oscilación no es estadísticamente significativa en el T4, no se puede interpretar como un dato positivo ya que se observa un aumento del índice CAOS ($0,89 \pm 1,79$).

CAOS									
	Basal (T0)				12 meses (T4)				Análisis estadístico
	Promedio	Car. T0	Aus. T0	Obt. T0	Promedio	Car. T4	Aus. T4	Obt. T4	
Control	$0,37 \pm 1,32$	0,46	0	0,1	$0,89 \pm 1,79$	0,00	0	1,77	$p = 1,00 +$
Clinpro	$3,70 \pm 3,38$ (α)	2,2	0	0	$2,02 \pm 2,41$	0,14	0	0,91	$p = 0,151 \uparrow$
MI	$1,94 \pm 2,89$	1,55	0	0,3	$1,34 \pm 2,05$	0	0	1,37	$p = 0,541 \uparrow$
Análisis estadístico †	$p = 0,039$				$p = 0,766$				

Tabla VIII. CAOS (media \pm desviación estándar) y Superficies dentarias careadas, ausentes y obturadas (media). +: test de Wilcoxon. \uparrow : T de Student pareada. †: test de Kruskal-Wallis. α : vs grupo control.

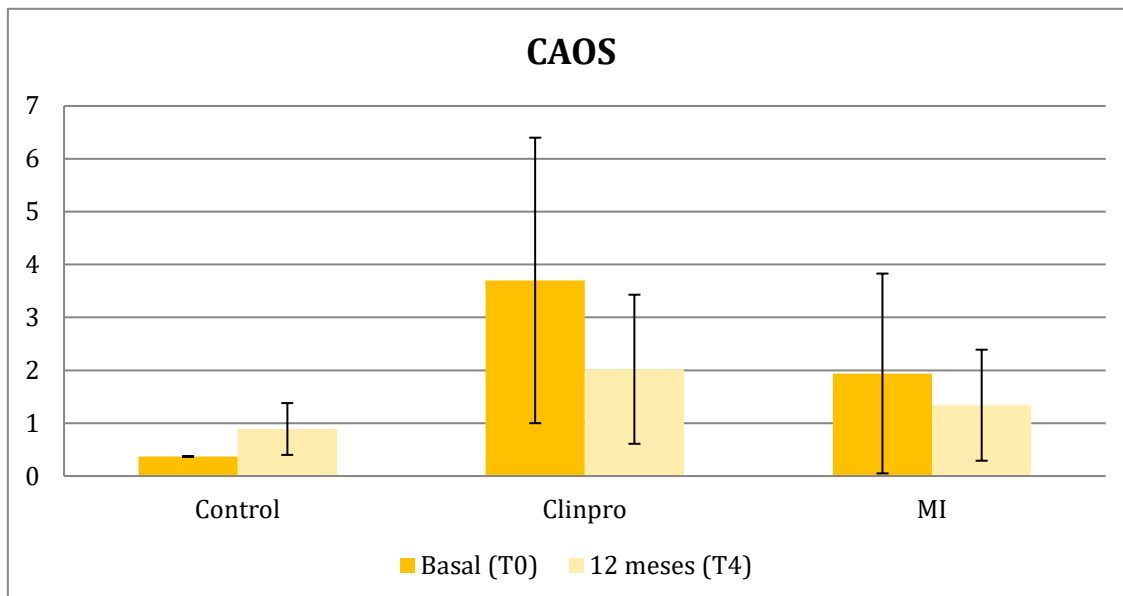


Figura 22. Evolución del CAOS entre T0 y T4 para cada grupo de barnices.

5.2.2. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 2: ÍNDICES DE HIGIENE

Los valores basales del índice de Turesky (**Tabla IX**) fueron similares en los tres grupos ($p=0,057$). Se observó un descenso significativo de los valores del índice de Turesky a lo largo del seguimiento en los tres grupos de estudio.

Los valores de IMAP (**Tabla IX**) no mostraron diferencias basales ($p=0,102$). Observamos una reducción significativa en los valores del índice IMAP en todos los tiempos de intervención respecto de los valores basales en los tres grupos.

Comparando la ratio calculada de reducción de placa, “Greater Plaque Reduction Score”¹⁵⁴, en el grupo Clinpro se observó una mayor reducción tanto en el índice Turesky QH PI 2.59 veces (160%) como en el índice IMAP 1,54 veces (54%) respecto al grupo control. El grupo MI consiguió reducir 1.84 veces (84%) el índice Turesky QH PI y 1.18 veces (18%) el índice IMAP respecto al grupo control (**Tabla IX**).

Turesky QH PI							
	Basal (T0)	3 meses (T1)	6 meses (T2)	9 meses (T3)	12 meses (T4)	Greater Plaque Reduction Score (Ratio, %) ¹⁵⁴	Análisis estadístico
Control	1,99± 0,54	1,64± 0,65	1,15± 0,41 a,b	1,30± 0,60 a	1,42± 0,71 a		p= 0,002 *
Clinpro	2,76± 0,89	1,74± 0,55	1,77± 0,45	1,46± 0,66 a	1,28± 0,66 a	2,59X; 160%	P<0,001 &
MI	2,23± 0,74	1,74± 0,65 a	1,43± 0,62 a	1,27± 0,55 6 a,b	1,18± 0,27 a,b	1,84X; 84%	p<0,001 *
IMAP							
Control	0,39± 0,10	0,33± 0,08 a	0,28± 0,07 a	0,32± 0,06 a	0,28± 0,08 a		p= 0,002 *
Clinpro	0,49± 0,10	0,40± 0,13 a,c	0,40± 0,13 a,c	0,37± 0,11 a	0,32± 0,12 a	1,54 X; (54%)	p< 0,001 *
MI	0,46± 0,13	0,36± 0,11 a	0,32± 0,07 a	0,28± 0,06 a, b	0,33± 0,06 a	1,18X; (18%)	P< 0,001*

Tabla IX. Turesky QH PI e IMAP a lo largo de las diferentes fases para cada grupo de estudio. *: test de varianza simple de medidas repetidas más test de Duncan. &: test de varianza simple sobre rangos de medidas repetidas más test de Tukey. **a:** p<0,05 respecto del valor basal (T0). **b:** p<0,05 respecto del valor a los 3 meses (T1). **c:** p<0,05 respecto del valor a los 12 meses (T4). “Greater Plaque Reduction Score” Ratio = {(reducción de placa total en grupo de intervención T0 – T4) - (reducción de placa total en grupo de placebo T0 – T4)}/(reducción de placa total en grupo de placebo T0 – T4)}. % = 100 x {(reducción de placa total en grupo de intervención T0 – T4) - (reducción de placa total en grupo de placebo T0 – T4)}/(reducción de placa total en grupo de placebo T0 – T4)}.

5.2.3. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 3: pH

El pH basal fue similar en todos los grupos de estudio. Tras la intervención, todos los grupos mostraron un incremento progresivo, aunque no significativo, con pequeñas variaciones (**Tabla X; Figura 23**).

pH						
	Basal (T0)	3 meses (T1)	6 meses (T2)	9 meses (T3)	12 meses (T4)	Análisis estadístico *
Control	7,691 ± 0,277	7,892 ± 0,312	7,767 ± 0,246	7,858 ± 0,345	7,850 ± 0,390	p=0,388
Clinpro	7,689 ± 0,293	7,650 ± 0,295	7,470 ± 0,683	7,610 ± 0,396	7,710 ± 0,325	p=0,564
MI	7,627 ± 0,329	7,682 ± 0,402	7,718 ± 0,309	7,945 ± 0,370	7,800 ± 0,286	p=0,079

Tabla X. Concentraciones de pH a lo largo de las diferentes fases para cada grupo de estudio. *: Análisis de varianza simple de medidas repetidas.

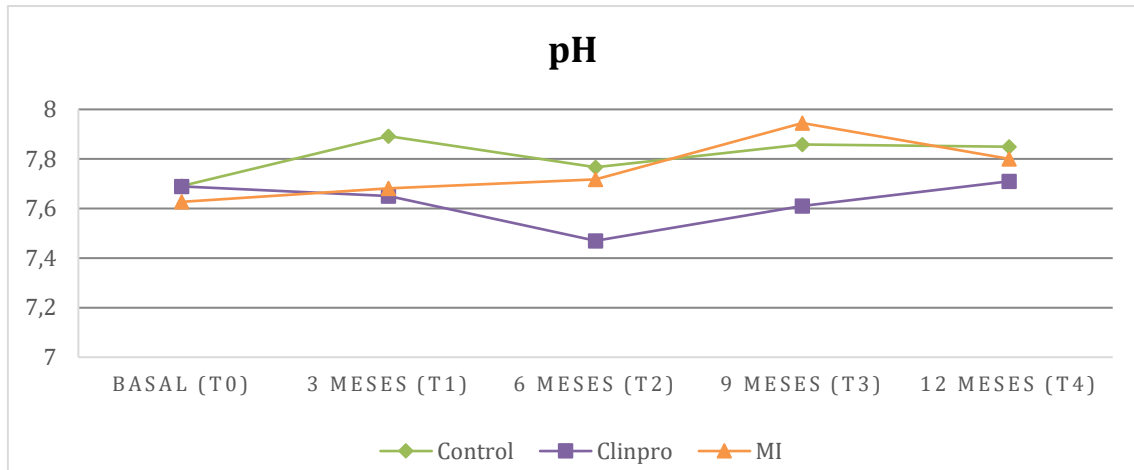


Figura 23. Evolución del pH a lo largo de las diferentes fases de estudio para cada grupo de barnices.

5.2.4. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 4: ÁCIDO LÁCTICO

Los grupos Clinpro y Control presentaron una concentración basal de ácido láctico similar, mientras que la del grupo MI fue ligeramente mayor. Tras 12 meses de seguimiento, hubo un descenso de ácido láctico, que no fue significativo en ningún grupo. El grupo Control fue el grupo que mayor descenso de ácido láctico presentó. (Tabla XI; Figura 24).

ÁCIDO LÁCTICO (mg/L)						
	Basal (T0)	3 meses (T1)	6 meses (T2)	9 meses (T3)	12 meses (T4)	Análisis estadístico *
Control	19,289±15,332	13,978 ± 9,415	21,036±17,990	22,630±16,428	8,438±5,903	p= 0,098
Clinpro	19,275±10,584	26,825±16,797	32,712±20,395	21,114±17,635	18,417±17,425	p= 0,224
MI	24,362±16,195	23,137±18,911	27,200±16,339	14,930±11,224	22,089±12,714	p= 0,471

Tabla XI. Concentraciones de Ácido Láctico (mg/L) a lo largo de las diferentes fases para cada grupo de estudio. *: Análisis de varianza simple de medidas repetidas.

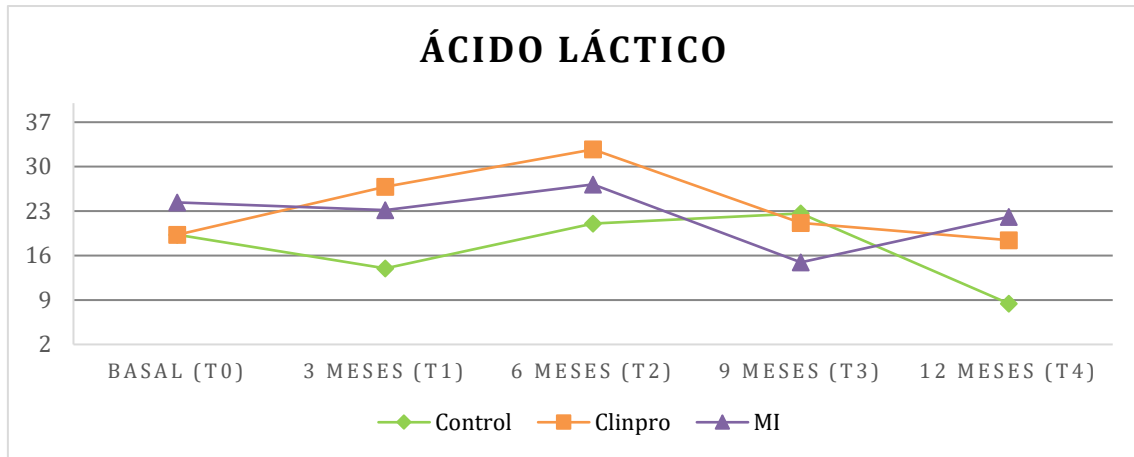


Figura 24. Evolución del ácido láctico a lo largo de las diferentes fases de estudio para cada grupo de barnices.

5.2.5. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 5: ELEMENTOS TRAZA

Se detectaron concentraciones de los iones ^{23}Na , ^{39}K , ^{24}Mg , ^{44}Ca , y ^{31}P en el rango de 100-1200 ppm. ^{57}Fe , ^{27}Al y ^{66}Zn presentaron concentraciones en el rango 100-700 ppb. ^{63}Cu , ^{55}Mn y ^{137}Ba en el rango de 10-100 ppb y ^{52}Cr , ^{59}Co , ^{75}As , ^{111}Cd , y ^{208}Pb en el rango de 0.1-10 ppb.

Sólo se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de ^{24}Mg en el grupo Control entre los tiempos T0, T1 y T2 frente a T3, y T1 frente a T4; ^{31}P en el grupo Control entre T0 frente a T1, T2, T3 y T4 y ^{66}Zn en los tiempos T3 y T4 frente al T0 del grupo Control (**Tabla XII**).

El resto de los elementos traza estudiados ^{23}Na , ^{27}Al , ^{39}K , ^{44}Ca , ^{52}Cr , ^{55}Mn , ^{57}Fe , ^{59}Co , ^{63}Cu , ^{75}As , ^{111}Cd , ^{137}Ba , ^{208}Pb y ^{19}F no modificó su concentración a lo largo del estudio en ninguno de los grupos (**Tabla XIII**)

	CONTROL					CLINPRO					MI				
	T0	T1	T2	T3	T4	T0	T1	T2	T3	T4	T0	T1	T2	T3	T4
MAGNESIO (ppm)	5,964 ± 2,530 c	6,033 ± 1,878 c,d	5,679 ± 1,550 c	4,197 ± 1,875 b	4,763 ± 1,868	5,176 ± 1,727	5,490 ± 3,819	5,955 ± 2,363	4,691 ± 2,231	5,349 ± 2,612	5,099 ± 1,644	5,620 ± 2,271	6,039 ± 3,399	5,177 ± 2,625	4,834 ± 1,969
FÓSFORO (ppm)	205,273 ± 78,814 a,b,c,d	198,102 ± 59,206	198,390 ± 65,518	165,450 ± 52,551	172,776 ± 67,742	178,866 ± 45,689	202,141 ± 52,828	201,097 ± 62,726	198,657 ± 55,295	180,379 ± 52,449	175,243 ± 88,092	189,651 ± 56,666	185,310 ± 68,068	199,371 ± 147,554	172,743 ± 51,287
ZINC (ppb)	697,063 ± 431,615	511,339 ± 292,248	428,145 ± 166,827	377,632 ± 255,334 f	358,914 ± 309,153 f	360,907 ± 100,713	497,673 ± 527,331	283,983 ± 138,173	436,796 ± 493,820	246,976 ± 155,103	451,570 ± 261,448	297,659 ± 135,544	617,446 ± 759,010	359,778 ± 281,762	306,541 ± 183,673

Tabla XII. Elementos traza con diferencias significativas $p \leq 0.05$: **a:** vs T1; **b:** vs T2; **c:** vs T3; **d:** vs T4; **f:** vs T0. ppm= mg/L; ppb=ng/L

	CONTROL					CLINPRO					MI				
	T0	T1	T2	T3	T4	T0	T1	T2	T3	T4	T0	T1	T2	T3	T4
pH	7,691 ± 0,277	7,892 ± 0,312	7,767 ± 0,246	7,858 ± 0,345	7,850 ± 0,390	7,689 ± 0,293	7,650 ± 0,295	7,470 ± 0,683	7,610 ± 0,396	7,710 ± 0,325	7,627 ± 0,329	7,682 ± 0,402	7,718 ± 0,309	7,945 ± 0,370	7,800 ± 0,286
ACIDO LACTICO (mg/L)	19,289 ± 15,332	13,978 ± 9,415	21,036± 17,990	22,630± 16,428	8,438± 5,903	19,275± 10,584	26,825± 16,797	32,712± 20,395	21,114± 17,635	18,417± 17,425	24,362± 16,195	23,137± 18,911	27,200± 16,339	14,930± 11,224	22,089± 12,714
SODIO (ppm)	248,194 ± 139,716	201,595 ± 66,288	218,480± 170,891	173,850 ± 85,649	240,168 ± 135,968	225,429 ± 147,144	215,098 ± 171,809	224,836 ± 124,393	220,662 ± 180,556	212,320 ± 111,239	160,551 ± 70,881	181,645 ± 79,014	204,946 ± 100,158	169,328 ± 82,909	162,175± 74,268
ALUMIN IO (ppb)	333,208 ± 183,751	234,432 ± 132,795	191,094 ± 123,028	180,855 ± 111,019	293,447 ± 345,301	186,702 ± 88,419	211,754 ± 142,646	513,260 ± 782,415	180,783 ± 89,185	214,838 ± 209,433	352,480 ± 333,027	238,117 ± 162,809	327,611 ± 273,735	227,774 ± 189,359	230,263 ± 106,472
POTASI O (ppm)	1025,74 1 ± 276,149	993,496 ± 180,808	1002,781 ± 221,995	920,151 ± 153,085	957,936 ± 228,272	936,678 ± 184,584	1057,216 ± 289,940	1055,634 ± 290,046	1105,300 ± 262,103	1008,175 ± 213,882	936,756 ±192,816	981,274 ± 206,305	964,686 ± 215,792	929,090 ± 254,098	937,495 ± 132,456
CALCI O (ppm)	94,786 ± 35,781	88,603 ± 26,733	92,572 ± 35,049	61,407 ±21,515	70,536 ± 24,694	88,898 ± 43,968	73,684 ±30,781	66,012 ±31,476	58,324 ±17,708	59,406 ± 24,819	73,989 ± 36,378	77,978 ± 20,440	88,883 ± 68,376	84,379 ± 41,876	78,395 ± 24,987
CROM O (ppb)	4,013 ± 6,785	2,295 ± 1,404	1,435 ± 1,072	1,559 ± 1,616	2,458 ± 3,103	1,218 ± 1,473	2,254 ± 2,320	3,445 ± 4,317	4,537 ± 6,220	1,871 ± 3,653	2,082 ± 1,100	2,750 ± 2,905	2,933 ± 2,385	6,546 ± 13,866	2,787 ± 3,289
MANGA NESO (ppb)	55,852 ± 32,229	49,281 ± 30,059	60,706 ± 21,520	48,331 ± 26,383	53,574 ±31,954	47,842 ± 32,057	50,339 ± 42,555	40,063 ± 28,127	41,016 ± 25,129	39,694 ± 28,462	42,251 ± 31,591	50,519 ±20,276	52,462 ± 41,599	53,124 ± 27,774	51,673 ± 17,636
HIERR O (ppb)	147,952 ± 90,313	147,144 ± 88,435	164,172 ± 88,824	140,449 ± 117,831	186,385 ± 169,798	103,283 ± 49,763	151,232 ± 105,901	166,435 ± 185,257	105,924 ± 73,330	122,435 ± 92,716	142,072 ± 93,081	150,262 ± 125,766	220,809 ± 188,328	155,368 ± 116,249	164,515 ± 94,194
COBAL TO (ppb)	1,646 ± 0,889	2,112 ± 1,621	1,994 ± 1,072	1,899 ± 0,999	1,903 ± 1,514	1,421 ± 1,170	1,300 ± 1,026	1,336 ± 0,916	1,439 ± 0,920	1,329 ± 1,040	1,157 ± 0,858	1,289 ± 1,163	1,359 ± 1,209	1,127 ± 1,241	1,187 ± 0,947
COBRE (ppb)	70,412 ± 59,314	70,833 ± 46,034	50,914 ± 25,602	63,243 ±61,103	52,858 ± 59,830	32,533 ± 24,889	68,003 ± 135,975	61,914 ± 42,271	44,274 ± 38,882	39,072 ± 56,660	34,676 ± 19,508	54,865 ± 34,184	96,771 ± 84,260	44,290 ± 45,844	118,943 ± 283,883
ARSÉNI CO (ppb)	2,009 ±1,452	1,923 ± 1,396	2,090 ±1,631	2,396±1,3 97	2,691 ±1,534	2,566 ±1,339	2,491 ±1,233	2,466 ± 1,053	2,549 ± 1,253	2,281 ± 1,246	1,843 ± 1,543	1,759 ± 1,512	1,889 ± 1,496	1,966 ± 1,568	2,131 ± 1,613
CADMI O (ppb)	0,698 ± 0,677	0,853 ± 1,405	0,437 ± 0,360	0,669±0,5 22	0,698 ± 0,677	0,359 ± 0,543	0,612 ± 0,735	1,503 ± 3,908	0,483 ± 0,422	0,347 ± 0,421	0,337 ± 0,283	0,384 ± 0,276	0,605 ± 0,792	0,313 ± 0,181	0,816 ± 0,784
BARIO (ppb)	21,002 ± 14,780	19,456 ± 11,772	12,753 ± 6,548	17,328 ± 26,994	21,246± 30,018	8,790 ± 5,546	12,096 ± 9,927	11,900 ± 15,873	12,707 ± 9,965	10,016 ± 8,097	19,181 ± 11,538	13,971 ± 7,363	21,576 ± 19,071	19,095 ± 17,679	17,238 ± 15,998
PLOMO (ppb)	17,077 ± 11,782	6,140 ± 9,077	3,054 ± 5,685	2,423 ± 4,086	6,356 ± 9,687	4,252 ± 8,489	12,496 ± 29,752	3,499 ± 8,701	1,114 ± 1,427	3,801 ± 7,776	5,943 ± 9,236	2,688 ± 2,487	6,397 ± 7,296	2,739 ± 3,024	4,361 ± 9,152
FLUOR (ppm)	0,0467± 0,0186	-	-	-	0,0617±0, 0286	0,0560 ± 0,0434	-	-	-	0,0660 ±0,0261	0,0540±0, 0152	-	-	-	0,0920±0, 0409

