UNIVERSIDAD DE MURCIA

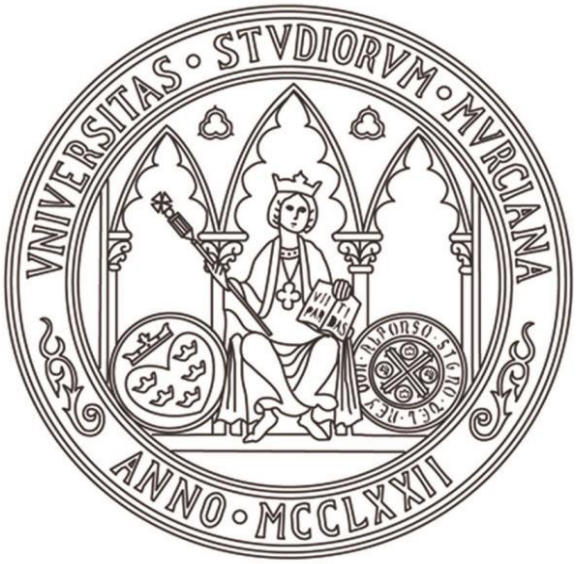
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Potencial remineralizante y resistencia al ataque ácido del péptido P11-4, nanohidroxiapatita, silicato de calcio/fosfato de sodio y barniz de fluoruro sódico en esmalte bovino desmineralizado.

D. Yanet Martínez Millán

2024



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Potencial remineralizante y resistencia al ataque ácido del péptido P11-4, nanohidroxiapatita, silicato de calcio/fosfato de sodio y barniz de fluoruro sódico en esmalte bovino desmineralizado.

Autor: D. Yanet Martínez Millán

Directores: Dra. Yolanda Martínez Beneyto

Dr. Antonio José Ortiz Ruiz

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Yanet Martínez Millán

doctorando del Programa de Doctorado en

Ciencias de la Salud

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Potencial remineralizante y resistencia al ataque ácido del péptido P11-4, nanohidroxiapatita, silicato de calcio/fosfato de sodio y barniz de fluoruro sódico en esmalte bovino desmineralizado.

y dirigida por,

D./Dña. Yolanda Martínez Beneyto

D./Dña. Antonio José Ortiz Ruiz

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 9 de septiembre de 2024

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Dª. Yolanda Martínez Beneyto, Profesora 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 "Potencial remineralizante y resistencia al ataque ácido del péptido P11-4, nanohidroxiapatita, silicato de calcio/fosfato de sodido y barniz de fluoruro sódico en esmalte bovino desmineralizado ", realizada por D. Yanet Martínez Millán, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 6 de Septiembre de 2024

MARTINEZ BENEYTO YOLANDA -

Firmado digitalmente por MARTINEZ BENEYTO YOLANDA -
Fecha: 2024.09.06 07:43:04 +02'00'

UNIVERSIDAD DE
MURCIA

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 "Potencial remineralizante y resistencia al ataque ácido del péptido P11-4, nanohidroxiapatita, silicato de calcio/fosfato de sodio y barniz de fluoruro sódico en esmalte bovino desmineralizado", realizada por Dª. Yanet Martínez Millán , bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 4 de Septiembre de 2024

ORTIZ RUIZ ANTONIO JOSE -

Firmado digitalmente por ORTIZ RUIZ ANTONIO JOSE -

Fecha: 2024.09.04 13:48:12 +02'00'

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mis directores Yolanda Martínez Beneyto por su apoyo, dedicación y paciencia, por ayudarme a buscar alternativas cuando creía que todo estaba perdido y por ser una de las personas vitamina que tengo en mi vida, que me llena de energía y confianza, por esa simbiosis que hemos hecho y porque eres muy grande. A Antonio Ortiz por ser mi guía en este campo de la investigación. Ojalá y algún día pueda tener la mitad de tu sabiduría. Eres un ejemplo a seguir como profesional y como persona, no cambies nunca.

A mi pareja Eugenio, por acompañarme durante todos estos años dándome fuerzas y motivos para seguir adelante, por ser mi mejor amigo y mi compañero de vida.

A mi familia: mis abuelos, mis padres, mis hermanos, tíos y primos a los que tanto quiero y admiro, por darme todo ese cariño y apoyo incondicional.

A Guillermo Pardo por sus consejos y ayuda durante este recorrido de tantos años. Por ser el mejor mentor que se puede tener y enseñarme con tanto cariño y tanta generosidad.

A Fernando del Departamento de Ingeniería Mecánica, Materiales y Fabricación de la Universidad Politécnica de Cartagena por haber sido mi guía con los microdurómetros.

A Tere del Servicio Universitario de Microscopía de la Universidad de Murcia, por enseñarme tanto sobre el mundo de los microscopios.

A mis Antoñitas por estar siempre, por hacer mis días más bonitos y porque juntas somos el mejor equipo.

A todos los que de una forma u otra han puesto su granito de arena durante estos años, mil gracias porque sin vosotros esto no hubiera sido posible.

¡Gracias!

ABREVIATURAS

ACP: Fosfato de calcio amorfo.

ACFP: fosfato de fluoruro de calcio amorfo

ADS: Arginina deiminasa.

AMBN: Ameloblastina.

AMELX: Amelogenina.

AmF: Fluoruro de amino.

AMS: Asamblea Mundial de la Salud.

AMTN: Amelotina.

APF: Aplicación profesional de fluoruros.

AFM: Microscopio de fuerza atómica.

Ca: Calcio.

Ca^{2+}: Ion Calcio.

$Ca_3(PO_4)_2$: Fosfato de calcio.

CAC: Conexión amelocementaria.

CAD: Conexión amelodentinaria.

CaF_2: Fluoruro cálcico.

CAMBRA: Caries Management by Risk Assessment.

Cl: Cloro.

CPP: Fosfopéptido de caseína.

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

CPP-ACPF: Fosfato de calcio amorfo estabilizado con fosfopéptido de caseína y flúor.

Cu: Cobre.

DPP: Fosfoproteína dentinaria.

DSS: Tripéptido aspartato- serina-serina.

EAER: Remineralización acelerada y mejorada eléctricamente.

F: Flúor.

F^-: Ion flúor.

FA: Fluorapatita.

FDA: Federación Dental Americana.

Fe: Hierro.

FESEM: Microscopio electrónico de barrido de alta resolución de emisión de campo.

FHA: Fluorhidroxiapatita.

Gpa: Gigapascales.

H^+: Ion hidrógeno, protones.

HA: Hidroxiapatita.

HCO^-: Bicarbonato.

HIM: Hipomineralización incisivo-molar.

HV: Dureza Vickers.

ICDAS: Sistema de Detección y Evaluación Internacional de Caries.

K: Potasio.

kg: Kilogramo.

KI: Yoduro de potasio.

KLK4: Kalicreina.

LRAP: Péptidos de Amelogenina ricos en Leucina.

mm: Milímetro.

m2/g: Área de la superficie por unidad de masa.

M: Unidad de medición de molaridad, equivalente a 1mol/l.

MFP: Monofluorfosfato de sodio.

Mg: Magnesio.

ml: Mililitro.

MMP20: Metaloproteinasa de la matriz 20.

Mn: Manganesio.

n-HAP: Nanohidroxiapatita.

Na: Sodio.

NaF: Fluoruro de sodio

nm: Nanómetro.

OH^-: Ion hidroxilo.

P: Fósforo.

PAMAM: Poliamidoamina.

Pi: Fósforo inorgánico.

PO_4^{3-}: Ion fosfato.

ppm: Partícula por millón.

SD: Solución desmineralizante pH 4,4.

SDF: Fluoruro diamino de plata.

SEM: Microscopio electrónico de barrido.

Si: Silicio.

SiO_2: Óxido de silicio.

SnF_2: fluoruro de estaño.

SR: Solución remineralizante pH 7,0.

TCP: Fosfato tricálcico.

TMP: Trimetafosfato de sodio.

TRA: Tratamiento restaurador atraumático.

β –TCP: Beta- fosfato tricálcico.

***f*-TCP:** Fosfato tricálcico funcionalizado.

µm: Micras.

Zn: Zinc.

Ø: Símbolo correspondiente al diámetro.

ÍNDICE

1.1 RESUMEN **1**

1.2 ABSTRACT **3**

2 INTRODUCCIÓN **5**

2.1 Esmalte dental: características y composición **6**

2.1.1 Propiedades físicas **7**

2.1.2 Composición química **9**

2.1.3 Histología del esmalte **12**

2.2 La caries dental: definición y etiopatogenia **15**

2.2.1 Definición **15**

2.2.2 Etiopatogenia **15**

2.2.3 Histología de la caries dental **18**

2.2.4 Riesgo individual de caries **20**

2.3 Proceso de demineralización y remineralización **21**

2.4 Biomineralización **22**

2.5 Agentes remineralizantes **23**

2.5.1 Saliva **25**

2.5.2 Fluoruros **26**

2.5.3 Sistemas biomiméticos **33**

2.5.4 Fosfatos de calcio **37**

2.5.5 Vidrios Bioactivos **39**

2.5.6 Sistemas de Polifosfato **39**

2.5.7 Productos naturales **40**

2.5.8 Arginina **40**

2.6 Justificación **42**

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS **43**

3.1 Hipótesis **43**

3.2 Objetivos **43**

4 MATERIAL Y MÉTODO **45**

4.1 Muestras **46**

4.2 Selección y aleatorización **50**

4.3 Formación de las lesiones cariosas incipientes **51**
4.4 Modelo químico de los ciclos de pH (Remineralización/Desmineralización) **51**
4.5 Grupos experimentales y procedimientos **53**
4.6 Test de microdureza **61**
4.7 Microanálisis por energía de dispersión de rayos x **62**
4.8 Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo **63**
4.9 Microscopio de fuerza atómica **64**
4.10 Análisis estadístico **67**
5 RESULTADOS **71**
5.1 Resultados para alcanzar el objetivo específico número 1 **71**
5.2 Resultados para alcanzar el objetivo específico número 2 **74**
5.3 Resultados para alcanzar el objetivo específico número 3 **87**
5.4 Resultados para alcanzar el objetivo específico número 4 **95**
6 DISCUSION **104**
6.1 Discusión del método **104**
6.1.1 Desmineralización y remineralización del esmalte **104**
6.1.2 Muestras del estudio **106**
6.1.3 Estudios in vitro: características **107**
6.1.4 Agentes remineralizantes empleados **108**
6.2 Discusión de los resultados **112**
6.2.1 Microdureza superficial del esmalte **112**
6.2.2 Contenido mineral porcentual en peso (%) del esmalte **117**
6.2.3 Alteraciones morfológicas **125**
6.2.4 Rugosidad superficial del esmalte **129**
6.3 Limitaciones del estudio **133**
6.4 Líneas futuras de investigación **133**
7 CONCLUSIONES **134**
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS **136**
9 ANEXOS **167**

LISTADO DE TABLAS

Tabla I	Agentes remineralizantes según material, producto utilizado y grado de evidencia científica.	**24**
Tabla II	Fórmulas químicas de fluoruros en los dentífricos, compatibilidad con el calcio de los abrasivos, principio activo y efectos.	**29**
Tabla III	Composición de Duraphat® 2,26% F; Barniz de Fluoruro.	**53**
Tabla IV	Composición de Pasta dental Parodontax® Sin Flúor.	**54**
Tabla V	Composición del Sérum Advance Enamel Serum™ y de la pasta dental Regenerate Advance Toothpaste ™.	**56**
Tabla VI	Composición de la pasta dental Orthocare nHAp™ Toothpaste y serúm Orthocare nHAp® Boost Sponge de 1 ml.	**58**
Tabla VII	Composición de Curodont™ Protect.	**59**
Tabla VIII	Composición de Fluor Protector, 1,5% Barniz en Ampollas de 1ml.	**60**
Tabla IX	Valores de microdureza inicial y final por grupos experimentales.	**72**
Tabla X	Resultados de microanálisis por grupos experimentales y elementos químicos.	**75**
Tabla XI	Resultados de microanálisis por grupos experimentales y elemento químico Ca.	**76**
Tabla XII	Resultados de microanálisis por grupos experimentales y elemento químico P.	**77**
Tabla XIII	Resultados de microanálisis por grupos experimentales y Ratio Ca/P.	**78**
Tabla XIV	Resultados de microanálisis por grupos experimentales y elemento químico C.	**79**
Tabla XV	Resultados de microanálisis por grupos experimentales y elemento químico O.	**80**
Tabla XVI	Resultados de microanálisis por grupos experimentales y elemento químico F.	**81**
Tabla XVII	Resultados de microanálisis por grupos experimentales y elemento químico Na.	**82**
Tabla XVIII	Resultados de microanálisis por grupos experimentales y elemento químico Mg.	**83**
Tabla XIX	Resultados de microanálisis por grupos experimentales y elemento químico Si.	**85**
Tabla XX	Resultados de microanálisis por grupos experimentales y elemento químico Cl.	**86**
Tabla XXI	Rugosidad superficial media de los distintos grupos experimentales.	**96**

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1	Proyección hexagonal de los iones que forman la estructura cristalina de hidroxiapatita.	**11**
Figura 2	Detalles en un corte longitudinal de los prismas del esmalte.	**14**
Figura 3	Diagrama de la metáfora del iceberg para la identificación de la caries dental siguiendo la clasificación del Sistema de Detección y Evaluación Internacional de caries (ICDAS).	**17**
Figura 4	Sección transversal de una lesión cariosa incipiente no cavitada observada bajo luz polarizada.	**19**
Figura 5	Balance del riesgo de caries modificado.	**20**
Figura 6	Proceso de desmineralización y remineralización.	**22**
Figura 7	Esquema del diseño del estudio experimental que se ha llevado a cabo.	**46**
Figura 8	Maxilares bovinos, fórceps de incisivos superiores y botador recto.	**47**
Figura 9	Bisturí del 15 y diente después de retirar ligamento periodontal.	**47**
Figura 10	Pasta profiláctica sin flúor y limpieza de superficies vestibulares con cepillo.	**48**
Figura 11	Discos de corte y sentido de corte de las muestras	**48**
Figura 12	Lijadora/pulidora manual Shapir 250 MI y pulido de la zona inferior de las muestras con discos de grano fino P240.	**49**
Figura 13	Muestras pintadas.	**49**
Figura 14	Microdurómetro de sobremesa Vickers KMHV-1000Z y platina con las muestras pegadas y enumeradas.	**51**
Figura 15	Estufa de laboratorio empleada en el estudio.	**52**
Figura 16	Duraphat® 2,26% F; Barniz de Fluoruro.	**53**
Figura 17	Pasta dental Parodontax® Sin Flúor.	**54**
Figura 18	Sérum Advance Enamel Serum™ y de la pasta dental Regenerate Advance Toothpaste ™.	**55**
Figura 19	Pasta dental Orthocare nHAp™ Toothpaste y serúm Orthocare nHAp® Boost Sponge de 1 ml.	**57**
Figura 20	Curodont™ Protect.	**59**
Figura 21	Fluor Protector, 1,5% Barniz en Ampollas de 1ml.	**60**
Figura 22	Cepillo VITIS®-DENTAID.	**61**
Figura 23	Microdurómetro de sobremesa Vickers KMHV-1000Z	**62**
Figura 24	Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) y muestras recubiertas con platino para la realización del microanálisis.	**63**
Figura 25	Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de campo (FESEM).	**64**
Figura 26	Microscopio de Fuerza Atómica y muestras escogidas.	**65**
Figura 27	Trazado de 5 líneas paralelas y equidistantes en una de las 3 mediciones realizadas a una de las muestras con barrido hacia arriba y hacia abajo.	**65**

Figura 28	Ejemplo de medición del punto A y punto B en cada una de las líneas paralelas de la muestra.	**66**
Figura 29	Ejemplo de los valores que se han tenido en cuenta: A, B y A-B de la fila #1.	**66**
Figura 30	Imagen en tres dimensiones tomada en cada una de las muestras para realizar análisis topográfico.	**67**
Figura 31	Resultados de microdureza inicial entre grupos experimentales	**69**
Figura 32	Resultados de microdureza final entre grupos experimentales	**70**
Figura 33	Resultados de microdureza inicial, microdureza final y diferencias entre grupos experimentales	**73**
Figura 34	Microdureza final según el tipo de agente remineralizante	**74**
Figura 35	Concentración de Calcio en los diferentes grupos experimentales.	**75**
Figura 36	Concentración de Fósforo en los diferentes grupos experimentales.	**76**
Figura 37	Ratio Ca/P.	**78**
Figura 38	Concentración de Carbono en los diferentes grupos experimentales.	**79**
Figura 39	Concentración de Oxígeno en los diferentes grupos experimentales.	**80**
Figura 40	Concentración de Flúor en los diferentes grupos experimentales.	**81**
Figura 41	Concentración de Sodio en los diferentes grupos experimentales.	**82**
Figura 42	Concentración de Magnesio en los diferentes grupos experimentales.	**83**
Figura 43	Concentración de Sílice en los diferentes grupos experimentales.	**84**
Figura 44	Concentración de Cloro en los diferentes grupos experimentales.	**85**
Figura 45	Microfotografías con FESEM de la superficie del grupo de Esmalte Intacto.	**87**
Figura 46	Microfotografías con FESEM de la superficie del grupo de Esmalte Desmineralizado.	**88**
Figura 47	Microfotografías con FESEM de la superficie del grupo Control Positivo (Duraphat).	**89**
Figura 48	Microfotografías con FESEM de la superficie del grupo Control Negativo (Pasta sin F).	**90**
Figura 49	Microfotografías con FESEM de la superficie del grupo tratado con Regenerate.	**91**
Figura 50	Microfotografías con FESEM de la superficie del grupo tratado con Orthocare.	**92**
Figura 51	Microfotografías con FESEM de la superficie del grupo tratado con Curodont Protect.	**93**
Figura 52	Microfotografías con FESEM de la superficie del grupo tratado con Curodont Protect + Fluor Protector.	**94**
Figura 53	Valores de rugosidad superficial de los diferentes grupos experimentales.	**95**

Figura 54	Valores de rugosidad superficial media entre los diferentes agentes remineralizantes.	**97**
Figura 55	Micrografía de fuerza atómica en área 10 x 10 μm^2 del grupo esmalte intacto.	**98**
Figura 56	Micrografía de fuerza atómica en área 10 x 10 μm^2 del grupo esmalte desmineralizado.	**99**
Figura 57	Micrografía de fuerza atómica en área 10 x 10 μm^2 del grupo Control Positivo (Duraphat).	**100**
Figura 58	Micrografía de fuerza atómica en área 10 x 10 μm^2 del grupo Control Negativo (Pasta sin F).	**100**
Figura 59	Micrografía de fuerza atómica en área 10 x 10 μm^2 del grupo tratado con Regenerate.	**101**
Figura 60	Micrografía de fuerza atómica en área 10 x 10 μm^2 del grupo tratado con Orthocare.	**102**
Figura 61	Micrografía de fuerza atómica en área 10 x 10 μm^2 del grupo tratado con Curodont Protect.	**103**
Figura 62	Micrografía de fuerza atómica en área 10 x 10 μm^2 del grupo tratado con Curodont Protect + Fluor Protector.	**103**

1.1 RESUMEN

Introducción

La formación de la caries dental es un proceso dinámico, donde se alternan diversos ciclos de desmineralización y remineralización a lo largo del día en la cavidad oral. Todo ello dependerá de diversos factores como el biofilm bacteriano, la estructura dental y los azúcares de la dieta, así como de las influencias ambientales, genéticas y salivales de cada individuo. Las afectaciones en el esmalte dental, principalmente la caries dental, repercuten directamente en la calidad de vida de las personas, no sólo por el dolor físico y la limitación funcional que conllevan, sino también por su impacto a nivel psicológico y social cuando existe afectación estética; por tanto, es importante llevar a cabo estrategias que permitan fortalecer y remineralizar el esmalte dental.

Objetivos

El objetivo general del proyecto es determinar la posible capacidad remineralizadora y resistencia al ataque ácido de cuatro materiales de uso dental empleados sobre esmalte bovino previamente desmineralizado mediante un sistema de pH cíclico.

Material y método

Se llevó a cabo un estudio experimental in vitro, realizando un modelo de desmineralización en dientes bovinos mediante una solución desmineralizante pH (4,4), seguido de una remineralización (pH 7,0) utilizando 4 agentes remineralizantes (péptido P11-4 (Curodont® Protect), nanohidroxiapatita (Orthocare nHAp®), silicato de calcio/fosfato de sodio (Regenerate Enamel Science™ y barniz de fluoruro sódico (Duraphat® 2,26% F) sometidos a ciclos de pH (22 horas de solución remineralizante y 2 horas de solución desmineralizante) durante 30 días. Se utilizaron 160 muestras las cuales se distribuyeron de forma aleatoria en 8 grupos de experimentación y fueron previamente desmineralizadas con ácido láctico durante 72 horas, excepto el grupo de esmalte intacto. Posteriormente se evaluó la microdureza superficial, microanálisis del contenido mineral del esmalte (Ca, P, C, O, F, Na, Mg, Si, Cl) junto con la obtención de imágenes de alta resolución (SEM/FESEM), análisis de la topografía externa mediante AFM.

Resultados

Los valores obtenidos de microdureza inicial fueron similares en los grupos experimentales, excepto en el esmalte desmineralizado que fue inferior ($p < 0.001$). El más resistente a los ciclos de desmineralización/remineralización, con menor pérdida de microdureza fue Control positivo (Duraphat), seguido de Regenerate y Control negativo. Curodont Protect obtuvo valores inferiores a Duraphat y Regenerate, pero superiores respecto a Orthocare y Esmalte intacto. Los menos resistentes fueron esmalte desmineralizado y Orthocare ($p < 0.001$).

En cuanto al microanálisis del contenido mineral, el grupo Esmalte desmineralizado fue el de menor concentración de Ca, P, C, F, Si, Cl y obtuvo diferencias significativas con el resto, la mayor concentración de F se encontró en Duraphat seguido de Regenerate ($p < 0.001$). En cuanto al Ca, los valores fueron homogéneos. Regenerate presentó mayor contenido en P seguido de Curodont P. La mayor concentración de Si se encontró en Regenerate, seguido de Orthocare ($p < 0.001$).

El análisis morfológico mostró una superficie con depósitos de fluoruro cálcico en los grupos Duraphat, Regenerate y Curodont Protect. Sin embargo, en Orthocare se apreciaron numerosos poros y espacios intercristalinos.

El análisis de rugosidad permitió observar que Duraphat presentaba mayor rugosidad superficial, seguido de Curodont + Fluor y Orthocare. Menor rugosidad se obtuvo Orthocare y Regenerate.

Conclusiones

Los resultados de este estudio han demostrado que en el análisis de microdureza, el grupo Duraphat fue más resistente, seguido de Regenerate; Curodont Protect y por último Orthocare, presentando valores inferiores al esmalte intacto. En cuanto al contenido mineral, se han observado variaciones en los grupos experimentales, siendo Duraphat el de mayor contenido en F y Regenerate de P y Si. Todos los grupos han sufrido modificaciones en la morfología del esmalte, destacando Orthocare como el grupo con menor depósito de fluoruro calcio y mayor depósito Duraphat. En cuanto a la rugosidad el valor más alto se detectó en Duraphat y más bajo en Curodont P y Regenerate, interpretándose como un signo de remineralización.

1.2 ABSTRACT

Background

The formation of dental caries is a dynamic process, with several cycles of demineralisation and remineralisation alternating throughout the day in the oral cavity. This will depend on various factors such as bacterial biofilm, tooth structure and dietary sugars, as well as environmental, genetic and salivary influences on the individual. Damage to dental enamel, mainly dental caries, has a direct impact on people's quality of life, not only because of the physical pain and functional limitation that it entails, but also because of its impact on the psychological and social level when there is aesthetic affectation; therefore, it is important to carry out strategies to strengthen and remineralise dental enamel.

Objectives

The general objective of the project is to determine the possible remineralising capacity and resistance to acid attack of four dental materials used on previously demineralised bovine enamel using a cyclic pH system.

Method

An experimental in vitro study was carried out using a model of demineralisation in bovine teeth using a demineralising solution pH (4.4), followed by remineralisation (pH 7.0) using 4 remineralising agents (P11-4 peptide (Curodont® Protect), nanohydroxyapatite (Orthocare nHAp®), calcium silicate/sodium phosphate (Regenerate Enamel ScienceTM) and sodium fluoride varnish (Duraphat® 2.26% F) subjected to pH cycling (22 hours of remineralising solution and 2 hours of demineralising solution) for 30 days. A total of 160 samples were randomly distributed into 8 experimental groups and were previously demineralised with lactic acid for 72 hours, except for the intact enamel group. Subsequently, surface microhardness, microanalysis of enamel mineral content (Ca, P, C, O, F, Na, Mg, Si, Cl) together with high-resolution imaging (SEM/FESEM) roughness analysis and external topography by AFM.

Results

The initial microhardness values obtained were similar in the experimental groups, except for the demineralised enamel, which was lower ($p < 0.001$). The most resistant to the demineralisation/remineralisation cycles, with the lowest loss of microhardness was Positive Control (Duraphat), followed by Regenerate and Negative Control. Curodont Protect had lower values than Duraphat and Regenerate, but higher values than Orthocare and Intact Enamel. The least resistant were demineralised enamel and Orthocare ($p < 0.001$).

Regarding the microanalysis of the mineral content, the demineralised enamel group had the lowest concentration of Ca, P, C, F, Si, Cl and obtained significant differences with the rest, the highest concentration of F was found in Duraphat followed by Regenerate ($p < 0.001$). As for Ca, the values were homogeneous. Regenerate had the highest P content followed by Curodont P. The highest Si concentration was found in Regenerate, followed by Orthocare ($p < 0.001$).

Morphological analysis showed a surface with calcium fluoride deposits in the Duraphat, Regenerate and Curodont Protect groups. However, Orthocare showed numerous pores and intercrystalline spaces.

The roughness analysis showed that Duraphat had the highest surface roughness, followed by Curodont + Fluor and Orthocare. Orthocare and Regenerate had the lowest roughness.

Conclusions

The results of this study have shown that in terms of microhardness analysis, the Duraphat group was more resistant, followed by Regenerate; Curodont Protect and finally Orthocare, presenting lower values than intact enamel. Regarding the final mineral content after the demineralisation process, variations were observed in the experimental groups, with Duraphat having the highest F content and Regenerate the highest P and Si content. All the groups have undergone modifications in the morphology of the enamel, with Orthocare standing out as the group with the lowest calcium fluoride deposit and the highest Duraphat deposit. As for roughness, the highest value was detected in Duraphat and the lowest in Curodont P and Regenerate, interpreted as a sign of remineralisation.

2. INTRODUCCIÓN

Actualmente más de 3.500 millones de personas en el mundo padecen enfermedades bucodentales (1), entre ellas, destacar, las alteraciones del esmalte dental; ya sea por el desgaste dentario debido a acción química más conocido como *erosión dental*, donde se ha observado un aumento significativo en la prevalencia de los mismos, pasando de un 14,2 % (2) en el año 2015, hasta un 34,2% en 2020 (3). Por otro lado, el *bruxismo dental*, con una prevalencia descrita desde un 5,1 hasta un 22,1% (4). Además se han descrito defectos del esmalte como la Hipomineralización Incisivo-Molar (HIM) donde también se ha visto aumentada su prevalencia del 12% en 2015 (2) al 20,7% descrita en el año 2020 (3). Sin embargo, la caries dental no tratada sigue siendo la enfermedad bucodental más prevalente en el mundo (1, 5).

En 2021 se determinó en la 74ª Asamblea Mundial de la Salud (OMS) que la caries dental no tratada en dientes permanentes afecta a más de 2.300 millones de personas y más de 530 millones de niños sufren caries dental no tratada en dentición primaria (1, 5).

En España, el porcentaje de caries activas según la última encuesta de salud oral realizada en 2020 (3), ha disminuido durante las últimas décadas en niños mayores de 6 años. En dentición temporal el valor ha disminuido ligeramente de un 30,0% obtenido en la encuesta de salud bucodental realizada en 2000 (6) a un 28,3% en la del 2020 (3). Sin embargo, se ha observado un ligero repunte de 3 puntos en caries no tratada en dentición temporal desde la encuesta del año 2015 hasta la del 2020. En dentición permanente se ha observado que existe una disminución considerable de un 33,9% en el año 2000 (6) hasta un 12,7 % en la última encuesta de salud oral del 2020 (3). A pesar de la reducción la caries dental en niños de 6 años de edad, posiblemente debido a la incorporación de los programas preventivos a nivel nacional, sigue siendo un problema con gran repercusión a nivel de salud pública (5).

Se ha descrito que las afectaciones en el esmalte dental repercuten directamente en la calidad de vida de las personas, no sólo por el dolor físico y la limitación funcional que conllevan, sino también por su impacto a nivel psicológico y social cuando existe afectación estética; por tanto, es importante llevar a cabo estrategias que permitan fortalecer y remineralizar el esmalte dental (7, 8).

2.1 ESMALTE DENTAL: CARACTERÍSTICAS Y COMPOSICIÓN

El esmalte dental, también conocido como tejido o sustancia adamantina, comienza su desarrollo en los seres humanos en el tercer trimestre del embarazo y no es hasta los 6 meses de vida cuando se completa la mineralización (9). Es el tejido más duro del organismo compuesto por un 96% de matriz inorgánica microcristalina, un 3% de agua y 0,36-1% de matriz orgánica. Los cristales de hidroxiapatita formados por fosfato cálcico representan el componente inorgánico principal del esmalte y estructuralmente está formado por millones de varillas o prismas mineralizados a lo largo de todo su espesor (10, 11).

El esmalte dental es una estructura única en nuestro organismo por diversas razones:

- Embriológicamente, es de naturaleza ectodérmica y deriva del órgano del esmalte a diferencia de los otros tejidos dentarios de naturaleza ectomesenquimática, y su matriz orgánica está compuesta principalmente de proteínas con un agregado de polisacáridos (12, 13).
- Los cristales de hidroxiapatita son solubles frente a la acción de los ácidos, siendo una característica fundamental para entender la formación de la caries dental. Estos cristales se encuentran densamente empaquetados y son de mayor tamaño que los de otros tejidos mineralizados (14, 15).
- Los ameloblastos, son células que sintetizan y secretan gran cantidad de proteínas de la matriz del esmalte las cuales van a participar en la regulación del desarrollo estructural del esmalte (16). También se ha observado que regulan el pH durante la amelogénesis mediante mecanismos ácidos-base, porque durante este proceso se producen protones de hidrógeno y lo contrarresta con la secreción de bicarbonato para evitar interrupciones en el crecimiento de los cristales (17, 18). Los ameloblastos se diferencian a partir del epitelio interno del órgano del esmalte y tras completar la formación del esmalte involucionan y desparecen durante la erupción dentaria por apoptosis. Por tanto, no hay crecimiento ni nueva aposición de esmalte después de la erupción dental (19).
- El esmalte maduro no contiene células ni prolongaciones celulares, a diferencia de otros tejidos biomineralizados como el hueso y la dentina (9). Por ello

actualmente se le considera como una estructura biocerámica nanocompuesta que cubre y protege al diente (20).

- Frente a un ataque ácido, agentes físicos o químicos el esmalte reacciona perdiendo sustancia, y es incapaz de repararse por sí solo. Por tanto, no tiene poder regenerativo, pero si puede dar lugar a otro proceso conocido como remineralización (19, 21).

Su espesor máximo se encuentra entre 2-3 mm sobre todo en las cúspides de premolares y molares permanentes y en el borde incisal de caninos e incisivos, zonas de mayor impacto durante la masticación. Este espesor va disminuyendo hacia la región cervical, sobre todo en la conexión amelocementaria (CAC), y también en los surcos y fosas de las caras oclusales (9, 11).

2.1.1. Propiedades físicas

- *Dureza*. Es la oposición que ofrecen los materiales a alteraciones físicas como penetración, abrasión o rayado debido a la firme unión de las moléculas que lo conforman. El esmalte en la escala de Mohs se corresponde con un valor de 5 (escala del 1 al 10) y va determinado por la apatita, por tanto, a mayor grado de mineralización mayor dureza (22).

  Los valores promedio de dureza en dientes permanentes están entre 2,5 y 6 GPa (22). Esta microdureza puede variar dependiendo de la orientación y de la cantidad de cristales en las distintas zonas de los prismas, siendo mayor en la zona oclusal o incisal (6GPa) y menor en la unión amelodentinaria (CAD) (2.3 – 3 GPa) (11).

- *Permeabilidad*. Es muy limitada, aunque se ha podido apreciar con ciertos marcadores radioactivos o radioisótopos que puede actuar como una membrana semipermeable, permitiendo el transporte de agua y algunos iones presentes en el medio oral. Debido a esta semipermeabilidad es posible llevar a cabo la prevención de la caries dental mediante el uso de fluoruros, ya que los iones flúor sustituyen a los grupos hidroxilos del cristal de apatita y lo hacen menos soluble a los ácidos, aumentando la resistencia del esmalte al ataque acido. Esto ocurre en la zona más superficial del esmalte (30 μm) (19, 23).