Tabla XIII. Elementos traza salivares analizados sin significación estadística $p \leq 0.05$. ppm= mg/L; ppb=ng/L.

A. MAGNESIO

En el grupo Control los valores ^{24}Mg se redujeron de forma significativa, alcanzando la menor concentración a los 9 meses. En los grupos de barniz la concentración de ^{24}Mg no se modificó a lo largo del seguimiento (Tabla XIV; Figura 25).

MAGNESIO (ppm)						
	Basal (T0)	3 meses (T1)	6 meses (T2)	9 meses (T3)	12 meses (T4)	Análisis estadístico *
Control	5,964 ± 2,530 d	6,033 ± 1,878 c,d	5,679 ± 1,550 d	4,197 ± 1,875	4,763 ± 1,868	P<0,001
Clinpro	5,176 ± 1,727	5,490 ± 3,819	5,955 ± 2,363	4,691 ± 2,231	5,349 ± 2,612	P=0,740
MI	5,099 ± 1,644	5,620 ± 2,271	6,039 ± 3,399	5,177 ± 2,625	4,834 ± 1,969	P=0,744

Tabla XIV. Concentraciones de Magnesio (ppm) a lo largo de las diferentes fases para cada grupo de estudio. *: test de varianza simple de medidas repetidas más test de Holm-Sidak. **c:** p<0,05 vs T4. **d:** p<0,05.

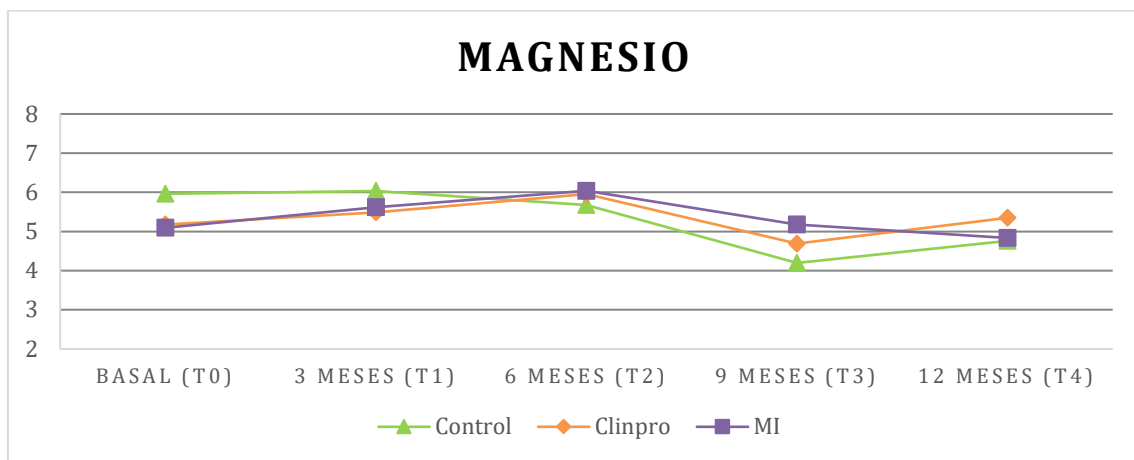


Figura 25. Evolución del magnesio a lo largo de las diferentes fases de estudio para cada grupo de barnices.

B. FÓSFORO

El grupo control experimentó una disminución progresiva y estadísticamente significativa a lo largo de todo el seguimiento. Los grupos donde se aplicó barniz no alteraron sus concentraciones de ^{31}P (Tabla XV; Figura 26).

FÓSFORO (ppm)						
	Basal (T0)	3 meses (T1)	6 meses (T2)	9 meses (T3)	12 meses (T4)	Análisis estadístico *
Control	205,273 ± 78,814 b,c,d,e	198,102 ± 59,206	198,390 ± 65,518	165,450 ± 52,551	172,776 ± 67,742	p=0,033
Clinpro	178,866 ± 45,689	202,141 ± 52,828	201,097 ± 62,726	198,657 ± 55,295	180,379 ± 52,449	p=0,462
MI	175,243 ± 88,092	189,651 ± 56,666	185,310 ± 68,068	199,371 ± 147,554	172,743 ± 51,287	p=0,900

Tabla XV. Concentraciones de Fósforo (ppm) a lo largo de las diferentes fases para cada grupo de estudio
*: test de varianza simple de medidas repetidas más test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. **b:** vs T1. **c:** vs T4. **d:** vs T3. **e:** vs T2.

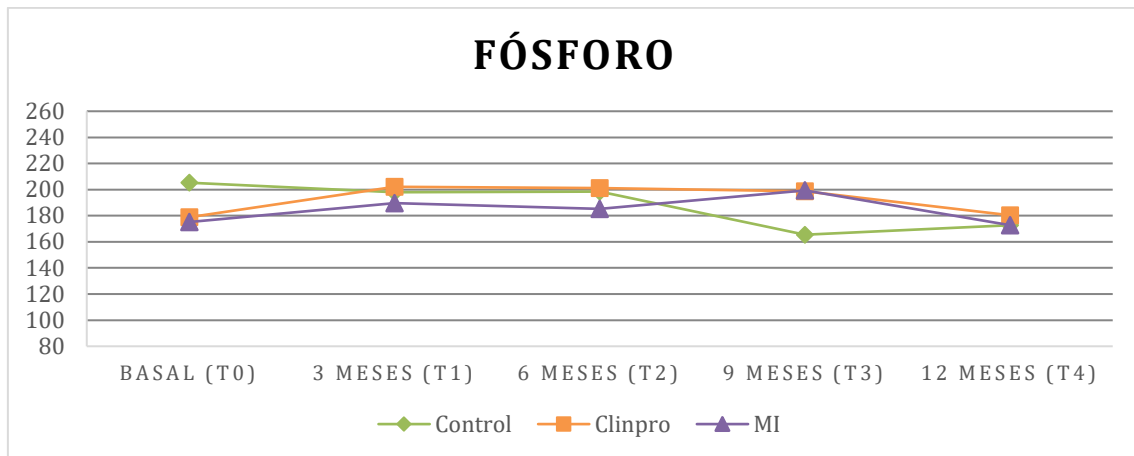


Figura 26. Evolución del fósforo a lo largo de las diferentes fases de estudio para cada grupo de barnices.

C. ZINC

El grupo control presentó una reducción progresiva significativa de las concentraciones de ^{66}Zn en la saliva. El valor más bajo se alcanzó a los 12 meses de seguimiento. En los grupos donde se aplicó barniz no hubo modificación de las concentraciones salivares de ^{66}Zn (Tabla XVI; Figura 27).

ZINC (ppb)						
	Basal (T0)	3 meses (T1)	6 meses (T2)	9 meses (T3)	12 meses (T4)	Análisis estadístico *
Control	697,06 ± 431,61 c,d	511,34 ± 292,25	428,14 ± 166,83	377,63 ± 255,33	358,91 ± 309,15	P = 0,005
Clinpro	360,907 ± 100,713	3187,626 ± 8520,892	283,983 ± 138,173	436,796 ± 493,820	246,976 ± 155,103	P = 0,364
MI	451,570 ± 261,448	297,659 ± 135,544	617,446 ± 759,010	359,778 ± 281,762	306,541 ± 183,673	P = 0,268

Tabla XVI. Concentraciones de Zinc (ppb) a lo largo de las diferentes fases para cada grupo de estudio *: test de varianza simple de medidas repetidas más test de comparaciones múltiples de Holm-Sidak. **c:** vs T4; **d:** vs T3.

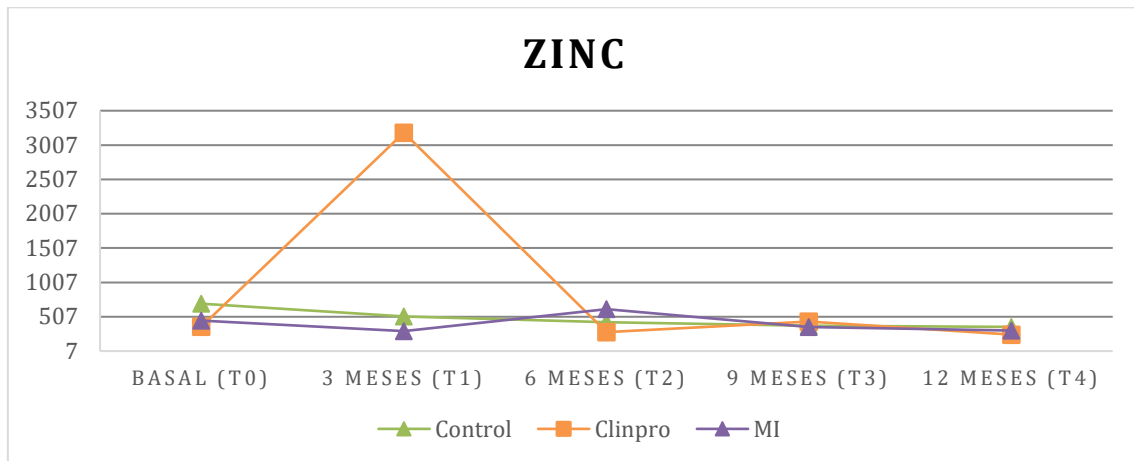


Figura 27. Evolución del zinc a lo largo de las diferentes fases de estudio para cada grupo de barnices.

D. CALCIO

No se han detectado diferencias significativas en la concentración salival de ^{44}Ca ni en el grupo control ni en los grupos donde se aplicó barniz a lo largo del estudio (**Tabla XVII**; **Figura 28**).

CALCIO (ppm)						
	Basal (T0)	3 meses (T1)	6 meses (T2)	9 meses (T3)	12 meses (T4)	Análisis estadístico *
Control	94,786 ± 35,781	88,603 ± 26,733	92,572 ± 35,049	61,407 ± 21,515	70,536 ± 24,694	p=0,057
Clinpro	88,898 ± 43,968	73,684 ± 30,781	66,012 ± 31,476	58,324 ± 17,708	59,406 ± 24,819	p=0,119
MI	73,989 ± 36,378	77,978 ± 20,440	88,883 ± 68,376	84,379 ± 41,876	78,395 ± 24,987	p=0,935

Tabla XVII. Concentraciones de Calcio (ppm) a lo largo de las diferentes fases para cada grupo de estudio.
*: test de varianza simple de medidas repetidas.

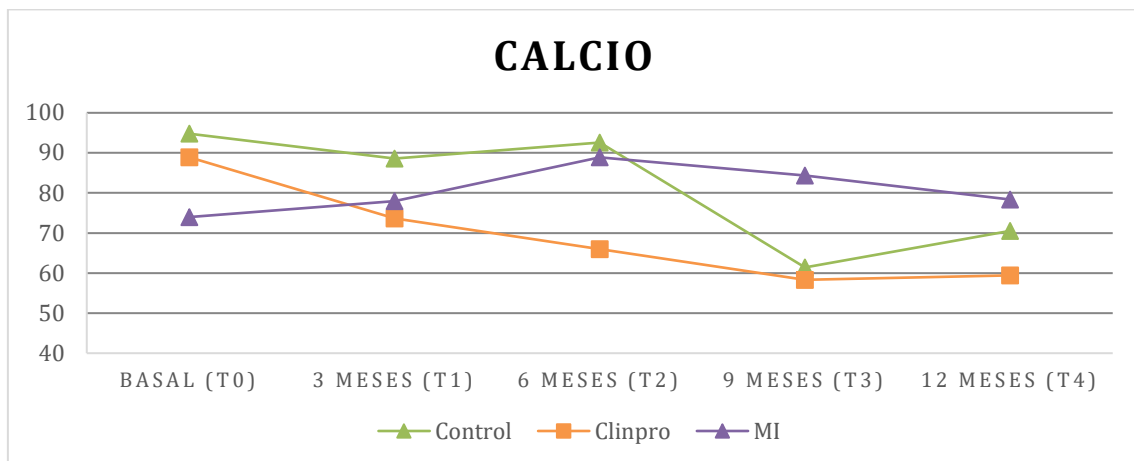


Figura 28. Evolución del calcio a lo largo de las diferentes fases de estudio para cada grupo de barnices.

E. FLUÓR

Al inicio del estudio, todos los sujetos mostraron niveles de fluoruro salival similares, alrededor de 0.05 ± 0.02 ppm. Tras un año de seguimiento (T4), hubo un incremento no significativo de la concentración de fluoruro en los tres grupos, observándose en el grupo MI el mayor incremento. (Tabla XVIII; Figura 29).

FLUOR (ppm)			
	Basal (T0)	12 meses (T4)	Análisis estadístico
Control	0,0467±0,0186	0,0617±0,0286	p=0,107 ¶
Clinpro	0,0560 ± 0,0434	0,0660 ±0,0261	p=0,747 ¶
MI	0,0540±0,0152	0,0920±0,0409	p=0,063 +
Análisis estadístico @	p=0,843	p=0,291	

Tabla XVIII. Concentraciones de Flúor (ppm) a lo largo de las diferentes fases para cada grupo de estudio. ¶: T de Student pareada. +: test de Wilcoxon. @: test de varianza simple.

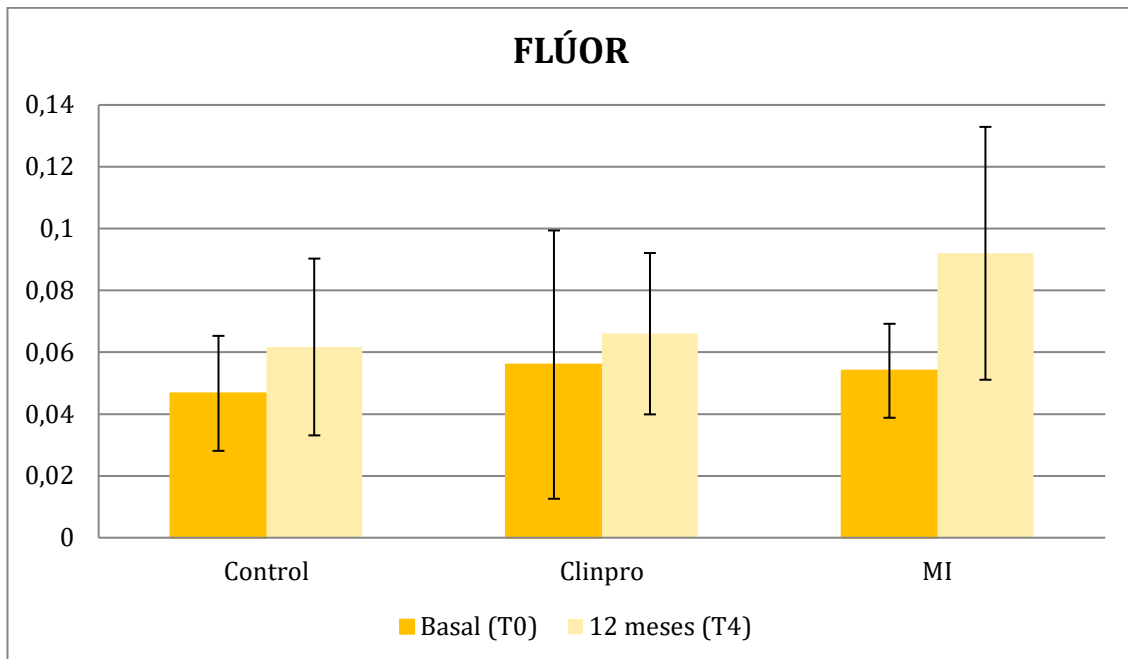


Figura 29. Evolución del flúor a lo largo de las diferentes fases de estudio para cada grupo de estudio.

5.2.6. RESULTADOS DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 6: RECuento BACTERIANO

El recuento bacteriano total basal estuvo en el rango 10^6 – 10^7 en todos los grupos. Los barnices no consiguieron una reducción del recuento bacteriano de manera significativa ni entre los distintos grupos ni entre los tiempos T0 y T4 dentro de un mismo grupo (Tabla XIX; Figura 30).