- *Radiopacidad*. Debido a su alto grado de mineralización, el esmalte es la estructura más radiopaca del organismo, presenta un índice de radiopacidad relativa del 198-220%, por tanto, cuando presenta afectación por caries se puede apreciar mayor radiolucidez en la zona afectada debido a la descalcificación (24).

- *Elasticidad*. Debido a su extrema dureza, la elasticidad del esmalte dental es muy limitada porque presenta muy poca cantidad de agua y sustancia orgánica. Tiene una tendencia a las macro y microfracturas haciéndolo un tejido muy frágil, sobre todo, cuando no tiene apoyo dentinario (11, 25).

  El *módulo elástico según Young* es la capacidad elástica de un material o deformación que sufre al incidir sobre él una fuerza, en el esmalte los valores medios oscilan desde 72,7 ± 4,5 hasta 87,5 ± 2,2 GPa, cuando las determinaciones se realizan en perpendicular o en paralelo al eje de los prismas. Estos valores disminuyen entre 115 y 90 GPa en la zona externa del esmalte hasta valores entre 75 a 60 GPa en el tercio interno del esmalte. La elasticidad será mayor cuanto más contenido en sustancia orgánica haya, por ejemplo, en la zona del cuello y en la periferia de la cabeza de la varilla (19, 23).

- *Color y transparencia*. Debido a que el esmalte es traslúcido, su color varía entre blanco-amarillento a un blanco-grisáceo, este color no es propio del esmalte, porque va a depender de las estructuras subyacentes principalmente de la dentina. En las zonas de menor espesor presenta un color blanco-amarillento, y en las zonas de mayor espesor tiene una tonalidad más grisácea. La transparencia también depende del grado de calcificación y homogeneidad, ya que, a mayor mineralización, mayor traslucidez del esmalte dental (19).

- *Anisotropía*. Esta nueva propiedad del esmalte se encuentra en estudio; se ha visto que determinadas propiedades físicas, tales como: módulo elástico y dureza en el esmalte pueden variar según la dirección en que son examinadas, y en eso se basa la anisotropía (11). Por ejemplo, la dureza y el módulo elástico disminuyen gradualmente desde la superficie del esmalte hasta la CAD y ambos presentan valores positivos en relación con un mayor contenido de calcio. La dureza y el

módulo elástico de las cabezas de las varillas de esmalte son claramente más altos que los de la cola y la sección transversal axial, esta sería una nueva propiedad que permitiría estudiar esta estructura desde otro enfoque (11, 23, 26).

2.1.2 Composición química

El esmalte está formado por una por una matriz orgánica (0,36-1%), una matriz inorgánica (96%) y agua (3%) (10, 11).

- La *matriz orgánica* es de naturaleza proteica y constituye un sistema complejo de multiagregados polipeptídicos que no han sido caracterizados de forma definitiva (27). Durante las fases tempranas del desarrollo del esmalte los ameloblastos producen una gran cantidad de matriz orgánica, la cual irá decreciendo durante el proceso de maduración, dando lugar a un mayor volumen de material inorgánico (14). Entre las proteínas presentes en la matriz orgánica se encuentran:

  - Amelogeninas (Amelx), son las proteínas más abundantes, constituye más del 90% al comenzar la amelogénesis y van disminuyendo progresivamente a medida que aumenta la madurez del esmalte. Su principal función es controlar la orientación y el crecimiento de las varillas del esmalte durante el proceso de mineralización; su presencia es importante para que pueda formarse un esmalte normal (9). Se conocen como proteínas del esmalte inmaduro y se localizan entre los cristales de las sales minerales, sin estar unidas a ellos (28, 29).
  - Enamelinas (Enam), representan el 2- 3% de la matriz orgánica del esmalte y se localizan en la periferia de los cristales formando las proteínas de cubierta, aunque algunos autores afirman que pueden encontrarse también en el seno de las estructuras cristalinas (27, 30).
  - Ameloblastinas (Ambn), representan el 5% del componente orgánico y es la segunda glicoproteína específica del esmalte. Funciona como molécula de adhesión celular para los ameloblastos (31). Se localizan inmunohistoquímicamente en la superficie del proceso ameloblástico de Tomes y en la periferia de los cristales y de los prismas del esmalte (28, 32).

- Proteína odontogénica, participa en la regulación de la proteinasa MMP20. Parece encontrarse vinculada a la membrana basal que separa al ameloblasto y al esmalte en la fase de maduración, deponiéndose más cercana a la superficie celular que la amelotina (27, 30).
- Amelotina (Amtn), es una proteína que se forma en la fase de maduración del esmalte y participa en la mineralización y la formación del esmalte aprismático (12, 28).
- Proteinasas, intervienen en la remodelación de las proteínas recién formadas. Son capaces de procesar y degradar la amelogenina y otras proteínas del esmalte. Entre ellas destacan la enamelsina, que es la metaloproteinasa de la matriz 20 (MMP20), y la proteinasa de serina de la matriz 1, actualmente denominada kalicreina 4 (KLK4) y la Caldecrin (Ctrc) (33, 34).
- Colágena tipo VII, este tipo de proteína es muy escasa en la conexión amelodentinaria, pero actúa como fibra de anclaje y contribuye a estabilizar mecánicamente la unión entre el esmalte y la dentina en la CAD (12, 19).

- La *matriz inorgánica* está constituida por sales minerales cálcicas, principalmente de fosfato y carbonato. Se depositan en la matriz del esmalte, lo que da origen rápidamente a un proceso de cristalización que transforma la masa mineral en cristales de hidroxiapatita. Hay también sales minerales de Ca, como carbonatos y sulfatos, y oligoelementos, como K, Mg, Fe, F, Mn, Cu, etc (35).

  Los iones flúor (F^-) pueden sustituir a los iones hidroxilos (OH^-) presentes en el cristal de hidroxiapatita (HA) y convertirlo en un cristal de fluorhidroxiapatita (FHA) que lo hace más resistente a la acción de los ácidos y, por tanto, más resistente a la caries. En las 50 µm más superficiales del esmalte se encuentran las concentraciones más altas de flúor, mientras que, en las más profundas, la concentración disminuye hasta 20 veces (36, 37).

  El contenido de flúor en el esmalte varía dependiendo de dos factores:
  1) Biológicos, que hace referencia a la incorporación de flúor a través del agua bebida o en los alimentos.

2) Clínicos, por aplicación tópica de geles y pastas dentales fluoradas sobre la superficie del esmalte (23).

Los cristales de apatita están formados por la integración de las «células» o celdillas unitarias (no son células biológicas), que son las unidades básicas de asociación iónica de las sales minerales en el seno del cristal. Estas celdillas unitarias que, asociadas conforman el cristal, presentan una configuración química y cristalográfica hexagonal; en sus vértices tienen iones Ca^{2+} y en su centro, un ion OH^- (38, 39) **(ver figura 1)**.

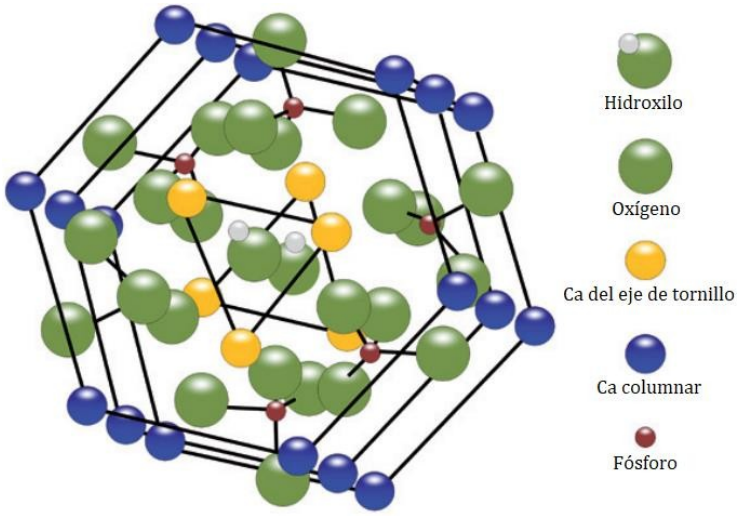


Figura 1. Proyección hexagonal de los iones que forman la estructura cristalina de hidroxiapatita. Fuente: Brunton y cols., (2013) (40).

- El *agua* es el tercer componente químico el esmalte, su porcentaje es muy pobre y va disminuyendo con la edad. Lo podemos localizar en la periferia del cristal y constituye la denominada capa de hidratación o capa de agua adsorbida (10, 14).

2.1.3. Histología del esmalte

Histológicamente el esmalte está formado por la unidad estructural básica conocido como varilla o prisma del esmalte y por las unidades estructurales secundarias.

a) Unidad estructural básica del esmalte dental:

Es una estructura compuesta por cristales de hidroxiapatita y puede dividir en esmalte prismático o varillar y esmalte aprismático o avarillar (38).

- Esmalte prismático o varillar.
  Morfológicamente son unas bandas delgadas y paralelas en los cortes longitudinales y en los cortes transversales presenta forma de ojo de cerradura antigua. Están compuestas por un conjunto de cristales hidroxiapatita. Presenta dos regiones la cabeza (es más ancha, con forma circular u ovoide, va a soportar las fuerzas de la masticación) y la cola (es más delgada y se encuentra debajo de la cabeza, disipando y distribuyendo las fuerzas masticatorias) Su diámetro varía entre 4-10 μm, siendo mayor a medida que se acerca a la superficie libre. El material orgánico en esta zona es muy escaso y se encuentra recubriendo la cabeza y la cola formando lo que se conoce como vaina del prisma o varilla (11, 42).

- Esmalte aprismático o avarillar.
  Es un material adamantino carente de prismas o varillas. Tiene un espesor de 30-100 μm y se va a localizar en la superficie externa del esmalte prismático. Va a estar presente en todos los dientes primarios (en la superficie de la corona) y en un 70% en los dientes permanentes (región cervical, surcos y vertientes cuspídeas) (36, 43).

b) Unidades estructurales secundarias del esmalte:

Son estructuras que se originan a partir de las primarias y dependiendo de varios mecanismos como el diferente grado de mineralización, cambio en el

recorrido de las unidades estructurales primarias o la interrelación de la dentina, esmalte o con la periferia medioambiental (41), va a dar lugar a las siguientes estructuras secundarias:

- Estrías de Retzius: marcan la sucesiva aposición de material durante la formación de la corona, por ello se conocen también como líneas incrementales **(ver figura 2)**. Tienen forma de bandas de color parduzco o castaño con luz transmitida o claras con luz reflejada (36).
- Bandas de Hunter-Shreger: se encuentran presentes en todos los dientes permanentes. Son bandas claras (parazonas) y oscuras (diazonas) debido a la distinta curvatura de los prismas del esmalte. Su anchura es variable y sus límites no están bien definidos. Se pueden apreciar con cortes longitudinales y luz polarizada (43).
- Penachos adamantinos o de Linderer: son muy parecidos a las microfisuras del esmalte y comparable con las fallas geológicas, se extienden desde el tercio interno del esmalte hasta la CAD en forma de arbusto (19, 41).
- Esmalte nudoso: se encuentra en las cúspides dentarias formando un complejo entramado de prismas adamantinos, esto aumenta la resistencia justamente en las zonas más expuestas a la acción masticatoria (19).
- Husos adamantinos: tienen forma de bastones irregulares y se encuentran en la CAD, alojan en su interior a las prolongaciones de los odontoblastos que discurren por los túbulos dentinarios. A nivel fisiológico son muy importantes en la transmisión de estímulos (41).
- Conexión amelodentinaria (CAD): es la zona que relaciona el esmalte con la dentina. Esta conexión microscópicamente es festoneada, y está constituida por fosas pequeñas y concavidades. Su espesor es de aproximadamente 11,8 micras. Es una frontera muy importante en el progreso de la caries dental (19).
- Fisuras y surcos del esmalte: su origen se debe a una coalescencia incompleta de los lóbulos cuspídeos, donde la actividad ameloblástica se desarrolla de forma independiente y luego se sueldan, dando lugar a estas invaginaciones de profundidad variable y morfología diversa (19, 36).

- Periquimatías y líneas de imbricación de Pickerill: en los surcos el esmalte forma unos rodetes que se conocen como periquimatías y van desapareciendo con la edad debido al desgaste. Las líneas de imbricación son surcos poco profundos que se encuentran en la porción cervical de la corona y no son más que las estrías de Retzius observadas desde la superficie del esmalte (14).
- Laminillas o microfisuras: son similares a las fallas geológicas, son invaginaciones de morfología y profundidad variable que se extienden de forma recta desde el esmalte hasta la dentina, son finas y delgadas (36).

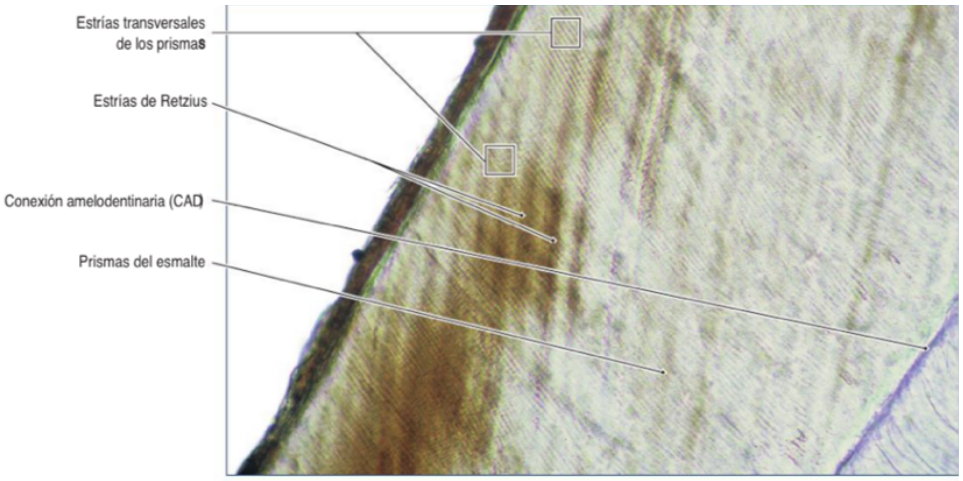


Figura 2. Detalles en un corte longitudinal de los prismas del esmalte. Estrías de Retzius oblicuas en relación con los prismas. Técnica por desgaste x 60. Fuente: Gómez de Ferrais y Campos Muñoz., (2009) (19).

2.2 LA CARIES DENTAL: DEFINICIÓN Y ETIOPATOGENIA

2.2.1 Definición

La caries dental es una enfermedad multifactorial, no transmisible y dinámica, que produce una pérdida de minerales en los tejidos duros dentales, se encuentra mediada por una biopelícula cariogénica y modulada por la dieta. Esta determinada por factores biológicos, conductuales, ambientales y psicosociales. Como consecuencia de este proceso, se desarrolla la lesión de caries (44).

2.2.2 Etiopatogenia

La formación de la caries dental dependerá de diversos factores como el biofilm bacteriano, la estructura dental y los azúcares de la dieta, así como de las influencias ambientales, genéticas y salivales de cada individuo, todo ello se engloba un proceso dinámico y sinérgico con periodos de desmineralización y remineralización. Si se produce una desmineralización neta durante un tiempo suficiente dará lugar a una lesión de caries, siendo consecuencia de un desequilibrio ecológico, dentro del equilibrio fisiológico entre el diente y la biopelícula microbiana oral (46, 47).

En la placa dental supragingival el número de especies bacterianas varia desde 500-600 hasta 200 especies en cavidades dentinarias o 125 en las lesiones de mancha blanca (47), por lo tanto, el número es considerablemente grande y rompe con las hipótesis de la placa específica de la caries dental (48). Esta microbiota oral se origina de forma natural y desempeña un papel positivo en el mantenimiento de la salud oral, sin embargo, cuando existe una ruptura del equilibrio homeostático normal entre el huésped y la microbiota residente, ocurre una *disbiosis* y comienza el proceso de la enfermedad (49). La disbiosis puede deberse a múltiples factores, pero específicamente en el caso de la caries dental comienza cuando las bacterias metabolizan los carbohidratos fermentables de la dieta, principalmente azúcares, y actúan en la superficie del esmalte favoreciendo la desmineralización (50,51). El ácido láctico es el principal ácido orgánico del metabolismo de los azúcares y es el mayor responsable de la caries dental (46, 53).

Estos ácidos se van acumulando en la fase líquida de la biopelícula, haciendo descender el pH hasta un punto en que las condiciones de la interfase de la biopelícula con el esmalte se vuelven insaturadas y el ácido comienza a desmineralizar poco a poco la capa superficial del esmalte (46).

Esta pérdida de minerales produce un ensanchamiento de los espacios intercristalinos del esmalte, aumento de la porosidad, y reblandecimiento de la superficie, esto favorece que difundan más rápidamente los ácidos hacia zonas más profundas del diente, provocando la desmineralización que se encuentra bajo la superficie (desmineralización subsuperficial) (45).

Debido a que es un proceso dinámico, esta primera fase de la caries puede detenerse o revertirse (53). Esta situación se produce mediante el acúmulo de productos de esta reacción como el Ca y PO_4^{3-} y esto protege parcialmente la capa superficial porque eleva el grado de saturación. Además, la saliva tiene acción amortiguadora de estos ácidos, neutralizándolos. Otro eslabón clave en los factores protectores es el flúor. Todos estos factores favorecen a que el pH de la biopelícula vuelva a la neutralidad y se vuelva a saturar con Ca, PO_4^{3-} y fluoruros favoreciendo la deposición de minerales en la superficie (remineralización) (54).

Por el contrario, cuando existe una progresión de la desmineralización, la pérdida mineral se hace mayor y aparece clínicamente una mancha blanca. Esta fase inicial clasificada por el Sistema de Detección y Evaluación Internacional de Caries (ICDAS), como ICDAS 1 y 2; es el primer cambio visual en esmalte, donde aún no existe cavitación (55). Esta fase inicial de la caries es muy importante porque la lesión puede detenerse y revertirse por la precipitación de minerales en la lesión, modificando así los factores causales o aplicando medidas preventivas, o permanecer activas y progresar a los siguientes niveles (56).

Si la biopelícula adherida a la superficie del diente se deja madurar y permanece durante más tiempo va a dar lugar a una pérdida de minerales como el fosfato, el calcio y carbonato del diente desarrollando microcavitaciones en la superficie, y dando lugar a un ICDAS 3, en este caso aumenta la porosidad de la superficie del esmalte, existe pérdida de la integridad, pero sin afectación de dentina. En lesiones ICDAS 4, se puede apreciar

una sombra subyacente de dentina, pero sin cavitación (21, 55, 56). Estas dos situaciones clínicas de denominan caries en estado moderado.

ICDAS 5 y 6 aquí ya existe una cavidad con dentina visiblemente afectada, este nicho favorecerá a la biopelícula protegiéndola y favoreciendo la progresión de la lesión cariosa hasta un ICDAS 6 donde puede existir compromiso pulpar, favoreciendo una necrosis y periodontitis apical (55–57), estas lesiones se encuentran ya en estado avanzado.

Pitts y cols., (2017) describen la metáfora del iceberg para la identificación de la caries y la prevalencia de esta en la **figura 3** (45).

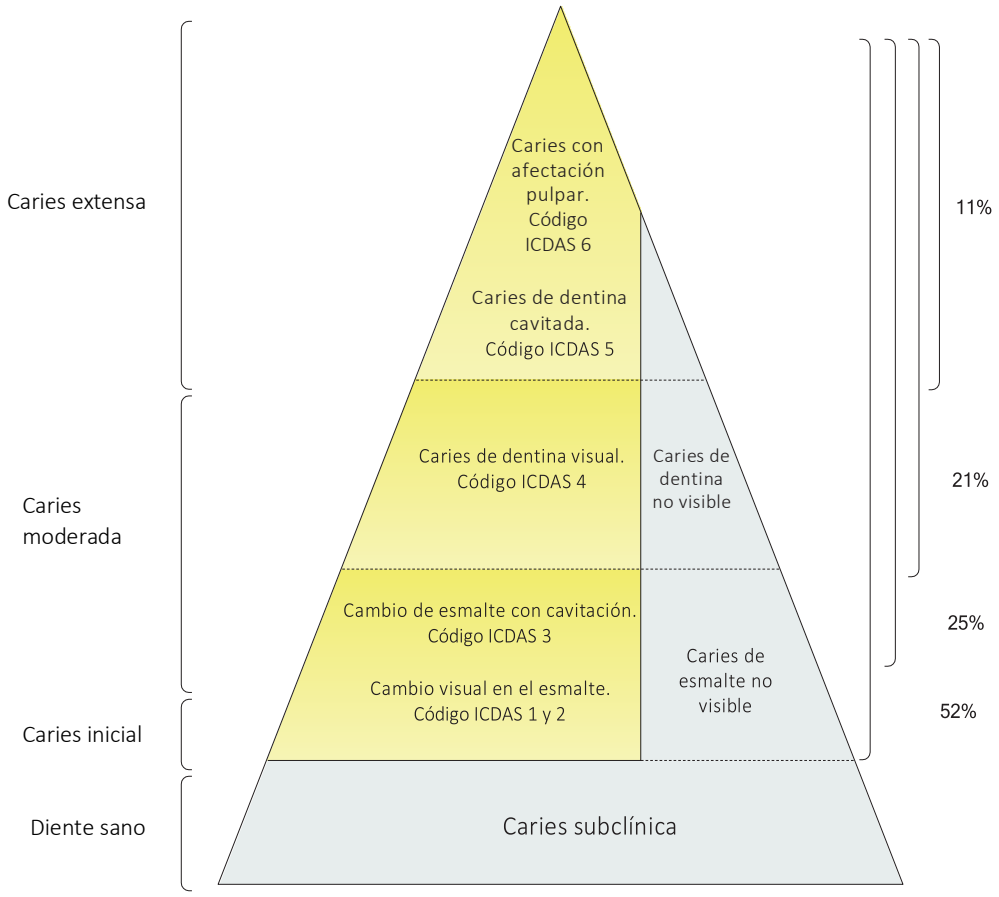


Figura 3. Diagrama de la metáfora del iceberg para la identificación de la caries dental siguiendo la clasificación del Sistema de Detección y Evaluación Internacional de Caries (ICDAS) y porcentajes de prevalencia de caries. Fuente: Pitts y cols., (2017) (45).

2.2.3. Histología de la caries dental

Histológicamente se han identificado diversas zonas con características y microscópicas relevantes en las lesiones incipientes de caries (ICDAS 1 y 2) mediante microscopía de luz polarizada (ver figura 4).

- Zona superficial a prismática o capa de Darling: Tiene un espesor de 30 micras y se encuentra sobre un área radiolúcida. Actúa como gradiente de difusión permitiendo la entrada y salida de iones de calcio y fosfato de los prismas del esmalte. El movimiento de flúor de la boca a la superficie del esmalte hace que la capa superficial sea más resistente a los ataques ácidos formando fluoruro de calcio (58). Es la estructura más dura y eso se debe a los intercambios iónicos durante los ciclos de desmineralización y remineralización. De este modo, la superficie intacta del esmalte actúa como barrera contra la invasión bacteriana (52, 60).
- Cuerpo de la lesión o zona subsuperficial: ocupa la mayor parte de la lesión de esmalte, se extiende por debajo de la zona superficial o capa de Darling hasta la zona oscura. En esta zona, la desmineralización es mayor y presenta gran cantidad de materia orgánica y agua. Los prismas del esmalte aparecen estriados y las estrías de Retzius están aumentadas, así como los espacios intercristalinos. Si el volumen del poro es lo suficientemente amplio es posible ver bacterias en el cuerpo de la lesión (58).
- Zona oscura: se encuentra ubicada por debajo del cuerpo de la lesión. Es una zona con poros muy pequeños por los que la quinolina no es capaz de pasar y es birrefrigente a la luz polarizada. Como estos poros están llenos de aire, la zona afectada aparece de color blanco opaco en clínica. El volumen total de poros en la capa oscura varía entre el 2% y el 4%. Se observa una disolución de los cristales por la acción de los ácidos (59, 61).
- Zona translucida: es la zona más profunda de la lesión, corresponde al frente de avance interno y se encuentra por debajo de la zona oscura Existe una disminución del carbono y el magnesio. En esta zona se puede observar una modificación de los prismas debido a la intensa

desmineralización que comienza en la sustancia interprismática **(ver figura 4)** (52, 59).

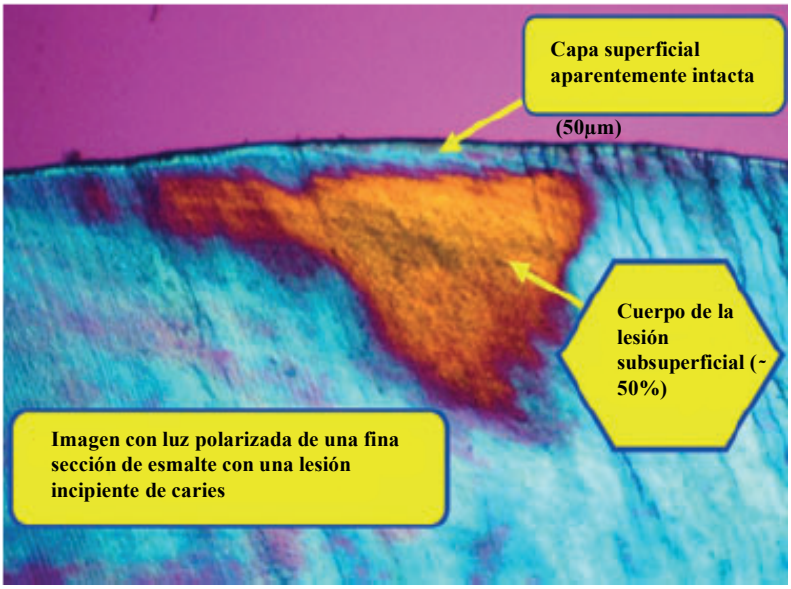


Figura 4. Sección transversal de una lesión cariosa incipiente no cavitada observada bajo luz polarizada, se aprecia el cuerpo de la lesión y la capa superficial aparentemente intacta. Fuente: Featherstone y cols., (2009) (51).

Según el grado de afectación de la caries dental, se llevan a cabo diversas estrategias de intervención. Teniendo en cuenta la progresión de la caries y la remoción del tejido dental afectado (63):

1. Estrategias no invasivas: No se elimina el tejido dental duro y se basan sobre todo en el uso de fluoruros y otras estrategias químicas para controlar el equilibrio mineral, controlar el biofilm y la dieta.

2. Estrategias microinvasivas o mínimamente invasivas: eliminan la superficie del tejido dental duro a nivel micrométrico, normalmente con grabado ácido, como las técnicas de sellado o infiltración.

3. Estrategias invasivas: eliminan el tejido duro dental, por ejemplo, mediante el uso de cucharillas de caries, instrumentos rotatorios u otros dispositivos. Esta estrategia se encuentra asociada a la colocación de restauraciones.

2.2.4 Riesgo individual de caries

La caries dental como lesión, es un proceso dinámico, donde se alternan diversos ciclos de desmineralización y remineralización a lo largo del día en la cavidad oral (53). Sin embargo la caries como enfermedad está determinada por el equilibrio entre diversos indicadores como son los factores protectores y factores de riesgo **(ver figura 5)**, estos factores determinarán en qué sentido se balancea el proceso de la caries, si se revierte, progresa o se detiene (62, 63). Es una representación visual de la naturaleza multifactorial de la caries dental y nos ayuda a evaluar el riesgo de aparición de la misma gracias a cuestionarios que evalúan el riesgo de caries. Además, existen basándose en el riesgo de caries individual del paciente, protocolos para prevenir, revertir y tratar la caries dental, según el riesgo de caries de forma individualizada (62, 64).

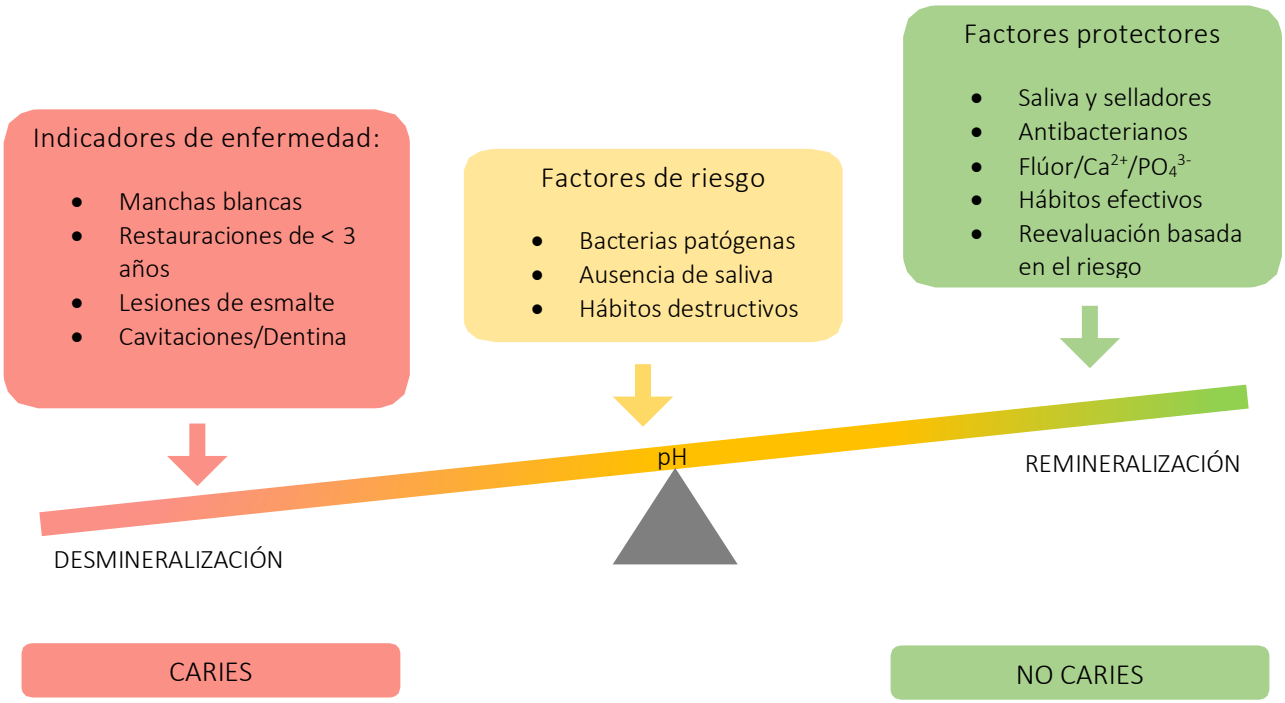


Figura 5. Balance del riesgo de caries modificado. Fuente: Young y Featherstone., (2013) (62).

2.3. PROCESO DE DESMINERALIZACIÓN Y REMINERALIZACIÓN

El proceso de desmineralización y remineralización es un ciclo continuo y variable que se repite después de la ingesta de alimentos. Específicamente los carbohidratos fermentables se metabolizan en la placa dentobacteriana, y las bacterias de este biofilm producen ácidos orgánicos como el ácido láctico, butírico, propiónico y succínico. La presencia de estos ácidos va a dar lugar a una bajada del pH a valores críticos, con un nivel de pH inferior 5,5 para el esmalte y 6,5 para la dentina, con la consecuente liberación de H^+ que penetran en los cristales de HA. Cuanto mayor sea la liberación de H^+ mayor será la disolución del esmalte (21, 64, 65).

Los iones H^+ van a reaccionar con los grupos hidroxilos (OH^-) y los iones PO_4^{3-} de la HA, dando lugar a la formación de los fosfatos primarios (HPO_{4-}^{-2}), fosfatos secundarios (H_2PO_{4-}), ácido fosfórico y agua (66). Esto da lugar a una continua pérdida de OH^- y PO_4^3, provocando una subsaturación de estos iones y favoreciendo la pérdida de fosfatos, seguida de la perdida de Ca^{2+} , situación que hace que se altere la estructura cristalina de la hidroxiapatita, provocando un ensanchamiento de los espacios intercristalinos y aumentando la porosidad en la superficie, este proceso es conocido como desmineralización (66, 68). Es el primer paso en la formación de lesión de caries dental, que puede evolucionar desde una mancha blanca hasta una cavitación en el esmalte dental (67).

Si los iones de flúor están presentes en la superficie del cristal en una concentración suficiente antes o durante la desmineralización, estos pueden adsorberse en la superficie e inhibir notablemente la desmineralización (52, 69). Por otro lado, si el pH es superior a 4,5 y existe presencia de ion es flúor, se produce una nueva precipitación de minerales al esmalte, debido a que la biopelícula se sobresatura con respecto a la FA, disminuyendo así el proceso de desmineralización (37, 66).

Después de 20-40 min, el pH vuelve a subir por encima del nivel crítico (pH superior a 5.5 en esmalte y 6.5 en dentina), y disminuye la concentración de H^+, esto va a permitir que los iones de OH^-, PO_4^{3-} y Ca^{2+} queden libres para difundirse en la biopelícula y luego en los prismas del esmalte afectado **(ver figura 6)**; esta ganancia neta

de minerales que reemplaza lo que previamente se había perdido se conoce como *remineralización* (66, 68, 70).

Este proceso de reparación natural da lugar a la formación de nuevos precipitados minerales con propiedades físicas y químicas diferentes, presentando una mayor complejidad. Estas zonas remineralizadas tendrán menor microporosidad y mayor concentración de fluoruro; van a estar compuesta de FA y FHA, haciendo a la superficie menos soluble a la acción de los ácidos y por tanto más resistente a la desmineralización (70).

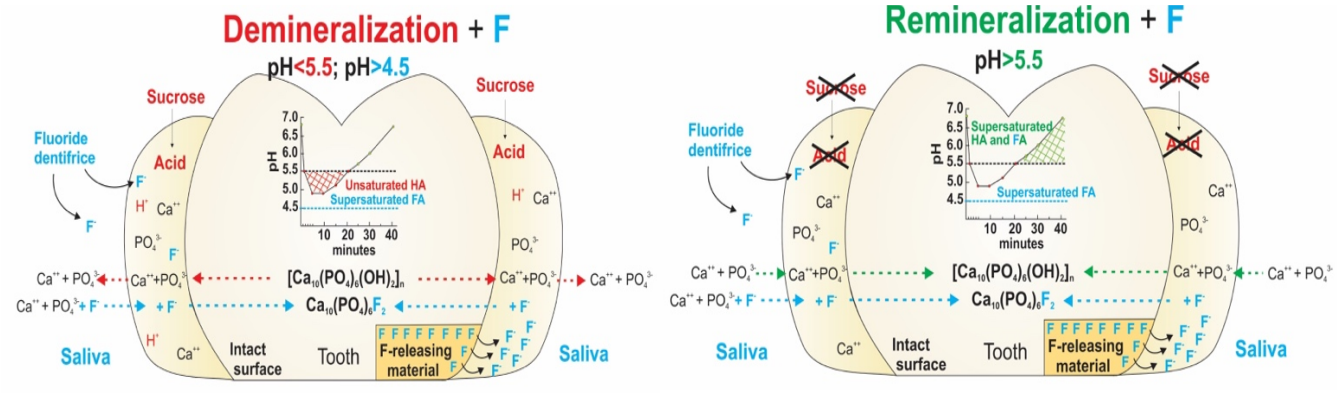


Figura 6. Proceso de desmineralización y remineralización. Fuente: Cury J. y cols., (2016) (65).

2.4. BIOMINERALIZACIÓN

La biomineralización es un proceso dinámico y complejo, mediante el cual los organismos vivos controlan las precipitaciones de nanocristales inorgánicos dentro de matrices orgánicas para formar tejidos biológicos híbridos únicos y, jerárquicamente estructurados como por ejemplo el esmalte, dentina, cemento y hueso (71).

En el esmalte dental la biomineralización es un proceso mediado por la matriz orgánica donde las proteínas del espacio extracelular son las que dirigen la iniciación, orientación, empaquetamiento y maduración de los cristales. Después de la erupción dentaria, el esmalte maduro no contiene células ni puede remodelarse de ahí la importancia en la comprensión de este mecanismo para el diseño e investigación con

materiales biomiméticos (materiales que imitan procesos biológicos) y su aplicación en odontología mínimamente invasiva (9).

Existen ciertos factores que se deben controlar para conseguir un material biomimético, como por ejemplo que exista un pH adecuado y el momento de la adición de las proteínas al sistema, siempre en un laboratorio que permita unas condiciones cercanas al microambiente fisiológico (31).

Tras los recientes avances en la síntesis de materiales biomiméticos, han ido surgiendo estrategias basadas en aditivos peptídicos y autoensamblaje de proteínas que pueden controlar etapas clave de la mineralización, como la nucleación y la organización del crecimiento (72), destacando el péptido 8DSS, P11-4, péptidos de amelogenina ricos en leucina, PAMAM, y la nanohidroxiapatita, que explicaremos a continuación.

2.5. AGENTES REMINERALIZANTES

La remineralización puede ocurrir de forma natural a través de la saliva, siendo un proceso más lento y dando lugar a un depósito de minerales en la capa más subsuperficial. Además puede ser inducida por diversos agentes remineralizantes (69), todos ellos han sido clasificados según el material, producto utilizado, y grado de evidencia científica de las publicaciones **(ver tabla I)**.

	Material	*Producto comercial*	*Grado de evidencia*
Saliva Fluoruros			
	Colutorios: 0.05%; 0.2% (225 ppm; 900 ppm)	Lacer, Kin, etc …	(P) Moderado
	Pastas dentífricas: 1.000–5.000 ppm	Lacer; Kin; Duraphat 5000	(P) Alto
	Geles: 12.500 ppm	Flugel; Clarben	(P) Mod/bajo
	Barnices: 5% (22.600 pm)	Duraphat; profluorid Varnish	Moderado (esmalte)
	$AgF(NH3)_2$: 44.800 ppm	Riva Star; Riva Star Aqua	Alto (dentina)
Sistemas Biomiméticos	Péptidos 8DSS (Aspartato-Serina-Serina) Fosfoproteína de dentina	–	–
	Péptido sintético P11-4	Curodont Repair/Protect;Regenamel	??? 1 meta / 2 ECAS
	Péptidos de Amelogenina ricos en Leucina	–	–
	Dendrímeros de poli amido-amina (PAMAM)	–	–
	Remineralización mejorada y acelerada eléctricamente (REMINOVA)	–	–
	Nanohidroxiapatita	Apagard toothpaste / Desensin pasta y colutorio; Vitis anticaries; Orthocare; Remin Pro	Bajo
Fosfatos de calcio	Fosfato de calcio amorfo	Enamelon toothpaste (SnF_2 -1150 ppm F)	–
	Fosfato de calcio amorfo estabilizado con fosfopéptido de caseína (ACP-CPP)	GC Tooth mouse / MI paste plus (900 ppm F)/ MI paste one toothpaste (900 ppm F) /MI varnish (22600 ppm F)	Alta evidencia de que solos no funcionan
	Fosfato ß-tricálcico funcionalizado	Clinpro white varnish (22600 ppm F) / clinpro toothpaste (950 ppm F)	Alta evidencia de que solos no funcionan
Vidrios Bioactivos	Bioglass	Novamin (pastas, composites, adhesivos, etc..)	No evidencia
Sistemas de Polifosfato	Trimetafosfato sódico Glicerofosfato cálcico Hexametafosato sódico	Oral B pro-expert pasta (SnF_2 - 1100 ppm F; NaF 350ppm F)	No evidencia
Productos Naturales	Galla Chinensis Hesperidina Goma arábiga	–	
Arginina		Productos Colgate	Alto riesgo de sesgo

Tabla I. Agentes remineralizantes según material, producto utilizado y grado de evidencia científica.

2.5.1. Saliva

La saliva es una secreción exocrina de consistencia acuosa producida por las glándulas salivares de la cavidad oral, puede definirse también como un biofluido complejo compuesto por derivados de los sacos gingivales, superficies dentales y mucosas (73). Es ligeramente ácida y está compuesta principalmente por un 99,5% de agua, un 0,3% de proteínas (mucinas) y un 0,2% de enzimas y sustancias inorgánicas (74, 75).

El ser humano es capaz de producir aproximadamente un total de 1-1,5 litros de saliva al día, esto equivale a 0,5 ml/min (75). Es un sistema de defensa natural y participa en diversas funciones como por ejemplo el gusto, la digestión inicial favoreciendo la formación del bolo alimenticio, lubricación, dilución y limpieza gracias a que el fluido salival elimina el exceso de carbohidratos limitando su biodisponibilidad en el biofilm bacteriano. También desempeña un importante papel en la protección y reparación tisular (76). Presenta actividad antibacteriana modulando la adhesión de microorganismos al tejido oral, además, debido a la presencia de inmunoglobulinas, como al IgA, IgG y IgM tiene capacidad de neutralizar, virus, bacterias y toxinas enzimáticas (74), también las moléculas proteómicas, como las histatinas, la mucina, lactoperoxidasa, las defensinas, los péptidos ricos en prolina y la lactoferrina (LF), regulan la flora microbiana de la cavidad oral ejerciendo efectos antibacterianos directos (77).

La función buffer de la saliva juega un papel primordial, ya que regula el pH salival mediante cuatro sistemas de amortiguación: bicarbonato, fosfato, proteínas y urea esto permite mantener la integridad del esmalte dental modulando los procesos de desmineralización y remineralización. La concentración de bicarbonato en el sistema tampón desempeña un papel importante en la protección contra la caries dental y actúa principalmente para neutralizar los ácidos (78). La saliva libera iones de bicarbonato (HCO^-) y PO_4^{-3} que capturan el exceso de protones de H^+ y de esta manera evita la caída del pH en la cavidad oral (79).

La saliva es capaz de suministrar iones de calcio, fosfato y fluoruro biodisponibles al diente. A pH fisiológico (pH 7.0), la saliva está sobresaturada de minerales (80) favoreciendo un entorno reparador y protector manteniendo la integridad de los tejidos dentales (49). Normalmente no se produce la precipitación de las fases de fosfato de calcio

en la saliva, debido a la presencia de proteínas salivales, en particular estaterina (81) y fosfoproteínas ricas en prolina (82). Las proteínas se unen a los grupos de iones de Ca^{2+} y PO_4^{3-}, impidiendo su crecimiento hasta el tamaño requerido para la precipitación y transformación en una fase cristalina; esto va a permitir que los iones permanezcan biodisponibles para difundirse en las lesiones deficientes en minerales y se produzca la remineralización de los cristales desmineralizados, al tiempo que se evita la deposición superficial en forma de sialolitos (69). Los bajos niveles de calcio, fosfato y flúor disponibles en la saliva pueden ser absorbidos por las glicoproteínas de la biopelícula temprana, las cuales actúan a lo largo de la interfase entre la placa y la superficie dental atrayendo los iones Ca^{2+}, las fosfoproteínas regulan la precipitación del Ca^{2+}, uniendo y estabilizando el Ca^{2+}y el fósforo (P) y las proteínas ácidas ricas en prolina (PRP) se van a unir a la HA y Ca^{2+} para favorecer la formación de nuevos cristales y evitar la desmineralización (83).

Se ha demostrado que la remineralización neta producida por la saliva es escasa y lenta, con una tendencia a que la ganancia mineral se encuentre en la capa superficial de la lesión debido al bajo gradiente de concentración de la saliva en la lesión (70, 85).

La tasa de flujo salival es muy importante en la evaluación del riesgo de caries, en la que se considera un parámetro clave (85). Existe una relación directa entre la tasa de flujo salival y la tasa de eliminación que, a su vez, afecta a la formación de caries dentales, lo que significa que cuanto mayor sea la tasa de flujo salival, más rápida será la tasa de eliminación y mayor será la capacidad de amortiguación, lo que se traducirá en una reducción significativa de la formación de caries dentales (80, 87, 88).

2.5.2. Fluoruros: mecanismo de acción

El flúor es un elemento químico que pertenece al grupo de los halógenos de bajo peso atómico y cuenta con una gran electronegatividad, esto permite que pueda interaccionar con cationes, como el calcio o el sodio, para formar compuestos estables como el fluoruro de calcio o el fluoruro de sodio (89, 90).

La acción más importante del flúor es tópica, cuando el ion flúor está presente en el lugar correcto (saliva o biofilm), en el momento adecuado (justo después de eliminar

el biofilm o cuando el biofilm es expuesto al azúcar) y en una concentración apropiada, es cuando interfiere en el proceso de desmineralización y remineralización (37, 91).

Cuando existe un ambiente ácido (pH 5.5), la presencia de flúor evita que se produzca la disolución del principal mineral del esmalte dental, la hidroxiapatita, impidiendo la desmineralización del esmalte en la superficie del cristal y protegiendo los cristales de hidroxiapatita (91). Cuando el pH se eleva por encima del nivel crítico de 5.5, el F^- conduce a la remineralización, y refuerza el depósito de Ca^{2+} y PO_4^{3-} en el esmalte formando FA y FHA, volviendo al esmalte más resistente al entorno ácido debido a la disminución del pH crítico (5,5 esmalte y 6,5 en dentina) en los cristales de FHA. Si al esmalte desmineralizado se elimina la placa dental mediante el cepillado, la saliva es capaz de remineralizarlo, pero si hay presencia de F^-, este efecto aumentaría pero, para ello son necesarios 3,0 μM (0,05 ppm F) para que no sólo tenga un efecto preventivo, sino también terapéutico; a este fenómeno se le conoce como fluorterapia (92, 93).

Se ha descrito como los iones de flúor afectan a la fisiología de las células bacterianas inhibiendo las enzimas glicolíticas y afectando a la permeabilidad de la membrana celular y disminuyendo el pH citoplasmático, lo que provoca una disminución de la producción de ácidos (butírico y acético), mecanismo inicial indispensable para la descomposición de la HAP en iones calcio, fosfato y agua (92, 93). Además, se ha visto que en presencia de flúor ocurre una disminución de la producción de polisacáridos de la matriz extracelular en la placa dental (89, 90).

El empleo de sistemas tópicos (pastas fluoradas, geles, colutorios) se encuentra asociado a una reducción significativa de las lesiones de caries dental (94-96) (figura 8) . En este sentido hay que destacar:

- Los *colutorios* a nivel comercial se pueden encontrar como fluoruro de sodio al 0,2 % (900 ppm) con uso de forma semanal, o al 0,05% (225 ppm); para uso diario (68, 97).

  En una revisión sistemática realizada por Marinho VC. y cols., (2003) (97) no se obtenía una asociación directa con la concentración del enjuague, frecuencia de

uso, exposición previa a fluoruros o nivel de riesgo de caries de los pacientes debido a la gran heterogeneidad de los estudios presentes en la literatura (98, 99).

Se observó una disminución del 27% de la prevalencia de caries con el uso de enjuagues fluorados en dentición permanente, con un grado de evidencia de calidad moderada y escasa evidencia con respecto a los efectos adversos (99). En dentición temporal existe muy poca información al respecto, no hay ningún ensayo que analice el efecto de los enjuagues fluorados en dentición temporal (100).

- El empleo de *pastas dentales fluoradas* es el método más eficaz para reducir la aparición y controlar las lesiones de caries. Su efecto es doble, por un lado, se produce una remoción mecánica de la placa mediante el cepillado dental y por otra tiene acción el flúor presente en el dentífrico. Actualmente las pastas dentales fluoradas se han incluido en la lista de medicamentos esenciales para la salud de niños y adultos según la OMS, permitiendo que sea un producto más asequible, donde su calidad y disponibilidad se han convertido en un punto de interés para la salud pública (101).

  Las pastas dentales se pueden comercializar con fluoruro de sodio, fluoruro de estaño, fluoruro de amina y el monofluorfosfato de sodio (102, 103) **(ver tabla II)**.

  En las fórmulas de las pastas dentales, el flúor debe ser soluble químicamente, favoreciendo su biodisponibilidad en la cavidad oral durante el cepillado. Dicha biodisponibilidad dependerá de si el flúor y el abrasivo empleados son compatibles. Debido a la incompatibilidad del NaF, SnF_2 y AmF con abrasivos a base de calcio, se han utilizado partículas de sílice (SiO_2). En estas formulaciones, el F^- es soluble y por tanto más efectivo contra la caries dental. Pastas dentales que contienen abrasivos a base de calcio, como el monofluorfosfato de sodio (MFP) parte del F^- total queda insoluble en estas formulaciones y su biodisponibilidad es parcial (37, 91, 102, 104).

Fórmula	Nombre	Compatibilidad con el Ca de los abrasivos	Principio activo y efecto Anti-Caries	Efecto Anti-bacteriano y anti-gingivitis	Efecto Anti-Erosivo y principios activos
NaF	Fluoruro de sodio	Incompatible	F^- (ion Flúor) Fuerte & Directo	Ausente	Débil (F^-)
SnF_2	Fluoruro de estaño	Incompatible	F^- (ion Flúor) Fuerte & Directo	Sn^{++}	Bueno ($Sn^{++} + F^-$)
$C_{27}H_{60}N_2F_2O_3$	Fluoruro de amina ("Olaflur")	Incompatible	F^- (ion Flúor) Fuerte & Directo	Débil	Débil (F^-)
Na_2FPO_3	Monofluoro-fosfato de sodio	Relativamente compatible	Ion FPO_3^{2-} Fuerte pero indirecto	Ausente	Ausente

Tabla II. Fórmulas químicas de fluoruro en los dentífricos, compatibilidad con el calcio de los abrasivos, principio activo y efectos. Fuente: Gudiño Fernández S., (2023) (67).

Existe suficiente evidencia científica sobre el empleo de las pastas dentales fluoradas, se ha demostrado que reducen la caries dental en un 24 % en dentición permanente en comparación con aquellas pastas sin flúor (94), con un grado de evidencia relativamente alto. En cuanto a la dentición temporal solo un estudio determinó que uso de pasta dental fluorada puede conseguir una reducción aproximada del 37% (105, 106), siendo necesarios más estudios en dentición temporal. La recomendación actual es que presenten al menos 1000 ppm F desde el primer año de vida y 1500 ppm F en mayores de seis años, adolescentes y adultos (98). En pacientes con alto riesgo de caries el uso de una pasta dental con una alta concentración de flúor (2.450 a 5.000 ppm F), dos veces al día, es más eficaz para prevenir futuras lesiones de caries que las formulaciones convencionales (98, 107). Existen pastas dentales disponibles en forma traslúcida (gel), las cuales no presentan abrasivos, tienen niveles más altos de F y son diferentes a los geles convencionales de fluoruro, estas se suelen utilizar en consulta y se aplican con menor frecuencia que una pasta de dientes convencional (102, 106, 108).

En la efectividad clínica de las pastas dentales van a intervenir otros factores a parte de la concentración de flúor, como es la cantidad de pasta utilizada, edad inicial de uso, frecuencia, tiempo y duración del cepillado (97, 103).

En estudios *in vitro* e *in vivo*, se observó que la combinación de fluoruros y aceites esenciales (mentol, timol, eucalipto e metilsalicilato) en colutorios no reduce su efecto anticaries y añade los beneficios de los aceites esenciales contra la gingivitis (109, 110), aunque son necesarias más investigaciones al respecto.

- Los geles de flúor contienen una alta concentración de fluoruro y es la manera más habitual de aplicación a nivel profesional, puede ser en cubetas cuando hablamos de gel de fluoruro de fosfato acidulado (12.500 ppm F). Es importante no confundir las pastas dentales con flúor que están disponibles en formato gel con los geles de flúor convencionales, ya que estos últimos suelen tener una concentración de flúor mucho mayor que las pastas de dientes con flúor, no contienen abrasivos y su frecuencia de aplicación suele ser cada 6 meses (111).
  En un metaanálisis evaluaron numerosos estudios con un grado de evidencia moderado y demostraron que la aplicación de geles de flúor puede disminuir el riesgo de caries en la dentición permanente en un 28% (111). También observaron que en dentición temporal el riesgo de caries tuvo una reducción del 20% al utilizar los geles de flúor en comparación con un placebo (IC del 95% del 1 al 38%) pero, con un nivel de evidencia de bajo (111).

- Los barnices de flúor los podemos encontrar principalmente en concentraciones de 22.600 y de 56.300 ppm F. La aplicación del barniz produce un aumento en las superficies de los dientes de los depósitos de fluoruro cálcico en la cavidad oral y su efecto dependerá de la concentración/solubilidad de fluoruro presente en el producto y del pH (a mayor acidez, reacción química más rápida) (112). Cuando se aplica flúor en gel (acuoso) la reacción es inmediata, porque contienen fluoruro soluble; sin embargo, cuando aplicamos barniz que tiene fluoruro insoluble, tendrá lugar a una reacción más lenta, porque la saliva debe penetrar en la capa de barniz adherido a la superficie y disolver el NaF para que el fluoruro pueda

interaccionar con los minerales del diente (91, 104). Por tanto, es necesario que el barniz permanezca en la superficie del diente más tiempo entre 4 a 24 horas (113).

Diversos estudios han demostrado que la aplicación de barniz de flúor 2-4 veces al año se asocia a una disminución significativa de la caries dental(95,114). El uso de barniz de flúor en dentición permanente se asoció con una reducción de caries del 43%; mientras que en la dentición temporal la reducción fue de un 37% (96, 114). Sin embargo, el grado de evidencia en el 68% de los estudios se clasificó como de alto riesgo de sesgo y el resto de sesgo incierto, ya que presentan gran heterogeneidad en la recogida de pruebas en los diversos ensayos incluidos en la última revisión de Cochrane (95).

- El Fluoruro Diamino de Plata (SDF) existe desde la década de 1970, pero no fue hasta 2014 que fue aprobado por la FDA como agente desensibilizante, antibacteriano y remineralizante para tratar la caries dental. En 2017 la Asociación Americana de Odontopediatria (AAPD) recomendó el empleo de SDF para reducir las lesiones de caries cavitadas en dentición primaria como parte del manejo de la caries dental. Es una solución tópica, acuosa y transparente que contiene fluoruro diamino de plata al 38%, esto equivale a 44.800 ppm de fluoruro y 255.000 ppm de plata; lo podemos encontrar en otras concentraciones (10%, 12% y 30%) dependiendo del país de comercialización (115, 116). Estos elementos, en tan alta concentración, dan lugar a la siguiente reacción: hidroxiapatita + SDF → fluoruro de calcio + fosfato de plata + hidróxido de amonio (117).

  El fluoruro de calcio se une débilmente al diente y actúa como reservorio de fluoruro que se liberará cuando exista una disminución de pH. El fosfato de plata también actúa como reservorio de iones fosfato en las caídas de pH (116). Por otro lado, los iones de plata se adhieren a la estructura de la pared celular, favoreciendo la ruptura de las membranas e inhibiendo la movilidad bacteriana. También puede actuar en el interior de las células bacterianas interactuando con el ADN, inactivando el ADN/ARN o dando lugar a mutaciones del ADN lo que conllevaría a una apoptosis celular (116, 117). Se ha observado que los iones de plata van a

destruir el colágeno tipo I presente el contenido orgánico de la lesión cariosa en dentina (117, 118).

Como se ha podido demostrar son muchas las ventajas del Fluoruro Diamino de Plata, desde inhibir la desmineralización de los tejidos duros del diente y favorecer la remineralizacion, hasta su efecto bactericida sobre los microorganismos cariogénicos. Su principal desventaja es la tinción de diente (115, 118). El tejido afectado por la caries, tanto en esmalte como en dentina se vuelve de un color marrón oscuro o negro, esta tinción solo se podrá eliminar mediante el uso de fresas. En el esmalte sano no se producirá la tinción (115). También se han descrito lesiones, tinciones e irritaciones reversibles en la mucosa, además de mal sabor en la boca justo después de su aplicación (119, 120).

Se ha observado que combinando el SDF con yoduro de potasio (KI), , bajo la marca Riva Star con la incorporación de amoniaco y se ha observado una reducción de la tinción, ya que el yoduro de potasio va a interaccionar con los precipitados de plata formados durante la mineralización y elimina los excesos de iones de plata que son los causantes de las manchas no deseadas, dando muy buenos resultados en diversos estudios (121–123).

Actualmente existe una nueva generación de Fluoruro Diamino de Plata llamada Riva Star Aqua, donde se ha sustituido el amoniaco por el agua, lo cual supone un menor riesgo en cuanto a irritación de los tejidos, no necesita refrigeración para su conservación y no presenta olor ni sabor desagradable, disminuyendo las desventajas del Fluoruro Diamino de Plata convencional, pero, reduciendo su efectividad contra la caries dental (124, 125).

Diversos estudios han demostrado que el uso de SDF en comparación con el tratamiento restaurador atraumático (ART) disminuye la aparición de caries en la dentición temporal y mixta, pero, estos presentan un nivel de evidencia bajo. Además, es importante tener en cuenta que SDR aumenta el riesgo de efectos adversos en comparación con ART (126).

El porcentaje de reducción de caries evaluado para un SDF al 38% fue de un 70-78% en dentición temporal (117) y de un 64% en dentición permanente (127), con un grado de evidencia bajo (128).

2.5.3. Sistemas biomiméticos

El efecto biomimético se basa en la capacidad de imitar tejidos biológicos y sus funciones. La remineralización biomimética imita el proceso de biomineralización natural al reemplazar el agua desmineralizada de la matriz de colágeno por cristales de apatita (129). Existen diferentes sistemas que se describen a continuación:

a) Péptidos 8 DSS (Aspartato- Serina- Serina)

Es un péptido derivado de la fosfoproteína dentinaria (DPP) que es secretada por los odontoblastos y se encuentra en el frente de mineralización de la dentina. Es la proteína no colágena más abundante que existe en la matriz extracelular de la dentina y se ha empleado como plantilla de nucleación en la formación de hidroxiapatita para iniciar la mineralización de la dentina (130).

La DPP presenta numerosas secuencias nucleótidas repetitivas de aspartato-serina-serina que se cree que favorecen la formación de hidroxiapatita (131). Se han analizado varios péptidos pequeños basados en la secuencia de la fosfoproteína de la dentina, y estos péptidos son múltiples repeticiones del tripéptido aspartato-serina-serina (DSS), y se ha visto que presentan gran afinidad por los compuestos de fosfato cálcico. De todos estos péptidos los 8 DSS (contiene 8 repeticiones de aspartato-serina-serina), son los más activos en la mediación de la deposición mineral (132–134). Se ha demostrado en varios estudios que promueve la remineralización in vitro, inhibiendo la desmineralización del esmalte y potenciando el efecto anticaries del NaF, pero son necesarios más estudios al respecto (133–135).

b) Péptido sintético P11-4

Los péptido autoensamblantes, son péptidos monoméricos de bajo peso molecular y de enlaces no covalentes, capaces de penetrar en las lesiones de esmalte y formar un armazón donde se depositará la hidroxiapatita (98,136,137). Un ejemplo de ello es el péptido bioactivo P11-4 sintetizado a partir de 11 aminoácidos naturales con la secuencia Gln-Gln-Arg-Phe-Glu-Trp-Glu-Phe-Glu-Gln-Gln el cual responderá ante las variaciones de pH y flujo salival (138,139).

El péptido se va a ensamblar siguiendo un orden jerárquico de cintas, cintas, fibrillas y fibras hasta formar un andamio tridimensional, imitando la matriz del esmalte dental. Cuando existe un pH inferior a 7,5 el P11-4 forma ensamblajes en forma de cinta de lámina ß. Cuando el pH disminuye, el péptido se modifica de una fase fluida a una fase gelatinosa y más rígida en respuesta a estas variaciones de pH (139). Los grupos aniónicos de las cadenas laterales como el ácido glutámico atraen iones de Ca^{2+} y la arginina atraen iones de PO_4^{3-} de HAP al esmalte (139–141). Esto da lugar a la deposición del calcio y fosfato presentes en la saliva en esta matriz 3D y se espera una remineralización desde la zona más profunda hasta la más superficial de la lesión de caries (142, 143).

El P11-4 se ha comercializado mediante Curolox Technology con los nombres comerciales de "CurodontTM Repair" y "Curodont™ Protect". La diferencia entre ambos radica en la composición: Curodont™ Repair es una forma monomérica del P11-4, que se aplica a nivel profesional en clínica, mientras que Curodont™ Protect es una forma polimérica de matriz peptídica de autoensamblaje que contiene 1000 ppm P11-4 y 900 ppm de fluoruro y fosfato de calcio, destinada tanto para uso profesional como para uso doméstico (144). Ambos productos difieren no solo en su formulación y concentración, sino también en su modo de acción por ejemplo, la forma monomérica permite una difusión dentro del cuerpo de la lesión cuando se aplica en lesiones cariosas activas y , la acción de la forma polimérica es principalmente en la superficie dental porque sus fibras son demasiado largas para poder penetrar en el cuerpo de la lesión (139, 141, 144).

c) Péptidos de Amelogenina ricos en Leucina

Las principales proteínas que forman el esmalte son las amelogeninas, y juegan un papel esencial en la regulación de la mineralización y organización estructural de este tejido. Esta proteína estabiliza transitoriamente el fosfato de calcio amorfo y hace de guía durante el proceso de cristalización para obtener una superficie de fluorapatita más compacta (145). La amelogenina es clave para poder desarrollar péptidos más cortos y usarlos en la remineralización del esmalte, como por ejemplo el p 11-4 (146). Los péptidos de Amelogenina ricos en Leucina (LRAP), son derivados del gen de la amelogenina expresado a lo largo del desarrollo del esmalte (147). Se ha demostrado que los dominios N-terminal y C-terminal desempeñan un papel esencial en la formación adecuada de minerales del esmalte (148). La LRAP presenta propiedades similares a la amelogenina original con respecto a la regularización de la mineralización y la estabilización del fosfato de calcio amorfo en estudios in vitro (149, 150).

d) Dendrímeros de Poli amido-amina (PAMAM)

Los dendrímeros son moléculas de naturaleza polimérica obtenidas por síntesis química y poseen una estructura bien definida, muy ramificada y monodispersa (151). Presentan un tamaño que se puede medir en escala nanoscópica y puede funcionalizarse su superficie de forma controlada (152). Los más usados con los poliamidoaminas (PAMAM), son proteínas artificiales que imitan el comportamiento de autoensamblaje de las amelogeninas para formar una estructura muy parecida in vitro y sirven de plantilla orgánica para controlar la síntesis de los cristales de hidroxiapatita (153). Investigaciones sobre el efecto de la poliamida modificada con grupos de ácido carboxílico en la cristalización de la hidroxiapatita en la superficie de esmalte grabado han demostrado que favorece la formación de cristales de hidroxiapatita con la misma orientación, estructura y mineralización que el esmalte intacto en un tiempo relativamente corto (154).

Diversos estudios han combinado PAMAM con otros materiales inorgánicos para guiar la biomineralización, como el fosfato de calcio amorfo (155) o nanocompuestos de oro (156) y aunque presenten buenos resultados, es necesario continuar las investigaciones para mejorar la matriz de PAMAM y su capacidad de unión a la HAP (157).

En cuanto a su bioseguridad aún no se ha especificado su concentración, ni tiempos de procesamiento, tampoco se ha investigado en profundidad las características físicas o químicas de la capa mineral formada con PAMAM (microdureza o resistencia al ataque ácido) (158). Actualmente las investigaciones se encuentran en fases preclínicas, por tanto, es necesario continuar con las investigaciones y sobre todo evaluar su seguridad antes de pasar a fases clínicas de experimentación.

e) Remineralización mejorada y acelerada eléctricamente (REMINOVA)

Una de las últimas tecnologías diseñadas para la remineralización del esmalte es la iontoforesis, que se encarga de crear un pequeño campo eléctrico desde un dispositivo dental específico para acelerar el flujo de iones minerales hacia las áreas más profundas de las lesiones de caries, previamente limpias y acondicionadas (159). Este método se conoce como remineralización acelerada y mejorada eléctricamente (EAER). El objetivo es reparar las lesiones de caries de forma no quirúrgica y de manera indolora. Los estudios muestran que el esmalte tratado con EAER es tan duro que el esmalte sano y con una densidad mineral muy similar (160). Aunque se trata de una tecnología prometedora aún no se tienen resultados suficientes para su evaluación.

f) Nanohidroxiapatita

La nanohidroxiapatita (n-HAP) ha ganado actualmente una amplia aceptación en las ciencias de la salud por ser uno de los materiales más biocompatibles y bioactivos, tiene una morfología y una estructura cristalina similar a la apatita dental (161, 162). En general las partículas nanométricas, presentan propiedades mejoradas en comparación con las partículas micrométricas y se le considera como una biocerámica (162). Contiene alrededor de 4 ± 1 % en peso de iones carbonatados, estos iones sustituyen especialmente a los grupos fosfato. Los nanocristales biomiméticos de carbonato-hidroxiapatita pueden agregarse en grupos. Estos agregados presentan una superficie nanoestructurada de aproximadamente 80 m2/g (129).

El tamaño nanométrico permite penetrar fácilmente dentro de los túbulos dentinarios y las microfisuras del esmalte; de esta forma permite un sellado de los túbulos, restaurando la microestructura y composición química de los tejidos dentales. Además, provoca una alteración del flujo del fluido intertubular, reduciendo la conductancia

hidráulica y disminuyendo la sensibilidad dental (163). Los cristales de n-HAP, se depositan en la capa externa de la lesión de caries formando una nueva capa altamente mineralizada, actuando de relleno y haciendo que la superficie del esmalte se vuelva más resistente frente a los ataques ácidos (161, 163), pero, a su vez, impide la difusión de iones minerales hacia las regiones más profundas de la lesión (164, 165).