RECuento BACTERIANO TOTAL (Q _{bact} /ml de saliva)				
	Basal (T0)	12 meses (T4)	Reducción desde el inicio	Análisis estadístico
Control	13.20 x10 ⁶ ± 9.23 x10 ⁶	8.45 x10 ⁶ ± 7.21 x10 ⁶	4,75 x10 ⁶ ± 2,02 x10 ⁶	P = 0,103 ¶
Clinpro	19.74 x10 ⁶ ± 30.13 x10 ⁶	15.63 x10 ⁶ ± 21.66 x10 ⁶	4,11 x10 ⁶ ± 8,47 x10 ⁶	P= 0,388 ¶
MI	12.65 x10 ⁶ ± 16.70 x10 ⁶	6.85 x10 ⁶ ± 5.84 x10 ⁶	5,80 x10 ⁶ ± 1,09 x10 ⁷	P = 0,520 +
Análisis estadístico †	P = 0,689	P = 0,432		

Tabla XIX. Concentraciones del recuento bacteriano (Q_{bact}/ml de saliva) a lo largo de las diferentes fases para cada grupo de estudio. ¶: T de Student pareada. +: test de Wilcoxon. †: test de Kruskal-Wallis

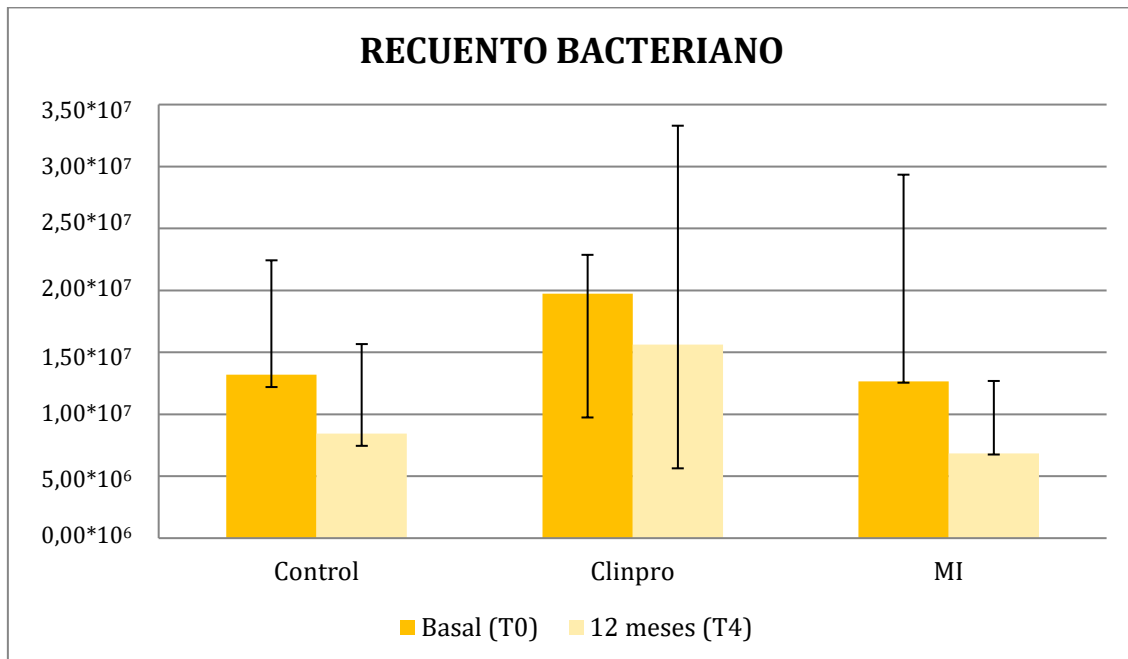


Figura 30. Evolución del recuento bacteriano para cada grupo de barnices. 10^6

5.2.7. CORRELACION DE LOS ELEMENTOS ESTUDIADOS

Con el objetivo de establecer el grado de asociación entre las variables del estudio: pH, ácido láctico, valores de caos y CAOS, índices de Turesky e IMAP y recuento bacteriano total, todas ellas en los tiempos 0 y 4, hemos realizado un test de correlación de Pearson (Anexo 9).

Los elementos que se correlacionan linealmente están resumidos en la **Tabla XX**. Existe una correlación altamente positiva entre el valor de lactato en el T4 y el valor de caos en el T4, como así lo muestra la fuerte dependencia lineal positiva con coeficientes de correlación $r > 0.5$. Asimismo, se puede observar una correlación acentuada entre el índice IMAP en el T4 e índice Turesky en el T4 ($p = 0,00947$; $r = 0,445$) y entre el recuento bacteriano entre el T0 y el T4 ($p = 0,00000316$; $r = 0,713$). Por otro lado, correlaciones menos acentuadas se dan para caos T0-IMAP T0, caos T4-IMAP T4 e IMAP T0-Turesky T0.

CORRELACIÓN ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA DE LOS ELEMENTOS ESTUDIADOS						
	caos T4	IMAP T0	IMAP T4	TURESKY T0	TURESKY T4	Recuento bacteriano T4
Ácido láctico T4	0,654 p<0,001					
caos T0		0,424 P=0,013				
caos T4			0,397 P=0,024	0,437 P=0,012		
IMAP T0				0,434 p=0,012		
IMAP T4				0,432 p=0,012	0,445 P=0,009	
pH T0					0,424 p=0,017	
Recuento bacteriano T0						0,713 P<0,001

Tabla XX. Matriz de correlación con los resultados estadísticamente significativos entre los parámetros analizados (n=33). IMAP: índice de maduración y acidez de la placa. Turesky: Índice Turesky QH PI.

6

DISCUSIÓN

En este ensayo clínico hemos evaluado el efecto de la aplicación de dos barnices de fosfato de calcio, MI Varnish™ (CPP-ACP con fluoruro de sodio al 5%) y Clinpro™ White Varnish (fTCP con fluoruro sódico al 5%), aplicados trimestralmente durante un año a niños con alto o extremo riesgo de caries, sobre el índice de caries, el índice de placa, el pH, la concentración de ácido láctico, la concentración de elementos traza y recuento bacteriano total en la saliva.

La saliva ha sido estudiada como un posible indicador de susceptibilidad a la caries, buscando parámetros de la fisiología salival, niveles de antioxidantes, proteínas, microelementos y elementos traza que puedan dar información sobre el riesgo de caries de un paciente ⁸⁰. Hasta donde nosotros conocemos no existen ensayos clínicos controlados y aleatorizados que hayan estudiado la influencia del uso de los barnices de fosfato de calcio en niños con alto riesgo de caries sobre los parámetros salivales anteriormente mencionados ^{124,155,156}.

6.1. DISCUSIÓN DEL MÉTODO

La edad de los niños incluidos en nuestro estudio osciló entre los 4 y los 12 años, ya que es la población en la que se realiza prevención de caries por ser uno de los grupos con mayor posibilidad de desarrollar de caries ⁹⁹.

Decidimos pautar la secuencia de revisiones y aplicación de barnices de acuerdo con el modelo CAMBRA. Es un programa de dos fases basado en la evaluación del riesgo y en el tratamiento de la caries. Tras la evaluación del riesgo se realiza un plan de tratamiento individualizado que incluye la terapia química y una remineralización constante ^{39,67,142,143}.

Decidimos valorar la capacidad de los dos barnices de modificar el riesgo mediante la determinación a nivel salival del pH, de las concentraciones de ácido láctico y los elementos traza ^{20,114,157}, del recuento bacteriano total ¹⁵⁸, así como con el índice de caries y de placa ⁹⁹.

El *pH* de la saliva es un indicador de la salud bucodental. Un pH fisiológico refleja una relación simbiótica entre el huésped, el ambiente oral y el microbioma. La ingesta frecuente de azúcar y/o la reducción del flujo de saliva resultan en periodos prolongados de pH bajo, lo que interrumpe esta relación simbiótica. Tales condiciones inhiben el crecimiento de especies beneficiosas e impulsan la selección de bacterias acidogénicas y acidúricas induciendo una disbiosis del medio ¹⁴².

El *ácido láctico*, ácido principal producido y liberado por las bacterias de la placa dental, es considerado el principal ácido involucrado en la formación de caries ²⁰.

Existe una amplia gama de biomoléculas en la saliva, incluidos los *elementos traza*, que se relacionan con el estado fisiológico oral y, por lo tanto, pueden proporcionar información sobre la dinámica de la caries ¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Varios métodos se han usado para medir los elementos traza en saliva: espectrofotometría de absorción atómica ^{146,162-165}, espectrometría de absorción atómica multielemental ¹⁶⁶, método colorimétrico de Subbarow ^{72,167}, fotómetro de llama ⁷², espectrometría de masas de plasma (ICP-OES) ¹⁶⁸ o electrodo sensible al fluoruro ^{162,169}. Recientemente, la ICP-MS ha permitido la medición de microelementos salivales con mayor facilidad y precisión. En nuestro estudio

examinamos los niveles de elementos traza en la saliva mediante ICP-MS que es capaz de detectar concentraciones de partes por trillón (ppt) ¹⁷⁰ y proporciona información sobre metabolitos que no se pueden medir mediante ningún otro método ¹⁷¹.

Otro de los parámetros estudiados fue el *recuento bacteriano*. Un recuento bacteriano oral alto también puede ser un factor de riesgo, ya que las bacterias cariogénicas son necesarias para el desarrollo de la caries dental ¹⁷². Se cree que aún no se pueden cultivar más del 50% de las bacterias existentes en la cavidad oral, lo que dificulta la comprensión de la actividad microbiana respecto a la caries dental y, por ello, descartamos las técnicas basadas en cultivos. Las tecnologías emergentes, como la técnica de hibridación “chekerboard” ADN-ADN, la huella digital genómica y la clonación y secuenciación del gen de ARN ribosómico 16S, junto con la rápida expansión de los datos del genoma bacteriano, han permitido evaluar la diversidad microbiana de la saliva humana y su asociación con la caries dental ⁷⁰. Para el recuento bacteriano total hemos utilizado la técnica cuantitativa de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), que es un método basado en el recuento de ADN ¹⁷³, más sensible al recuento de bacterias en la saliva en comparación con los métodos tradicionales basados en cultivos ¹⁷⁴.

La *saliva* ha sido ampliamente estudiada como un posible indicador de susceptibilidad a la caries ⁸⁰. Los microelementos más importantes para la remineralización y maduración del tejido dentario como calcio, sodio, magnesio, zinc y flúor ^{80,81} se encuentran en la saliva, considerada como el principal vehículo en la remineralización del esmalte ya que representa el medio inicial en el que se libera el fluoruro y el resto de iones ⁷⁹. Además, en poblaciones vulnerables, como bebés y niños, la saliva es el medio diagnóstico perfecto debido a su recolección no invasiva, fácil manejo y fácil almacenamiento ¹⁶¹.

El conocimiento de su composición puede ayudarnos a detectar carencias en los pacientes que presentan alto riesgo de caries y, así, poder hacer un tratamiento individualizado que revierta la situación de riesgo ¹⁴⁶. No obstante, se han publicado pocos estudios sobre la composición salival de niños sanos y nuestro conocimiento sobre la importancia biológica de la saliva humana en reposo es muy escaso en la actualidad, especialmente en niños ^{72,175}.

Pereira y cols. ¹⁶⁰ detectaron diferencias en la composición de la saliva en función de la presencia o no de caries, pero no encontraron diferencias entre la saliva estimulada y la

no estimulada de niños, ni entre géneros, ni en función del estadio de la dentición. Sejdini y cols.¹⁷⁶ observaron que tampoco existía diferencia en la composición para determinados elementos entre la placa bacteriana y la saliva (sodio, amonio, potasio, magnesio y cloro), aunque la actividad metabólica de la placa bacteriana podría hacer variar su composición inorgánica estableciendo diferencias con la de la saliva. Por ello, es posible que para conocer el riesgo de padecer caries y su monitorización no sólo sea útil medir la composición y los biomarcadores de la saliva sino también los de la placa bacteriana.

Teniendo en cuenta que la cantidad y la composición de la saliva podría alterarse por las influencias hormonales, el estado de hidratación, la ansiedad¹⁶⁶, los ritmos circadianos¹⁷⁷, etc., la recolección de la saliva se realizó siempre en la sala de espera, entre las 15:00 y las 18:00.

Los *barnices utilizados* en nuestro estudio contienen fluoruro de sodio al 5% –equivalente a 22.600 ppm o 1.19 M de fluoruro– y fosfato de calcio en dos formas químicas diferentes, CPP-ACP y *f*TCP. La prevención de la caries se basa en la capacidad de los iones fluoruro para inhibir la disolución del esmalte y mejorar la remineralización de las lesiones incipientes⁸⁴. Estudios clínicos recientes han demostrado que el fluoruro por sí mismo tiene efectos mínimos en la ecología del microbioma^{129,178,179}, de modo que son necesarias medidas adicionales para complementar los efectos fisicoquímicos cariostáticos del fluoruro, especialmente en individuos con alto riesgo de caries¹⁸⁰. La principal limitación de la remineralización se encuentra en el aporte adecuado de iones Ca y P a las zonas desmineralizadas. Si tenemos en cuenta la composición de la hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$) y de la fluorapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$), observamos que se requieren un número determinado de iones Ca y P para su formación^{77,115,116}. Por lo tanto, los productos utilizados han de aportar los niveles suficientes de Ca y P. Estudios *in vitro* han demostrado la capacidad preventiva y remineralizante de CPP-ACP y *f*TCP ya que son capaces de generar soluciones supersaturadas de calcio y fosfato en la biopelícula y saliva^{84,122,123}.

Los datos de *experiencia de caries* fueron registrados con ICDAS y transformados a CAOS/caos, ya que a pesar de que con ICDAS se obtiene información detallada con respecto a la gravedad de la lesión, es un método lento y difícil de analizar¹⁸¹. Los índices CAOS/caos pueden proporcionar datos y perspectivas potentes sobre la caries dental y es el método más rápido de aplicar y valorar¹⁸¹, aunque también tienen algunas limitaciones:

presenta mucho sesgo y variabilidad entre observadores; sus valores no proporcionan ninguna predicción sobre el número de dientes en riesgo o los datos que son útiles para estimar la necesidad de tratamiento; da el mismo peso a las ausencias, dientes no tratados o dientes bien restaurados; no tienen en cuenta los dientes sellados ya que los selladores y otras restauraciones cosméticas no existían en la década de 1930 cuando se ideó este método ^{151,182}. En nuestro protocolo tuvimos en cuenta los dientes ausentes debido a caries, a pesar de la dificultad descrita en la literatura de distinguir entre los dientes extraídos debido a caries y los que se han exfoliado naturalmente ¹⁴⁸ y, además, recibieron un factor de corrección de 3 superficies ¹⁵¹.

Para teñir la placa dental y poder evaluar los *índices de higiene*, en vez de usar un revelador de placa convencional, empleamos el gel revelador de placa de 3 tonos –Tri Plaque ID Gel™– que evidencia tanto la maduración como la producción de ácido de la biopelícula mediante diferentes colores ¹⁸³. A la hora de valorar los índices de higiene, no sólo medimos la cantidad de placa mediante el índice de Turesky QH PI, sino que desarrollamos el índice IMAP, que con una numeración nos clasifica al paciente en función de la maduración y la acidez de la biopelícula ¹⁸⁰.

Hemos realizado un ensayo clínico porque la mejor manera de probar la efectividad de un biomaterial es la experimentación in vivo en ensayos controlados y aleatorizados. Además, los agentes remineralizantes usados en nuestro estudio necesitan las proteínas salivales para ejercer su acción completamente, y su efecto se hubiera subestimado si hubiéramos usado algún modelo con saliva artificial ⁷⁶. Los ensayos controlados y aleatorizados aportan un alto nivel de evidencia científica, aunque presentan el problema de la pérdida de pacientes ¹⁸⁴. Esta pérdida es mayor en nuestro estudio debido a que los niños de alto o extremo riesgo de caries suelen faltar a las citas por sus condicionantes socioeconómicos; por ello se estimó una tasa de pérdidas de seguimiento del 45%.

6.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados de nuestro estudio muestran que los barnices de fosfato de calcio, MI Varnish™ (CPP-ACP con fluoruro de sodio al 5%) y Clinpro™ White Varnish (fTCP con fluoruro sódico al 5%), aplicados trimestralmente durante un año, a niños con alto o extremo riesgo de caries, no modifican el pH, ni las concentraciones de ácido láctico, ni la mayoría de los elementos traza estudiados, ni el recuento bacteriano total en saliva no estimulada, ni el caos/CAOS. No obstante, sí se redujo el índice de placa dental de forma similar en todos los grupos de estudio. Por ello solo podemos rechazar parcialmente la hipótesis nula planteada en el estudio.

Nuestra muestra de niños es de alto o extremo riesgo de caries con un *caos* basal entre $18,33 \pm 10,07$ y $32,34 \pm 19,93$ y *CAOS* entre $0,37 \pm 1,32$ y $3,70 \pm 3,38$. El *CAOS* tiende a disminuir en los grupos en los que se aplica barniz y aumenta ligeramente en el grupo control, lo cual sugiere que el CPP-ACP y el fTCP, combinados con el flúor ofrecen una protección contra la caries dental, probablemente debido a su eficacia en las lesiones oclusales de caries temprana, tal y como describen Tao y cols. en su revisión sistemática y metaanálisis¹⁵⁵. Sin embargo, el caos no disminuyó en los grupos Clinpro y MI, por lo que cabe suponer que el barniz puede no haber sido tan efectivo en lesiones interproximales y de superficies lisas¹⁵⁵, predominantes en niños de alto riesgo.

Los niños que recibieron tan sólo instrucciones de higiene oral y pasta dental fluorada (grupo Control) junto a un protocolo de visitas trimestral no mostraron un índice caos superior al de los grupos tratados con barniz. De hecho, tal y como observan Cury y cols.¹¹⁴ el efecto anticaries de los materiales liberadores de flúor se ha demostrado claramente en estudios *in vitro* e *in situ* pero no en ensayos clínicos aleatorizados siendo la higiene oral diaria, preferiblemente con dentífrico fluorado, una de las estrategias obligatorias para lograr el máximo control de la caries. Así mismo, Memarpour y cols.¹¹⁸ establecen que la educación en salud oral y las visitas regulares al dentista se consideran intervenciones básicas de salud dental pública destinadas a disminuir la caries dental.

Una de las limitaciones de los índices *CAOS/caos* es que tienen el mismo valor las ausencias, los dientes careados o dientes obturados¹⁸². En nuestro estudio, el grupo Clinpro, pasó de 14 superficies careadas, 1,8 ausentes y 0,7 obturadas en T0 a 0 superficies careadas, 5,33 ausentes por caries y 12,66 superficies obturadas en T4. Estos

valores también se modificaron siguiendo la misma tendencia en el grupo Control y MI. Por lo tanto, aunque el valor numérico de CAOS/caos no haya variado significativamente el estado de salud oral de esos pacientes sí mejoró.

En todos los grupos hubo una reducción significativa en los *índices de higiene* entre el T0 y el T4. Esto puede ser el resultado de las instrucciones de higiene oral ofrecidas, las limpiezas trimestrales, las medidas de apoyo al cumplimiento de las citas y los recordatorios para usar los productos de tratamiento provistos. Otros estudios ya han observado que la educación de los padres de niños con alto riesgo de desarrollar caries es una parte muy importante del tratamiento ^{118,185}. Es más, se ha demostrado que la repetición y el refuerzo desempeñan un papel crucial en la sostenibilidad del efecto de los programas de Educación en Salud Oral ¹⁸⁶.