Estudios in vitro han evaluado la capacidad remineralizante de la n-HAP, y tras dos semanas de su uso hubo una reducción visible de las zonas desmineralizadas y un aumento significativo de la microdureza del esmalte tratado en comparación con el no tratado (163). Sin embargo, otros estudios demuestran que las pastas dentales con nanohidroxiapatita independientemente de la presencia de fluoruro o no, no tienen capacidad de reducir la desmineralización del esmalte y la dentina (166). Actualmente existen hallazgos contradictorios y muy pocos ensayos clínicos que permitan verificar el efecto remineralizante de la nanohidroxiapatita (164), de ahí la importancia de continuar investigando sobre este material.

2.5.4. Fosfatos de calcio

Existen tres sistemas de remineralización a base de fosfato de calcio.

El primer sistema es el *fosfato cálcico amorfo no estabilizado* (ACP o Enamelon TM) utiliza iones como el sulfato de calcio e iones fosfato (por ejemplo, fosfato de amonio) a veces en presencia de flúor o utilizados de forma individual. A medida que las sales se mezclan con la saliva, se disuelven liberando iones de calcio y fosfato, lo cual favorece la precipitación inmediata de ACP o en caso de ser usado junto con iones fluoruro, fosfato de fluoruro de calcio amorfo (ACFP). A nivel intraoral, estas fases (ACP y ACFP) son muy inestables y se transforman rápidamente en hidroxiapatita y fluorhidroxiapatita. Sin embargo, antes de las fases de transformación, los iones de calcio y fosfato deben estar transitoriamente biodisponibles para inhibir la desmineralización del esmalte y promover la remineralización del esmalte afectado (167). Los fabricantes afirman que la formación de fosfato de calcio amorfo por vía oral ayuda a reconstruir el esmalte dental a través de la remineralización, pero actualmente la literatura no recoge suficientes estudios que puedan validar esta afirmación (167).

El segundo sistema es el *fosfato cálcico amorfo estabilizado con fosfopéptido de caseína (ACP-CPP)*. El fosfopéptido de caseína (CPP) debe su nombre a la proteína que se encuentra en la leche bovina y contiene la secuencia de los siguientes aminoácidos: (-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-), tiene una notable capacidad para estabilizar el calcio y el fosfato (168, 169). Al mezclar los CPP con una solución de sales de fosfato y de calcio, los péptidos ayudan a organizar un cristal amorfo de fosfato de cálcico (ACP) o fosfato de fluoruro cálcico (CPP-ACPF) (98).

El efecto anticariogénico de los ACP-CPP se debe a que estos complejos se incorporan al biofilm y se adhieren a la superficie dental, actuando como un reservorio de calcio y fosfato. Estas nanopartículas de péptidos de caseína y fosfato de calcio, durante condiciones ácidas favorecen la liberación de iones PO_4^{-3}, OH^- y Ca^{+2} del esmalte, son capaces de capturar este exceso de los iones libres y mantienen un ambiente de sobresaturación de estos iones con respecto al esmalte, lo cual impide la caída del pH evitando la desmineralización (170). En estudios in vitro se ha visto que ACP-CPP es capaz de interaccionar con los iones de hidrógeno y puede difundirse en el esmalte dental, favoreciendo una remineralización a nivel subsuperficial (171).

El tercer sistema es el *fosfato β-tricálcico funcionalizado (β -TCP),* es el resultado de la funcionalización de β-fosfato tricálcico (β-TCP) con porciones orgánicas y/o inorgánicas, como ácidos carboxílicos (ácido fumárico), tensioactivos (laurilsulfato de sodio), polímeros o copolímeros (172). La funcionalización permite crear una barrera para evitar interacciones prematuras del fluoruro con el calcio, lo cual favorece una liberación a dosis bajas del fosfato de calcio cuando se aplica a través de dentífricos o enjuagues bucales. Está diseñado para mejorar la actividad de los iones flúor en la superficie del esmalte y facilitar la remineralización gracias a los iones calcio y fosfato presentes en la saliva (173).

Los estudios han demostrado que la combinación de fluoruro y fosfato β-tricálcico funcionalizado (f -TCP) produce un mineral más fuerte y resistente al ácido en relación con el fluoruro solo, el β-TCP original o el f-TCP sólo (173,174). Da lugar a una liberación lenta de flúor a baja dosis contrarrestando las bajadas de pH. Es importante destacar que el f-TCP no es un sustituto del fluoruro, sino que debe trabajar en sinergia

con él para obtener mejores resultados, actualmente se incorpora en pastas dentales y colutorios (98, 173).

2.5.5. Vidrios Bioactivos (Bioglass)

Los vidrios bioactivos son materiales que tienen la capacidad de estimular una respuesta beneficiosa en el tejido huésped, al principio se utilizaban principalmente para indicaciones de regeneración ósea. En 2004, se descubrió una partícula muy fina de Bioglass 45S5 llamada NovaMin (NovaMin Technology, FL; ahora propiedad de GlaxoSmithKline, Reino Unido) (175). Este vidrio bioactivo está compuesto por fosfosilicato de calcio y sodio, es un mineral sintético que reacciona en medios acuosos liberando iones de sodio, fosfato y calcio, neutralizando el pH y permitiendo la formación de una capa mineral en la superficie adamantina que formará cristales de hidroxiapatita de calcio carbonatada, favoreciendo la remineralización (98, 176, 177).

También es utilizado en dentífricos para tratar la hipersensibilidad dental porque las partículas de Bioglass 45S5 se adhieren a la dentina y forman una capa de HCA de composición similar a la del esmalte dental y bloquean los túbulos, aliviando el dolor durante periodos más prolongados (178, 179).

2.5.6. Sistemas de polifosfatos

El trimetafosfato de sodio (TMP) es un fosfato inorgánico condensado capaz de unirse fuertemente al esmalte y formar una capa protectora para evitar la pérdida de iones durante el ataque ácido, disminuyendo la solubilidad de la hidroxiapatita y alterando la afinidad de las proteínas salivares en la superficie del esmalte (180); esta capa protectora no afecta la difusión de los iones de Ca^{2+} y F^- en el esmalte dental (181).

Se ha demostrado en diversos estudios in vitro que la adición de TMP a productos fluorados da lugar a una disminución de la desmineralización del esmalte en comparación con sus homólogos sin TMP (182). Actualmente son necesarios ensayos clínicos para poder confirmar estos resultados (159).

2.5.7. Productos naturales

Se han llevado a cabo diversos estudios in vitro de varios compuestos naturales para evaluar la remineralización del esmalte dental. Dependiendo del compuesto específico, podrían afectar a la saturación mineral y a la precipitación, actuar como antimicrobianos o estabilizar el colágeno que podría funcionar como matriz para la deposición mineral (159, 183). Se ha demostrado que las proantocianidinas derivadas del arándano rojo posiblemente tienen un efecto sinérgico con compuestos del fosfato de calcio.

La *Galla chinensis* una hiel producida por los pulgones parásitos (*Melaphis chinensis Bell*), utilizado en la medicina tradicional china durante muchos años. Se ha visto que presenta gran cantidad de polifenoles monoméricos y poliméricos los cuales interactúan en la matriz orgánica bloqueando la difusión de iones y evitando la desmineralización (184).

Otro producto natural es la *Hesperidina*, un flavonoide de los cítricos, que se ha visto que posee propiedades protectoras frente a la degradación proteolítica del colágeno en dentina bovina, reduciendo la desmineralización, aunque se necesitan más estudios para investigar el mecanismo de acción en tejido dental humano (185, 186).

2.5.8. Arginina

La arginina es un aminoácido esencial y considerado un prebiótico que, en su forma libre se encuentra en los péptidos y proteínas salivales (187). Se ha demostrado que equilibra el microbioma en disbiosis, ya que *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus sanguis* (bacterias que favorecen un microbioma compatible con la salud) la metabolizan por la vía de la arginina deiminasa (ADS) produciendo citrulina, ornitina, CO_2, adenosina trifosfato (ATP) y amoniaco. La producción de amoniaco a partir del metabolismo de la arginina produce un aumento del pH en la biopelícula evitando el crecimiento de las bacterias cariogénicas y por tanto la desmineralización del esmalte (188, 189)

La arginina en pasta de dientes está disponible comercialmente al 1,5% y 8% con base de calcio insoluble y monofluorofosfato de sodio (MFP) de 1450 ppm. La pasta de dientes de arginina-fluoruro al 1,5% se introdujo como un agente preventivo de la caries (190), mientras que la pasta de dientes de arginina-fluoruro al 8% con variante de bicarbonato de arginina, se utilizaba para el tratamiento de la hipersensibilidad dentinaria. Se ha visto que la arginina combinada con el flúor proporciona un efecto ligeramente superior en cuanto a remineralización que el flúor solo, aunque son necesarios más estudios clínicos de calidad y que no se encuentren respaldados por la industria para obtener unas conclusiones definitivas (191–193).

2.5 JUSTIFICACIÓN

Aunque existe evidencia a nivel mundial de una disminución en la prevalencia de caries debido a intervenciones como el cepillado dental y el uso de selladores de fisuras, sigue siendo una enfermedad que afecta a millones de personas en todo el mundo, sobre todo en las poblaciones con menos recursos económicos y menor nivel cultural. La caries dental tiene una enorme repercusión a nivel de salud pública, y desde la OMS con los nuevos objetivos para el año 2030 (5) se están intentando que todos los países alcancen dichos objetivos para mejorar la salud oral de la población mundial.

Se ha descrito en numerosos artículos (37, 40, 67, 94, 125, 154, 194) que el empleo de técnicas mínimamente invasivas como es el uso de fluoruros, selladores, tratamiento restaurador atraumático (TRA) y materiales bioactivos con capacidad remineralizante permitiría reducir y controlar lesiones de caries con un coste-efectivad y coste-beneficio muy alto para el paciente con poca cobertura y accesibilidad.

Por otro lado, los defectos de esmalte están aumentando de forma significativa, viéndose afectada la calidad de vida del paciente y, un aumento secundario de la caries dental. El empleo de agentes que permitan biomineralizar este tipo de lesiones reduciendo los efectos secundarios de estos.

Es fundamental la filosofía de trabajo desde un punto de vista mínimamente intervencionista, llevando a cabo tratamientos innovadores mediante técnicas y materiales que permitan aumentar la resistencia del diente a agentes externos y por otro lado reparar lesiones ya instauradas. Este estudio experimental in vitro, tiene como objetivo determinar la capacidad remineralizante y resistencia al ataque ácido de materiales recientemente incorporados en el mercado, como es el péptido P11-4, la nanohidroxiapatita, el silicato de calcio/fosfato de sodio frente al barniz de fluoruro sódico como el material tradicional más empleado por excelencia. Todo ello se llevará a cabo en esmalte bovino previamente desmineralizado con ácido láctico.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

Las hipótesis nulas que se plantearon analizar en el presente trabajo fueron las siguientes:

- Hipótesis nula (H0) 1. La aplicación de los agentes remineralizantes péptido P11-4, nanohidroxiapatita, barniz de flúor 2.26% NaF y sistemas de silicato de calcio y fosfato de sodio no afecta a la microdureza del esmalte bovino desmineralizado.
- Hipótesis nula (H0) 2. La aplicación de los agentes remineralizantes péptido P11-4, nanohidroxiapatita, barniz de flúor 2.26% NaF y sistemas de silicato de calcio y fosfato de sodio no afecta al contenido mineral del esmalte bovino desmineralizado.
- Hipótesis nula (H0) 3. La aplicación de los agentes remineralizantes péptido P11-4, nanohidroxiapatita, barniz de flúor 2.26% NaF y sistemas de silicato de calcio y fosfato de sodio no afecta a la morfología del esmalte bovino desmineralizado.
- Hipótesis nula (H0) 4. La aplicación de los agentes remineralizantes péptido P11-4, nanohidroxiapatita, barniz de flúor 2.26% NaF y sistemas de silicato de calcio y fosfato de sodio no afecta a la rugosidad de superficie del esmalte bovino desmineralizado.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo general

El objetivo general del estudio ha sido determinar la capacidad remineralizadora y la resistencia al ataque ácido de cuatro materiales de uso dental empleados sobre esmalte bovino desmineralizado mediante un sistema de pH cíclico.

3.2.2. Objetivos específicos

1. Medir el efecto de la aplicación de cuatro agentes remineralizantes (péptido P11-4, nanohidroxiapatita, barniz de flúor 2.26% NaF y sistemas de silicato de calcio y fosfato de sodio) sobre la microdureza del esmalte bovino desmineralizado.

2. Determinar el efecto de la aplicación de cuatro agentes remineralizantes (péptido P11-4, nanohidroxiapatita, barniz de flúor 2.26% NaF y sistemas de silicato de calcio y fosfato de sodio) sobre el contenido mineral del esmalte bovino desmineralizado.

3. Estudiar el efecto de la aplicación de cuatro agentes remineralizantes (péptido P11-4, nanohidroxiapatita, barniz de flúor 2.26% NaF y sistemas de silicato de calcio y fosfato de sodio) sobre la morfología del esmalte bovino desmineralizado.

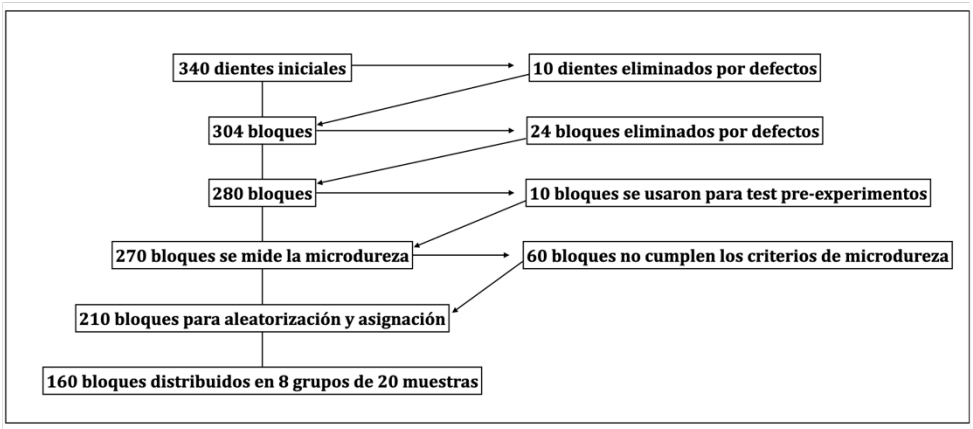
4. Analizar el efecto de la aplicación de cuatro agentes remineralizantes (péptido P11-4, nanohidroxiapatita, barniz de flúor 2.26% NaF y sistemas de silicato de calcio y fosfato de sodio) sobre la rugosidad de superficie del esmalte bovino desmineralizado.

4. MATERIAL Y MÉTODO

El estudio se ha realizado durante el periodo comprendido entre abril del 2021 y junio del 2023. La preparación de las muestras se ha llevado a cabo en la Clínica Odontológica Universitaria de la Universidad de Murcia y en el Laboratorio de Investigación Biosanitaria (LAIB) del Palmar, laboratorio 6.08 (Odontología Mínimamente Invasiva). El microanálisis mediante SEM/FESEM y análisis de topografía y superficie con AFM fue realizado en el Edificio SACE localizado en el Campus de Espinardo de la Universidad de Murcia. Las pruebas de microdureza fueron realizadas en el Laboratorio de Investigación Biosanitaria (LAIB), laboratorio 6.08.

El estudio ha obtenido previamente el informe favorable de la Comisión de Ética en Investigación, así como el Comité de Bioseguridad en Experimentación de la Universidad de Murcia, España [CBE 447/2022] (**Anexo 1**).

En la **figura 7** se puede observar el diseño del estudio que se ha llevado a cabo. Del total de muestras que cumplían los requisitos de microdureza se escogieron 160 mediante un proceso de aleatorización y se asignaron 20 muestras para cada uno de los 8 grupos de experimentación. Posteriormente fueron desmineralizadas con ácido láctico durante 72 horas, excepto el grupo de esmalte intacto. Se aplicaron los diferentes agentes remineralizantes siguiendo las instrucciones del fabricante y fueron sometidas a los ciclos de pH durante 30 días para posteriormente evaluar la microdureza superficial, microanálisis del contenido mineral del esmalte (Ca, P, C, O, F, Na, Mg, Si, Cl) (SEM), análisis morfológico con la obtención de imágenes de alta resolución (FESEM), análisis de la rugosidad superficial y topografía externa mediante AFM.



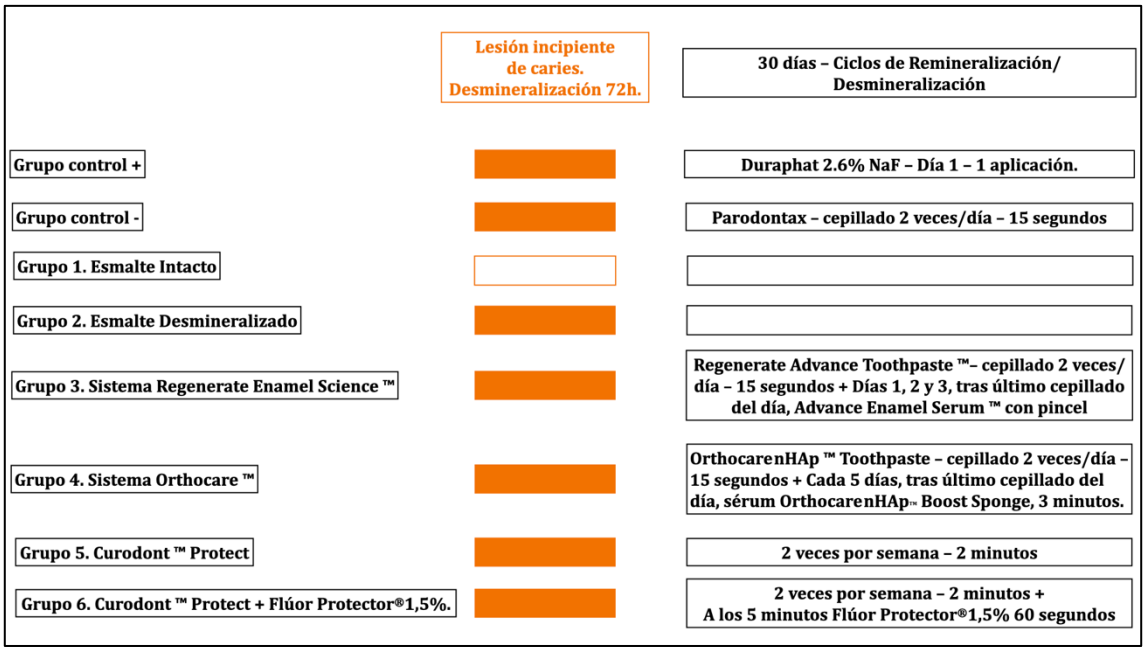


Figura 7. Esquema del diseño del estudio experimental que se ha llevado a cabo.

4.1. MUESTRAS

Se extrajeron 340 incisivos temporales inferiores bovinos de mandíbulas procedentes de un matadero industrial (El Cabezo de la Plata, Cañadas de San Pedro, Murcia) con un fórceps de incisivos centrales superiores (Carl Martin™, Solingen-Langenfeld, Alemania) y un botador recto (Carl Martin™, Solingen-Langenfeld, Alemania) (Figura 5). Se les retiraron los restos de tejidos adheridos a la superficie radicular con un bisturí del 15 (Carl Martin™, Solingen-Langenfeld, Alemania) **(ver figura 8)**, se limpiaron con un cepillo (Dentaflux ®, Madrid, España) y pasta profiláctica sin flúor (Detartrine™, Septodont, Francia) **(ver figura 9)**. Se sumergieron en una

solución de Timol al 0,1% durante 24 horas, se lavaron abundantemente y se almacenaron en agua destilada (Funiza™ Laboratories, Málaga, España) a 4ªC de temperatura, que se cambió diariamente hasta el momento de su uso, que nunca fue más de 6 meses (195). En esta fase se eliminaron 10 dientes por presentar fracturas de esmalte o signos de desmineralización.

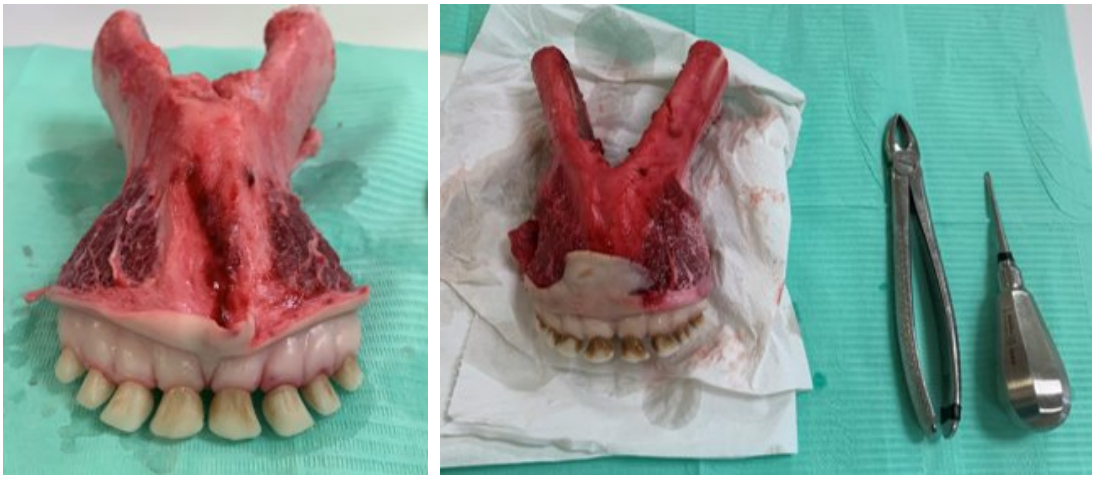


Figura 8. a) Maxilar bovino y b) maxilar bovino, fórceps de incisivos superiores (Carl Martin™, Solingen-Langenfeld, Alemania) y botador recto (Carl Martin™, Solingen-Langenfeld, Alemania).

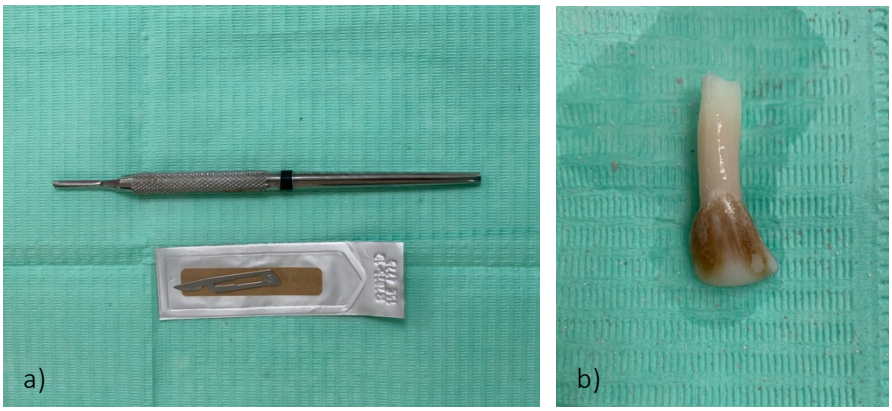


Figura 9. a) Bisturí del 15 (Carl Martin™, Solingen-Langenfeld, Alemania) y b) diente después de retirar el ligamento periodontal.

Figura 10. a) Pasta profiláctica sin flúor (Detartrine™, Septodont, Francia) y b) limpieza de las superficies vestibulares con cepillo (Dentaflux ™, Madrid, España).

De cada corona se extrajo un bloque rectangular que incluyó la zona más plana y regular de la cara vestibular, con pieza de mano (KaVo Dental GmbH, Biberach, Alemania) **(ver figura 11 b)**, discos de corte de diamante (SuperFlex DAPEX 220M, Dumont Instruments, Bélgica) **(ver figura 11 a)** y abundante irrigación. La cara interna de la muestra fue pulida y aplanada en una lijadora/pulidora manual (Shaphir 250 M1, NEURTEK S.L, Guipúzcoa, España) **(ver figura 12 a)**, con discos de pulir de tamaño decreciente, consiguiendo un apoyo totalmente liso y plano con respecto a las platinas **(figura 12 b)**. De los 304 bloques obtenidos, 24 fueron desechados porque presentaban defectos.

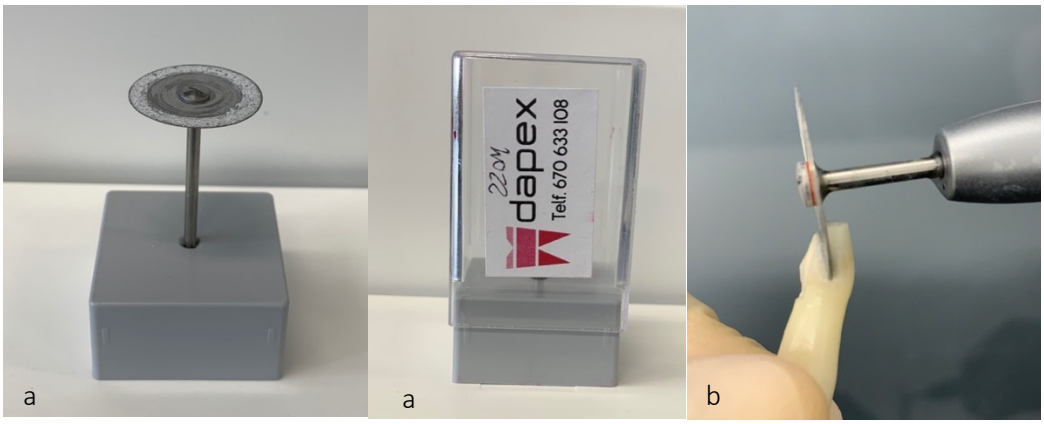


Figura 11. a) Discos de corte (SuperFlex DAPEX 220M, Dumont Instruments, Bélgica) y b) Sentido de corte de las muestras.

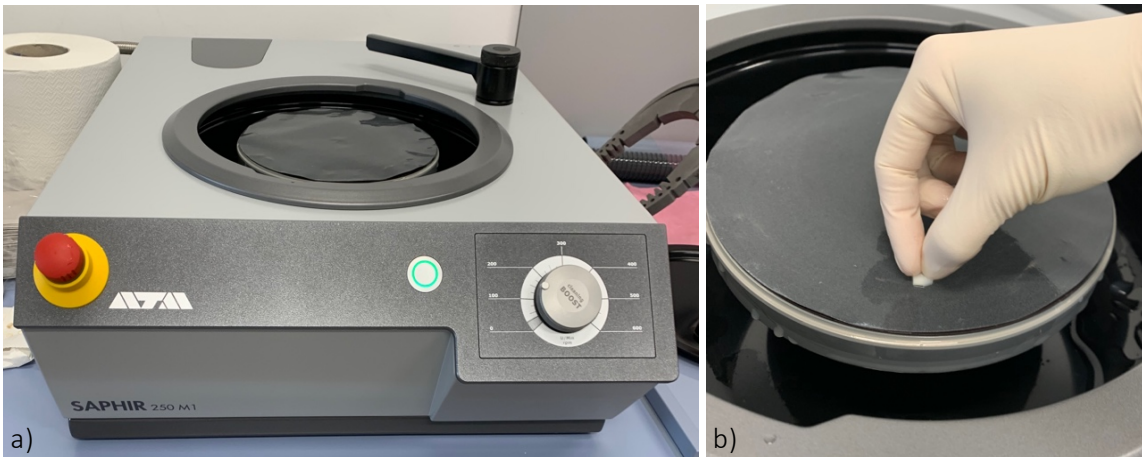


Figura 12. a) Lijadora/pulidora manual Shaphir 250 M1 (NEURTEK S.L, Guipúzcoa, España) y b) pulido de la zona inferior de las muestras con discos de grano fino P 240 (MESTRA®, Bizkaia, España).

De las 280 muestras, 10 fueron utilizadas para poner a punto las técnicas experimentales. Los 270 bloques restantes se pintaron con dos capas de laca de uñas (ESSIE 350, L´Oreal, Madrid, España) **(ver figura 13 a)**, dejando al descubierto solo la zona más plana y regular de la superficie vestibular **(ver figura 13 b)**, donde posteriormente se realizarán los diferentes estudios y se congelaron a -22ºC (Beko Electronics España S.L) hasta el comienzo de la fase experimental. La descongelación se realizó lentamente pasando de -22ªc a 4ºC y temperatura ambiente.

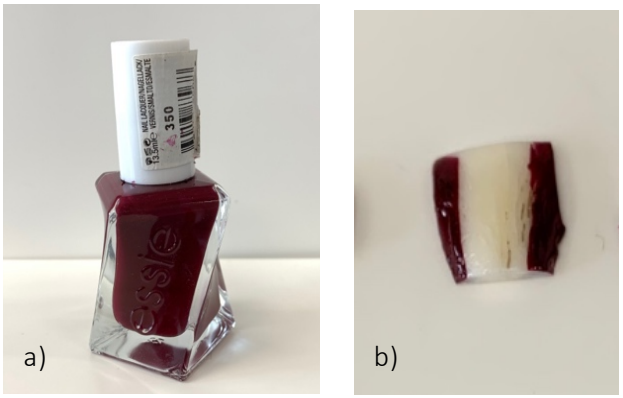


Figura 13. Muestras pintadas.

4.2. SELECCIÓN Y ALEATORIZACIÓN

Para determinar la homogeneidad y validez de las muestras para la experimentación se usó el valor de la microdureza de la superficie del esmalte.

Las 270 muestras se montaron en pletinas sobre una cinta adhesiva de carbón y fueron enumeradas del 1 al 270 **(ver figura 14 b)**. Se realizaron 3 indentaciones en cada muestra **(ver figura 14 a)** con una carga de 200 gr y 10 segundos de duración, siguiendo el mismo procedimiento explicado en el apartado "test de microdureza" de esta misma sección. Se obtuvo el promedio de los tres valores de microdureza de Vickers por muestra. Se excluyeron del estudio aquellas muestras con una variabilidad en los valores de microindentación superior al 10% y, también, aquellas cuyos valores cuyo promedio fueron superiores o inferiores al 10% de la dureza media del total de las muestras (317±10% HV) (196).

De las 270 muestras, 60 no cumplen los criterios de inclusión. Las 210 muestras restantes se sometieron a un proceso de aleatorización usando un listado de números aleatorios proporcionado por la función "ALEATORIO.ENTRE" del programa Excel, versión 16.77.1, y asignación de 20 muestras a 8 grupos experimentales (total 160 muestras).

Cada muestra se introdujo en un tubo de ensayo trasparente de 12 ml (DELTALAB, S.L, Barcelona, España) con la codificación correspondiente.

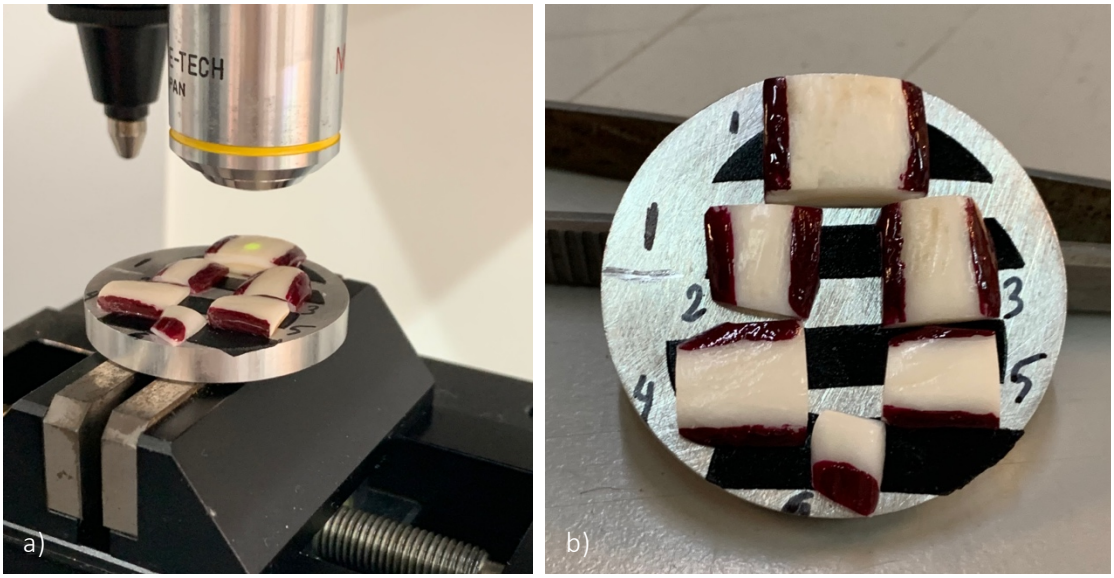


Figura 14. a) Microdurómetro de sobremesa Vickers KMHV-1000Z (Kansert, S.L. Navarra, España) enfocando con el lente amarillo y b) platina con las muestras pegadas y enumeradas.

4.3. FORMACIÓN DE LAS LESIONES CARIOSAS INCIPIENTES.

Para la creación de las lesiones cariosas incipientes se utilizó una solución de 0,1 M de ácido láctico (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) y 50 mg/L de fosfato de calcio (Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU.) en agua destilada (93,197,198).

Los bloques se sumergieron en la solución durante 72 horas, excepto los del grupo 1 (esmalte intacto).

Trascurridas las 72 horas se enjuagaron bien con agua destilada y se secaron para poder aplicar los agentes remineralizantes de los distintos grupos experimentales.

Para comprobar la efectividad de la solución en la producción de las lesiones cariosas incipientes, a 20 muestras se les midió el grado de desmineralización determinando la microdureza, habiendo obtenido unos valores un 25% inferiores a los de referencia.

4.4. MODELO QUÍMICO DE LOS CICLOS DE PH (REMINERALIZACIÓN/ DESMINERALIZACIÓN).

Todos los grupos fueron sometidos a ciclos de pH (ciclos de desmineralización y remineralización) diariamente durante 30 días, durante los cuales las muestras se

mantuvieron a 37ºC en una estufa P Selecta® (JP Selecta S.A, Barcelona, España) **(ver figura 15).**

La fase de desmineralización se realizó durante 2 horas al día, introduciendo en el tubo de ensayo que contenía el bloque de esmalte 2,5 ml de la solución desmineralizante (SD) compuesta por: 2,2 mM $CaCl_2$ (cloruro de calcio; Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU.), 2,2 mM KH_2PO_4 (fosfato monopotásico; Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU.), ácido acético 0.05 M (Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU.), ajustando el pH a 4,40 con KOH 5,0 M (hidróxido de potasio; Sigma Aldrich) (195,196).

La fase de remineralización se realizó durante 22 horas al día, introduciendo en el tubo de ensayo que contenía el bloque de esmalte 2,5 ml de la solución remineralizante (SR) compuesta por: $CaCl_2$ 1,5 mM (cloruro de calcio; Sigma Aldrich), NaH_2PO_4 0,9 mM (fosfato monosódico; Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU.) y 0,15 KCl M (cloruro potásico; Sigma Aldrich), ajustando el pH a 7,0 con KOH 5,0 M (hidróxido de potasio; Sigma Aldrich). (197,198)

Entre una fase y otra las muestras se sometían a un lavado con agua destilada.

Se utilizaron un total de 14 litros de SD: pH 4,4 y 14 litros de SR: pH 7. Al abrir una botella de solución se comprobaba el pH con tiras universales indicadoras de pH Scharlau pH 0-14 (Scharlab S.L. Barcelona, España).

Figura 15. Estufa de laboratorio P Selecta®, (JP Selecta S.A, Barcelona, España).

4.5. GRUPOS EXPERIMENTALES Y PROCEDIMIENTOS.

Grupo control positivo. Tras la formación de las lesiones cariosas incipientes, se aplicó barniz de fluoruro Duraphat® 2,26% NaF (Colgate-Palmolive Company, Madrid. España) **(ver figura 16)**. El barniz se aplicó el primer día y, después, las muestras se sometieron a los ciclos de remineralización/desmineralización durante 30 días. La composición del barniz viene recogida en la **Tabla III**.

Figura 16. Duraphat® 2,26% F; Barniz de Fluoruro (Colgate-Palmolive Company, Madrid. España.

PRODUCTO	COMPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN (% W/W)
Duraphat® 2,26% F; Barniz de Fluoruro (Colgate-Palmolive Company, Madrid. España).	Colophonium (agente de fijación y control de viscosidad) Etanol (alcohol etílico) Fluoruro de sodio	>= 30 - < 50 >= 20 - < 30 >= 1 - < 10
Fuente MSDS: https://d3tfk74ciyjzum.cloudfront.net/proclinic-es/annexes/383601_msds_es_.pdf		

Tabla III. Composición de Duraphat® 2,26% F; Barniz de Fluoruro.

Grupo control negativo. Tras la formación de las lesiones cariosas incipientes, durante los 30 días siguientes, se realizó, 2 veces al día durante 15 segundos cada vez, el cepillado de la cara vestibular de cada una de las muestras con Parodontax® Sin Flúor (GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, S.A, Madrid, España), **(ver figura 17)**. Las

muestras se sometieron a los ciclos de remineralización/desmineralización durante 30 días. La composición del Parodontax® Sin Flúor viene recogida en la **Tabla IV**.

Figura 17. Pasta dental Parodontax® Sin Flúor (GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, S.A (GSK), Madrid, España)

PRODUCTO	COMPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN (% W/W)
Parodontax® Sin Fluor (GlaxoSmithKline Consumer Healthcare, S.A (GSK), Madrid, España)	Glicerina	5-15%
	Cocoamidopropil betaína	3-5%
	Sabor Puma whizzle	0-2.5%
	Sabor Optamint	0-1.5%
	TEGO® Betain CK D (Surfactante anfótero)	0-1.5%
	Aceite de menta	0-1%
	Sin terpenos	0-1%
	Óxido férrico rojo	0-1%
	Aceite de menta piperita	0-0.5%
	Floruro de sodio	0-0.5%
	Dióxido de titanio	0-0.5%
	Isopropilmetilfenol	
Fuente MSDS: https://psdcdn.blob.core.windows.net/coshh/PBB352.pdf		

Tabla IV. Composición de la Pasta dental Parodontax® Sin Flúor.

Grupo 1. Esmalte intacto. Las muestras de este grupo no se sometieron al proceso de desmineralización para la formación de lesiones incipientes de caries. Durante 30 días realizaron los ciclos de remineralización/desmineralización.

Grupo 2. Esmalte desmineralizado. Tras la formación de las lesiones cariosas incipientes, las muestras de este grupo se sometieron durante 30 días a los ciclos de remineralización/desmineralización.

Grupo 3. Sistema Regenerate Enamel Science™. Tras la formación de las lesiones cariosas incipientes, durante los 30 días siguientes, se realizó el cepillado de la cara vestibular de las muestras, 2 veces al día, durante 15 segundos, con el dentífrico Regenerate Advance Toothpaste ™ (Unilever, Reino Unido) **(ver figura 18 b)**. Los días 1, 2 y 3, tras el último cepillado del día, se aplicó con un pincel el Advance Enamel Serum™ (Unilever, Reino Unido) **(ver figura 18 a**) dejándolo actuar durante 3 minutos. El sérum se obtiene tras la mezcla de dos componentes: el NR-5 Serum™ y el Gel Activador™. La composición del sistema Regenerate Enamel Science™ viene recogida en la **Tabla V**.

a) b)

Figura 18. a) Sérum: Advance Enamel Serum™ (Unilever, Reino Unido) y b) pasta dental: Regenerate Advance Toothpaste ™ (Unilever, Reino Unido).

PRODUCTO	COMPOSICIÓN	
Regenerate Enamel Science™ (Unilever, Reino Unido)	**Pasta dental:** Regenerate Advance Toothpaste ™ (Unilever, Reino Unido)	Glicerina Silicato de calcio PEG-8 (polímero sintético humectante) Sílice hidratada Fosfato trisódico Fosfato sódico Aqua PE-60 (aceite hidrogenado emulsionante y tensioactivo) Lauril sulfato sódico Monofluorofosfato sódico Aroma Fluorflogopita sintética Sacarina sódica Ácido poliacrílico Óxido de estaño Limoneno C177891(Colorante blanco: dióxido de titanio)
	Sérum: Advance Enamel Serum™ (Unilever, Reino Unido)	**NR-5 Serum ™** Glicerina Silicato de Calcio PEG-8 (polímero sintético humectante) Fosfato Trisódico Fosfato de Sodio Agua PEG-60 (aceite hidrogenado emulsionante y tensioactivo) Lauril Sulfato de Sodio Monofluorofosfato de Sodio Aroma Sílice Hidratada Fluorflogopita Sintética Sacarina de Sodio Ácido Poliacrílico Óxido de Estaño Limoneno CI 77891 (Colorante blanco: dióxido de titanio)

		Gel Activador ™ Aqua Glicerina Goma de celulosa, Fluoruro de sodio, Alcohol bencílico Etilhexilglicerina Fenoxietanol CI 42090 (tinte azul sintético) Fluoruro de Sodio (1450 ppm F)
Fuente: https://www.regeneratenr5.co.uk/products/advanced-toothpaste		

Tabla V. Composición del Sérum Advance Enamel Serum™ y de la pasta dental Regenerate Advance Toothpaste ™.

Grupo 4. Sistema Orthocare™. Tras la formación de las lesiones cariosas incipientes, durante los 30 días siguientes, se realizó el cepillado de la cara vestibular de las muestras, 2 veces al día, durante 15 segundos, con la pasta dental Orthocare nHAp™ Toothpaste (Prevdent® International B.V, Países Bajos; **ver figura 19 a**). Cada 5 días, tras el último cepillado del día, se aplicó el sérum Orthocare nHAp™ Boost Sponge, (Prevdent® International B.V, Países Bajos; **ver figura 19 b)**, dejándolo actuar durante 3 minutos. La composición del sistema Orthocare™ aparece recogida en la **Tabla VI**.

Figura 19. a) Pasta dental: Orthocare nHAp™ Toothpaste (Prevdent® International B.V, Países Bajos) y b) Sérum: Orthocare nHAp® Boost Sponge de 1 ml (Prevdent® International B.V, Países Bajos).

PRODUCTO	COMPOSICIÓN
Pasta dental: Orthocare nHAp™ Toothpaste (Prevdent® International B.V, Países Bajos)	Agua Sílice hidratada Sorbitol Glicerina Xilitol Nitrato de potasio Hidroxiapatita (nano) Silicato de magnesio y aluminio Aceite de menta piperita Lauroilsarcosinato de sodio Goma xantana Fenoxietanol Cloruro de potasio Sulfato de sodio Sacarina de sodio Linalol Limoneno Benzoato de bencilo CI 77891
Sérum: Orthocare nHAp® Boost Sponge de 1 ml	Agua Xilitol Hidroxiapatita (nano) cloruro potásico Goma esclerótica Aceite de menta piperita Linalol Limoneno
Fuente: https://www.orthocareshop.com/product/orthocare-nhap-toothpaste/	

Tabla VI. Composición pasta dental Orthocare nHAp™ Toothpaste y serúm Orthocare nHAp® Boost Sponge de 1 ml.

Grupo 5. Curodont™ Protect. Tras la formación de las lesiones cariosas incipientes, se aplicó Curodont™ Protect (Credentis AG, Dorfstrasse, Windisch, Switzerland) 2 veces por semana, soplando los excesos cuando era necesario y dejándolo actuar durante 2 minutos **(ver figura 20)**. La composición del Curodont™ Protect aparece recogida en la **Tabla VII**.

Figura 20. Curodont™ Protect (Credentis AG, Dorfstrasse, Windisch, Switzerland)

PRODUCTO	COMPOSICIÓN
Curodont™ Protect (Credentis AG, Dorfstrasse, Windisch, Switzerland)	Hidrolizado de almidón hidrogenado Agua Sílice hidratada PEG-8 Goma de celulosa Monofluorofosfato sódico (900 ppm) Aroma Sacarina sódica Ácido cítrico Hidróxido sódico Fosfato dicálcico Oligopeptido-104 Glicerofosfato cálcico Cloruro sódico Sulfato sódico Limoneno Cinamal (agente parfumante y saborizante) CI 42090
Fuente: https://professional.vvardis.com/product/curodont-protect/	

Tabla VII. Composición Curodont™ Protect.

Grupo 6. Curodont™ Protect + Flúor Protector® al 1,5%. Tras la formación de las lesiones cariosas incipientes, se aplicó Curodont™ Protect (Credentis AG, Dorfstrasse, Windisch, Switzerland) 2 veces por semana, soplando los excesos cuando era necesario y dejándolo actuar durante 2 minutos. A los 5 minutos de aplicar el Curodont™ Protect se aplicó una capa de Flúor Protector® 1,5% (Ivoclar, Vivadent S.L.U, Schaan, Liechtenstein; **ver figura 21**), se dejó secar durante 60 segundos y se

sopló con aire comprimido. La composición del Flúor Protector® viene recogida en la **Tabla VIII**.

Figura 21. Fluor Protector, 1,5% Barniz en Ampollas de 1ml (Ivoclar, Vivadent S.L.U, Schaan, Liechtenstein).

PRODUCTO	COMPOSICIÓN	CONCENTRACIÓN (% W/W)
Fluor Protector, Barniz en Ampollas de 1ml (Ivoclar, Vivadent S.L.U, Schaan, Liechtenstein)	Acetato de etilo Isoamilpropionato Poliisocianato	> 65% < 21% < 12%
Fuente MSDS: https://media.dentalcompare.com/m/25/Downloads/Fluor%20Protector%20MSDS.pdf		

Tabla VIII: Composición Fluor Protector, 1,5% Barniz en Ampollas de 1ml.

Una vez aplicados los diferentes productos se introducían en la solución remineralizante, donde siempre estuvieron un mínimo de 2 horas, antes de una nueva aplicación o antes de la sustitución por la solución desmineralizante.

Para la realización del cepillado (grupo control negativo, grupo 3 y grupo 4) se emplearon cepillos dentales (VITIS®-DENTAID, Barcelona, España) de dureza suave

(ver figura 22). El cepillado de cada muestra se realizó con una presión suave y de manera rítmica durante 15 segundos.

Figura 22. Cepillo VITIS®-DENTAID, Barcelona, España de dureza suave.

4.6. TEST DE MICRODUREZA

Se realizó el test de microdureza en 160 muestras con un microdurómetro de sobremesa Vickers KMHV-1000Z (Kansert, S.L. Navarra, España) **(ver figura 23)**. Antes de cada sesión de medida, el microdurómetro se calibró utilizando un Block Control HMW- 700, obteniendo valores 703,8 – 706,9 (media 704,88 HV). Una vez calibrado se colocaron las pletinas con las muestras, se realizó un primer enfoque con la lente x10 para escoger la zona a analizar, después un segundo enfoque de la zona elegida con la lente x 40 y, a continuación, la indentación con el indentador de Vickers con una carga de 200 g, durante 10 s. La medida se repitió tres veces, en zonas separadas entre sí un mínimo de 3 veces la marca (rombo), y se usó el promedio de los tres valores.

Figura 23. Microdurómetro de sobremesa Vickers KMHV-1000Z (Kansert, S.L. Navarra, España).

4.7. MICROANÁLISIS POR ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X

Para realizar el microanálisis elemental se utilizó el sistema de microanálisis por dispersión de Rayos X INCA (Oxford Instruments Analytical Halifax Road, UK) incorporado a un microscópio electrónico de barrido (SEM) (JEOL-6100, Tokyo, Japón) **(ver figura 24 a)**. Antes de cada sesión el microscopio era calibrado con una muestra de cobre.

De cada grupo experimental se seleccionaron 8 muestras aleatoriamente, usando un listado de números aleatorios proporcionado por la función "ALEATORIO.ENTRE" del programa Excel, versión 16.77.1. Se colocaron en pletinas y se recubrieron con una capa de 5nm de platino en una cámara metalizadora Leica EM ACE600 (Leica, Heidelberg, Alemania). En cada muestra se seleccionaron 5 zonas, una en cada extremo y otra en el centro). Las mediciones se llevaron a cabo a una magnificación de x1000, obteniéndose imágenes de ellas. Se realizó un barrido de cada zona durante 100 segundos

(ver figura 24 b). Posteriormente, y mediante el programa INCA Energy (Oxford Instruments Analytical Halifax Road, UK), se obtuvieron datos del contenido porcentual en peso del Ca, P, C, O, F, Na, Mg, Si y Cl.

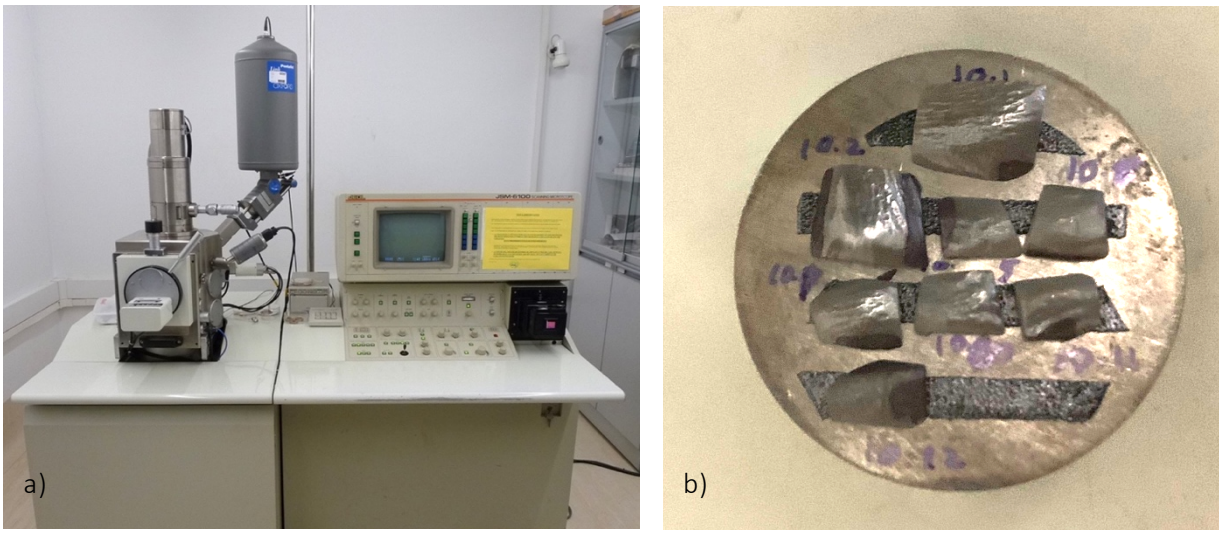


Figura 24. a) Microscopio electrónico de barrido (SEM) (JEOL-6100, Tokyo, Japón). b) Muestras recubiertas con platino para la realización del microanálisis.

4.8. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO

Para la obtención de imágenes de alta resolución de la superficie de las muestras se utilizó un Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FESEM) Thermo Scientific Apreo S (Fisher Scientific S.L. Alcobendas, Madrid) **(ver figura 25)**.

Se obtuvieron imágenes a 3000, 15000 y 30000 aumentos de 3 muestras, ya metalizadas con platino, de cada grupo experimental.

Figura 25. Microscopio Electrónico de Barrido de Emisión de Campo (FESEM) Thermo Scientific Apreo S (Fisher Scientific S.L. Alcobendas, Madrid).

4.9. MICROSCOPIO DE FUERZA ATÓMICA

Mediante un Microscopio de Fuerza Atómica (AFM Nano- Observer, ScienTec Ibérica, Madrid, España) se llevó a cabo el análisis de la topografía superficial de los bloques de esmalte. La técnica consta del empleo de una punta muy fina que presenta el microscopio y escanea la superficie haciendo un barrido de hasta 100 micras en los ejes XY y 14 micras en Z, obteniendo un mapeo de la superficie analizada **(ver figura 26 a)**. Para la realización de esta prueba se escogieron 2 muestras de cada grupo y se montaron en pequeñas pletinas. En cada muestra se analizaron 3 zonas (puntos rojos en **figura 26 b**) y en cada una de ellas se realizaban 2 mediciones (barrido hacia arriba y barrido hacia abajo; por ejemplo: a y a2, b y b2, c y c2) **(ver figura 27)**.

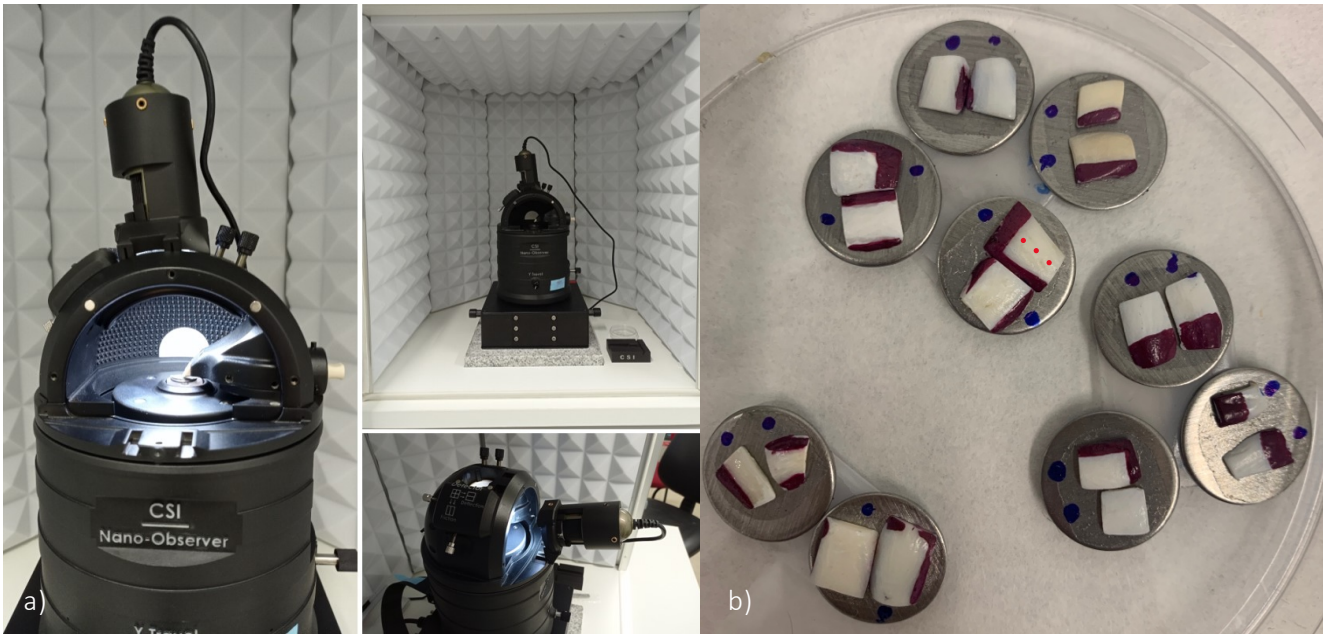


Figura 26. a) Microscopio de fuerza atómica (AFM Nano- Observer, ScienTec Ibérica, Madrid, España) y b) muestras escogidas para la realización de esta prueba.

Cada medición fue guardada y analizada con el programa Gwyddion 2.62. A cada muestra se le trazaron un total de 5 líneas paralelas y equidistantes **(ver figura 27)**, para de esta manera medir el punto más alto, correspondiente al punto B (triángulo de color verde) y el punto más bajo, correspondiente al punto A (triángulo de color rojo) **(ver figura 28)**. Se anotaron los valores de A, B y A-B en nanómetros (fila #1) en un documento Excel **(ver figura 29)**.

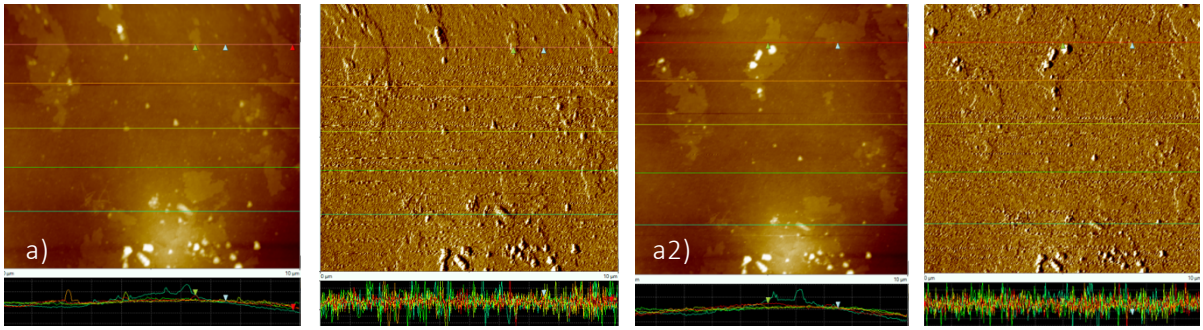


Figura 27. Trazado de las 5 líneas paralelas y equidistantes en una de las tres mediciones realizadas en una muestra. barrido hacia arriba (a) y barrido hacia abajo (a2).

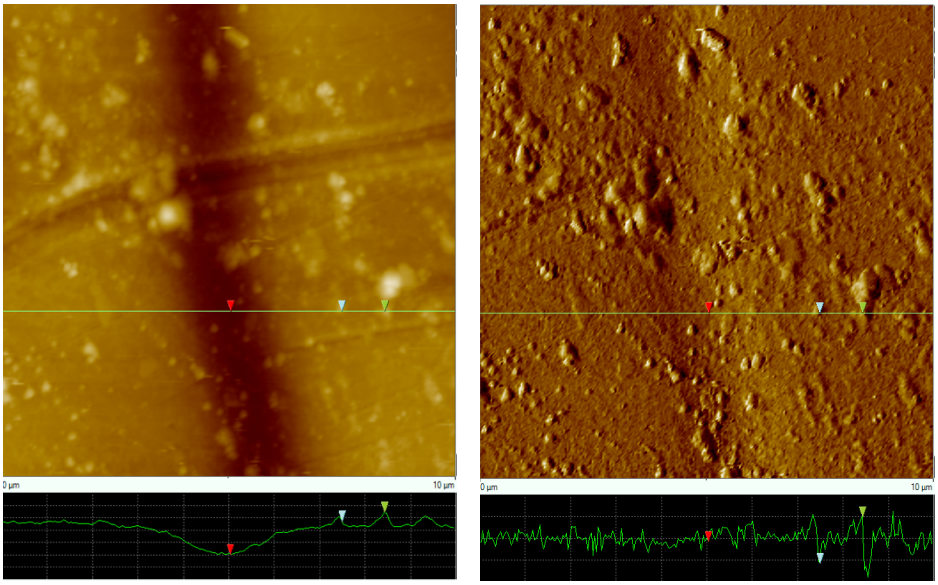


Figura 28. Ejemplo de la medición del punto A (triangulo de color rojo: punto más bajo) y punto B (triangulo de color verde: punto más alto) en cada una de las 5 líneas paralelas de la muestra.

	A	B	A - B	C	A - C
X	5.051 µm	8.456 µm	3.404 µm	7.5 µm	2.449 µm
#1	-39.65 nm	28.02 nm	67.68 nm	19.38 nm	59.04 nm
#2	-7.846 mV	48.66 mV	56.51 mV	-55.16 mV	-47.31 mV

Figura 29. Ejemplo de los valores que se han tenido en cuenta: A, B y A-B, fila #1 (valores en nanómetros).

También se tomaron imágenes en tres dimensiones para un mejor análisis topográfico de las muestras **(ver figura 30)**.

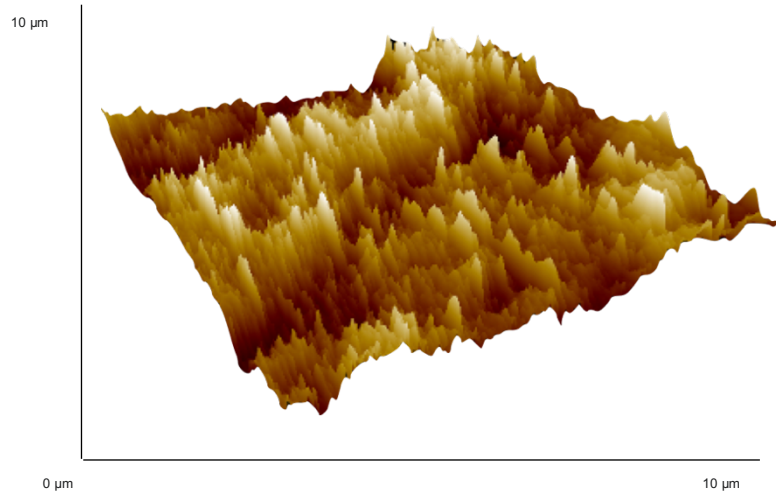


Figura 30. Imagen en tres dimensiones tomada en cada una de las muestras para realizar el análisis topográfico.

4.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el estudio se han evaluado cuatro variables principales, una por cada objetivo específico: microdureza de Vickers, composición elemental (concentraciones porcentuales en peso de Ca, P, C, O, F, Na, Mg, Si, Cl, micromorfología y rugosidad de la superficie del esmalte.

De la micromorfología de superficie del esmalte se ha realizado un análisis descriptivo.

Para realizar la estadística se ha utilizado el programa Jamovi v 2.3 (199, 200). Se realizó un análisis descriptivo de las variables del estudio. Se utilizó el test de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad y el test de Levene para la homogeneidad de varianzas.

Para determinar diferencias en los valores iniciales de microdureza y su evolución, en la composición elemental y en la rugosidad de superficie, entre todos los grupos, se realizó un test de Kruskal Wallis, porque no todos los grupos presentaron normalidad. Las comparaciones dos a dos se realizaron con el test de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner.

El comportamiento de la microdureza en los grupos frente a los ciclos de desmineralización/remineralización se determinó con una t-test pareada, cuando se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, y cuando no se cumplieron se usó el test de Wilcoxon.

La significación estadística se consideró a partir de una $p<0.05$.

5. RESULTADOS

5.1.Resultados para alcanzar el objetivo específico 1

Microdureza superficial

Todos los grupos, salvo el grupo 2 Esmalte desmineralizado, presentaron una microdureza inicial comprendida entre 319.23 ± 15.00 HV y 325.14 ± 12.36 HV, sin diferencias significativas entre ellos. El valor medio de microdureza del grupo 2 "esmalte desmineralizado" fue de 261.11 ± 16.30HV ($p < 0.001$) **(Figura 31; Tabla IX)**.

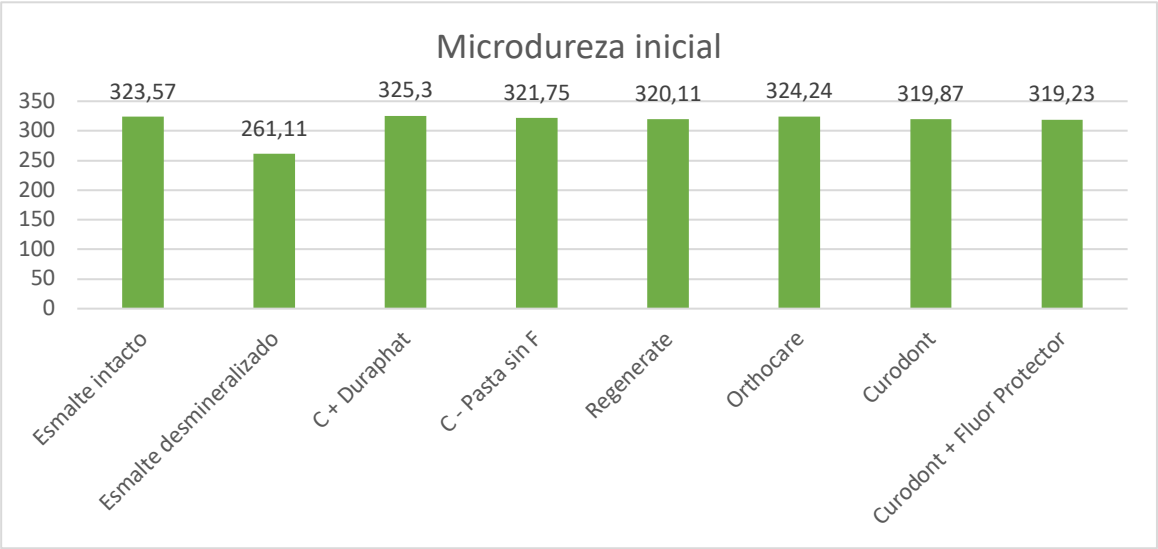


Figura 31. Resultados de microdureza inicial entre grupos experimentales.

Después de los 30 días de experimentación se evaluó la microdureza final de cada grupo experimental. El más resistente a los ciclos de desmineralización/remineralización y con menor pérdida de microdureza fue el grupo control positivo (GC+) tratado con Duraphat, con una microdureza final de 240.76 ± 61.91 HV, seguido del grupo tratado con Regenerate, con valores de 234.23 ± 29.37 HV, y el grupo Control negativo (pasta dental sin F-) con 110.77 ± 37.13 HV. El grupo con menor microdureza final fue el del esmalte desmineralizado con valores de 10.57 ± 1.86 HV, seguido del grupo tratado con

Orthocare con 25.66 ± 4.61HV y el del esmalte intacto con valores de 45.05 ± 9.65 HV **(ver Figura 32; Tabla IX)**.

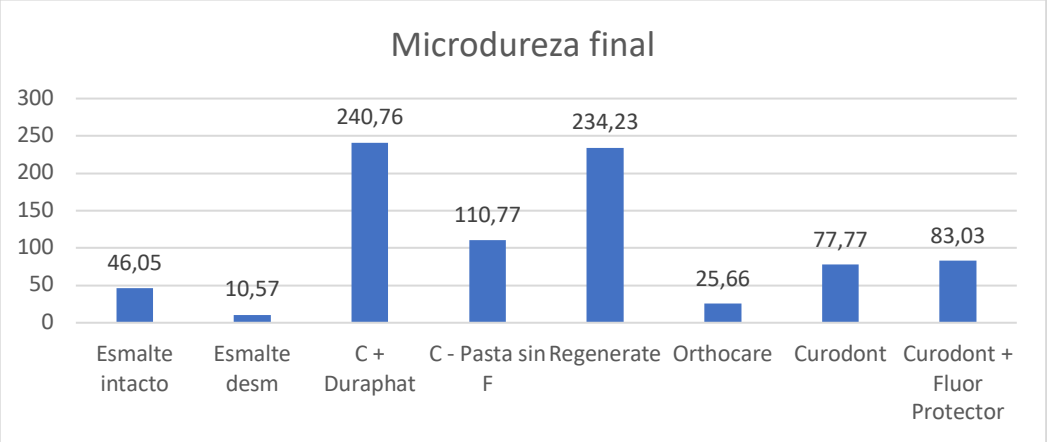


Figura 32. Resultados de microdureza final entre grupos experimentales.