La reducción en los índices de higiene observada fue mayor en los grupos en los que se habían aplicado los barnices comparado con el grupo control. Tanto el CPP-ACP como el *f*TCP podrían haber provocado un cambio ecológico microbiano beneficioso en la biopelícula ^{102,129,187,188}. Se cree que los efectos cariostáticos ecológicos de CPP-ACP están mediados, predominantemente, a través de sus acciones anti-adhesión y amortiguación e interrupción de la biopelícula ^{129,189,190}. Varios estudios *in vitro* también han demostrado las propiedades anti-caries del fluoruro de sodio con *f*TCP ^{133,134,191,192}, pero la eficacia clínica sigue siendo desconocida. Recientemente, Yu y cols.¹⁸⁷ encontraron que el nitrato de plata y el barniz de fluoruro de sodio con *f*TCP redujeron el daño de la caries de dentina causada por biopelícula cariogénica artificial, formada por *S. mutans*. El *f*TCP aumentó la absorción de flúor y proporcionó iones de calcio adicionales. Esto facilitó la remineralización de la lesión de caries de dentina artificial y produjo una profundidad de lesión significativamente menor que la tratada sólo con barniz de NaF.

El valor basal de *pH* que presentaron los niños de nuestro estudio estuvo entre 7,6 y 7,7, aunque los pacientes fueron de alto o extremo riesgo de caries, y este valor no se modificó significativamente a lo largo del estudio, ni en el grupo control ni en los grupos que recibieron barnices.

Algunos autores como Pyati y cols.¹⁹³ y Singh y cols.¹⁹⁴ registraron menores valores de *pH* y sí observaron diferencias significativas en los valores de *pH* en saliva no estimulada en un grupo de niños sin caries de inicio temprano (7,20) frente a otro grupo de niños con

caries de inicio temprano (6,07). Zhou y cols.¹⁹⁵ observaron que el pH difería significativamente entre los sujetos con caries (7,70) y sin caries (8,05) aunque en este caso el estudio se realizó en adultos.

Prabhakar y cols.¹⁹⁶ registraron un rango más amplio que el nuestro en los valores de pH salival en niños con caries activa (6,20 – 7,90) y no encontraron correlación entre el pH y la actividad de la caries^{196,197}. Asimismo, Tayab y cols.⁷², Preethi BP y cols.¹⁹⁸ y Tulunoglu y cols.¹⁹⁷ concluyeron que no hay correlación entre los valores de pH y la actividad de caries.

La saliva actúa como buffer neutralizando las variaciones del pH ocasionadas por los alimentos azucarados y la actividad de los microorganismos^{20,199}. Cuando la ingestión de azúcar cesa, la capacidad buffer de la saliva aumenta el pH en un plazo de 20-40 minutos¹¹⁴. Por ello, las condiciones experimentales de nuestro estudio (el pH se obtiene de saliva no estimulada y transcurrida 1 hora como mínimo desde la última ingesta antes de la extracción de saliva) también pueden explicar la discrepancia obtenida en los resultados.

No obstante, estamos de acuerdo con autores como Gao y cols.⁷⁰ y Tayab y cols.⁷² que estipulan que la medición estática del valor del pH salival podría ser de poca utilidad para evaluar el riesgo de caries debido a la función buffer de la saliva. Mira A⁴⁸ y otros autores^{20,84,114,195}, indican que sería la acidificación del pH de la biopelícula, en la zona de la lesión, el determinante en la generación de la caries dental y se correlacionaría con el alto riesgo de caries.

El papel de la producción de *ácido láctico* en la patogenia de la caries está bien documentado²⁰. A pesar de ello, existen pocos estudios sobre la concentración de ácido láctico en la saliva total de niños.

Fidalgo y cols.²⁰⁰ y Pereira y cols.¹⁶⁰ detectaron una mayor concentración de lactato y otros ácidos orgánicos (acetato y n-Butyrate) en la saliva de niños con caries dental. Nosotros hemos observado valores basales de ácido láctico superiores a los obtenidos en otros estudios¹⁶⁰, probablemente porque nuestros pacientes son de alto y extremo riesgo de caries, aunque ni el grupo control ni los grupos donde se administró barniz se consiguió reducir la concentración de ácido láctico de forma significativa durante el periodo de seguimiento.

En nuestro estudio, el lactato en el T4 muestra dependencia lineal positiva con el caos en T4, es decir, a mayor concentración de lactato los pacientes presentarán un índice caos más alto. Bretz y cols.²⁰¹, también observaron que la tasa de ácido láctico se asociaba con una alta prevalencia de caries dental, pudiendo diferenciar los pacientes libres de caries de los pacientes con caries activas. En este caso se utilizó un dispositivo denominado Clinpro Cario L-Pop (3M ESPE, Saint Paul, MN, USA) que se fundamenta en una oxidación enzimática basada en lactato-deshidrogenasa y la muestra analizada se obtiene de la película biológica de la lengua. Shimizu y cols.²⁰² hallaron una correlación entre la producción de ácido láctico en placa dental con el incremento de caries en dentición temporal, pero no la hallaron en la dentición permanente. Lingström y cols.²⁰³ apuntan a que la producción del ácido láctico depende de la maduración y/o de la actividad acidogénica de la placa dental, sugiriendo así una maduración diferente entre la caries en los dientes primarios y permanentes.

El papel de los *elementos traza* presentes en la saliva sobre la caries dental no está todavía clarificado¹⁶⁸. De los elementos traza detectados en nuestro trabajo, el Ca, P, F, Mg, Zn y Cu están, de alguna forma, relacionados con el estado de mineralización de los dientes. Sin embargo sus concentraciones en saliva no siempre reflejan el grado de desmineralización/remineralización de los dientes, la presencia de caries dental o el riesgo de padecerla^{166,204}.

No existe un consenso acerca del significado de los niveles Cu, Zn y Mg con relación a la caries dental. Para Brookes y cols.²⁰⁵ el Cu²⁺ podría tener un efecto protector directo sobre la disolución del esmalte, aunque otros autores^{70,146,163,166,206,207} observaron un alto nivel de Cu en pacientes con caries procedente de los cristales de hidroxiapatita destruidos. Nosotros hemos detectado altos niveles de Cu en saliva de niños con extremo o alto riesgo de caries, con un caos basal entre $18,33 \pm 10,07$ y $32,34 \pm 19,93$ y los niveles no se redujeron durante el tiempo del estudio en ninguno de los grupos.

Al igual que el Cu, el zinc ha presentado en los tres grupos niveles más altos que los publicados por otros autores como Lynch y cols.²⁰⁸. Obtuvimos una reducción estadísticamente significativa en el nivel de Zn del grupo Control entre los tiempos T1, T2, T3, T4 vs T0; mientras que en los grupos MI y Clinpro se mantuvo estable durante todo el tiempo de seguimiento. En el estudio realizado por Sejdini y cols.⁸¹ hubo un

aumento en la incidencia de caries cuando las ratas fueron alimentadas con una dieta deficiente en zinc porque el zinc está implicado en la biomineralización.

Hussein y cols.¹⁶³ sugieren que las propiedades y el comportamiento del Zn en la saliva son similares a las del Cu, teniendo también su origen, en parte, en la desmineralización que ocurre con la caries. Estos valores elevados del Cu y Zn podrían estar reflejando la puesta en marcha de los sistemas antioxidantes de la saliva ya que ambos iones actúan como co-enzimas de la superóxido dismutasa⁸⁰.

En los grupos donde se aplicó barniz los niveles de Mg se mantuvieron estables durante el periodo de seguimiento. Sin embargo, en el grupo control hubo un descenso de los niveles de manera significativa. Para Sejdini y cols.¹⁷⁶ el Mg favorece la resistencia a la caries, por lo que niños con bajas concentraciones de Mg tendrían alto índice de caries. Esto podría explicar los bajos niveles de Mg que presentaron nuestros niños y que son similares a los registrados por Monaci y cols.²⁰⁹ y Rajesh y cols.²¹⁰.

La aplicación de barnices de fosfato de calcio debería reflejar un incremento en las concentraciones de estos dos iones en la saliva de los niños, como se ha observado *in vitro*. Cochrane y cols.²¹¹ y Shen P y cols.¹⁵⁶, estudiaron la liberación *in vitro* de iones calcio, fosfato y fluoruro de cinco barnices, MI VarnishTM, ClinproTM White Varnish, Enamel Pro[®], Bifluorid 5[®] y Colgate[®] Duraphat[®], observando una mayor liberación acumulada de estos iones por parte del MI VarnishTM. En investigaciones *in vivo*, la vida media que han demostrado los barnices en el medio oral es muy corta y por ello, los barnices deben liberar sus iones en un período de tiempo relativamente corto. Se ha calculado que la vida media del CPP en la placa es de 124,8 minutos y que la caseína es hidrolizada por las bacterias salivales en un período de tiempo similar⁷⁷. Parece que el barniz permanece *in situ* hasta 24 horas^{79,108,211} porque es eliminado por la acción de la masticación, el flujo salival, el roce de las mejillas y la lengua y la higiene oral⁷⁹. Esto puede haber estado influyendo en nuestros resultados porque la recolección de saliva se realizó 3 meses después de cada aplicación y no hemos observado el efecto acumulativo de los estudios *in vitro*. Por lo tanto, la alta carga iónica inicial se diluyó a lo largo del tiempo.

Las concentraciones de calcio observadas en nuestro estudio no se han modificado de forma significativa tras la aplicación de los barnices. En cambio, el fósforo sí se redujo

de forma significativa, en el T4, en el grupo control, pero no en los grupos de barniz. Esto concuerda con lo reportado por Cochrane y cols.²¹¹ en el estudio in vitro en el que se observó que la liberación de fosfato es mayor en los barnices Enamel Pro[®] y MI Varnish[™] en comparación con otros barnices. En este estudio reportaron que el Clinpro[™] White Varnish liberaba menores cantidades de iones fosfato. Varios autores^{156,211} coinciden en que esto puede ocurrir por una baja cantidad de *f*TCP que se agrega al barniz o por la baja solubilidad del fosfato tricálcico.

Las concentraciones de fósforo halladas no concuerdan con las concentraciones medidas por ICP-MS reportados en la literatura¹⁷¹, son mayores que los observados en nuestro estudio. No obstante, estos datos han sido medidos en pacientes adultos sin caries activas. Esta diferencia de valores podría atribuirse a que los carbohidratos de la dieta reducen temporalmente la concentración de fosfato salival debido a la necesidad de fosfato por parte de los tejidos durante el metabolismo de los carbohidratos, lo que provoca una caída en los niveles salivales⁷². Dado que los pacientes son de alto o extremo riesgo y suelen consumir una dieta rica en carbohidratos, que se seleccionaron al azar y no según la dieta, podría explicar la diferencia en los valores obtenidos en los grupos. Sin embargo, diferentes autores han obtenido valores de fósforo inorgánico inferiores a los recogidos en nuestra muestra^{72,194,209,212,213}, lo cual podría deberse a los distintos métodos empleados para el análisis de fosfato.

Podría parecer que las concentraciones de Ca y P, principales componentes de la hidroxiapatita del diente, estarían incrementadas en saliva durante los procesos de desmineralización, aunque algunos autores encuentran una relación inversa entre la presencia de caries dental y los niveles de calcio salival^{72,194,197} y de fosfato^{194,214} y otros no encuentran ninguna relación^{70,72,212,215}. Preethi y cols.¹⁹⁸ y Ben-Aryeh H y cols.²¹⁶ observaron que la concentración de calcio en la saliva es menor en niños que en adultos, lo que sugiere que los niños tienen un equilibrio negativo de calcio y que un déficit de otros parámetros salivales podría acelerar el proceso de caries.

El F de la saliva juega, sin duda, un papel importante en la remineralización. A pesar de que se ha demostrado que el fluoruro se puede almacenar en los tejidos orales blandos y duros, así como en la placa dental, la saliva representa el medio inicial en el que se libera el fluoruro⁷⁹. Además, aumentos en F salival parecen predecir aumentos en el F del fluido

de la placa, lo que implica que ambos son buenos indicadores de cambios en los niveles intraorales de F cuando se utilizan diferentes concentraciones de F²¹⁷⁻²¹⁹.

Los niveles basales de fluoruro en todos los grupos estuvieron en torno a 0,05 ppm y hubo un incremento no significativo que fue mayor en el grupo MI que en el resto, llegando a los $0,0920 \pm 0,0402$ ppm. Las concentraciones iniciales fueron similares a las descritas por Sekhri y cols.¹⁶⁸ en grupos libre de caries y superiores a las descritas por Rechman y cols.¹⁴⁹ y Dehailan y cols.²²⁰. Como uno de los criterios de exclusión fue el consumo de agua corriente fluorada, el mayor nivel de fluoruro basal de la saliva de los niños del estudio se podría deber al consumo de alguna fuente externa de flúor, como aguas embotelladas. De hecho, un estudio que analizó el contenido en flúor de 20 marcas de aguas embotelladas comercializadas en el área de procedencia de los niños encontró concentraciones de fluoruro entre 0,05 ppm y 0,95 ppm²²¹.

Un nivel de fluoruro superior a 0,04 ppm está relacionado con una muy baja progresión de caries en los estudios de evaluación de riesgo de caries^{149,222}, si bien los niveles de flúor ideales en reposo son de alrededor de 0,1 ppm para una protección casi completa contra la progresión de la caries²²³. En nuestro estudio la concentración máxima alcanzada fue de $0,0920 \pm 0,0402$ ppm en el grupo MI.

El *recuento bacteriano* total basal estuvo en el rango 10^6 – 10^7 en todos los grupos. Goodson y cols.²²⁴ registraron niveles de recuento bacteriano total similares a los nuestros, al igual que Ledder y cols.²²⁵, en niños con caries de primera infancia en un rango de edades de 4 a 7 años. En adultos jóvenes, sin tener en consideración la experiencia de caries, Gardner y cols.²²⁶ y Oyetola y cols.²²⁷ obtuvieron una concentración global de bacterias en la saliva superior. Para Lira-Junior y cols.²²⁸ el recuento bacteriano tendría relación directa con la edad, con un incremento del recuento bacteriano y una modificación de la composición, o maduración, del microbioma oral a medida que se aumenta de edad, pareciéndose cada vez más a la de los adultos que conviven con el niño¹⁷².

Abbate y cols.²²⁹ registraron una cantidad total de ADN microbiano más alto en aquellos sujetos que no padecían caries frente a aquellos que sí, indicando que los pacientes sin caries parecen presentar una flora más variada y amplia representada, principalmente, por bacterias antagonistas de la microflora acidófila, que estarían protegiendo contra el

desarrollo de la enfermedad de caries. Por el contrario, los pacientes con caries, debido a la acidificación de la placa, desarrollarían una flora más seleccionada ²²⁹. Así, algunos estudios han encontrado una asociación entre la composición microbiana y enfermedades orales como caries o gingivitis en muestras de placa bacteriana pero no en la saliva ^{230,231}. La saliva contendría microorganismos de todas las zonas orales, incluyendo aquellas no relacionadas con la enfermedad. Esto introduce una gran diversidad microbiana que altera el valor diagnóstico de los microorganismos salivales y destaca la importancia de la necesidad de un muestreo apropiado para las pruebas de diagnóstico de caries basadas en microorganismos ^{232,233}.

Ni en los grupos en los que se aplicó barniz ni en el grupo control se consiguió una alteración significativa del recuento bacteriano a lo largo del seguimiento, a pesar de que los índices de higiene sí mejoraron de forma significativa en los tres grupos. Esto podría explicarse por el importante grado de estabilidad del microbioma oral en condiciones de salud ²³⁴ o porque los cambios introducidos por la intervención estén sucediendo a nivel de biopelícula y no se reflejan en la saliva total. Oyetola y cols.²²⁷ y Mashima y cols.²³⁵, obtuvieron resultados opuestos al nuestro, detectando una relación inversa entre el número de bacterias en la saliva y el estado de higiene oral.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Nuestro estudio presenta algunas limitaciones. Aunque los ensayos controlados y aleatorizados aportan un alto nivel de evidencia científica, presentan el problema de la pérdida de pacientes ¹⁸⁴, condicionando tamaños muestrales pequeños.

Todas las medidas se han realizado en saliva total no estimulada, no habiendo encontrado variaciones importantes en las concentraciones de los elementos estudiados como consecuencia de las intervenciones en los tres grupos, sin embargo, sí hemos observado cambios importantes en los índices de higiene oral. Es probable que los cambios que nuestra intervención ha ocasionado se reflejen a nivel de placa bacteriana y no en saliva y que sea preciso tomar muestras de placa supra y subgingival para la determinación analítica del riesgo de caries.

Tampoco hemos tenido en cuenta la influencia de la dieta, ni el estado socioeconómico de los padres, ni la ubicación geográfica sobre las variables de nuestro estudio.

TRABAJOS FUTUROS

Como continuación de nuestro trabajo proponemos las siguientes líneas de actuación:

- Considerar la influencia de la dieta, el estado socioeconómico de los padres y la ubicación geográfica sobre los parámetros salivales estudiados.
- Determinar la evolución del microbioma salival tras la aplicación de los barnices de fosfato de calcio y fluoruro.
- Determinar si el índice IMAP se correlaciona con la concentración de bacterias en la biopelícula.
- Determinar si la concentración de bacterias de la biopelícula es diferente en cada una de las distintas zonas teñidas por el Tri Plaque ID Gel™.
- Determinar la concentración de ácido láctico que es capaz de generarse en cada una de las tres zonas de color indicadas por el Tri Plaque ID Gel™.

7

CONCLUSIONES

Los resultados de nuestro estudio reflejan que:

Conclusión 1. La aplicación de dos barnices de fosfato de calcio, el MI Varnish™ y el Clinpro™ White Varnish, aplicados trimestralmente durante 12 meses a niños con alto o extremo riesgo de caries no modificó los índices de caries CAOS/caos.

Conclusión 2. Se obtuvo una mejora en los Índices de placa similar tanto en el grupo control (placebo) como en los grupos donde se administró el barniz de fluoruro y fosfato de calcio. La propia intervención, con la mejora de los hábitos de higiene oral, ha sido la responsable de este progreso. El IMAP podría ser un índice útil para determinar el nivel de agresividad de la placa bacteriana y establecer las medidas terapéuticas suficientes para reducir el riesgo de caries.

Conclusión 3: La aplicación de MI Varnish™ y el Clinpro™ White Varnish no modificó el pH salival en ningún grupo de estudio, por lo que no es un valor predictivo sobre el riesgo de caries.

Conclusión 4. Los barnices de calcio y fosfato estudiados no han tenido ningún efecto sobre las concentraciones de ácido láctico salival, por lo que no podemos establecer una correlación entre sus niveles salivales y el riesgo a padecer caries.

Conclusión 5. La aplicación trimestral de los barnices no presentó efecto sobre las concentraciones de los elementos traza salivales. Ninguno de los elementos traza estudiados ha servido para definir una situación de riesgo ni para monitorizar el tratamiento que hemos realizado con los barnices de fluoruro y fosfato de calcio.