En el grupo de Esmalte intacto la reducción de la microdureza inicial con respecto a la final fue de -277.52 ± 17.32 HV. Esta disminución fue significativamente superior ($p<0.001$) al registrado en el grupo Esmalte desmineralizado (237.49 ± 60.43 HV), grupo Regenerate (85.88 ± 29.73 HV), grupo Control positivo (Duraphat) (-84.54 ± 61.57 HV), grupo Control negativo (pasta sin F^-) (-210.98 ± 44.80 HV), grupo Curodont P (-242.09±35.54 HV) y grupo Curodont P + Flúor Protector (-236.19 ± 34.03 HV). Esto se podría interpretar como que el esmalte intacto es menos resistente a los ciclos de desmineralización/remineralización que los otros grupos, salvo el grupo tratado con Orthocare, en el que la disminución de la microdureza es significativamente superior que la del esmalte intacto (-298.58±15.63 HV; $p<0.001$) y, por lo tanto, el más sensible de todos a la desmineralización **(ver tabla IX; figura 33)**.

El grupo de Esmalte desmineralizado obtuvo una pérdida de microdureza de -237.49 ± 60.43 HV y presentó diferencias significativas ($p < 0.001$) con el grupo Regenerate (-85.88 ± 29.73 HV) y Control positivo (Duraphat) (-84.54 ± 61.57 HV) resistiendo menos a los ciclos de desmineralización/remineralización.

El grupo Control positivo, tratado con Duraphat durante 30 días y el grupo tratado con Regenerate presentaron la menor reducción de la microdureza inicial (-84.54 ± 61.57

HV y -85.88 ± 29.73 HV; respectivamente) y, por tanto, fueron los grupos más resistente a los ciclos de desmineralización/remineralización **(ver tabla IX; figura 33)**.

Por otra parte, en el grupo Control negativo (pasta sin F) (-210.98 ± 44.80 HV) si se observó una diferencia entre su microdureza inicial y final estadísticamente significativa ($p < 0.001$) muy superior a los grupos Regenerate (-85.88 ± 29.73 HV) y Control positivo (Duraphat) (-84.54 ± 61.57 HV), siendo mucho menos resistente al ataque ácido que estos dos grupos **(ver tabla IX; figura 33)**.

El grupo tratado con Curodont Protect (242.09 ± 35.54 HV) obtuvo diferencias significativas ($p < 0.001$) respecto a los grupos Regenerate (-85.88 ± 29.73 HV) y Control Positivo (Duraphat) (-84.54 ± 61.57 HV) quedando por debajo de ellos ($p < 0.001$). Sin embargo, al compararlo con el grupo Control Orthocare (-298.58 ± 15.63) y Esmalte intacto (-277.52 ± 17.32) ($p < 0.001$), el valor que se obtuvo con Curodont Protect se encuentra por encima de estos valores, siendo más resistente que estos últimos al ataque ácido, pero menos resistente si lo comparamos con Regenerate y Control positivo **(ver tabla IX; figura 33)**.

Las muestras tratadas con Curodont P + Fluor Protector presentaron una diferencia de -236.19 ± 34.03 entre su microdureza inicial y final; valores significativamente superiores a los grupos Regenerate (-85.88 ± 29.73), Control Positivo (Duraphat) (-84.54 ± 61.57), encontrándose por debajo y siendo menos resistente a los ciclos de desmineralización/remineralización que estos grupos. Por otra parte, al compararlo con Orthocare (-298.58 ± 15.63) el valor de Curodont P + Fluor Protector se queda por encima, siendo más resistente al ataque ácido que Orthocare ($p < 0.001$). Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas al comparar Curodont Protect y Curodont P + Flúor Protector **(ver tabla IX; figura 33)**.

Grupos experimentales	Microdureza inicial (HV)	Microdureza final (VH)	Análisis estadístico	Δ microdureza (HV)
Esmalte intacto	323.57 ± 15.79 **a**	46.05 ± 9.65	P < 0.001 @	-277.52 ± 17.32 **f**
Esmalte desmineralizado	261.11 ± 1 6.30	10.57 ± 1.86	P < 0.001 #	-237.49 ± 60.43 **b, c, e, g**
C+ (Duraphat)	325.30 ± 18.25 **a**	240.76 ± 61.91	P < 0.001 @	-84.54 ± 61.57 **g**
C- (pasta sin F)	321.75 ± 17.38 **a**	110.77 ± 37.13	P < 0.001 #	-210.98 ± 44.80 **b, c, e, g**
Regenerate	320.11 ± 14.43 **a**	234.23 ±29.37	P < 0.001 #	-85.88 ± 29.73 **g**
Orthocare	324.24 ± 14.00 **a**	25.66 ± 4.61	P < 0.001 @	-298.58 ± 15.63 b, **c, g**
Curodont	319.87 ± 18.10 **a**	77.77 ± 25.34	P < 0.001 #	-242.09 ± 35.54 **b, c, e, g**
Curodont + Fluor Protector	319.23 ± 15.00 **a**	83.03 ± 26.80	P < 0.001 #	-236.19 ± 34.03 **b, c, e**
	P<0.001 KW + DSCF			P<0.001 KW + DSCF

Tabla IX. Valores de microdureza superficial inicial y final. **Δ:** decremento en la microdureza final respecto a la inicial. KW + DSCF: test de Kruskal Wallis + test de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner. **a:** vs grupo Esmalte desmineralizado. **b:** vs grupo Regenerate; **c:** vs grupo Duraphat; **d:** vs grupo Parodontax; **e:** vs grupo Orthocare; **f:** vs grupo Curodont + Fluor protect; **g:** vs grupo Esmalte intacto. @: Test de Wilcoxon. #: T- test pareado.

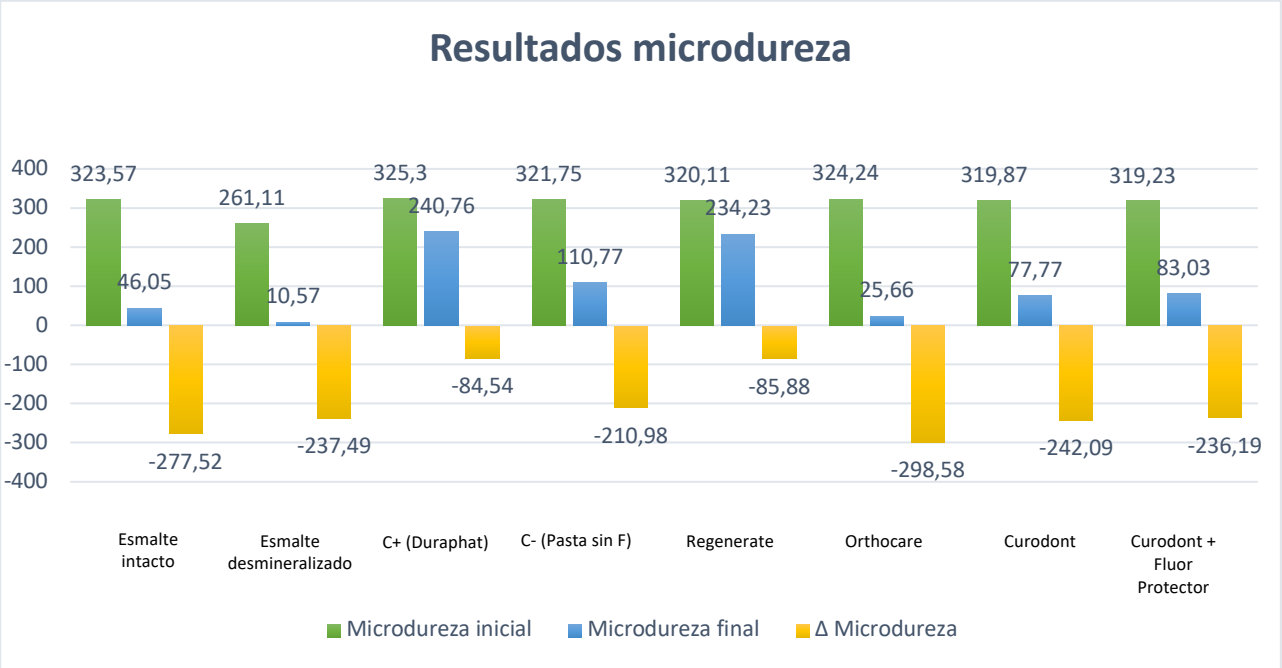


Figura 33. Resultados de microdureza inicial, microdureza final y diferencias entre microdureza inicial y final en los diferentes grupos experimentales (Δ).

Al interpretar estos valores según el tipo de agente remineralizante empleado, se puede observar que tras el empleo de barniz de flúor al 2.26% NaF (Control positivo (Duraphat) y el sistema de silicato de calcio y fosfato de sodio (Regenerate) se observa una mayor microdureza después de ser sometidos a los ciclos de desmineralización/remineralización, seguido del péptido P11-4 + Flúor (Curodont P + Fluor Protector), luego el péptido P11-4 (Curodont Protect) y en último lugar se encuentra la nanohidroxiapatia (Orthocare), la cual obtuvo valores de microdureza inferiores al grupo de Esmalte intacto, presentando muy baja resistencia a los ciclos desmineralización/remineralización **(ver figura 34)**.

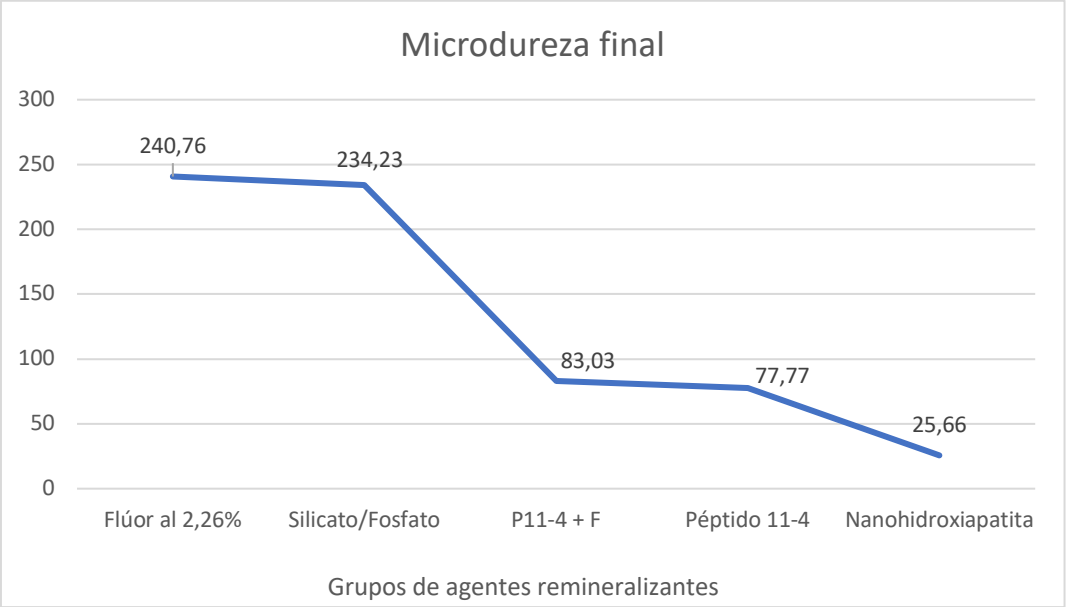


Figura 34. Microdureza final según el tipo de agente remineralizante.

5.2. Resultados obtenidos para alcanzar el objetivo específico 2

Para determinar la capacidad remineralizante de los cuatro agentes utilizados, se evaluó el contenido mineral porcentual en peso (%) después de 30 días de experimentación mediante microanálisis por dispersión dispersiva de rayos X. Se detectaron los siguientes elementos químicos: Ca, P, C, O, F, Na, Mg, Si, Cl) **(ver tabla X)**.

Grupos experimentales	Ca	P	Ca/P Ratio	C	O	F	Na	Mg	Si	Cl
Esmalte intacto	41.99±2.55	20.50±0.54	1.58±0.07 **d**	11.60±1.44	24.64±2.85	0.19±0.16 **b,c**	0.39±0.07 **d**	0.14±0.05 **c**	0.07±0.05 **b**	0.59±0.06 **b,c**
Esmalte desmineralizado	30.48±3.25 **b,c,d,e,f,g,h**	14.67±0.51 **b,c,d,e,f,g,h**	1.60±0.14	5.25±0.30 **b,c,d,e,f,g,h**	25.75±3.09	0.04±0.10 **b,c,d,e,f,g,h**	0.34±0.12	0.15±0.11	0.00±0.00 **b,c,d,e,f,g,h**	0.39±0.06 **b,c,d,e,f,g,h**
C+ (Duraphat)	40.57±2.88	20.11±1.13	1.56±0.07	13.48±4.80	23.96±3.21	0.82±0.88	0.35±0.13	0.19±0.07 **b**	0.08±0.06 **b**	0.52±0.11
C- (Pasta sin F)	42.92±2.44 **c**	20.50±0.85	1.62±0.05 **c**	11.55±1.54	24.37±2.64	0.28±0.16 **c**	0.46±0.10 **b,c**	0.13±0.06 **c**	0.06±0.04 **b**	0.56±0.07 **b**
Regenerate	42.88±3.07	20.80±0.66	1.59±0.08	11.21±1.64	23.52±3.25	0.45±0.29	0.37±0.07	0.12±0.04	0.22±0.17	0.46±0.09
Orthocare	42.27±2.10	20.36±0.52 **b**	1.60±0.06 **c**	11.50±1.74	24.47±2.43	0.28±0.24 **c**	0.42±0.09	0.16±0.09	0.14±0.13 **d**	0.55±0.09 **b**
Curodont Protect	43.20±3.11 **c**	20.73±0.51 **e**	1.61±0.09 **c**	11.84±1.29	22.98±3.30	0.22±0.12 **b,c**	0.34±0.08 **d,e**	0.11±0.05 **c**	0.08±0.05 **b**	0.59±0.07 **b,c**
Curodont Protect/Fluor Protector	43.07±4.11	20.68±0.63	1.61±0.13	11.93±1.12	23.05±4.37	0.18±0.11 **b,c**	0.32±0.09 **d,e**	0.12±0.04 **c**	0.11±0.13 **b**	0.59±0.06 **b**

Tabla X Resultados del microanálisis por grupos experimentales y elementos químicos con diferencias significativas p<0.001: **b:** vs Regenerate; **c:** vs Duraphat; **d:** vs Parodontax; **e:** vs Orthocare; **f:** vs Curodont + Fluor Protector; **g:** vs Esmalte intacto; **h:** vs Curodont. El test estadístico utilizado fue el Test de Kruskal-Wallis + Test de Dwass-Steel-Critchlow-Flinger

Calcio (Ca):

Todos los grupos presentaron valores similares, desde un máximo de 43.20 ± 3.11 en el grupo de Curodont Protect, seguido del grupo Curodont + Fluor Protector con 43.07 ± 4.11 hasta un mínimo de 30.48 ± 3.25 en el grupo de esmalte desmineralizado **(ver figura 35)**.

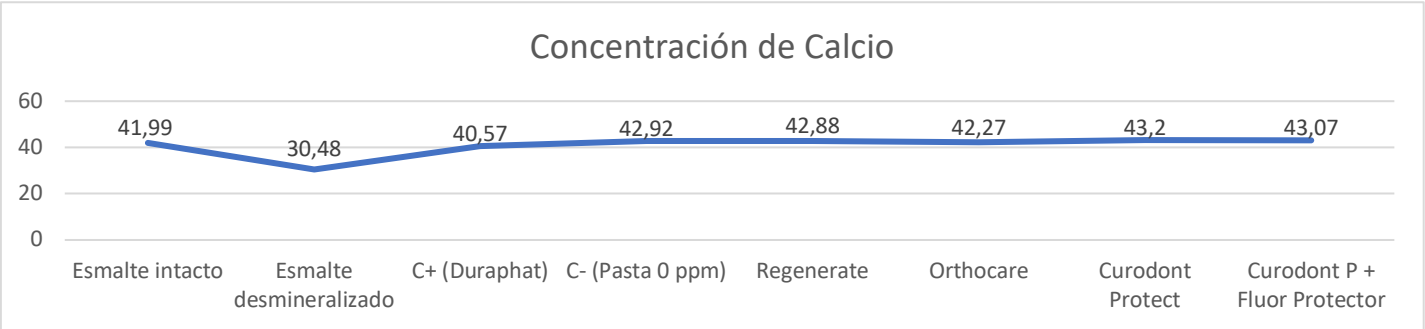


Figura 35. Concentración de Calcio (Ca) en los diferentes grupos experimentales.

Los valores obtenidos en el grupo de Esmalte desmineralizado fue el de menor concentración de Ca (30.48 ± 3.25) y obtuvo diferencias significativas con respecto al

resto de grupos experimentales: Regenerate, Control positivo (Duraphat), Control negativo (pasta sin F), Orthocare, Curodont + Fluor Protector, Esmalte intacto y Curodont Protect ($p < 0.001$) **(ver tabla XI)**.

El grupo Curodont Protect (43.20 ± 3.11) presentó diferencias significativas ($p < 0.001$) frente al grupo Control positivo (Duraphat) (40.57 ± 2.88), y se detectó una mayor concentración de Ca en Curodont Protect que en Duraphat, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos Curodont Protect y Curodont P + Fluor Protector **(ver tabla XI)**

Grupos experimentales	Esmalte intacto	Esmalte desmineralizado	C+ (Duraphat)	C- (Pasta sin F)	Regenerate	Orthocare	Curodont Protect	Curodont Protect/Fluor Protector
Concentración Ca	41.99±2.55	30.48±3.25 **b,c,d,e,f,g,h**	40.57±2.88	42.92±2.44 **c**	42.88±3.07	42.27±2.10	43.20±3.11 **c**	43.07±4.11

Tabla XI. Resultado de microanálisis por grupos experimentales y concentración del elemento químico Ca con diferencias significativas $p<0.001$: **b:** vs Regenerate; **c:** vs Duraphat; **d:** vs Parodontax; **e:** vs Orthocare; **f:** vs Curodont + Fluor Protector; **g:** vs Esmalte intacto; **h:** vs Curodont. **Diferencias entre grupos:** Test de Kruskal-Wallis. **Diferencias dos a dos:** Test de Dwass-Steel-Critchlow-Flinger.

Fósforo (P):

Se obtuvieron valores similares oscilando entre 20.80 ± 0.66 en el grupo tratado con Regenerate, seguido del Curodont Protect con 20.73 ± 0.51 y valores mínimos 14.67 ± 0.51 en el grupo de esmalte desmineralizado **(ver figura 36)**.

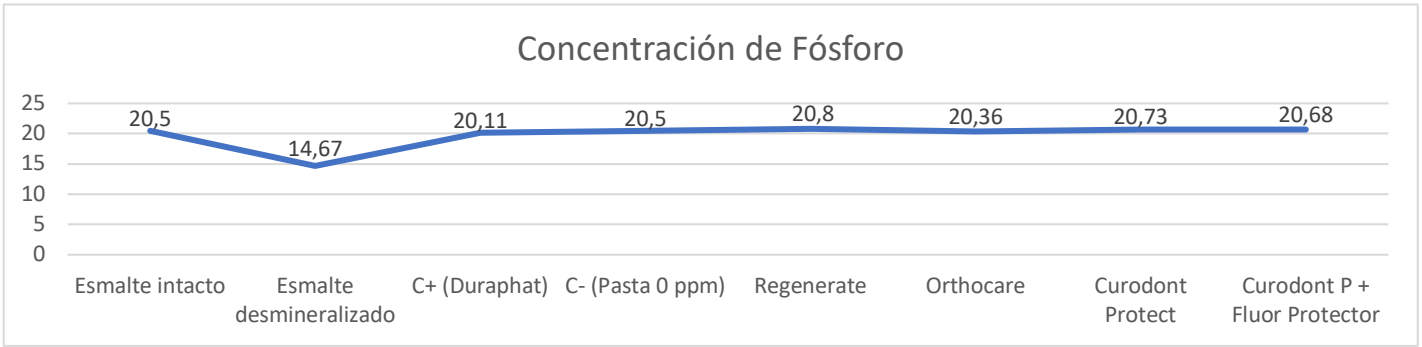


Figura 36. Concentración de Fósforo (P) en los diferentes grupos experimentales.

El grupo de Esmalte desmineralizado obtuvo diferencias significativas con respecto al resto de grupos experimentales: Regenerate, Control positivo (Duraphat), Control negativo (pasta sin F), Orthocare, Curodont + Fluor Protector, Esmalte Intacto y Curodont Protect, presentando la menor concentración de P (14.67 ± 0.51), ($p < 0.001$) **(ver tabla XII)**.

Los valores obtenidos en el grupo tratado con Orthocare 20.36 ± 0.52 fueron inferiores a los del grupo tratado con Regenerate (20.80 ± 0.66), siendo estadísticamente significativo ($p < 0.001$) **(ver tabla XII)**.

Los niveles de P en el grupo de Curodont Protect (20.73 ± 0.51) fueron superiores al grupo tratado con Orthocare (20.36 ± 0.52), existiendo diferencias significativas entre ambos ($p<0.001$) **(ver tabla XII)**.

Grupos experimentales	Esmalte intacto	Esmalte desmineralizado	C+ (Duraphat)	C- (Pasta sin F)	Regenerate	Orthocare	Curodont Protect	Curodont Protect/Fluor Protector
Concentración P	20.50±0.54	14.67±0.51 **b,c,d,e,f,g,h**	20.11±1.13	20.50±0.85	20.80±0.66	20.36±0.52 **b**	20.73±0.51 **e**	20.68±0.63

Tabla XII. Resultado de microanálisis por grupos experimentales y concentración del elemento químico P con diferencias significativas $p<0.001$: **b:** vs Regenerate; **c:** vs Duraphat; **d:** vs Parodontax; **e:** vs Orthocare; **f:** vs Curodont + Fluor Protector; **g:** vs Esmalte intacto; **h:** vs Curodont. **Diferencias entre grupos:** Test de Kruskal-Wallis. **Diferencias dos a dos:** Test de Dwass-Steel-Critchlow-Flinger.

Ca/P Ratio:

La ratio Ca/P fue relativamente homogénea en todos los grupos con algunas diferencias sobre todo en el grupo Control negativo (pasta sin F) en el cual se observó el valor máximo 1.62 ± 0.05 y el valor mínimo de 1.56 ± 0.07 en el grupo Control positivo (Duraphat) **(ver figura 37)**.

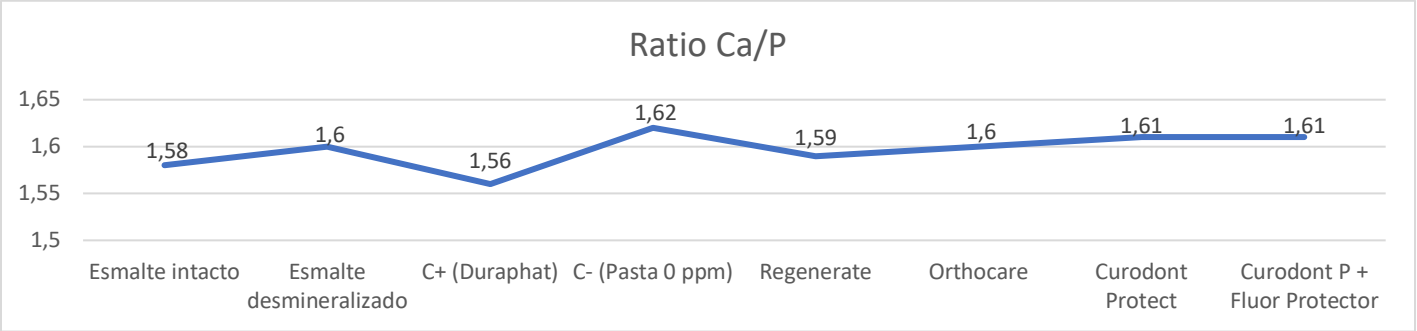


Figura 37. Ratio Ca/P en los diferentes grupos experimentales.

El grupo de Esmalte intacto (1.58 ± 0.07) presentó una Ratio Ca/P inferior al grupo Control negativo (pasta sin flúor) (1.62 ± 0.05), siendo estadísticamente significativo ($p < 0.001$) **(ver tabla XIII)**.

Los grupos como el Control negativo (pasta sin F) (1.62 ± 0.05), Orthocare (1.60 ± 0.06) y Curodont Protect (1.61 ± 0.09), mostraron diferencias significativas con respecto al Control positivo (Duraphat) (1.56 ± 0.07), con una ratio superior a este último ($p < 0.001$) **(ver tabla XIII)**.

Grupos experimentales	Esmalte intacto	Esmalte desmineralizado	C+ (Duraphat)	C- (Pasta sin F)	Regenerate	Orthocare	Curodont Protect	Curodont Protect/Fluor Protector
Ca/P Ratio	1.58±0.07 **d**	1.60±0.14	1.56±0.07	1.62±0.05 **c**	1.59±0.08	1.60±0.06 **c**	1.61±0.09 **c**	1.61±0.13

Tabla XIII. Resultado de microanálisis por grupos experimentales y Ratio Ca/P, con diferencias significativas p<0.001: **b:** vs Regenerate; **c:** vs Duraphat; **d:** vs Parodontax; **e:** vs Orthocare; **f:** vs Curodont + Fluor Protector; **g:** vs Esmalte intacto; **h:** vs Curodont. **Diferencias entre grupos:** Test de Kruskal-Wallis. **Diferencias dos a dos:** Test de Dwass-Steel-Critchlow-Flinger.

Carbono (C):

El contenido de carbono fue similar en la mayoría de los grupos; se observó el valor máximo 13.48 ± 4.80 en el grupo Control positivo (Duraphat), seguido del grupo Curodont + Fluor Protector (11.93 ± 1.12) y una concentración mínima de carbono de 5.25 ± 0.30 en las muestras de Esmalte desmineralizado (**ver figura 38).**

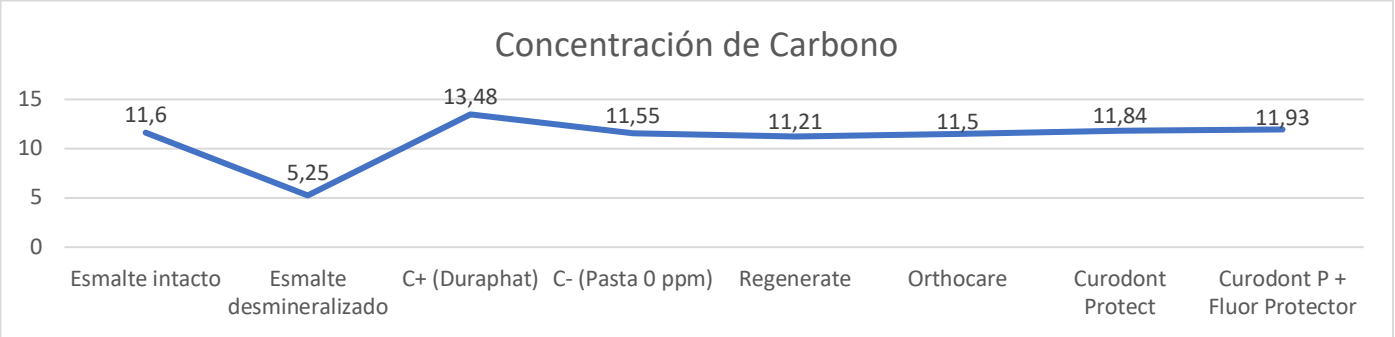


Figura 38. Concentración de Carbono (C) en los diferentes grupos experimentales.

Los valores obtenidos en el grupo de Esmalte desmineralizado (5.25 ± 0.30), se encuentran muy por debajo de los demás grupos experimentales: Regenerate (11.21±1.64), Control positivo (Duraphat) (13.48 ± 4.80), Control negativo (pasta sin F) (11.55 ± 1.54), Orthocare (11.50 ± 1.74), Curodont + Fluor Protector (11.93 ± 1.12), Esmalte Intacto (11.60 ± 1.44) y Curodont Protect (11.84 ± 1.29), presentando diferencias significativas ($p < 0.001$) **(ver tabla XIV)**.

Grupos experimentales	Esmalte intacto	Esmalte desmineralizado	C+ (Duraphat)	C- (Pasta sin F)	Regenerate	Orthocare	Curodont Protect	Curodont Protect/Fluor Protector
Concentración C	11.60±1.44	5.25±0.30 **b,c,d,e,f,g,h**	13.48±4.80	11.55±1.54	11.21±1.64	11.50±1.74	11.84±1.29	11.93±1.12

Tabla XIV. Resultado de microanálisis por grupos experimentales y concentración del elemento químico C con diferencias significativas p<0.001: **b:** vs Regenerate; **c:** vs Duraphat; **d:** vs Parodontax; **e:** vs Orthocare; **f:** vs Curodont + Fluor Protector; **g:** vs Esmalte intacto; **h:** vs Curodont. **Diferencias entre grupos:** Test de Kruskal-Wallis. **Diferencias dos a dos:** Test de Dwass-Steel-Critchlow-Flinger.

Oxígeno (O):

En cuanto a la presencia de oxígeno en las muestras analizadas los valores se encuentran entre 25.75 ± 3.09 en el grupo de Esmalte desmineralizado, seguido de 24.64 ± 2.8 en el grupo de Esmalte intacto y un valor mínimo de 22.98 ± 3.30 en el grupo tratado con Curodont Protect **(ver figura 39)**.

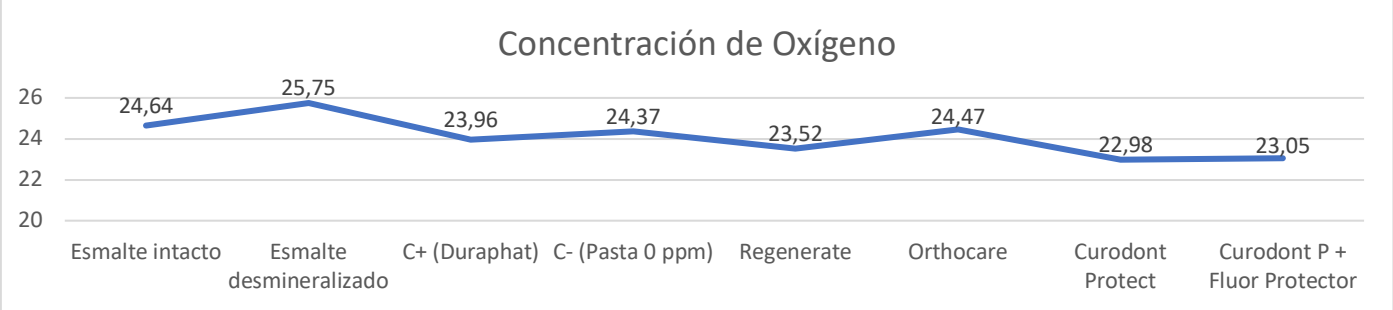


Figura 39. Concentración de Oxigeno (O) en los diferentes grupos experimentales.

No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de oxígeno entre los diferentes grupos experimentales **(ver tabla XV)**.

Grupos experimentales	Esmalte intacto	Esmalte desmineralizado	C+ (Duraphat)	C- (Pasta sin F)	Regenerate	Orthocare	Curodont Protect	Curodont Protect/Fluor Protector
Concentración O	24.64±2.85	25.75±3.09	23.96±3.21	24.37±2.64	23.52±3.25	24.47±2.43	22.98±3.30	23.05±4.37

Tabla XV. Resultado de microanálisis por grupos experimentales y concentración del elemento químico O con diferencias significativas p<0.001: **b:** vs Regenerate; **c:** vs Duraphat; **d:** vs Parodontax; **e:** vs Orthocare; **f:** vs Curodont + Fluor Protector; **g:** vs Esmalte intacto; **h:** vs Curodont. **Diferencias entre grupos:** Test de Kruskal-Wallis. **Diferencias dos a dos:** Test de Dwass-Steel-Critchlow-Flinger.

Flúor (F):

El grupo con mayor concentración de flúor fue el Control positivo (Duraphat) con valores de 0.82 ± 0.88, seguido del grupo Regenerate con una concentración 0.45 ± 0.29. El grupo con valores mínimos fue el Esmalte desmineralizado con una concentración de F de 0.04 ± 0.10, este último, significativamente diferente al resto de grupos experimentales ($p < 0.001$) **(ver figura 40; tabla XVI)**

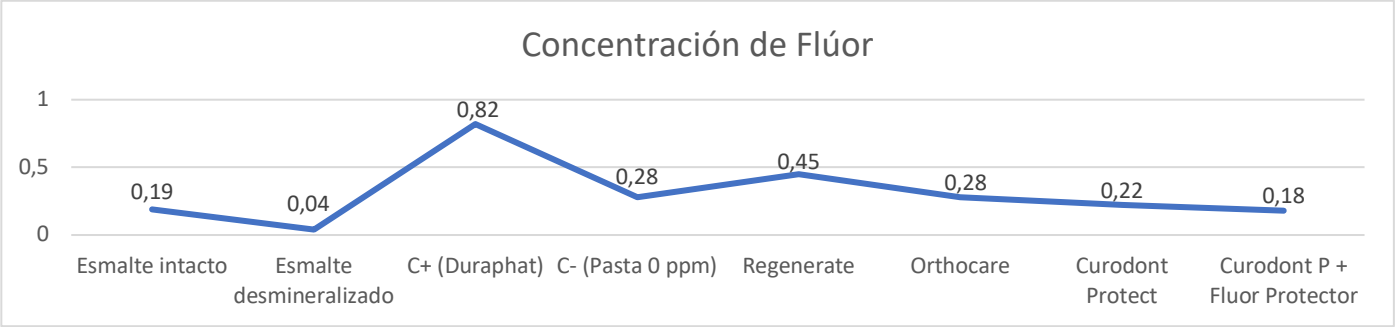


Figura 40. Concentración de Flúor (F) en los diferentes grupos experimentales.

El Control negativo (pasta sin flúor) (0.28± 0.16) y el grupo Orthocare (0.28±0.24), presentaron una concentración de F muy similar entre ellos, y a su vez inferior al valor del Control positivo (Duraphat) (0.82 ± 0.88), siendo estadísticamente significativo ($p < 0.001$) **(ver tabla XVI)**.

La concentración de F encontrada en los grupos de Esmalte intacto (0.19 ± 0.16), Curodont Protect (0.22 ± 0.12) y Curodont + Fluor Protector (0.18 ± 0.11) fue inferior a la encontrada en el grupo Regenerate (0.45 ± 0.29) y Control positivo (Duraphat) (de 0.82 ± 0.88), siendo estadísticamente significativo ($p < 0.001$) **(ver tabla XVI)**.

Grupos experimentales	Esmalte intacto	Esmalte desmineralizado	C+ (Duraphat)	C- (Pasta sin F)	Regenerate	Orthocare	Curodont Protect	Curodont Protect/Fluor Protector
Concentración F	0.19±0.16 **b,c**	0.04±0.10 **b,c,d,e,f,g,h**	0.82±0.88	0.28±0.16 **c**	0.45±0.29	0.28±0.24 **c**	0.22±0.12 **b,c**	0.18±0.11 **b,c**

Tabla XVI. Resultado de microanálisis por grupos experimentales y concentración del elemento químico F con diferencias significativas p<0.001: **b:** vs Regenerate; **c:** vs Duraphat; **d:** vs Parodontax; **e:** vs Orthocare; **f:** vs Curodont + Fluor Protector; **g:** vs Esmalte intacto; **h:** vs Curodont. **Diferencias entre grupos:** Test de Kruskal-Wallis. **Diferencias dos a dos:** Test de Dwass-Steel-Critchlow-Flinger.

Sodio (Na):

El sodio estuvo presente en mayor medida en el grupo Control negativo (pasta sin F) con valores de 0.46 ± 0.10, seguido de Orthocare con 0.42 ± 0.09 y; el grupo tratado

con Curodont + Fluor Protector presentaba la menor concentración con valores de 0.32 ± 0.09 **(ver figura 41).**

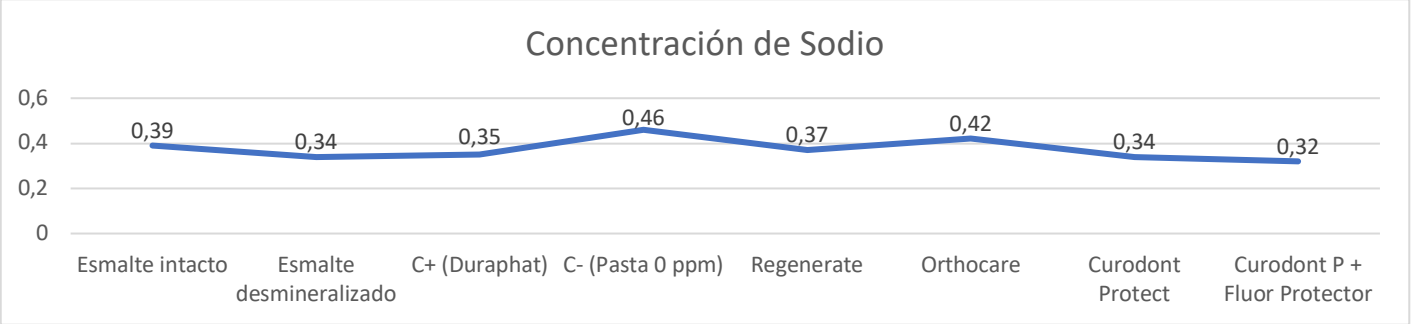


Figura 41. Concentración de Sodio (Na) en los diferentes grupos experimentales.

La concentración de Na en el grupo de Esmalte intacto (0.39±0.07) fue inferior a la encontrada en el grupo Control negativo (pasta sin F) (0.46 ± 0.10), siendo estadísticamente significativo ($p < 0.001$) **(ver tabla XVII)**.

El grupo Control negativo (pasta sin F) (0.46 ± 0.10) presentó valores superiores y estadísticamente significativos respecto a los grupos tratados con Regenerate (0.37 ± 0.07) y Control positivo (Duraphat) (0.35 ± 0.13), ($p < 0.001$) **(ver tabla XVII)**.

Los grupos Curodont Protect (0.34 ± 0.08) y Curodont Protect + Fluor Protector (0.32 ± 0.09), presentaron concentraciones de Na inferiores y estadísticamente significativos ($p < 0.001$) a las encontradas en el Control negativo (pasta sin F) (0.46 ± 0.10) y el grupo Orthocare (0.42 ± 0.09) **(ver tabla XVII**).

Grupos experimentales	Esmalte intacto	Esmalte desmineralizado	C+ (Duraphat)	C- (Pasta sin F)	Regenerate	Orthocare	Curodont Protect	Curodont Protect/Fluor Protector
Concentración Na	0.39±0.07 **d**	0.34±0.12	0.35±0.13	0.46±0.10 **b,c**	0.37±0.07	0.42±0.09	0.34±0.08 **d,e**	0.32±0.09 **d,e**

Tabla XVII. Resultado de microanálisis por grupos experimentales y concentración del elemento químico Na con diferencias significativas p<0.001: **b:** vs Regenerate; **c:** vs Duraphat; **d:** vs Parodontax; **e:** vs Orthocare; **f:** vs Curodont + Fluor Protector; **g:** vs Esmalte intacto; **h:** vs Curodont. **Diferencias entre grupos:** Test de Kruskal-Wallis. **Diferencias dos a dos:** Test de Dwass-Steel-Critchlow-Flinger.

Magnesio (Mg):

El grupo con mayor contenido en magnesio fue el Control positivo (Duraphat) con 0.19 ± 0.07 seguido del grupo Orthocare (0.16 ± 0.09). El grupo con menor concentración de Mg fue Curodont Protect con 0.11 ± 0.05 **(ver figura 42)**.

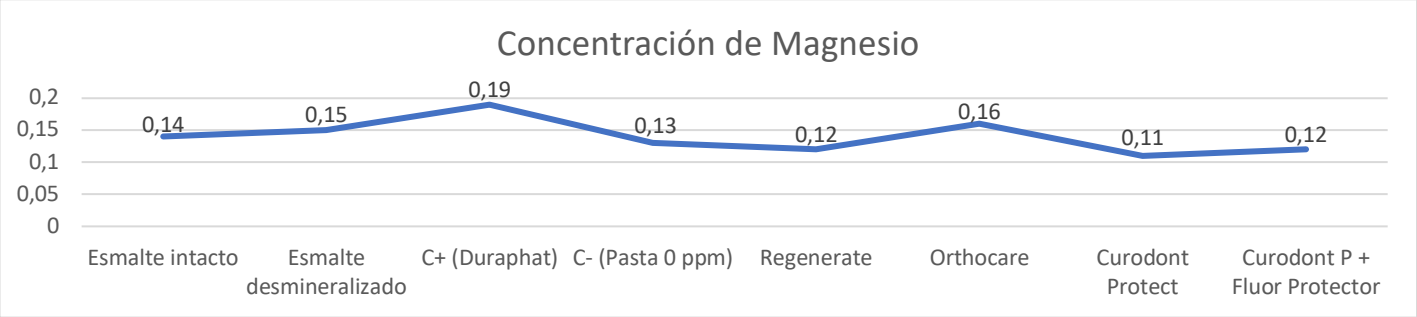


Figura 42. Concentración de Magnesio (Mg) en los diferentes grupos experimentales.

Los valores observados en los grupos de Esmalte intacto (0.14 ± 0.05), Control negativo (pasta sin F) (0.13 ± 0.06), Curodont Protect (0.11± 0.05) y Curodont Protect + Fluor Protector (0.12 ± 0.04) son inferiores y estadísticamente diferentes ($p < 0.001$) a los valores del grupo Control positivo (Duraphat) (0.19 ± 0.07) **(ver Tabla XVIII)**. El grupo Control positivo (Duraphat) (0.19 ± 0.07) obtuvo valores superiores con respecto al grupo Regenerate (0.12 ± 0.04), siendo estadísticamente significativo ($p < 0.001$) **(ver Tabla XVIII**).

Grupos experimentales	Esmalte intacto	Esmalte desmineralizado	C+ (Duraphat)	C- (Pasta sin F)	Regenerate	Orthocare	Curodont Protect	Curodont Protect/Fluor Protector
Concentración Mg	0.14±0.05 **c**	0.15±0.11	0.19±0.07 **b**	0.13±0.06 **c**	0.12±0.04	0.16±0.09	0.11±0.05 **c**	0.12±0.04 **c**

Tabla XVIII. Resultado de microanálisis por grupos experimentales y concentración del elemento químico Mg con diferencias significativas p<0.001: **b:** vs Regenerate; **c:** vs Duraphat; **d:** vs Parodontax; **e:** vs Orthocare; **f:** vs Curodont + Fluor Protector; **g:** vs Esmalte intacto; **h:** vs Curodont. **Diferencias entre grupos:** Test de Kruskal-Wallis. **Diferencias dos a dos:** Test de Dwass-Steel-Critchlow-Flinger.

Silicio (Si):

La mayor concentración de silicio se encontró en el grupo tratado con Regenerate (0.22 ± 0.17), seguido del grupo Orthocare con una concentración de 0.14 ± 0.13. En el grupo de Esmalte desmineralizado se obtuvo 0.00 ± 0.00 de silicio, siendo el único grupo en el que no estuvo presente este elemento químico **(ver figura 43)**.

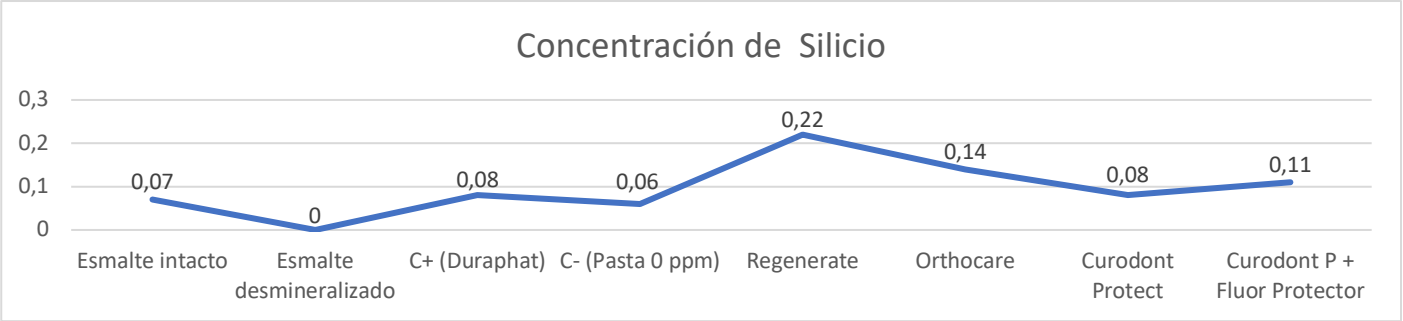


Figura 43. Concentración de Silicio (Si) en los diferentes grupos experimentales.

Las concentraciones de Si en los grupos: Esmalte intacto (0.07 ± 0.05), Control positivo (Duraphat) (0.08 ± 0.06), Control negativo (pasta sin F) (0.06 ± 0.04), Curodont Protect (0.08 ± 0.05) y Curodont Protect + Fluor Protector (0.11 ± 0.13) fueron significativamente inferiores con respecto a las concentraciones del grupo tratado con Regenerate (0.22 ± 0.17), ($p < 0.001$) **(ver tabla XIX)**.

El grupo de Esmalte desmineralizado no presentaba Si en su composición, estableciendo diferencias significativas con el resto de los grupos en los que si había presencia de este elemento químico ($p < 0.001$) **(ver tabla XIX)**.

Los valores observados en el grupo tratado con Orthocare (0.14±0.13) se encuentran muy por encima del grupo Control negativo (pasta sin F) (0.06 ± 0.04), siendo estadísticamente significativo ($p < 0.001$) **(ver tabla XIX)**.

Grupos experimentales	Esmalte intacto	Esmalte desmineralizado	C+ (Duraphat)	C- (Pasta sin F)	Regenerate	Orthocare	Curodont Protect	Curodont Protect/Fluor Protector
Concentración Si	0.07±0.05 **b**	0.00±0.00 **b,c,d,e,f,g,h**	0.08±0.06 **b**	0.06±0.04 **b**	0.22±0.17	0.14±0.13 **d**	0.08±0.05 **b**	0.11±0.13 **b**

Tabla XIX. Resultado de microanálisis por grupos experimentales y concentración del elemento químico Si con diferencias significativas p<0.001: **b:** vs Regenerate; **c:** vs Duraphat; **d:** vs Parodontax; **e:** vs Orthocare; **f:** vs Curodont + Fluor Protector; **g:** vs Esmalte intacto; **h:** vs Curodont. **Diferencias entre grupos:** Test de Kruskal-Wallis. **Diferencias dos a dos:** Test de Dwass-Steel-Critchlow-Flinger.

Cloro (Cl):

Las concentraciones de cloro fueron coincidentes en los grupos Esmalte intacto y el grupo tratado con Curodont Protect + Fluor Protector con valores de 0.59 ± 0.06 para ambos grupos. Estas cifras fueron muy similares al grupo Curodont Protect con 0.59 ± 0.07, encontrándose entre los valores más altos. El valor mínimo se detectó en el grupo de Esmalte desmineralizado con 0.39 ± 0.06 **(ver figura 44)**.

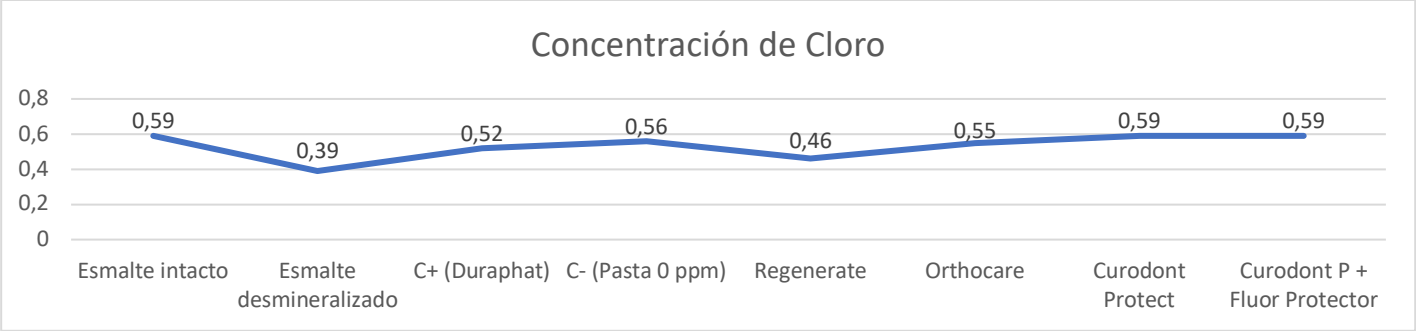


Figura 44. Concentración de Cloro (Cl) en los diferentes grupos experimentales.

Los resultados observados en los grupos de Esmalte intacto (0.59 ± 0.06) y Curodont Protect (0.59 ± 0.07) fueron superiores y estadísticamente significativos respecto a los valores del grupo Regenerate (0.46 ± 0.09) y Control positivo (Duraphat) (0.52 ± 0.11), ($p < 0.001$) **(ver Tabla XX)**.

Las concentraciones de Cl del grupo Control negativo (pasta sin F) (0.56 ± 0.07), Orthocare (0.55 ± 0.09) y Curodont + Fluor Protector (0.59 ± 0.06) fueron superiores a las encontradas en el grupo Regenerate (0.46 ± 0.09), existiendo diferencias significativas entre ellos ($p < 0.001$) **(ver Tabla XX)**.

Grupos experimentales	Esmalte intacto	Esmalte desmineralizado	C+ (Duraphat)	C- (Pasta sin F)	Regenerate	Orthocare	Curodont Protect	Curodont Protect/Fluor Protector
Concentración Cl	0.59±0.06 **b,c**	0.39±0.06 **b,c,d,e,f,g,h**	0.52±0.11	0.56±0.07 **b**	0.46±0.09	0.55±0.09 **b**	0.59±0.07 **b,c**	0.59±0.06 **b**

Tabla XX. Resultado de microanálisis por grupos experimentales y concentración del elemento químico Cl con diferencias significativas $p<0.001$: **b:** vs Regenerate; **c:** vs Duraphat; **d:** vs Parodontax; **e:** vs Orthocare; **f:** vs Curodont + Fluor Protector; **g:** vs Esmalte intacto; **h:** vs Curodont. **Diferencias entre grupos:** Test de Kruskal-Wallis. **Diferencias dos a dos:** Test de Dwass-Steel-Critchlow-Flinger.

5.3. Resultados para alcanzar el objetivo específico 3:

1. Esmalte intacto:

En el grupo de Esmalte intacto se visualiza una superficie con zonas homogéneas y otras zonas con pequeñas ondulaciones. Se observan numerosos depósitos alargados en forma de varillas y otros más cortos con forma más cuadrada, debido a la posible degradación de los cristales del esmalte. Estos depósitos, se encuentran formando capas de aglomerados en diversas zonas de la superficie del esmalte **(ver figura 45)**.

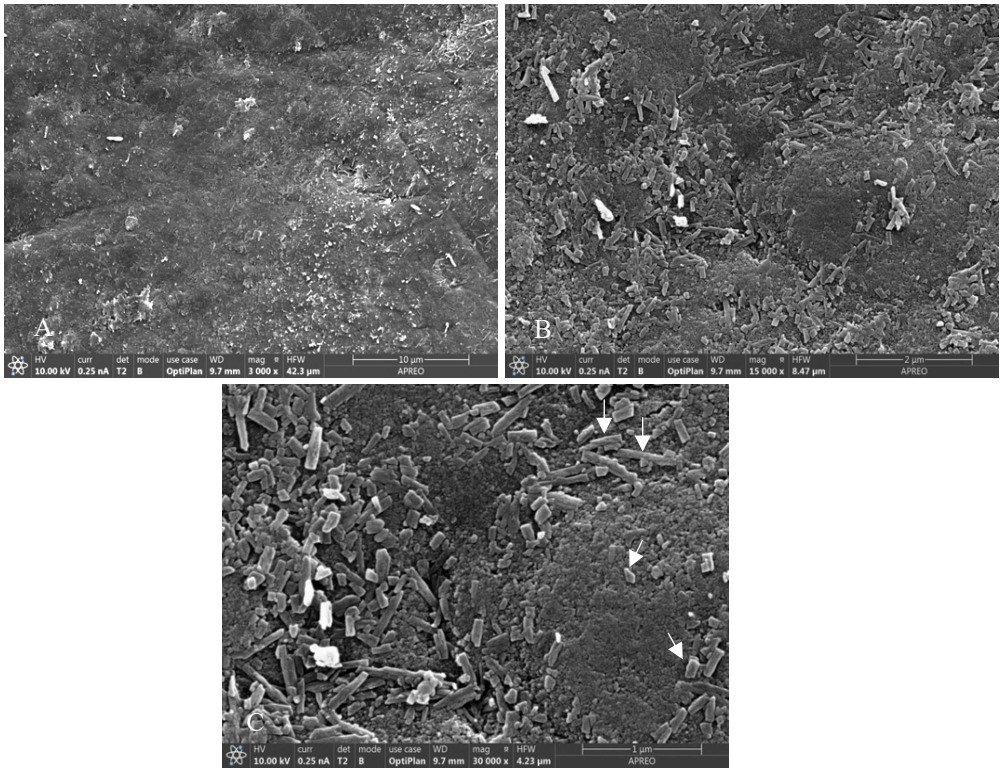


Figura 45. Microfotografías con FESEM de la superficie del grupo de Esmalte intacto, (A): imagen tomada a 3000 x, (B): 15 000 x y (C): 30 000 x. Depósitos alargados con forma de varilla y depósitos más cortos con forma cuadrada (punta de flecha).

2. Esmalte desmineralizado:

En el grupo de Esmalte desmineralizado se observa una superficie con diversas irregularidades donde se diferencian zonas con líneas bien marcadas y alargadas, con forma de varillas (puede interpretarse como primas del esmalte), y otras zonas más lisas y aplanadas ubicadas entre las líneas, siguiendo un patrón más esferoidal similar a un encaje (pueden interpretarse como material orgánico presente alrededor de los prismas, substancia interprismática) **(ver Figura 46)**.

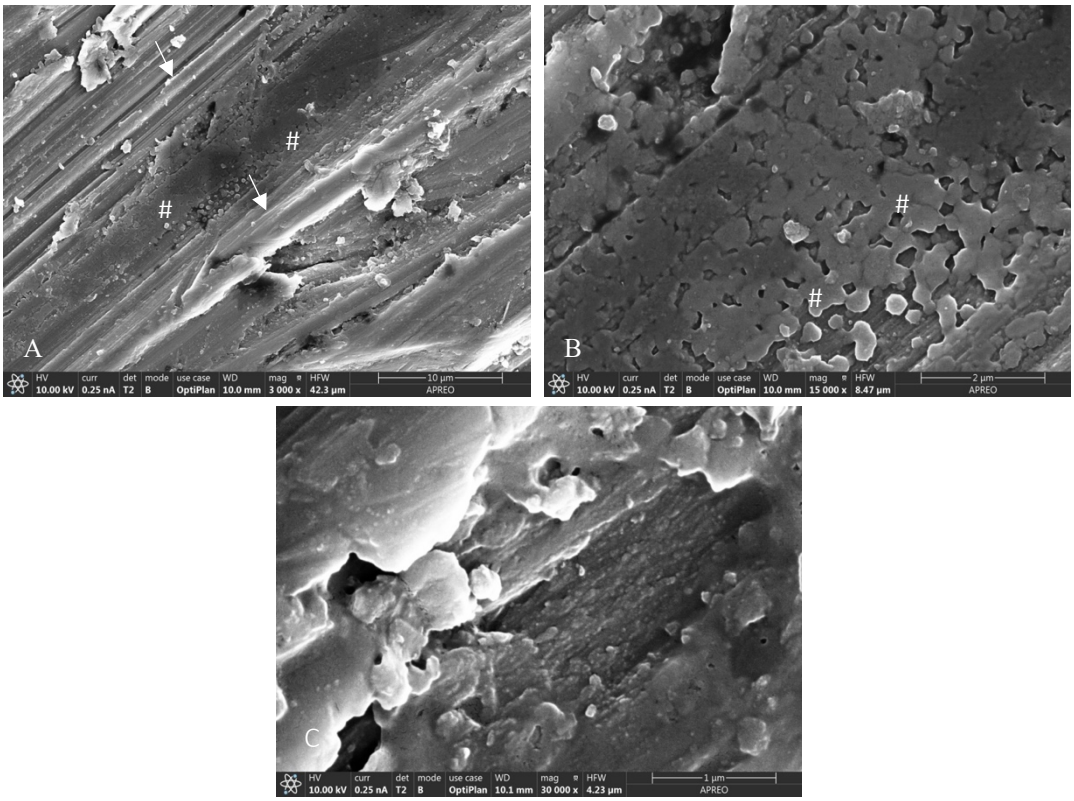


Figura 46. Microfotografías con FESEM de la superficie del grupo Esmalte desmineralizado, (A): imagen tomada a 3000 x, (B): 15 000 x y (C): 30 000 x. Líneas bien marcadas con forma de varillas o prismas del esmalte (puntas de flecha) y zonas con patrón esferoidal similar a un encaje (#).

3. Control positivo (Duraphat)

En el grupo Control positivo (Duraphat) también se aprecia una superficie densa e irregular, con áreas más suaves y onduladas y, otras zonas más irregulares y rugosas, caracterizada por la presencia de diversos poros, los cuales se encuentran en su mayoría obliterados por una capa de aglomerados de fluoruro cálcico que dibujan un punteado en la mayor parte de la superficie del esmalte **(ver figura 47)**.

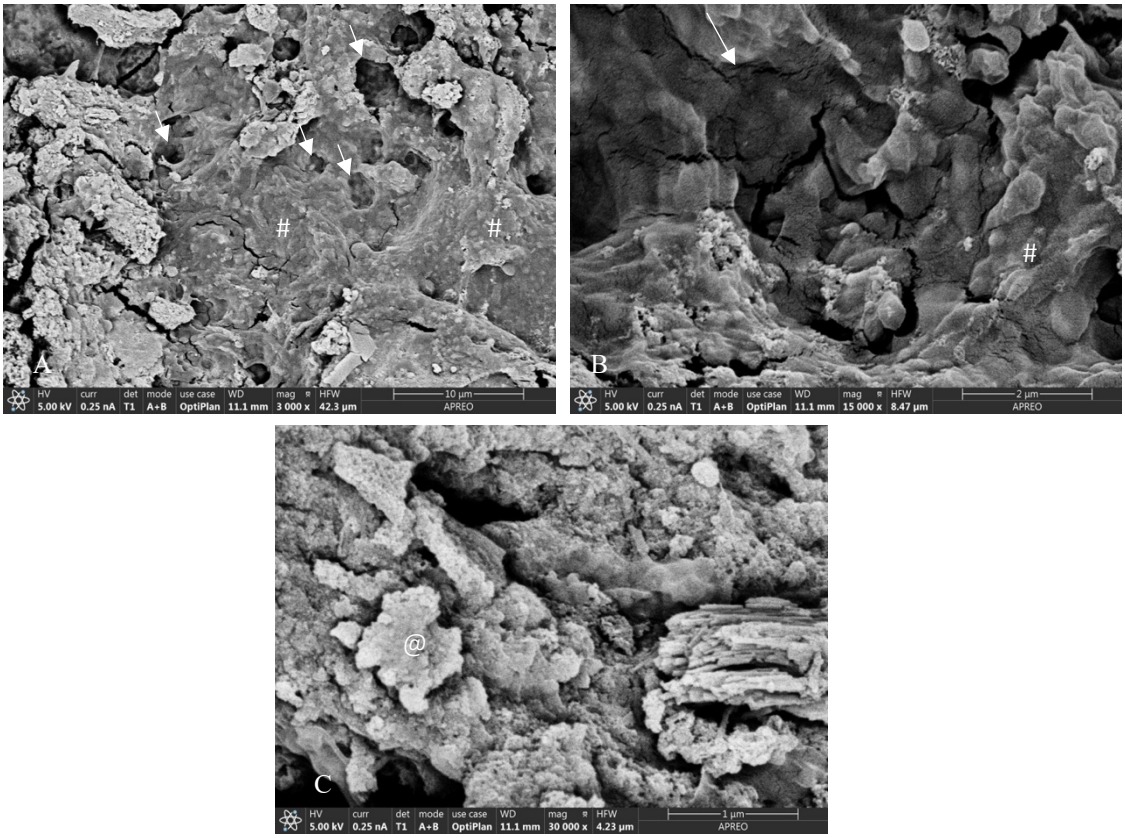


Figura 47. Microfotografías con FESEM de la superficie del grupo Control positivo (Duraphat), (A): imagen tomada a 3000 x, (B): 15 000 x y (C): 30 000 x. Presencia de diversos poros (puntas de flecha) en su mayoría obliterados por una capa de conglomerados esféricos que dibujan un punteado (#). Aglomerados de fluoruro cálcico (@).

4. Control negativo (pasta sin F)

En el grupo Control negativo (pasta sin F), se aprecia una superficie muy irregular, con aspecto moteado y rugoso. Se observan múltiples microporos y numerosos cristales en forma de varillas finas y alargadas. Se puede comprobar que existe una disposición más irregular y desorganizada de dichas varillas y múltiples espacios intercristalinos a lo largo de toda la superficie del esmalte, debido a la degradación de los cristales del esmalte (**ver figura 48)**.

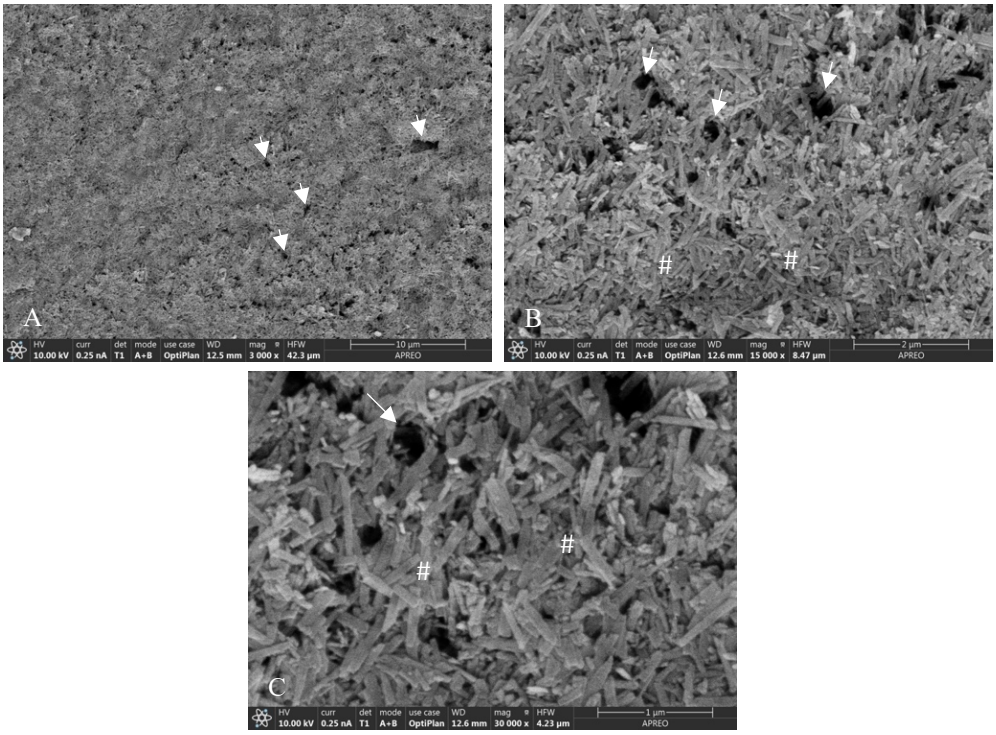


Figura 48. Microfotografías con FESEM de la superficie del grupo Control negativo (pasta sin F), (A): imagen tomada a 3000 x, (B): 15 000 x y (C): 30 000 x. Presencia de numerosos microporos (puntas de flecha) y varillas finas y alargadas con disposición irregular (#).

5. Regenerate:

En el grupo tratado con Regenerate se observa una superficie más homogénea y densa, con menos irregularidades, se pueden apreciar zonas con diversos poros. Estos se encuentran obliterados por una capa de aglomerados de fluoruro cálcico en la superficie que se alternan con otras zonas más planas y homogéneas. Las áreas planas también presentan depósito de partículas redondeadas y de menor tamaño que las encontradas dentro de los poros debido a la remineralización del esmalte **(ver figura 49)**.