Conclusión 6: El MI Varnish™ y Clinpro™ White Varnish, aplicados trimestralmente durante un año, no alteró el recuento bacteriano de saliva total no estimulada.

Tenemos que aceptar parcialmente la hipótesis nula de nuestro trabajo, ya que la aplicación de dos barnices de fosfato de calcio, el MI Varnish™ y el Clinpro™ White Varnish aplicados trimestralmente durante 12 meses no modifican el pH, la concentración de ácido láctico, la mayoría de los metales traza estudiados, el CAOS/caos ni el recuento bacteriano. El índice de higiene mejora tanto en el grupo control como en los grupos de estudio por lo que es la propia intervención (normas de higiene) la que determina esta mejora.

8

BIBLIOGRAFÍA

1. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003;31 Suppl 1:3-23. doi:10.1046/j..2003.com122.x
2. Petersen PE. World Health Organization global policy for improvement of oral health--World Health Assembly 2007. *Int Dent J.* 2008;58(3):115-121. doi:10.1922/IDJ
3. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W. Global burden of untreated caries: A systematic review and metaregression. *J Dent Res.* 2015;94(5):650-658. doi:10.1177/0022034515573272
4. Petersen P. The World Oral Health Report 2003. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003;31(Suppl):3-23. doi:10.1046/j..2003.com122.x
5. Bravo Pérez M, Almerich Silla J, Ausina Márquez V, et al. Encuesta de Salud Oral en España 2015. *RCOE.* 2016;21(Supl. 1):8-48.
6. Pitts NB. How the detection, assessment, diagnosis and monitoring of caries integrate with personalized caries management. *Monogr Oral Sci.* 2009;21:1-14. doi:10.1159/000224208
7. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ.* 2005;83(9):661-669. doi:/S0042-96862005000900011

8. Petersen PE, Kwan S, Zhu L, Zhang BX, Bian JY. Effective use of fluorides in the People's Republic of China--a model for WHO Mega Country initiatives. In: *Community Dental Health*. Vol 25. ; 2008:257-267. doi:10.1922/CDH
9. MacHiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res*. 2020;54(1):7-14. doi:10.1159/000503309
10. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet*. 2007;369(9555):51-59. doi:10.1016/S0140-6736(07)60031-2
11. Pitts NB. Are we ready to move from operative to non-operative/preventive treatment of dental caries in clinical practice? In: *Caries Research*. Vol 38. ; 2004:294-304. doi:10.1159/000077769
12. Fejerskov O, Nyvad B. Clinical features of caries lesions. In: Fejerskov O, Nyvad B, Kidd E, eds. *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management*. 3rd ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2015:11-20.
13. Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc*. 2000;131(7):887-899. doi:10.14219/jada.archive.2000.0307
14. Leal SC, Bronkhorst EM, Fan M, Frencken JE. Untreated cavitated dentine lesions: Impact on children's quality of life. *Caries Res*. 2012;46(2):102-106. doi:10.1159/000336387
15. Kidd E a. MAM, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res*. 2004;83 Spec No(suppl 1):C35-8. doi:10.1177/154405910408301S07
16. Pitts NB. Modern concepts of caries measurement. *J Dent Res*. 2004;83 Spec No:C43-C47. doi:10.1177/154405910408301S09
17. Schwendicke F, Frencken JE, Bjørndal L, et al. Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Carious Tissue Removal. *Adv Dent Res*. 2016;28(2):58-67. doi:10.1177/0022034516639271

18. Featherstone JDB. The continuum of dental caries--evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res.* 2004;(suppl 1):C39-42. doi:10.1177/154405910408301S08
19. Schwendicke F, Splieth C, Breschi L, et al. When to intervene in the caries process? An expert Delphi consensus statement. *Clin Oral Investig.* 2019;23(10):3691-3703. doi:10.1007/s00784-019-03058-w
20. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;May 25(3):17030. doi:10.1038/nrdp.2017.30
21. Nobbs AH, Jenkinson HF, Jakubovics NS. Stick to your gums: Mechanisms of oral microbial adherence. *J Dent Res.* 2011;90(11):1271-1278. doi:10.1177/0022034511399096
22. Zijngge V, Van Leeuwen MBM, Degener JE, et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One.* 2010;5(2). doi:10.1371/journal.pone.0009321
23. Wright CJ, Burns LH, Jack AA, et al. Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol.* 2013;28(2):83-101. doi:10.1111/omi.12012
24. Jakubovics NS, Yassin SA, Rickard AH. Community Interactions of Oral Streptococci. *Adv Appl Microbiol.* 2014;87:43-110. doi:10.1016/B978-0-12-800261-2.00002-5
25. Taylor P, Allison DG. The Biofilm Matrix The Biofilm Matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010;8(December 2014):37-41. doi:10.1038/nrmicro2415
26. Klein MI, Hwang G, Santos PHS, Campanella OH, Koo H. Streptococcus mutans-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2015;5:10. doi:10.3389/fcimb.2015.00010
27. Marsh PD. In Sickness and in Health-What Does the Oral Microbiome Mean to Us? An Ecological Perspective. *Adv Dent Res.* 2018;29(1):60-65. doi:10.1177/0022034517735295
28. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 2003;149(2):279-294. doi:10.1099/mic.0.26082-0

29. Simón-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol.* 2015;23(2):76-82. doi:10.1016/j.tim.2014.10.010
30. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: Consequences for oral health care. In: *Caries Research*. Vol 38. ; 2004:182-191. doi:10.1159/000077753
31. Fejerskov O. Pathology of dental caries. In: Fejerskov O, Nyvad B KE, ed. *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management*. 3rd ed. Oxford (UK): John Wiley & Sons, Ltd.; 2015:49-83.
32. Pitts N. Understanding Dental Caries: From Pathogenesis to Prevention and Therapy. In: Goldberg M, ed. *Understanding Dental Caries*. 1st ed. Springer International Publishing Switzerland; 2016:3-9. doi:10.1007/978-3-319-30552-3
33. Featherstone JDB. Dental caries: A dynamic disease process. In: *Australian Dental Journal*. Vol 53. ; 2008:286-291. doi:10.1111/j.1834-7819.2008.00064.x
34. Ismail AI, Sohn W, Tellez M, et al. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): An integrated system for measuring dental caries: Methods. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2007;35(3):170-178. doi:10.1111/j.1600-0528.2007.00347.x
35. Pitts N. "ICDAS" - An international system for caries detection and assessment being developed to facilitate caries epidemiology, research and appropriate clinical management. *Community Dent Health.* 2004;21(3):193-198.
36. Bjørndal L, Demant S, Dabelsteen S. Depth and activity of carious lesions as indicators for the regenerative potential of dental pulp after intervention. *J Endod.* 2014;40(4 SUPPL.):S76-81. doi:10.1016/j.joen.2014.01.016
37. Lussi A, Hellwig E, Klimek J. Fluorides – Mode of Action and Recommendations for Use. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2012;122(122):1030-1036. doi:smfz-2012-11-02 [pii]
38. Li X, Wang J, Joiner A, Chang J. The remineralisation of enamel: A review of the literature. *J Dent.* 2014;42:S12-S20. doi:10.1016/S0300-5712(14)50003-6

39. Featherstone J, Chaffee B. The evidence for caries management by risk assessment (CAMBRA). *Adv Dent Res.* 2018;29(1):9-14. doi:10.1177/0022034517736500
40. Hajishengallis E, Parsaei Y, Klein MI, Koo H. Advances in the microbial etiology and pathogenesis of early childhood caries. *Mol Oral Microbiol.* 2017;32(1):24-34. doi:10.1111/omi.12152
41. Fontana M. The Clinical, Environmental, and Behavioral Factors That Foster Early Childhood Caries: Evidence for Caries Risk Assessment. *Pediatr Dent.* 2015;37(3):217-225. doi:10.1016/S1352-2310(99)00471-9
42. Fisher-Owens SA, Gansky SA, Platt LJ, et al. Influences on children's oral health: A conceptual model. *Pediatrics.* 2007;120(3):e510-20. doi:10.1542/peds.2006-3084
43. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(12):745-759. doi:10.1038/s41579-018-0089-x
44. Devine DA, Marsh PD, Meade J. Modulation of host responses by oral commensal bacteria. *J Oral Microbiol.* 2015;7(1):1-4. doi:10.3402/jom.v7.26941
45. Zaura E, Ten Cate JM. Towards understanding oral health. *Caries Res.* 2015;49:55-61. doi:10.1159/000377733
46. Gomez A, Nelson KE. The Oral Microbiome of Children: Development, Disease, and Implications Beyond Oral Health. *Microb Ecol.* 2017;73(2):492-503. doi:10.1007/s00248-016-0854-1
47. Tanner ACR, Kressirer CA, Rothmiller S, Johansson I, Chalmers NI. The Caries Microbiome: Implications for Reversing Dysbiosis. *Adv Dent Res.* 2018;29(1):78-85. doi:10.1177/0022034517736496
48. Mira A. Oral Microbiome Studies: Potential Diagnostic and Therapeutic Implications. *Adv Dent Res.* 2018;29(1):71-77. doi:10.1177/0022034517737024
49. Burne RA. Getting to Know "The Known Unknowns": Heterogeneity in the Oral Microbiome. *Adv Dent Res.* 2018;29(1):66-70. doi:10.1177/0022034517735293

50. Featherstone JD, Fontana M, Wolff M. Novel Anticaries and Remineralization Agents: Future Research Needs. *J Dent Res.* 2018;97(2):125-127. doi:10.1177/0022034517746371
51. Sheiham A, James WPT. A reappraisal of the quantitative relationship between sugar intake and dental caries: The need for new criteria for developing goals for sugar intake. *BMC Public Health.* 2014;14:863. doi:10.1186/1471-2458-14-863
52. Moynihan PJ, Kelly SAM. Effect on caries of restricting sugars intake: Systematic review to inform WHO guidelines. *J Dent Res.* 2014;93(1):8-18. doi:10.1177/0022034513508954
53. Sheiham A, James WPT. Diet and dental caries: The pivotal role of free sugars reemphasized. *J Dent Res.* 2015;94(10):1341-1347. doi:10.1177/0022034515590377
54. Zero DT, Fontana M, Martínez-Mier EA, et al. The Biology, Prevention, Diagnosis and Treatment of Dental Caries: Scientific Advances in the United States. *J Am Dent Assoc.* 2009;140:25S-34S. doi:10.14219/jada.archive.2009.0355
55. Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, et al. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. *Caries Res.* 2008;42(5):380-386. doi:10.1159/000154783
56. Ribeiro CCC, Tabchoury CPM, Del Bel Cury AA, Tenuta LMA, Rosalen PL, Cury JA. Effect of starch on the cariogenic potential of sucrose. *Br J Nutr.* 2005;94(01):44. doi:10.1079/BJN20051452
57. Díaz-Garrido N, Lozano C, Giacaman RA. Frequency of sucrose exposure on the cariogenicity of a biofilm-caries model. *Eur J Dent.* 2016;10(3):345-350. doi:10.4103/1305-7456.184163
58. Van Loveren C. Sugar Restriction for Caries Prevention: Amount and Frequency. Which Is More Important? *Caries Res.* 2019;53(2):168-175. doi:10.1159/000489571
59. Nayak PA, Nayak UA, Khandelwal V. The effect of xylitol on dental caries and oral flora. *Clin Cosmet Investig Dent.* 2014;6:89-94. doi:10.2147/CCIDE.S55761

60. Zhan L. Rebalancing the Caries Microbiome Dysbiosis: Targeted Treatment and Sugar Alcohols. *Adv Dent Res.* 2018;29(1):110-116. doi:10.1177/0022034517736498
61. Wang Y, Li J, Sun W, Li H, Cannon RD, Mei L. Effect of non-fluoride agents on the prevention of dental caries in primary dentition: A systematic review. *PLoS One.* 2017;12(8):e0182221. doi:10.1371/journal.pone.0182221
62. Gasse B, Grabar S, Lafont AG, et al. Common SNPs of amelogeninX (AMELX) and dental caries susceptibility. *J Dent Res.* 2013;92(5):418-424. doi:10.1177/0022034513482941
63. Ozturk A, Famili P, Vieira AR. The antimicrobial peptide DEFB1 is associated with caries. *J Dent Res.* 2010;89(6):631-636. doi:10.1177/0022034510364491
64. De Soet JJ, Van Gemert-Schriks MCM, Laine ML, Van Amerongen WE, Morré SA, Van Winkelhoff AJ. Host and microbiological factors related to dental caries development. *Caries Res.* 2008;42(5):340-347. doi:10.1159/000151329
65. Wendell S, Wang X, Brown M, et al. Taste genes associated with dental caries. *J Dent Res.* 2010;89(11):1198-1202. doi:10.1177/0022034510381502
66. Opal S, Garg S, Jain J, Walia I. Genetic factors affecting dental caries risk. *Aust Dent J.* 2015;60(1):2-11. doi:10.1111/adj.12262
67. Rechmann P, Chaffee BW, Rechmann BMT, Featherstone JDB. Changes in Caries Risk in a Practice-Based Randomized Controlled Trial. *Adv Dent Res.* 2018;29(1):15-23. doi:10.1177/0022034517737022
68. Young D, Featherstone J. Caries management by risk assessment. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2013;41(1):e53-63. doi:10.1111/cdoe.12031
69. Hemadi AS, Huang R, Zhou Y, Zou J. Salivary proteins and microbiota as biomarkers for early childhood caries risk assessment. *Int J Oral Sci.* 2017;9(11):e1. doi:10.1038/ijos.2017.35
70. Gao X, Jiang S, Koh D, Hsu CYS. Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontol 2000.* 2016;70(1):128-141. doi:10.1111/prd.12100

71. Hicks J, Garcia-Godoy F, Flaitz C. Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1). *J Clin Pediatr Dent.* 2004;28(1):47-52. doi:10.17796/jcpd.28.1.yg6m443046k50u20
72. Tayab T, Rai K, Kumari A V. Evaluating the physicochemical properties and inorganic elements of saliva in caries-free and caries-active children. An in vivo study. *Eur J Paediatr Dent.* 2012;13(2):107-112.
73. Stookey GK. The effect of saliva on dental caries. *J Am Dent Assoc.* 2008;139(5 SUPPL.):11S-17S. doi:10.14219/jada.archive.2008.0347
74. Neel EAA, Aljabo A, Strange A, et al. Demineralization–remineralization dynamics in teeth and bone. *Int J Nanomedicine.* 2016;11:4743-4763. doi:10.2147/IJN.S107624
75. Walsh L. Molecular and Pharmaceutical Aspects of Novel Methods and Materials for the Prevention of Tooth Structure Loss. *Curr Pharm Biotechnol.* 2017;18(1):45-51. doi:10.2174/1389201017666161207163851
76. Walsh LJ. Contemporary technologies for remineralization therapies: A review. *Int Dent SA.* 2009;11(11):6-16.
77. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New Approaches to Enhanced Remineralization of Tooth Enamel. *J Dent Res.* 2010;89(11):1187-1197. doi:10.1177/0022034510376046
78. Dodds M, Roland S, Edgar M, Thornhill M. Saliva A review of its role in maintaining oral health and preventing dental disease. *BDJ Team.* 2015;2(1-8). doi:10.1038/bdjteam.2015.123
79. Downey D, Dennison J, Eckert GJ, et al. Fluoride levels in unstimulated whole saliva following clinical application of different 5% NaF varnishes. *Caries Res.* 2018;52(6):431-438. doi:10.1159/000485981
80. Hegde MN, Attavar SH, Shetty N, Hegde ND, Hegde NN. Saliva as a biomarker for dental caries: A systematic review. *J Conserv Dent.* 2019;22(1):2-6. doi:10.4103/JCD.JCD_531_18

81. Sejdini M, Begzati A, Salihu S, Krasniqi S, Berisha N, Aliu N. The Role and Impact of Salivary Zn Levels on Dental Caries. *Int J Dent*. 2018;8137915. doi:10.1155/2018/8137915
82. Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JGM, Veerman ECI. Salivary proteins: Protective and diagnostic value in cariology? In: *Caries Research*. Vol 38. ; 2004:247-253. doi:10.1159/000077762
83. Bardow A, Lagerlof F, Nauntofte B, Tenovou J. The role of saliva. In: Fejerskov O, Kidd E, eds. *Dental Caries. The Disease and Its Clinical Management*. 2nd ed. Oxford (UK): Blackwell Munsgaard; 2008:190-207.
84. Philip N. State of the Art Enamel Remineralization Systems: The Next Frontier in Caries Management. *Caries Res*. 2019;53(3):284-295. doi:10.1159/000493031
85. Ten Cate JM. Models and role models. *Caries Res*. 2015;49 Suppl 1:3-10. doi:10.1159/000380870
86. Martinez-Mier EA, Tenuta LMA, Carey CM, et al. European Organization for Caries Research Workshop: Methodology for Determination of Potentially Available Fluoride in Toothpastes. *Caries Res*. 2019;53(2):119-136. doi:10.1159/000490196
87. Kudiyirickal MG, Ivancaková R. Early enamel lesion part II. Histo-morphology and prevention. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2008;51(3):151-156. doi:10.14712/18059694.2017.17
88. Gonzalez-Cabezas C, Fernández CE. Recent Advances in Remineralization Therapies for Caries Lesions. *Adv Dent Res*. 2018;29(1):55-59. doi:10.1177/0022034517740124
89. Featherstone JD, Doméjean S. The Role of Remineralizing and Anticaries Agents in Caries Management. *Adv Dent Res*. 2012;24(2):28-31. doi:10.1177/0022034512452885
90. ten Cate JM. Novel Anticaries and Remineralizing Agents. *J Dent Res*. 2012;91(9):813-815. doi:10.1177/0022034512455032

91. Marinho VC, Higgins JP, Sheiham a, Logan S. Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003;(1):CD002278. doi:10.1002/14651858.CD002278
92. Walsh T, Worthington H V., Glenny AM, Marinho VCC, Jeroncic A. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;2019(3):3. doi:10.1002/14651858.CD007868.pub3
93. Benson PE, Parkin N, Dyer F, Millett DT, Furness S, Germain P. Fluorides for the prevention of early tooth decay (demineralised white lesions) during fixed brace treatment. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;12:CD003809. doi:10.1002/14651858.CD003809.pub3
94. Marinho V, Worthington H, Walsh T, Chong L. Fluoride gels for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;6:CD002280. doi:10.1002/14651858.CD002280.pub2
95. Marinho V, Chong L, Worthington H, Walsh T. Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;7:CD002284. doi:10.1002/14651858.CD002284.pub2
96. Fontana M. Enhancing Fluoride: Clinical Human Studies of Alternatives or Boosters for Caries Management. *Caries Res.* 2016;50(1):22-37. doi:10.1159/000439059
97. Marinho et al. Topical fluoride (toothpastes , mouthrinses , gels or varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents (Review). *J Dent Res.* 2009;71(4):1228-1237. doi:10.1177/00220345920710051601
98. Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: Role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999;27(1):31-40. doi:10.1111/j.1600-0528.1999.tb01989.x
99. Rechmann P, Kinsel R, Featherstone JDB. Integrating Caries Management by Risk Assessment (CAMBRA) and Prevention Strategies Into the Contemporary Dental Practice. *Compend Contin Educ Dent.* 2018;39(4):226-233; quiz 234.
100. Cury JA, Tenuta LMA. Enamel remineralization: Controlling the caries disease or

- treating early caries lesions? *Braz Oral Res.* 2009;23(SUPPLE. 1):23-30. doi:10.1590/s1806-83242009000500005
101. Dionysopoulos D. The effect of fluoride-releasing restorative materials on inhibition of secondary caries formation. *Fluoride.* 2014;47(3):258-265. doi:10.5301/jabfm.5000212
 102. Philip N, Walsh L. The potential ecological effects of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate in dental caries prevention. *Aust Dent J.* 2019;64(1):66-71. doi:10.1111/adj.12661
 103. Pandit S, Cai JN, Jung JE, Jeon JG. Effect of 1-minute fluoride treatment on potential virulence and viability of a cariogenic biofilm. *Caries Res.* 2015;49(4):449-457. doi:10.1159/000434731
 104. Carey CM. Focus on fluorides: Update on the use of fluoride for the prevention of dental caries. *J Evid Based Dent Pract.* 2014;14(SUPPL.):95-102. doi:10.1016/j.jebdp.2014.02.004
 105. Espasa E, Boj J. Caries dental en el niño. In: Boj J, Catalá M, Garcia-Ballesta C, Mendoza A, eds. *Odontopediatria*. 1a Ed. Barcelona: Masson; 2004:125-132.
 106. Gómez de Ferraris M, Campos Muñoz A. Glándulas salivales. In: Gómez De Ferraris M, Campos A, eds. *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental*. 4a Ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2019:151-187.
 107. Marinho V, Worthington H, Walsh T, Clarkson J. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Libr.* 2013;Jul 11(7):CD002279.
 108. Vogel GL. Oral fluoride reservoirs and the prevention of dental caries. In: *Fluoride and the Oral Environment*. Vol 22. ; 2011:146-157. doi:10.1159/000325166
 109. Shahmoradi M, Hunter N, Swain M. Efficacy of Fluoride Varnishes with Added Calcium Phosphate in the Protection of the Structural and Mechanical Properties of Enamel. *Biomed Res Int.* 2017;2017:7834905. doi:10.1155/2017/7834905
 110. Mishra P, Fareed N, Battur H, Khanagar S, Bhat MA, Palaniswamy J. Role of

- fluoride varnish in preventing early childhood caries: A systematic review. *Dent Res J (Isfahan)*. 2017;14(3):169-176. doi:10.4103/1735-3327.208766
111. Lenzi TL, Montagner AF, Soares FZM, De Oliveira Rocha R. Are topical fluorides effective for treating incipient carious lesions? A systematic review and meta-analysis. *J Am Dent Assoc*. 2016;147(2):84-91.e1. doi:10.1016/j.adaj.2015.06.018
112. Maguire A. ADA clinical recommendations on topical fluoride for caries prevention. *Evid Based Dent*. 2014;15(2):38-39. doi:10.1038/sj.ebd.6401019
113. Fejerskov O, Cury JA, Tenuta LM, Marinho VC. Fluorides in caries control. In: Fejerskov O, Nyad B, Kidd E, eds. *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management*. 3rd ed. Oxford (UK): Wiley Blackwell; 2015:233-250.
114. Cury JA, De Oliveira BH, Dos Santos APP, Tenuta LMA. Are fluoride releasing dental materials clinically effective on caries control? *Dent Mater*. 2016;32(3):323-333. doi:10.1016/j.dental.2015.12.002
115. Reynolds EC. Calcium phosphate-based remineralization systems: Scientific evidence? *Aust Dent J*. 2008;53(3):268-273. doi:10.1111/j.1834-7819.2008.00061.x
116. Tredwin CJ, Young AM, Abou Neel EA, Georgiou G, Knowles JC. Hydroxyapatite, fluor-hydroxyapatite and fluorapatite produced via the sol-gel method: Dissolution behaviour and biological properties after crystallisation. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(1):47-53. doi:10.1007/s10856-013-5050-y
117. Cochrane NJ, Reynolds EC. Calcium phosphopeptides -- mechanisms of action and evidence for clinical efficacy. *Adv Dent Res*. 2012;24(2):41-47. doi:10.1177/0022034512454294
118. Memarpour M, Fakhraei E, Dadaein S, Vossoughi M. Efficacy of fluoride varnish and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate for remineralization of primary teeth: A randomized clinical trial. *Med Princ Pract*. 2015;24(3):231-237. doi:10.1159/000379750
119. Gupta N, Mohan Marya C, Nagpal R, Singh Oberoi S, Dhingra C. A Review of Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate (CPP-ACP) and Enamel

- Remineralization. *Compend Contin Educ Dent.* 2016;37(1):36-40.
120. Vanichvatana S, Auychai P. Efficacy of two calcium phosphate pastes on the remineralization of artificial caries: a randomized controlled double-blind in situ study. *Int J Oral Sci.* 2013;5(4):224-228. doi:10.1038/ijos.2013.67
121. Dorozhkin S V. Amorphous calcium (ortho)phosphates. *Acta Biomater.* 2010;6(12):4457-4475. doi:10.1016/j.actbio.2010.06.031
122. Wierichs RJ, Stausberg S, Lausch J, Meyer-Lueckel H, Esteves-Oliveira M. Caries-Preventive Effect of NaF, NaF plus TCP, NaF plus CPP-ACP, and SDF Varnishes on Sound Dentin and Artificial Dentin Caries in vitro. *Caries Res.* 2018;52(3):199-211. doi:10.1159/000484483
123. Mohd Said SNB, Ekambaram M, Yiu CKY. Effect of different fluoride varnishes on remineralization of artificial enamel carious lesions. *Int J Paediatr Dent.* 2017;27(3):163-173. doi:10.1111/ipd.12243
124. Ekambaram M, Mohd Said SNB, Yiu CKY. A Review of Enamel Remineralisation Potential of Calcium- and Phosphate-based Remineralisation Systems. *Oral Health Prev Dent.* 2017;15:415-420. doi:https://dx.doi.org/10.3290/j.ohpd.a38779
125. Gurunathan D, Somasundaram S, Kumar SA. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: A remineralizing agent of enamel. *Aust Dent J.* 2012;57(4):404-408. doi:10.1111/adj.12006
126. Fernando JR, Shen P, Sim CPC, et al. Self-assembly of dental surface nanofilaments and remineralisation by SnF₂ and CPP-ACP nanocomplexes. *Sci Rep.* 2019;9(1):1285. doi:10.1038/s41598-018-37580-w
127. Li J, Xie X, Wang Y, et al. Long-term remineralizing effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on early caries lesions in vivo: A systematic review. *J Dent.* 2014;42(7):769-777. doi:10.1016/j.jdent.2014.03.015
128. Bader JD. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate shows promise for preventing caries. *Evid Based Dent.* 2010;11(1):11-12. doi:10.1038/sj.ebd.6400701

129. Philip N, Leishman SJ, Bandara HMHN, Walsh LJ. Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate Attenuates Virulence and Modulates Microbial Ecology of Saliva-Derived Polymicrobial Biofilms. *Caries Res.* 2019;53(6):643-649. doi:10.1159/000499869
130. Huq NL, Myroforidis H, Cross KJ, et al. The interactions of CPP-ACP with saliva. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6). doi:10.3390/ijms17060915
131. Patil N, Choudhari S, Kulkarni S, Joshi SR. Comparative evaluation of remineralizing potential of three agents on artificially demineralized human enamel: An in vitro study. *J Conserv Dent.* 2013;16(2):116-120. doi:10.4103/0972-0707.108185
132. Raphael S, Blinkhorn A. Is there a place for Tooth Mousse® in the prevention and treatment of early dental caries? A systematic review. *BMC Oral Health.* 2015;15(1).
133. Karlinsey RL, Pfarrer AM. Fluoride plus functionalized β -TCP: a promising combination for robust remineralization. *Adv Dent Res.* 2012;24(2):48-52. doi:10.1177/0022034512449463
134. Karlinsey RL, Mackey AC, Walker ER, Frederick KE. Preparation, characterization and in vitro efficacy of an acid-modified β -TCP material for dental hard-tissue remineralization. *Acta Biomater.* 2010;6(3):969-978. doi:10.1016/j.actbio.2009.08.034
135. Amaechi BT, Van Loveren C. Fluorides and non-fluoride remineralization systems. *Monogr Oral Sci.* 2013;23:15-26. doi:10.1159/000350458
136. Karlinsey RL, Pfarrer AM. Fluoride Plus Functionalized β -TCP. *Adv Dent Res.* 2012;24(2):48-52. doi:10.1177/0022034512449463
137. Berkathullah M, Farook MS, Mahmoud O. The Effectiveness of Remineralizing Agents on Dentinal Permeability. *Biomed Res Int.* 2018;2018:4072815. doi:10.1155/2018/4072815
138. Karlinsey R, Mackey A, Stookey G, Pfarrer A. In vitro assessments of experimental NaF dentifrices containing a prospective calcium phosphate

- technology. *Am J Dent*. 2009;22:180-184.
139. Mensinkai PK, Ccahuana-Vasquez RA, Chedjieu I, et al. In situ remineralization of white-spot enamel lesions by 500 and 1,100 ppm F dentifrices. *Clin Oral Investig*. 2012;16(4):1007-1014. doi:10.1007/s00784-011-0591-2
140. Karlinsey RL, Mackey AC, Stookey GK. In vitro remineralization efficacy of NaF systems containing unique forms of calcium. *Am J Dent*. 2009;22(3):185-188.
141. Stefania M, Pitts NB, Goffn G, et al. CariesCare practice guide: consensus on evidence into practice. *Br Dent J*. 2019;227(5):353-362. doi:10.1038/s41415-019-0678-8
142. Rechmann P, Chaffee BW, Rechmann BMT, Featherstone JDB. Caries Management by Risk Assessment: Results from a Practice-Based Research Network Study. *J Calif Dent Assoc*. 2019;47(1):15-24.
143. American Academy on Pediatric Dentistry Clinical Affairs Committee, American Academy of Pediatric Dentistry, Council on Clinical Affairs. Periodicity of Examination, Preventive Dental Services, Anticipatory Guidance/Counseling, and Oral Treatment for Infants, Children, and Adolescents. *Pediatr Dent* . 2018;40(6):194-204.
144. Ramos-Gomez F, Ng M-W. Into the future: keeping healthy teeth caries free: pediatric CAMBRA protocols. *J Calif Dent Assoc*. 2011;39(10):723-733. doi:10.1016/j.jclinane.2014.06.003
145. American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on caries-risk assessment and management for Infants, Children, and adolescents. *Pediatr Dent* . 2016;38(6):142-149.
146. Hegde MN, Hegde ND, Ashok A, Shetty S. Biochemical indicators of dental caries in Saliva: An in vivo study. *Caries Res*. 2014;48(2):170-173. doi:10.1159/000355580
147. Braga MM, Mendes FM, Ekstrand KR. Detection activity assessment and diagnosis of dental caries lesions. *Dent Clin North Am*. 2010;54(3):479-493. doi:10.1016/j.cden.2010.03.006

148. Cappelli D, Mobley C. Epidemiology/Biology of Dental Caries. In: Cappelli DP, Mobley C, eds. *Prevention in Clinical Oral Health Care*. 1st ed. St. Louis, MO.: Elsevier., Mosby; 2008:3-22.
149. Rechmann P, Bekmezian S, Rechmann BMT, Chaffee BW, Featherstone JDB. MI varnish and MI paste plus in a caries prevention and remineralization study: A randomized controlled trial. *Clin Oral Investig*. 2018;22Jul(6):2229-2239. doi:10.1007/s00784-017-2314-9
150. ElSalhy M, Ali U, Lai H, Flores-Mir C, Amin M. Caries reporting in studies that used the International Caries Detection and Assessment System: A scoping review. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2019;47(1):92-102. doi:10.1111/cdoe.12430
151. Broadbent JM, Thomson WM. For debate: Problems with the DMF index pertinent to dental caries data analysis. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2005;33(6):400-409. doi:10.1111/j.1600-0528.2005.00259.x
152. Turesky S, Gilmore ND, Glickman I. Reduced Plaque Formation by the Chloromethyl Analogue of Vitamin C. *J Periodontol*. 1970;41(1):41-43. doi:10.1902/jop.1970.41.41.41
153. Cugini MA, Thompson M, Warren PR. Correlations between two plaque indices in assessment of toothbrush effectiveness. *J Contemp Dent Pract*. 2006;7(5):001-009. doi:10.5005/jcdp-7-5-1
154. Ghassemi A, Vorwerk LM, Hooper WJ, Putt MS, Milleman KR. A four-week clinical study to evaluate and compare the effectiveness of a baking soda dentifrice and an antimicrobial dentifrice in reducing plaque. *J Clin Dent*. 2008;19(4):120-126.
155. Tao S, Zhu Y, Yuan H, et al. Efficacy of fluorides and CPP-ACP vs fluorides monotherapy on early caries lesions: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2018;Apr 30;13(4):e0196660. doi:10.1371/journal.pone.0196660
156. Shen P, Manton DJ, Cochrane NJ, et al. Effect of added calcium phosphate on enamel remineralization by fluoride in a randomized controlled in situ trial. *J Dent*. 2011;39(7):518-525. doi:10.1016/j.jdent.2011.05.002

157. Gao SS, Zhang S, Mei ML, Lo ECM, Chu CH. Caries remineralisation and arresting effect in children by professionally applied fluoride treatment - a systematic review. *BMC Oral Health*. 2016;16:12. doi:10.1186/s12903-016-0171-6
158. Fontana M, Young DA, Wolff MS, Pitts NB, Longbottom C. Defining dental caries for 2010 and beyond. *Dent Clin North Am*. 2010;54(3):423-440. doi:10.1016/j.cden.2010.03.007
159. Nascimento MM, Zaura E, Mira A, Takahashi N, Ten Cate JM. Second era of OMICS in caries research: Moving past the phase of disillusionment. *J Dent Res*. 2017;96:733–740. doi:10.1177/0022034517701902
160. Pereira JL, Duarte D, Carneiro TJ, et al. Saliva NMR metabolomics: Analytical issues in pediatric oral health research. *Oral Dis*. 2019;25(6):1545-1554. doi:10.1111/odi.13117
161. Pappa E, Kousvelari E, Vastardis H. Saliva in the “Omics” era: A promising tool in paediatrics. *Oral Dis*. 2019;25(1):16-25. doi:10.1111/odi.12886
162. Duggal MS, Chawla HS, Curzon MEJ. A study of the relationship between trace elements in saliva and dental caries in children. *Arch Oral Biol*. 1991;36(12):881-884. doi:10.1016/0003-9969(91)90118-E
163. Hussein AS, Ghasheer HF, Ramli NM, Schroth RJ, Abu-Hassan MI. Salivary trace elements in relation to dental caries in a group of multi-ethnic schoolchildren in Shah Alam, Malaysia. *Eur J Paediatr Dent*. 2013;14(2):113-118.
164. Preethi BP, Reshma D, Anand P. Evaluation of flow rate, pH, buffering capacity, calcium, total proteins and total antioxidant capacity levels of saliva in caries free and caries active children: An in vivo study. *Indian J Clin Biochem*. 2010;25(4):425-428. doi:10.1007/s12291-010-0062-6
165. Dodds MWJ, Johnson DA, Mobley CC, Hattaway KM. Parotid saliva protein profiles in caries-free and caries-active adults. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997;83(2):244-251. doi:10.1016/S1079-2104(97)90012-3
166. Watanabe K, Tanaka T, Shigemi T, Hayashida Y, Maki K. Mn and Cu

- concentrations in mixed saliva of elementary school children in relation to sex, age, and dental caries. *J Trace Elem Med Biol.* 2009;23(2):93-99. doi:10.1016/j.jtemb.2009.01.003
167. Kargül B, Yarat A, Tanboga I, Emekli N. Salivary protein and some inorganic element levels in healthy children and their relationship to caries. *J Marmara Univ Dent Fac.* 1994;2(1):434-440.
168. Sekhri P, Sandhu M, Sachdev V, Chopra R. Estimation of trace elements in mixed saliva of caries free and caries active children. *J Clin Pediatr Dent.* 2018;42(2):135-139. doi:10.17796/1053-4628-42.2.9
169. Seppä L, Hausen H, Kärkkäinen S. Plaque fluoride and mutans streptococci in plaque and saliva before and after discontinuation of water fluoridation. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(4):353-358. doi:10.1111/j.1600-0722.1996.tb00091.x
170. Ammann AA. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): A versatile tool. *J Mass Spectrom.* 2007;42(4):419-427. doi:10.1002/jms.1206
171. Dame ZT, Aziat F, Mandal R, et al. The human saliva metabolome. *Metabolomics.* 2015;11(6):1864-1883. doi:10.1007/s11306-015-0840-5
172. Kahharova D, Brandt BW, Buijs MJ, et al. Maturation of the Oral Microbiome in Caries-Free Toddlers: A Longitudinal Study. *J Dent Res.* 2019;99(2):002203451988901. doi:10.1177/0022034519889015
173. Guo L, Shi W. Salivary biomarkers for caries risk assessment. *J Calif Dent Assoc.* 2013;41(2):107–118.
174. Akiyama T, Miyamoto H, Fukuda K, et al. Development of a novel PCR method to comprehensively analyze salivary bacterial flora and its application to patients with odontogenic infections. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 2010;109(5):669-676. doi:10.1016/j.tripleo.2009.10.045
175. Segal A, Wong DT. Salivary diagnostics: Enhancing disease detection and making medicine better. *Eur J Dent Educ.* 2008;12(SUPPL. 1):22-29. doi:10.1111/j.1600-0579.2007.00477.x

176. Sejdini M, Meqa K, Berisha N, et al. The Effect of Ca and Mg Concentrations and Quantity and Their Correlation with Caries Intensity in School-Age Children. *Int J Dent*. 2018;2018:2759040. doi:10.1155/2018/2759040
177. Dawes C. Circadian rhythms in the flow rate and composition of unstimulated and stimulated human submandibular saliva. *J Physiol*. 1975;244(2):535-548. doi:10.1113/jphysiol.1975.sp010811
178. Burne RA, Zeng L, Ahn SJ, et al. Progress dissecting the oral microbiome in caries and health. *Adv Dent Res*. 2012;24(2):77-80. doi:10.1177/0022034512449462
179. Adams SE, Arnold D, Murphy B, et al. A randomised clinical study to determine the effect of a toothpaste containing enzymes and proteins on plaque oral microbiome ecology. *Sci Rep*. 2017;7:43344. doi:10.1038/srep43344
180. Philip N, Suneja B, Walsh LJ. Ecological Approaches to Dental Caries Prevention: Paradigm Shift or Shibboleth? *Caries Res*. 2018;52(1-2):153-165. doi:10.1159/000484985
181. Castro ALS, Vianna MIP, Mendes CMC. Comparison of caries lesion detection methods in epidemiological surveys: CAST, ICDAS and DMF. *BMC Oral Health*. 2018;18(1):122. doi:10.1186/s12903-018-0583-6
182. Burt BA. How useful are cross-sectional data from surveys of dental caries? *Community Dent Oral Epidemiol*. 1997;25(1):36-41. doi:10.1111/j.1600-0528.1997.tb00897.x
183. Jayanthi M, Shilpapiya M, Reddy V, Elangovan A, Sakthivel R, Vijayakumar P. Efficacy of three-tone disclosing agent as an adjunct in caries risk assessment. *Contemp Clin Dent*. 2015;6(3):358-363. doi:10.4103/0976-237X.161887
184. Dettori J. Loss to follow-up. *Evid Based Spine Care J*. 2011;2(01):7-10. doi:10.1055/s-0030-1267080
185. Stein C, Santos NML, Hilgert JB, Hugo FN. Effectiveness of oral health education on oral hygiene and dental caries in schoolchildren: Systematic review and meta-analysis. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2018;46(1):30-37. doi:10.1111/cdoe.12325

186. Haleem A, Khan MK, Sufia S, Chaudhry S, Siddiqui MI, Khan AA. The role of repetition and reinforcement in school-based oral health education-a cluster randomized controlled trial Health behavior, health promotion and society. *BMC Public Health*. 2016;16:2. doi:10.1186/s12889-015-2676-3
187. Yu OY, Zhao IS, Mei ML, Lo ECM, Chu CH. Effect of silver nitrate and sodium fluoride with tri-calcium phosphate on streptococcus mutans and demineralised dentine. *Int J Mol Sci*. 2018;19(5):pii: E1288. doi:10.3390/ijms19051288
188. Chen KJ, Gao SS, Duangthip D, Lo ECM, Chu CH. The caries-arresting effect of incorporating functionalized tricalcium phosphate into fluoride varnish applied following application of silver nitrate solution in preschool children: Study protocol for a randomized, double-blind clinical trial. *Trials*. 2018;19(1):352. doi:10.1186/s13063-018-2741-1
189. Plonka KA, Pukallus ML, Holcombe TF, Barnett AG, Walsh LJ, Seow WK. A randomized controlled clinical trial comparing a remineralizing paste with an antibacterial gel to prevent early childhood caries. *Pediatr Dent*. 2013;35(1):8-12.
190. Pukallus ML, Plonka KA, Holcombe TF, Barnett AG, Walsh LJ, Seow WK. A randomized controlled trial of a 10 percent cpp-acp cream to reduce mutans streptococci colonization. *Pediatr Dent*. 2013;35(7):550-555.
191. Karlinsey RL, MacKey AC, Walker ER, Frederick KE. Surfactant-modified β -TCP: Structure, properties, and in vitro remineralization of subsurface enamel lesions. *J Mater Sci Mater Med*. 2010;21(7):2009-2020. doi:10.1007/s10856-010-4064-y
192. Alamoudi SA, Pani SC, Alomari M. The effect of the addition of tricalcium phosphate to 5% sodium fluoride varnishes on the microhardness of enamel of primary teeth. *Int J Dent*. 2013;2013:486358. doi:10.1155/2013/486358
193. Pyati SA, Naveen Kumar R, Kumar V, Praveen Kumar NH, Parveen Reddy KM. Salivary flow rate, pH, buffering capacity, total protein, oxidative stress and antioxidant capacity in children with and without dental caries. *J Clin Pediatr Dent*. 2018;42(6):445-449. doi:10.17796/1053-4625-42.6.7

194. Singh S, Sharma A, Sood PB, Sood A, Zaidi I, Sinha A. Saliva as a prediction tool for dental caries: An in vivo study. *J Oral Biol Craniofacial Res.* 2015;5(2):59-64. doi:10.1016/j.jobcr.2015.05.001
195. Zhou J, Jiang N, Wang Z, et al. Influences of pH and iron concentration on the salivary microbiome in individual humans with and without caries. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(4):e02412-16. doi:10.1128/AEM.02412-16
196. Prabhakar A, Reshma D, Raju O. Evaluation of Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Calcium, Total Protein and Total Antioxidant Levels of Saliva in Caries Free and Caries Active Children—An In Vivo Study. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2(1):9-12.
197. Tulunoglu Ö, Demirtas S, Tulunoglu I. Total antioxidant levels of saliva in children related to caries, age, and gender. *Int J Paediatr Dent.* 2006;16(3):186-191. doi:10.1111/j.1365-263X.2006.00733.x
198. Preethi BP, Reshma D, Anand P. Evaluation of flow rate, pH, buffering capacity, calcium, total proteins and total antioxidant capacity levels of saliva in caries free and caries active children: An in vivo study. *Indian J Clin Biochem.* 2010;25(4):425-428. doi:10.1007/s12291-010-0062-6
199. Dawes C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *J Am Dent Assoc.* 2008;139(5 SUPPL.):18S-24S. doi:10.14219/jada.archive.2008.0351
200. Fidalgo TKS, Freitas-Fernandes LB, Angeli R, et al. Salivary metabolite signatures of children with and without dental caries lesions. *Metabolomics.* 2013;9(3):657-666. doi:10.1007/s11306-012-0484-7
201. Bretz WA, Corby PM, Costa S, et al. Microbial acid production (Clinpro Cario L-Pop) and dental caries in infants and children. *Quintessence Int (Berl).* 2007;38(4):e213-e217.
202. Shimizu K, Igarashi K, Takahashi N. Chairside evaluation of pH-lowering activity and lactic acid production of dental plaque: correlation with caries experience and incidence in preschool children. *Quintessence Int (Berl).* 2008;39(2):151-158.
203. Lingström P, Van Ruyven FOJ, Van Houte J, Kent R. The pH of dental plaque in

- its relation to early enamel caries and dental plaque flora in humans. *J Dent Res.* 2000;79(2):770-777. doi:10.1177/00220345000790021101
204. Watanabe K, Tanaka T, Shigemi T, et al. Al and Fe levels in mixed saliva of children related to elution behavior from teeth and restorations. *J Trace Elem Med Biol.* 2011;25(3):143-148. doi:10.1016/j.jtemb.2011.05.003
205. Brookes SJ, Shore RC, Robinson C, Wood SR, Kirkham J. Copper ions inhibit the demineralisation of human enamel. *Arch Oral Biol.* 2003;48(1):25-30. doi:10.1016/S0003-9969(02)00162-0
206. Pathak MU, Shetty V, Kalra D. Trace Elements and Oral Health: A Systematic Review. *J Adv Oral Res.* 2016;7(2):12-20. doi:10.1177/2229411220160203
207. Zahir S, Sarkar S. Study of trace elements in mixed saliva of caries free and caries active children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2006;24(1):27. doi:10.4103/0970-4388.22832
208. Lynch RJ, Duckworth RM. Chapter 4: Microelements: Part I: Zn, Sn, Cu, Fe and I. In: Zohoori F, Duckworth R, eds. *The Impact of Nutrition and Diet on Oral Health.* Monogr Oral Sci Basel, Karger; 2020:32–47. doi:10.1159/000499007
209. Monaci F, Bargagli E, Bravi F, Rottoli P. Concentrations of major elements and mercury in unstimulated human saliva. *Biol Trace Elem Res.* 2002;89(3):193-203. doi:10.1385/BTER:89:3:193
210. Rajesh K, Zareena, Hegde S, Arun Kumar MS. Assessment of salivary calcium, phosphate, magnesium, pH, and flow rate in healthy subjects, periodontitis, and dental caries. *Contemp Clin Dent.* 2015;6(4):461-465. doi:10.4103/0976-237X.169846
211. Cochrane NJ, Shen P, Yuan Y, Reynolds EC. Ion release from calcium and fluoride containing dental varnishes. *Aust Dent J.* 2014;59(1):100-105. doi:10.1111/adj.12144
212. Bagherian A, Asadikaram G. Comparison of some salivary characteristics between children with and without early childhood caries. *Indian J Dent Res.* 2012;23(5):628-632. doi:10.4103/0970-9290.107380

213. Poureslami H, Hoseinifar R, Khazaeli P, Hoseinifar R, Sharifi H, Poureslami P. Changes in the Concentration of Ions in Saliva and Dental Plaque after Application of CPP-ACP with and without Fluoride among 6-9 Year Old Children. *J Dent Biomater*. 2017;4(1):361-366.
214. Bardow A, Hofer E, Nyvad B, et al. Effect of saliva composition on experimental root caries. *Caries Res*. 2005;39(1):71-77. doi:10.1159/000081660
215. Shahrabi M, Nikfarjam J, Alikhani A, Akhoundi N, Ashtiani M, Seraj B. A comparison of salivary calcium, phosphate, and alkaline phosphatase in children with severe, moderate caries, and caries free in Tehran's kindergartens. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2008;26(2):74-77. doi:10.4103/0970-4388.41621
216. Ben-Aryeh H, Fisher M, Szargel R, Laufer D. Composition of whole unstimulated saliva of healthy children: Changes with age. *Arch Oral Biol*. 1990;35(11):929-931. doi:10.1016/0003-9969(90)90075-L
217. Vogel GL. Oral fluoride reservoirs and the prevention of dental caries. *Monogr Oral Sci*. 2011;22:146-157. doi:10.1159/000325166.
218. Zero DT, Raubertas RF, Fu J, Pedersen AM, Hayes AL, Featherstone JD. Fluoride concentrations in plaque, whole saliva, and ductal saliva after application of home-use topical fluorides. *J Dent Res*. 1992;71(11):1768-1775. doi:10.1177/00220345920710110201
219. Vogel GL, Mao Y, Chow LC, Proskin HM. Fluoride in Plaque Fluid, Plaque, and Saliva Measured for 2 hours after a Sodium Fluoride Monofluorophosphate Rinse. *Caries Res*. 2000;34(5):404-411. doi:10.1159/000016615
220. Al Dehailan L, Lippert F, González-Cabezas C, Eckert GJ, Martínez-Mier EA. Fluoride concentration in saliva and biofilm fluid following the application of three fluoride varnishes. *J Dent*. 2017;60:87-93. doi:10.1016/j.jdent.2017.03.005
221. Gallego Reyes SM, Martínez Beneyto Y, Serna-Muñoz C, Pérez-Silva A, Aparicio Cury J, Ortiz Ruiz AJ. Concentración de flúor y metales pesados en aguas embotelladas: medidas barrera frente a caries dental y fluorosis. *Rev Esp Salud Publica*. 2019;93:e201912110.


-
222. Stephan Eakle W, Featherstone JDB, Weintraub JA, Shain SG, Gansky SA. Salivary fluoride levels following application of fluoride varnish or fluoride rinse. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004;32(6):462-469. doi:10.1111/j.1600-0528.2004.00185.x
223. Featherstone JDB. Delivery challenges for fluoride, chlorhexidine and xylitol. *BMC Oral Health.* 2006;6(SUPPL. 1):S8. doi:10.1186/1472-6831-6-S1-S8
224. Goodson JM, Hartman ML, Shi P, et al. The salivary microbiome is altered in the presence of a high salivary glucose concentration. *PLoS One.* 2017;12(3):e0170437. doi:10.1371/journal.pone.0170437
225. Ledder RG, Kampoo K, Teanpaisan R, McBain AJ. Oral Microbiota in Severe Early Childhood Caries in Thai Children and Their Families: A Pilot Study. *Front Microbiol.* 2018;9:2420. doi:10.3389/fmicb.2018.02420
226. Gardner A, Parkes HG, So PW, Carpenter GH. Determining bacterial and host contributions to the human salivary metabolome. *J Oral Microbiol.* 2019;11(1):1617014. doi:10.1080/20002297.2019.1617014
227. Oyetola EO, Awosusi OO, Agho ET, Abdullahi MAS, Suleiman IK, Egunjobi S. Salivary bacterial count and its implications on the prevalence of oral conditions. *J Contemp Dent Pract.* 2019;20(2):184-189. doi:10.5005/jp-journals-10024-2495
228. Lira R, Åkerman S, Klinge B, Boström EA, Gustafsson A. Salivary microbial profiles in relation to age, periodontal, and systemic diseases. *PLoS One.* 2018;13(3):e0189374. doi:10.1371/journal.pone.0189374
229. Abbate GM, Borghi D, Passi A, Levrini L. Correlation between un-stimulated salivary flow, pH and streptococcus mutans, analysed with real time PCR, in caries-free and caries-active children. *Eur J Paediatr Dent.* 2014;15(1):51-54.
230. Ling Z, Kong J, Jia P, et al. Analysis of Oral Microbiota in Children with Dental Caries by PCR-DGGE and Barcoded Pyrosequencing. *Microb Ecol.* 2010;60(3):677-690. doi:10.1007/s00248-010-9712-8
231. Huang S, Yang F, Zeng X, et al. Preliminary characterization of the oral microbiota of Chinese adults with and without gingivitis. *BMC Oral Health.* 2011;11:33.

doi:10.1186/1472-6831-11-33

232. Mira A, Simon-Soro A, Curtis MA. Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *J Clin Periodontol*. 2017;44:S23-S38. doi:10.1111/jcpe.12671
233. Belda-Ferre P, Williamson J, Simón-Soro Á, Artacho A, Jensen ON, Mira A. The human oral metaproteome reveals potential biomarkers for caries disease. *Proteomics*. 2015;15(20):3497-3507. doi:10.1002/pmic.201400600
234. Cameron SJS, Huws SA, Hegarty MJ, Smith DPM, Mur LAJ. The human salivary microbiome exhibits temporal stability in bacterial diversity. *FEMS Microbiol Ecol*. 2015;91(9):fiv091. doi:10.1093/femsec/fiv091
235. Mashima I, Theodorea CF, Thaweboon B, Thaweboon S, Scannapieco FA, Nakazawa F. Exploring the salivary microbiome of children stratified by the oral hygiene index. *PLoS One*. 2017;12(9):e0185274. doi:10.1371/journal.pone.0185274

ANEXOS

Anexo 1. Informe de la Comisión de Ética de Investigación.

 <p>Vicerrectorado de Investigación</p>		
--	--	---

**INFORME DE LA COMISIÓN DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN
DE LA
UNIVERSIDAD DE MURCIA**

Jaime Peris Riera, Catedrático de Universidad y Secretario de la Comisión de Ética de Investigación de la Universidad de Murcia

CERTIFICA:

Que D^a. Andrea Poza Pascual ha presentado la Tesis Doctoral titulada "*Remineralización dental. Una intervención dirigida a niños de alto riesgo para la prevención de caries*", dirigida por el Dr. D. Antonio José Ortiz Ruiz, a la Comisión de Ética de Investigación.

Que dicha Comisión analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo acordado el día 19 de mayo de 2017¹, por unanimidad, se emite INFORME FAVORABLE, desde el punto de vista ético de la investigación.

Y para que conste y tenga los efectos que correspondan, firmo esta certificación, con el visto bueno del Presidente de la Comisión

Vº Bº
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN
DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA
UNIVERSIDAD DE MURCIA

Fdo.: Antonio Juan García Fernández

ID: 1499/2017

¹ A los efectos de lo establecido en el art. 19.5 de la Ley 40/2015 de 1 de octubre de Régimen Jurídico del Sector Público (B.O.E. 02-10), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación






Código seguro de verificación: RUXFMh3l-lieF+sYf-MVTWGLx-55zS10bN

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 2 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <http://sede.um.es/validador/>

Anexo 2. Informe de Comité de Bioseguridad en Experimentación.


 <p>UNIVERSIDAD DE MURCIA</p>	<p>Vicerrectorado de Investigación</p>	 <p>CBE Comité de Bioseguridad en Experimentación</p>	 <p>CAMPUS MARE NOSTRUM</p>
--	--	---	--

Antonio Juan García Fernández, Vicerrector de Investigación, en funciones de Presidente del Comité de Bioseguridad en Experimentación de la Universidad de Murcia, hace constar:


Que D. Antonio José Ortiz Ruiz tiene presentada la memoria del proyecto de investigación denominado *"Remineralización dental. Una intervención dirigida a niños de alto riesgo para la prevención de la caries"*, pendiente de que el Comité de Bioseguridad en Experimentación emita el informe pertinente.

Firmado con certificado electrónico reconocido.
La información sobre el firmante, la fecha de firma y el código de verificación del documento se encuentra disponible en los márgenes izquierdo e inferior.

CBE 50/2017



Administración Electrónica



Código seguro de verificación: RUXFMu7r-/TSEVEPM-6trZFqEb-CXhcNkXR

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 2 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: <http://sede.um.es/validador/>

Firmante: ANTONIO JUAN GARCIA FERNANDEZ. Fecha-hora: 30/09/2017 13:45:18. Error del certificado: CN=CN FNMT Usuarios, OU=Usuarios, CN=FNMT-REDUCES.

126

Anexo 3. Historia clínica.

HISTORIA CLÍNICA

DATOS DE FILIACIÓN.

- Apellidos y nombre:
- Dirección (con código postal):
- Teléfono:
- Email:
- Lugar y Fecha de nacimiento:
- Nombre de los padres:
- Trabajo de los padres:
- Número de hermanos:

ANAMNESIS.

- ¿Qué le pasa?
- ¿Desde cuándo?
- ¿Cómo le pasa?
- ¿A qué lo atribuye?

HISTORIA MÉDICA PREVIA.

- Embarazo y parto: cesárea prematuro normal
- Enfermedades de la madre durante el embarazo:
- Tratamientos de la madre durante el embarazo:
- Tipo de lactancia: materna (duración en meses)____ artificial mixta
- Problemas alérgicos:
- ¿Está tomando el niño alguna medicación?:
- ¿Ha sido el niño operado de algo?:
- Presenta el niño o ha presentado alguna de las siguientes enfermedades. ¿Desde cuándo?. ¿Qué tratamiento recibe o ha recibido?:
 - Enfermedades cardiovasculares:
 - Enfermedades pulmonares (asma, bronquitis, etc.)
 - Enfermedades Otorrinolaringológicas (faringitis, amigdalitis, otitis, rinitis, etc.):
 - Enfermedades gastrointestinales (gastritis, diarreas, etc.):
 - Enfermedades del hígado (hepatitis, etc.):
 - Enfermedades genitourinarias:
 - Alteraciones de la coagulación:
 - Enfermedades sanguíneas (anemias, etc.):
 - Enfermedades endocrinas (diabetes, etc.):
 - Enfermedades nerviosas:

HISTORIA FAMILIAR GENERAL Y BUCAL.

- Enfermedades hereditarias (Sdre. Down, clase III, amelogénesis imperfecta ...):
- Historia familiar de alteraciones en la posición de los maxilares (Clase III, etc)
- ¿Con qué frecuencia van los padres al dentista?
 Anualmente Cada dos años Más de dos años
- ¿Han presentado los padres caries alguna vez? (Obturaciones, extracciones)
 Caries hace más de dos años Caries en el último año No caries

Anexo 3. Historia clínica.

HISTORIA BUCAL.

- ¿Ha ido el niño ya al dentista?: sí no Generalista Odontopediatra
- Describa el comportamiento del niño:
- ¿Por qué problemas dentales llevó al niño al dentista?:
- el niño usa pasta dentífrica con flúor enjuagues con flúor pastillas de flúor
- Tratamientos previos.
- Hábitos:
 - ¿Cuántas veces se cepilla el niño al día? Ninguna Una Dos Más de dos
 - ¿En qué momento del día se cepilla los dientes?(varias opciones son validas)
 - Después del desayuno Después de la comida Después de la cena Otros
 - De alimentación (rellenar la hoja de dieta en Anexo 1).
 - Lugar de **desayuno** Casa Colegio Bar/Restaurante Otros
 - Lugar de **comida** Casa Colegio Bar/Restaurante Otros
 - Lugar de **cena** Casa Colegio Bar/Restaurante Otros
 - ¿Toma agua embotellada? sí no ¿Qué marca?
 - Ha usado el niño chupete, biberón o se muerde las uñas, ¿hasta cuándo?:

ASPECTOS PSICOLÓGICOS.

- ¿Ha padecido el niño alteraciones del desarrollo psicológico?:
- ¿Cómo definiría la forma de ser de su hijo?: normal nervioso consentido
 - caprichoso maduro rebelde.

EXPLORACIÓN EXTRAORAL.

- Exploración funcional: masticación, fonación y deglución.
- Exploración de la cara:
 - Vista frontal: simetría, tercios faciales y sellado labial.
 - Vista lateral: perfil y posición labial.
- Exploración de la cabeza: fontanelas.
- Exploración del cuello: ganglios.
- Exploración de la ATM: palpación, auscultación y movilidad.

EXPLORACIÓN INTRAORAL.

- Halitosis (local o general):
- Exploración de mucosas:
- Exploración de la encía:
- Exploración de la lengua:
- Exploración de frenillos:
- Exploración de las glándulas salivales:
- Exploración de la orofaringe (paladar y amígdalas):
- Exploración dental (alteraciones del número, tamaño, color, forma):
- Exploración de hábitos (deglución atípica, succión digital y respiración oral):
- Exploración ortodóncica:
 - Relación anteroposterior (clase de Angle):
 - Relación transversal:
 - Relación vertical:
 - Anomalías dentarias:
 - Apiñamiento:

Anexo 3. Historia clínica.

PRUEBAS COMPLEMENTARIAS:

- Radiografías periapicales:
- Radiografías de aletas de mordida:
- Radiografías oclusales:
- Ortopantomografía:
- Otras pruebas complementarias:

FOTOGRAFÍAS.

- Extraorales (frente, perfil):
- Intraorales (máxima intercuspidadòn frente, lateral derecha e izquierda, arcada superior e inferior, sonrisa, posición forzada del labio superior):

CLASIFICACIÓN DEL PACIENTE EN FUNCIÓN DEL RIESGO DE CARIES:

- Bajo:
- Moderado:
- Alto:

REGISTRO ICDAS

Fecha de registro _____ Siguiete cita _____

Edad _____

SUPERIOR DERECHO									SUPERIOR IZQUIERDO								
				55	54	53	52	51	61	62	63	64	65				
	18	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27	28	
M																	M
O																	O
D																	D
B																	B
L																	L

INFERIOR DERECHO									INFERIOR IZQUIERDO								
				85	84	83	82	81	71	72	73	74	75				
	48	47	46	45	44	43	42	41	31	32	33	34	35	36	37		
M																	M
O																	O
D																	D
B																	B
L																	L

Anexo 3. Historia clínica.

Plan de tratamiento.

Paciente:

Cita 1:

Cita 2:

Cita 3:

Cita 4:

Cita 5:

Cita 6:

Anexo 3. Historia clínica. Cuestionario CAMBRA.**CARIES RISK ASSESMENT:**

- Bajo:
- Moderado:
- Alto:
- Extremo:

Inicial/fecha de examen basal _____	Fecha revisión _____		
	Si	No	Notas
1. Indicadores de Riesgo de caries — Entrevista a padres/tutor**			
(a) La madre o cuidadores principales han tenido caries en los últimos 12 meses.			
(b) Se le han realizado restauraciones dentales al niño recientemente.			
(c) Los padres/cuidador tienen un bajo nivel socioeconómico y/o bajo nivel de educación sanitaria.			
(d) El niño tiene problemas de desarrollo.			
(e) No hay hábitos de higiene bucal en casa.			
2. Indicadores de Riesgo de caries (Biológicos) — Entrevista a padres/tutor**			
(a) El niño toma más de 3 veces al día dulces, snacks o bebidas azucaradas entre las comidas.			
(b) El niño presenta factores que reducen la saliva incluyendo fármacos o factores médicos (cáncer).			
(c) El niño toma en el biberón líquidos que no son agua.			
(d) El niño duerme con el biberón o se alimenta a demanda.			
3. Factores protectores (No biológicos) — Entrevista a padres/tutor**			
(a) La madre/cuidador no han tenido caries en los últimos 3 años.			
(b) El niño tiene hábitos de higiene bucal habituales en casa.			
4. Factores protectores (Biológicos) — Entrevista a padres/tutor**			
(a) EL niño vive en una comunidad de agua fluorada o toma suplementos (disueltos lentamente o en tabletas masticables)			
(b) El niño se cepilla los dientes con pasta fluorada diariamente.			
(c) La madre/cuidador mastica chicles o toma caramelos de xilitol 2-4 veces/día			
5. Indicadores de Riesgo de caries/Factores— Examen Clínico del niño**			
(a) Manchas blancas, descalcificaciones o lesiones de caries evidentes, presentes en los dientes del niño.			
(b) Restauraciones realizadas en los últimos 2 años			
(c) Los dientes presentan placa y/o las encías sangran fácilmente.			
(d) El niño lleva aparatología de ortodoncia (brackets, mantenedores de espacio...)			
(e) Factor de riesgo evidente: reducción del flujo salival, boca seca.			

Anexo 4. Consentimiento informado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO

REMNERALIZACIÓN DENTAL. UNA INTERVENCIÓN DIRIGIDA A NIÑOS PARA LA PREVENCIÓN DE LA CARIES.

Mediante la firma de este documento,

D/Dña. _____
 _____, con DNI/Pasaporte _____ otorgo mi consentimiento para que tanto yo como mi hijo/a, _____ participemos en este estudio de investigación, dirigido por el Dr. Antonio José Ortiz Ruiz, como Investigador Responsable de la Universidad de Murcia (UM). La investigación se realizará en las instalaciones de la Clínica Odontológica Universitaria, Facultad de Medicina de la Universidad de Murcia, situada en la segunda planta del Hospital Morales Meseguer.

Justificación del proyecto

El entendimiento actual de la caries dental y el surgimiento de nuevos sistemas para su diagnóstico y manejo integral han obligado a los profesionales a reconocer lesiones iniciales o subclínicas y a realizar tratamientos no operatorios que detengan la pérdida o induzcan la ganancia de minerales. En respuesta a esta necesidad, se han propuesto agentes remineralizantes como alternativa de tratamiento que requieren de mayor evidencia para ser recomendados en la práctica clínica.

Objetivo, metodología y procedimientos

El actual proyecto de investigación tiene como objetivo analizar la eficacia de nuevos agentes remineralizantes en el esmalte de dientes temporales.

Para ello se realizará a los padres un cuestionario previo que consta de una serie de instrumentos de evaluación de higiene dental, hábitos dietéticos y diferentes parámetros psicosociales. Adicionalmente, se educará a los niños en hábitos de higiene y salud oral y se les aplicarán diferentes agentes remineralizantes. Se recogerán diferentes índices dentales individuales que servirán para objetivar la evolución de la caries y motivar a los pacientes. A los niños se les recogerá una muestra de saliva para detectar indicadores de la actividad de la caries dental.

Se realizará un seguimiento trimestral donde se volverán a aplicar los agentes remineralizantes y a recoger los índices dentales y la muestra de saliva.

Es importante señalar que el presente proyecto no conlleva ningún tipo de riesgo ni contraindicación para ninguno de los pacientes participantes. Todo lo contrario, como cualquier técnica de intervención odontológica dentro de las técnicas de evidencia científica en odontología, la intervención a aplicar en el presente proyecto de investigación reúne todos los requisitos para la temprana y correcta identificación de niños con riesgo de caries. En estas intervenciones se trabajarán diferentes estrategias de higiene oral, hábitos dietéticos saludables y se implementarán las medidas preventivas, con lo que la enfermedad de caries puede ser controlada y disminuir su velocidad de progresión.

Beneficios del proyecto

El primer beneficio que se espera obtener es para la persona que participa en el proyecto. La terapia en la que se basa el programa, es una técnica de constatada eficacia que contribuye a incrementar la salud oral de los pacientes.

Además, los datos resultantes del presente proyecto supondrán la contrastación empírica de los diferentes agentes remineralizantes. Los hallazgos tendrían una importante repercusión en el ámbito de la promoción de la salud oral en niños ya que supone un aumento de la tecnología de intervención disponible.

El proyecto no recompensará a los pacientes que participen en el proyecto. La decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria. De igual modo, no habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted ni para su hijo/a, en caso de no aceptar la invitación.

Confidencialidad y responsabilidades

En lo que a la CONFIDENCIALIDAD se refiere, hay que señalar que el marco de interpretación de este documento se realizará, en los casos que sea aplicable, al amparo de la Ley 41/2002, de 14 de Noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.

El tratamiento de sus datos, en el supuesto de que lo hubiera y siempre y cuando los datos no pudieran tratarse de forma anónima y/o disociada, se hará de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre, de protección de datos de carácter personal, y demás legislación aplicable, pudiendo ejercer en cualquier momento los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición, reconocidos por esta normativa.

Con las garantías legales oportunas, los resultados del estudio podrán ser comunicados a la comunidad científica a través de congresos y publicaciones, garantizando que en todo el proceso de difusión, se omitirá su identidad y cualquier dato personal que pueda facilitar que se le identifique.

Declara que ha recibido suficiente información sobre el estudio y que ha tenido oportunidad de efectuar preguntas sobre el mismo y, en su caso, ha recibido respuestas satisfactorias del investigador/investigadores responsables. Ha comprendido la información recibida y la decisión que toma es libre y voluntaria pudiendo en cualquier momento revocar por escrito este consentimiento sin expresar la causa y sin que suponga perjuicio alguno en la asistencia sanitaria suya.

Derecho de la persona a retirarse del estudio

Puede abandonar en cualquier momento su participación en el estudio sin tener que dar explicaciones y sin que ello suponga perjuicio alguno.

En consecuencia, le solicitamos que firme y entregue la hoja de consentimiento informado que se adjunta.

Declara que se le entrega una copia de este documento.

En Murcia, a

de 2017

Firma y nombre del Investigador

Firma y nombre del participante.

Anexo 5. Instrucciones de higiene oral y dietéticas para padres.

LA BOCA Y LOS DIENTES

Hacia los 6 meses empiezan a salir los dientes de leche; sobre los 6 años empieza el recambio dentario y salen las primeras muelas definitivas por detrás de las muelas de leche, terminando el recambio a los 12 años. Por ello, es muy importante conservar los dientes temporales sin caries ya que sirven de guía para la colocación de los otros dientes definitivos.

Además a estas edades, la adquisición de hábitos correctos de alimentación e higiene dental influirá positivamente en su salud a lo largo de toda la vida.



PROBLEMAS MÁS FRECUENTES DE LOS ESCOLARES Y MODO DE PREVENIRLOS

CARIES DENTAL



Cuando tomamos alimentos que contienen azúcares, las bacterias que normalmente están en nuestra boca los transforman en ácidos que atacan al diente destruyéndolo poco a poco.

¿Cómo prevenir la caries?



1.- Por medio de una alimentación sana y variada:

. Los alimentos que más favorecen la aparición de caries son los dulces, como bollos, golosinas, mermeladas, galletas etc.



. Atención a los alimentos con azúcares "ocultos": refrescos, helados, batidos, yogures azucarados, etc.



. Evitar tomar dulces sobre todo fuera de las comidas.



. Atención a los alimentos pegajosos (miel, chocolate, etc.) ya que están más tiempo en contacto con los dientes



. Los frutos secos y las frutas frescas (pera, manzana, naranja, etc) aunque tengan sabor dulce, no producen caries. Pero conviene evitar las frutas en almibar o secas (higos, pasas, dátiles, etc.)

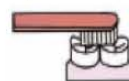
2.- Aumentando la resistencia del diente, cepillándose los dientes después de cada comida con pastas fluoradas.

CÓMO CEPILLAR LOS DIENTES

Cepillar los dientes **3 veces al día** (después del desayuno, comida y cena).

Durante **2 minutos**

Cepillar los caras que mastican



Limpiar los dientes y encías por dentro y por fuera



No olvidar limpiar la lengua



Cantidad de pasta:

Menores de 3 años
Tamaño grano de arroz o raspado sobre cepillo

Mayores de 3 años
Tamaño de un guisante



En niños menores de 7 años es necesaria la ayuda de un adulto

INSTRUCCIONES DURANTE EL ESTUDIO

Es primordial seguir estas indicaciones para que la recogida de las muestras se realice en las condiciones necesarias. De no ser así, los datos que acabarían analizándose no tendrían sentido en el marco del proyecto y/o dependerían de variables que no se había previsto encontrar en las muestras (restos de algún alimento, restos de dentífrico, etc.)

NO HABER COMIDO POR LO MENOS 1 H ANTES de la recogida de la muestra.



NO LAVARSE NI ENJUAGARSE los dientes una hora antes de la recogida de la muestra.



EVITAR OTRAS FUENTES DE FLUORURO (ambientales, suplementos, profesional u otros productos dentales) durante el período de estudio.

UTILIZAR LAS PASTAS Y EL CEPILLO QUE NOSOTROS ADMINISTRAMOS.

Anexo 6. Instrucciones de higiene oral para niños.

Higiene Dental

**Lavarse los
dientes 3 veces
al día**



Durante 2 MINUTOS



**Un adulto nos
ayudará (hasta los
6-7 años)**



**Limpiar los
dientes por fuera
y por dentro**



**Por la parte que
masticamos**



**Finalmente, la
lengua**



Anexo 7. Registro de toma de saliva e índice de higiene.

NOMBRE _____ FECHA _____

PROTOCOLO RECOGIDA SALIVAL

Durante la recogida de muestra:

1. Recoger aproximadamente 3,5 mL de saliva	SÍ NO
2. Apuntar hora toma de muestra	__h__min
3. Apuntar tiempo tardado en recoger la muestra.	_____min
4. Notificar la presencia de alguna enfermedad o herida en la boca.	SÍ Especificar: _____ NO
5. ¿Se ha cepillado los dientes antes de venir?	SÍ Especificar cuándo: _____ NO
6. ¿Ha comido o bebido algo antes de la cita?	SÍ Especificar cuándo: _____ NO

ÍNDICE DE PLACA

1. Medida TRIPLAQUE	Si NO
2. Fotos	Si NO

1. Comprobar pasta	Si NO
2. Comprobar cepillo	Si NO

Anexo 8. Instrucciones que los pacientes recibieron tras la aplicación de los barnices de flúor.

Instrucciones para el cuidado del paciente después del tratamiento

Su dentista bucal le ha aplicado una capa terapéutica de barniz sobre la superficie de varios dientes. Lo podrá notar como una delgada película blanca sobre la superficie del diente. El residuo de la película es temporal y debe dejarlo para obtener los mejores resultados terapéuticos en las áreas tratadas. A fin de obtener el máximo beneficio de la aplicación del barniz, le recomendamos lo siguiente:

No comer ni beber nada hasta una hora después de la aplicación del barniz

para obtener los mejores resultados terapéuticos

No se cepille los dientes ni use hilo dental 4- 6 horas

El barniz debe permanecer en los dientes aproximadamente de 4 a 6 horas

Ingiera alimentos blandos y evite alimentos calientes

Para evitar arrastrar la película que forma el barniz.

Anexo 9. Correlación estadística de los elementos estudiados

CORRELACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS ELEMENTOS ESTUDIADOS													
	pH4	Ácido láctico T0	Ácido láctico T4	caos T0	caos T4	CAOS T0	CAOS T4	IMAP T0	IMAP T4	TURESKY T0	TURESKY T4	PCR T0	PCR T4
pH 0 r	0,235	0,181	0,202	0,226	0,284	0,0876	-0,281	-0,0829	0,0627	-0,0492	0,424	-0,00380	-0,0315
Test estadístico	p= 0,203	p= 0,387	p= 0,356	p= 0,222	p= 0,121	p= 0,721	p= 0,205	p= 0,657	p= 0,738	p= 0,793	p= 0,0173	p= 0,984	p= 0,866
pH4		-0,194	0,0223	0,125	0,0244	0,283	-0,176	-0,153	0,00626	-0,106	-0,0402	-0,318	-0,326
Test estadístico		p= 0,352	p= 0,920	p= 0,489	p= 0,894	p= 0,241	p= 0,432	p= 0,396	p= 0,972	p= 0,558	p= 0,824	p= 0,0716	p= 0,0639
Ácido láctico T0			0,209	0,155	0,188	-0,184	-0,186	0,220	0,000871	0,0467	-0,153	-0,161	-0,265
Test estadístico			p= 0,339	p= 0,460	p= 0,368	p= 0,452	p= 0,408	p= 0,290	p= 0,997	p= 0,825	p= 0,464	p= 0,442	p= 0,200
Ácido láctico T4				0,0166	0,654	0,176	0,244	0,205	0,337	0,186	0,187	-0,143	-0,0993
Test estadístico				p= 0,940	p= 0,000705	p= 0,470	p= 0,274	p= 0,347	p= 0,116	p= 0,394	p= 0,393	p= 0,515	p= 0,652
caos T0					0,173	0,0922	0,0900	0,424	0,0492	-0,0323	-0,104	-0,189	-0,171
Test estadístico					p= 0,344	p= 0,707	p= 0,690	p= 0,0139	p= 0,786	p= 0,858	p= 0,563	p= 0,291	p= 0,342
caos T4						-0,0294	0,0700	0,249	0,397	0,437	0,255	-0,148	-0,149
Test estadístico						p= 0,905	p= 0,757	p= 0,169	p= 0,0243	p= 0,0125	p= 0,158	p= 0,418	p= 0,415
CAOS T0							-0,0460	-0,0299	0,0479	-0,105	0,226	-0,118	0,0180
Test estadístico							p= 0,852	p= 0,903	p= 0,846	p= 0,668	p= 0,351	p= 0,631	p= 0,942
CAOS T4								0,220	0,0399	0,144	-0,239	-0,163	-0,0763
Test estadístico								p= 0,325	p= 0,860	p= 0,523	p= 0,284	p= 0,469	p= 0,736
IMAP T0									0,185	0,434	-0,0701	-0,250	0,140
Test estadístico									p= 0,303	p= 0,0117	p= 0,698	p= 0,161	p= 0,436
IMAP T4										0,432	0,445	-0,333	-0,249
Test estadístico										p= 0,0121	p= 0,00947	p= 0,0584	p= 0,163
TURESK T0											0,303	-0,270	-0,0551
Test estadístico											p= 0,0867	p= 0,128	p= 0,761
TURESK T4												-0,0552	0,0236
Test estadístico												p= 0,760	p= 0,896
PCR T0													0,713
Test estadístico													p= 0,0000316