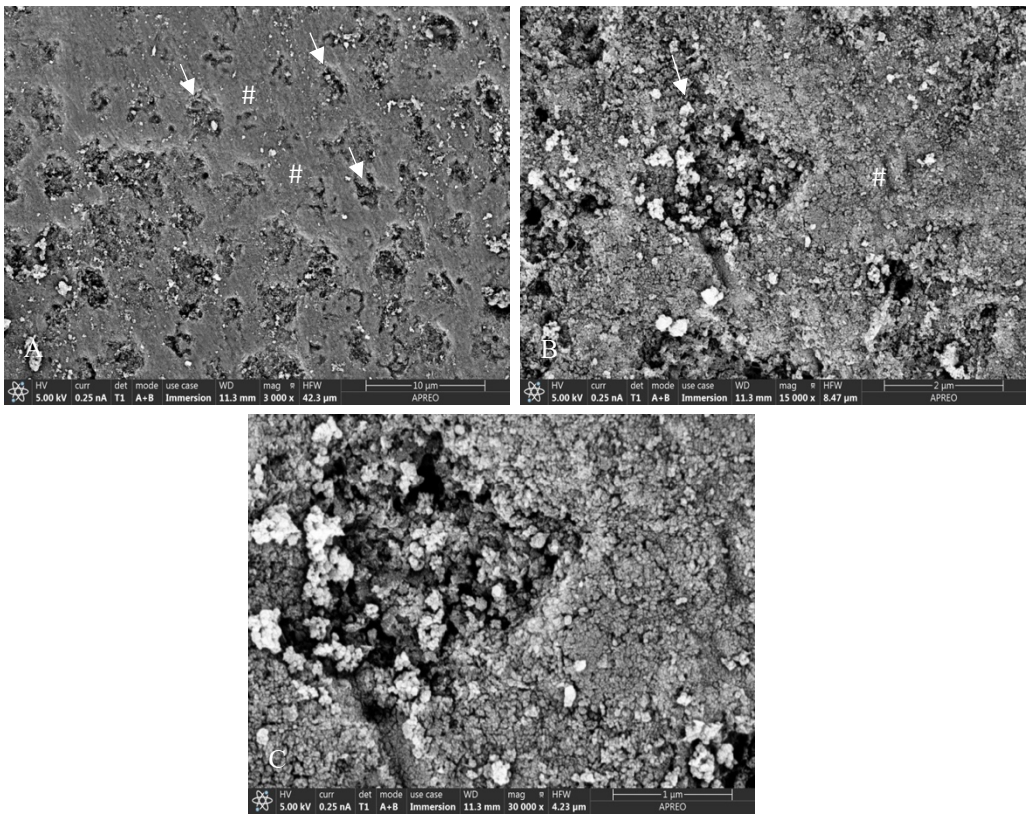


Figura 49. Microfotografías con FESEM de la superficie del grupo tratado con Regenerate, (A): imagen tomada a 3000 x, (B): 15000 x y (C): 30000 x. Poros obliterados por una capa de depósitos esferoidales (puntas de flecha) y zonas más planas con depósito de partículas redondeadas y de menor tamaño (#).

6. Orthocare:

En el grupo tratado con Orthocare se observa una superficie irregular, con numerosas porosidades y pequeñas depresiones, se aprecian múltiples varillas finas y alargadas las cuales se encuentran formando una especie de entramado desorganizado donde se pueden apreciar los espacios intercristalinos debido a la degradación de los cristales del esmalte **(ver figura 50)**. Son imágenes muy parecidas a las observadas en el grupo Control negativo (pasta sin F) **(ver figura 48)**.

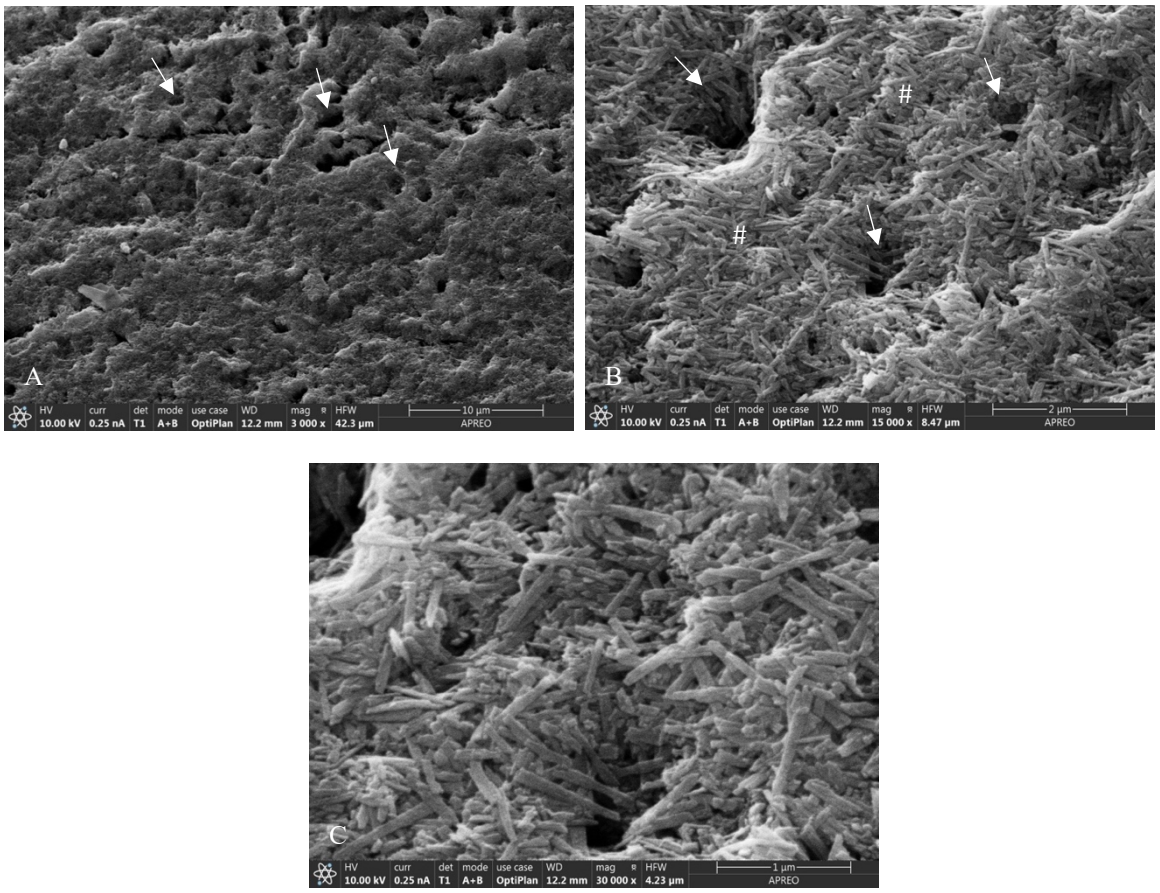


Figura 50. Microfotografías con FESEM de la superficie del grupo tratado con Orthocare, (A): imagen tomada a 3000 x, (B): 15000 x y (C): 30000 x. Zonas con poros abiertos (puntas de flecha) y entramado de varillas finas y alargadas (#).

7. Curodont Protect

En el grupo tratado con Curodont Protect se aprecia una superficie con diversas irregularidades y depresiones, se observan numerosos poros obliterados por una capa de aglomerados pequeños y redondeados y, también por diversas varillas alargadas y finas **(ver figura 51)**. Presenta una superficie similar a la observada en el grupo tratado con Regenerate, pero, a diferencia de este, también presenta varillas obliterando los poros y no solo partículas redondeadas (posible remineralización) **(ver figura 49)**.

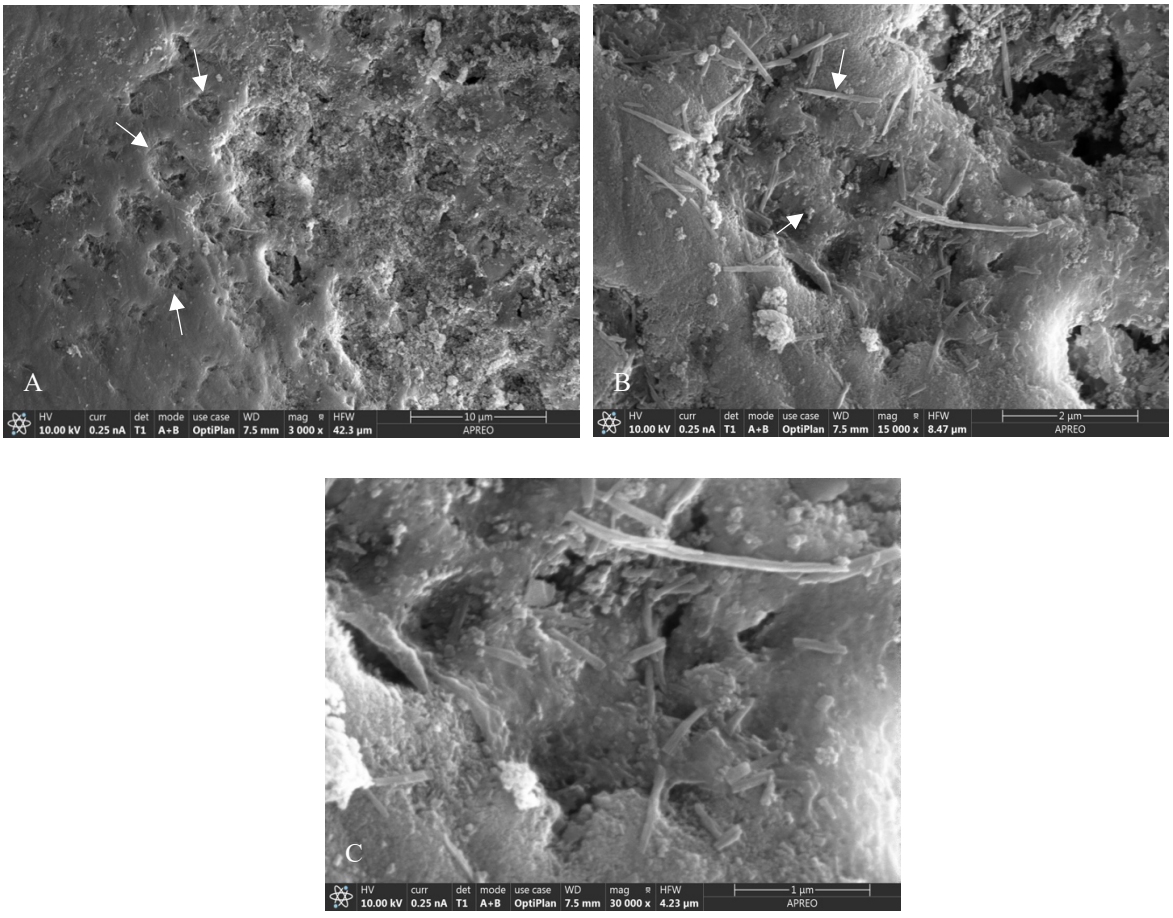


Figura 51. Microfotografías con FESEM de la superficie del grupo Curodont Protect, (A): imagen tomada a 3000 x, (B): 15000 x y (C): 30000 x. Poros obliterados por una capa de depósitos redondeados y con diversas varillas finas y alargadas (puntas de flecha).

8. Curodont Protect + Fluor Protector

En el grupo tratado con Curodont Protect + Fluor Protector se observa una superficie moteada, con ondulaciones, de aspecto áspero y agrietado. Se aprecian diversos montículos irregulares, los cuales presentan numerosas grietas y poros. Puede observarse a través de la apertura de las grietas unos precipitados en forma de láminas, capas o escamas y algunas varillas de forma aislada en algunos puntos de la superficie del esmalte, debido a una posible remineralización. **(ver figura 52)**.

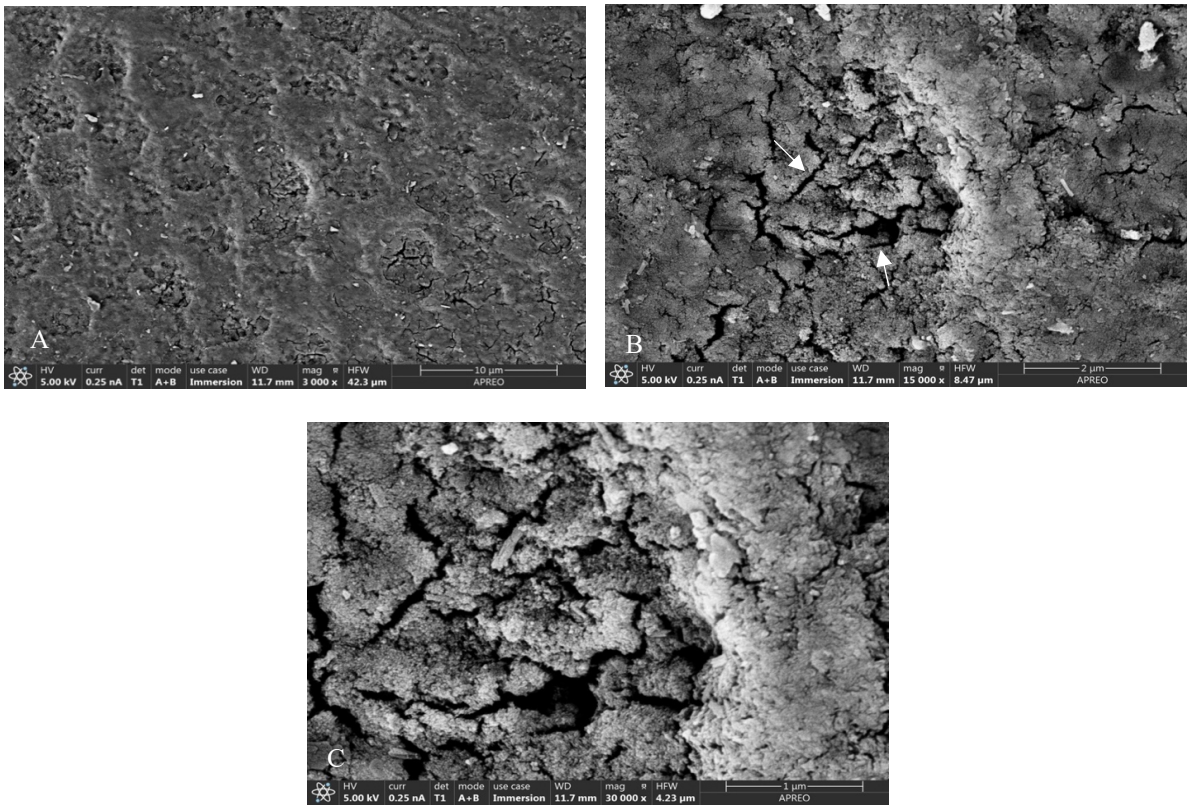


Figura 52. Microfotografías con FESEM de la superficie del grupo Curodont Protect + Fluor Protector, (A): imagen tomada a 3000 x, (B): 15000 x y (C): 30000 x. Grietas y poros de los diversos montículos presentes en la superficie del esmalte (puntas de flecha).

5.4. Resultados para alcanzar el objetivo específico 4:

El grupo con mayor rugosidad superficial fue el Control positivo (Duraphat) con valores de 205.89 ± 163.28 nm, seguido del grupo tratado con Curodont + Fluor Protector con resultados 197.42±154.03 nm y luego Orthocare con 190.20 ± 86.14 nm **(ver figura 53)**.

El grupo con menor rugosidad y que, por tanto, presentaba una superficie más homogénea fue el Control negativo (pasta sin F) con 93.01±44.99 nm **(ver figura 53)**.

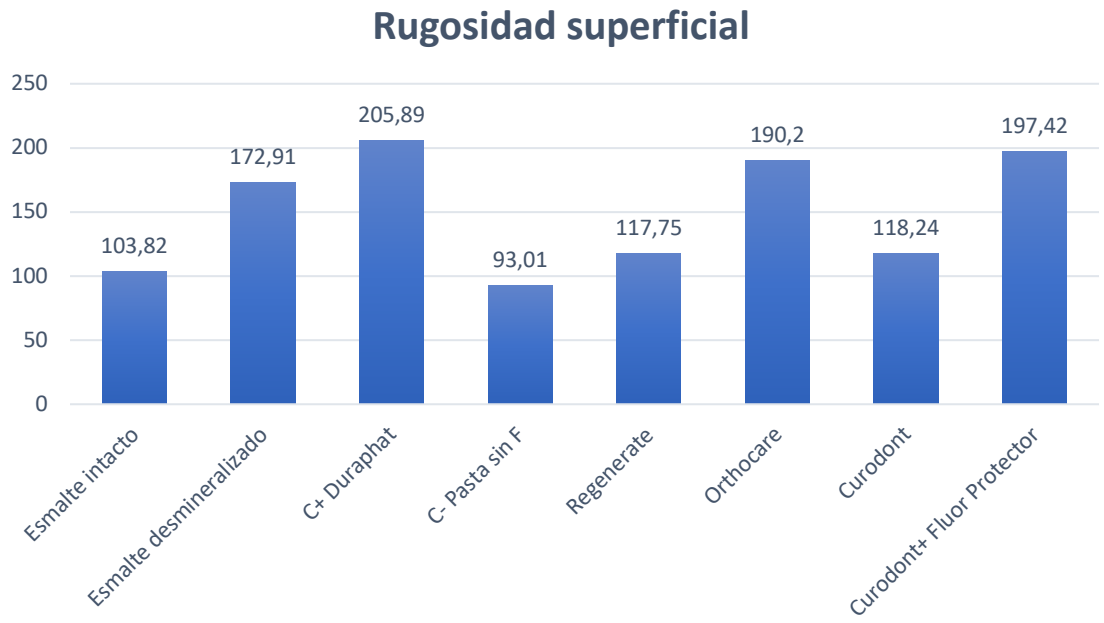


Figura 53. Valores de rugosidad superficial de los diferentes grupos experimentales.

Si comparamos las diferencias de rugosidad superficial media entre los diferentes grupos experimentales se puede apreciar que en el grupo de Esmalte intacto existe una rugosidad media de 103.82 ± 38,84 nm, un valor significativamente diferente frente a los grupos Control positivo (Duraphat) (205.89 ± 163.28), Orthocare (190.20±86.14), Curodont + Fluor Protector (197.42 ± 154.03) y Esmalte desmineralizado (172.91 ± 63.92), quedando muy por debajo de estos grupos ($p < 0.001$) **(ver tabla XXI)**.

El grupo de Esmalte desmineralizado (172.91 ± 63.92) presentó un valor de rugosidad más alto y, estadísticamente significativo si se compara con el grupo Regenerate (117.75 ± 84.75), Control negativo (pasta sin F) (93.01± 44.99) y Curodont Protect (118.24± 65.65) ($p < 0.001$) **(ver tabla XXI)**.

El grupo Control positivo (Duraphat) (205.89 ± 163.28) presentó diferencias significativas frente al grupo Regenerate (117.75 ± 84.75), y se detectó una mayor rugosidad respecto a este último ($p < 0.001$) **(ver tabla XXI)**.

En el grupo Control negativo (pasta sin F) (93.01± 44.99) se observó una menor rugosidad superficial que en el grupo Control positivo (Duraphat) (205.89 ± 163.28) con diferencias significativas ($p < 0.001$**) (ver tabla XXI)**.

GRUPOS	N	Media±SD	Mediana	Mínimo	Máximo
G1: Esmalte intacto	60	103.82±38.84 **c,e,f,g**	93.84	35.49	206.10
G2: Esmalte desmineralizado	60	172.91±63.92 **b,d,h**	158.65	74.82	431.10
G C+ (Duraphat)	60	205.89±163.28 **b**	148.60	42.77	804.50
G C- (pasta sin F)	60	93.01±44.99 **c**	77.91	28.24	196.10
G3: Regenerate	60	117.75±84.75	95.95	36.53	462.30
G4: Orthocare	60	190.20±86.14 **b,d**	160.50	70.51	439.00
G5: Curodont Protect	60	118.24±65.65 **c,e,f**	106.60	37.49	393.40
G6: Curodont + Fluor Protector	60	197.42±154.03 **b,d**	143.50	44.76	652.80

Tabla XXI. Rugosidad superficial media de los distintos grupos experimentales diferencias significativas $p < 0.001$: **b:** vs Regenerate; **c:** vs C+ (Duraphat); **d:** vs C- (pasta sin F); **e:** vs Orthocare; **f:** vs Curodont + Fluor Protector; **g:** vs Esmalte Desmineralizado; **h:** vs Curodont Protect. **Diferencias entre grupos:** Test de Kruskal-Wallis. **Diferencias dos a dos:** Test de Dwass-Steel-Critchlow-Flinger.

El grupo tratado con Regenerate (117.75 ± 84.75) obtuvo unos valores de rugosidad media sin diferencias significativas con el resto de los grupos experimentales **(ver tabla XXI)**.

El grupo Orthocare (190.20±86.14) presentó una mayor rugosidad superficial que los grupos Regenerate (117.75 ± 84.75) y Control negativo (pasta sin F) (93.01± 44.99), siendo estadísticamente significativo ($p < 0.001$) **(ver tabla XXI)**.

El grupo Curodont Protect (118.24± 65.65) obtuvo un valor de rugosidad media inferior a los grupos Control positivo (Duraphat) (205.89 ± 163.28), Orthocare (190.20±86.14) y Curodont + Fluor Protector (197.42 ± 154.03), presentando diferencias significativas respecto a estos grupos ($p < 0.001$) **(ver tabla XXI)**.

El grupo tratado con Curodont P + Fluor Protector presentó una rugosidad media de 197.42 ± 154.03, siendo mucho mayor que los valores de los grupos Regenerate (117.75 ± 84.75) y Control negativo (pasta sin F) (93.01± 44.99), siendo estadísticamente significativo ($p < 0.001$) **(ver tabla XXI)**.

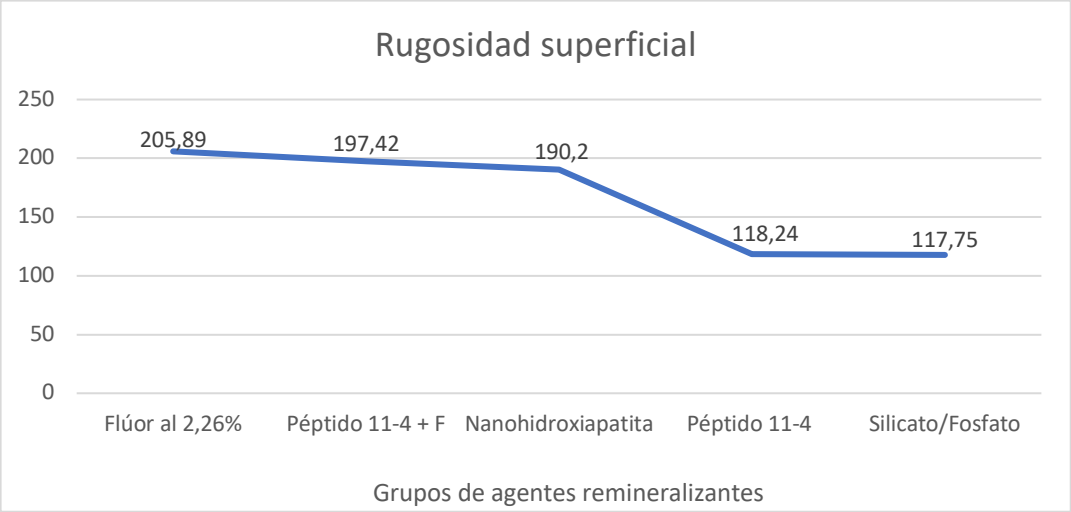


Figura 54. Valores de rugosidad superficial media en esmalte tras el empleo de los agentes remineralizantes.

Al analizar los resultados por grupos de agentes remineralizantes, se puede observar que el flúor al 2,26% presentó una mayor rugosidad superficial, seguido del grupo del péptido P11-4 + Flúor, la nanohidroxiapatita, el péptido P11-4 y por último y con menor rugosidad superficial el grupo de silicato/fosfato **(ver figura 54)**.

En cuanto al análisis topográfico de las imágenes obtenidas en 2D y 3D con AFM, se apreciaron los siguientes resultados:

1. Esmalte Intacto:

El grupo de esmalte intacto presentó una rugosidad superficial media 103.82 ± 38.84 nm. En cuanto al aspecto topográfico se puede apreciar una superficie irregular, con zonas de numerosos picos altos y bien pronunciados y otras zonas donde los picos son más cortos, observándose una serie de depresiones profundas en el relieve de la muestra **(ver figura 55)**.

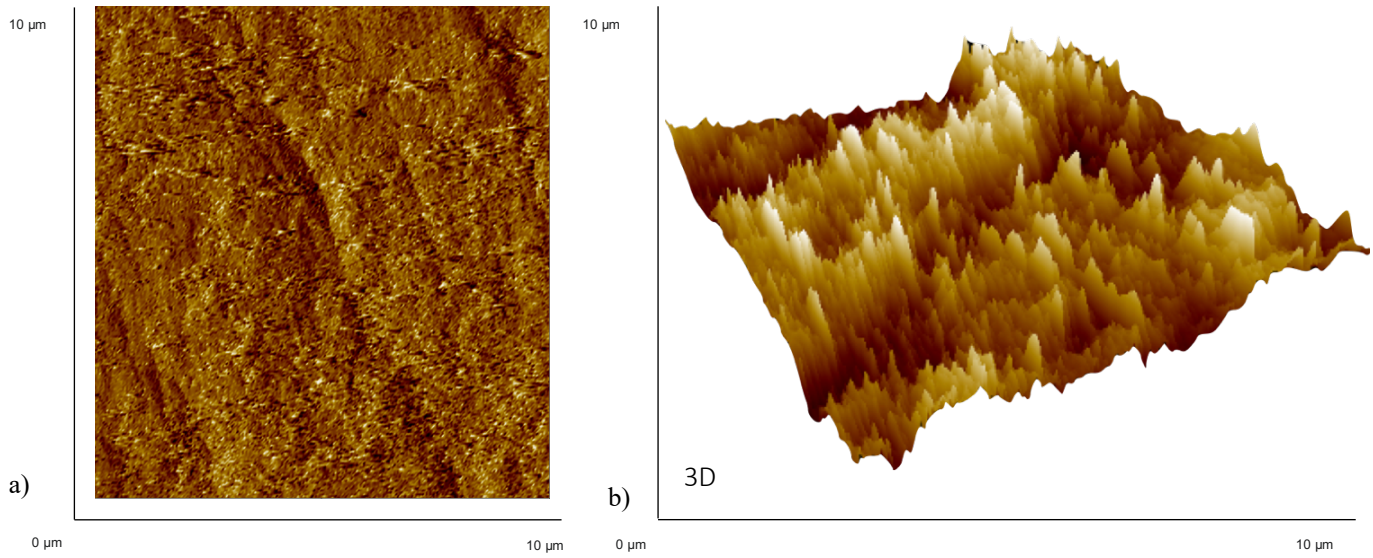


Figura 55. Micrografía de fuerza atómica en área de 10 x 10 µm^2 del grupo de esmalte intacto, imagen a) en 2D y b) en 3D.

2. Esmalte desmineralizado

El grupo de esmalte desmineralizado presentó una rugosidad superficial de 172.91 ± 63.92 nm. En cuanto al aspecto topográfico se puede observar una superficie ondulada, con picos anchos y redondeados similar a una imagen en forma de panal lo cual podría interpretarse como una disolución de los prismas del esmalte, también se pueden apreciar diversas depresiones profundas en el relieve que pueden interpretarse como poros abiertos **(ver figura 56)**.

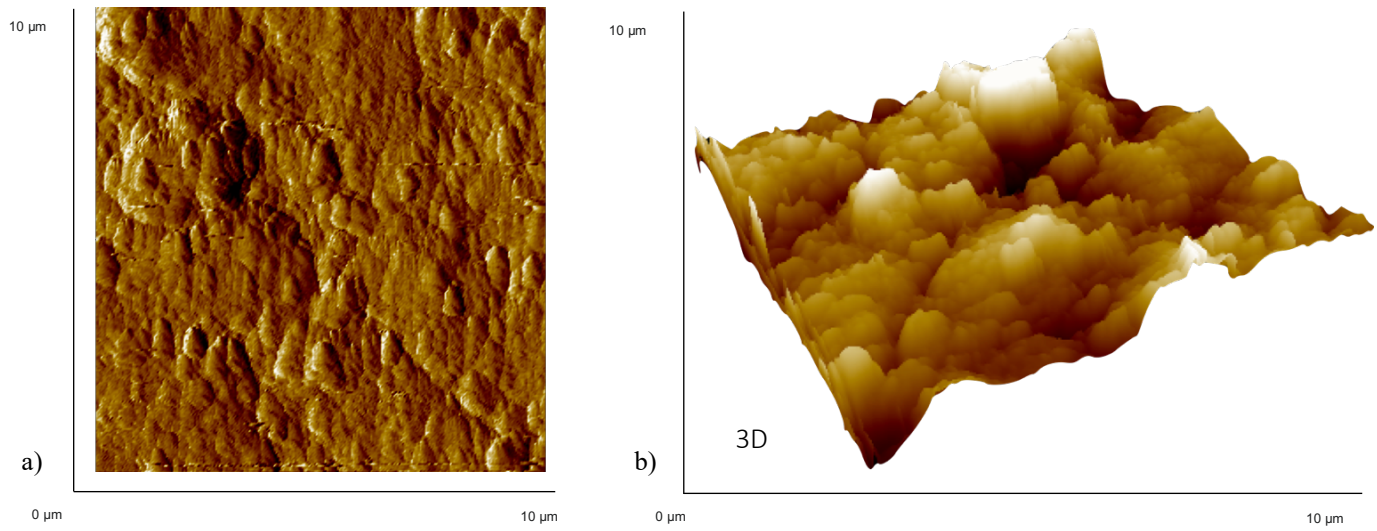


Figura 56. Micrografía de fuerza atómica en área de 10 x 10 µm^2 en 2D imagen a) y 3D imagen b) del grupo de esmalte desmineralizado.

3. Control positivo (Duraphat)

En el grupo control positivo tratado con Duraphat se obtuvieron valores de rugosidad superficial de 205.89 ± 163.28 nm. En el aspecto topográfico, se puede observar una superficie más regular, con picos pequeños y depresiones poco profundas, lo cual puede interpretarse como poros que se han cerrados. Presenta un relieve más aplanado y con ligeras ondulaciones, posiblemente por el precipitado de sustancias minerales en la superficie **(ver figura 57)**.

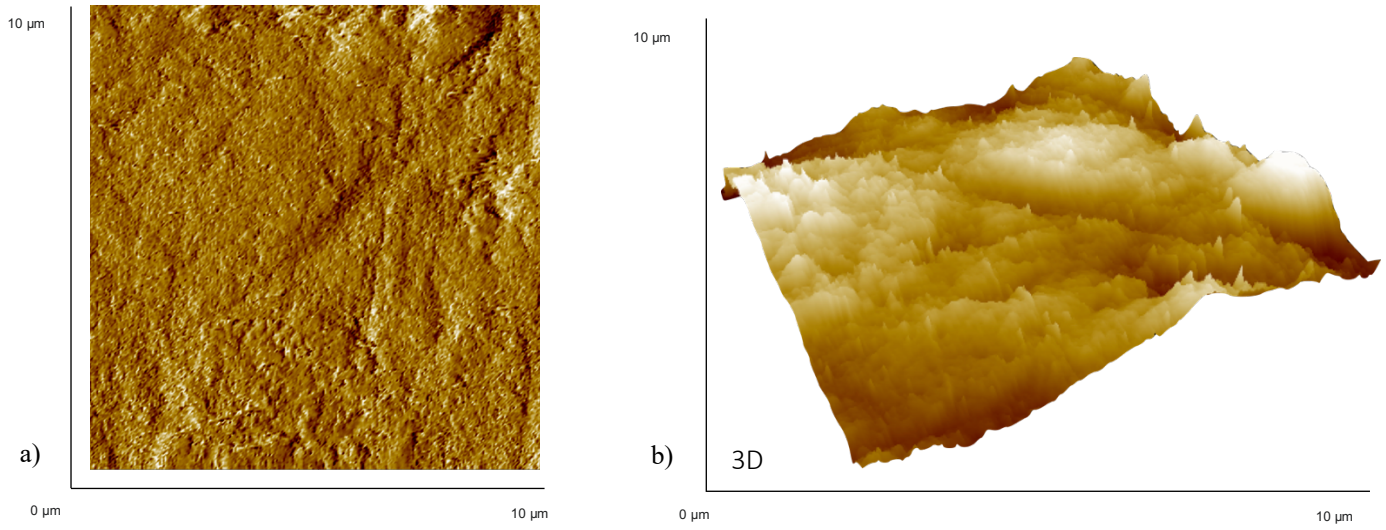


Figura 57. Micrografía de fuerza atómica en área de 10 x 10 µm^2 del grupo control positivo (Duraphat), imagen a) en 2D y b) en 3D.

4. Control negativo (pasta sin F)

El grupo control negativo (pasta sin F) presentó valores de rugosidad superficial de los más bajos (93.01 ± 44.99 nm) y; se puede observar una topografía menos irregular si lo comparamos con el Control positivo, más homogénea, con numerosos picos, pero de pequeño tamaño y con forma redondeada. El relieve presenta ondulaciones con áreas más elevadas y otras más bajas **(ver figura 58)**.

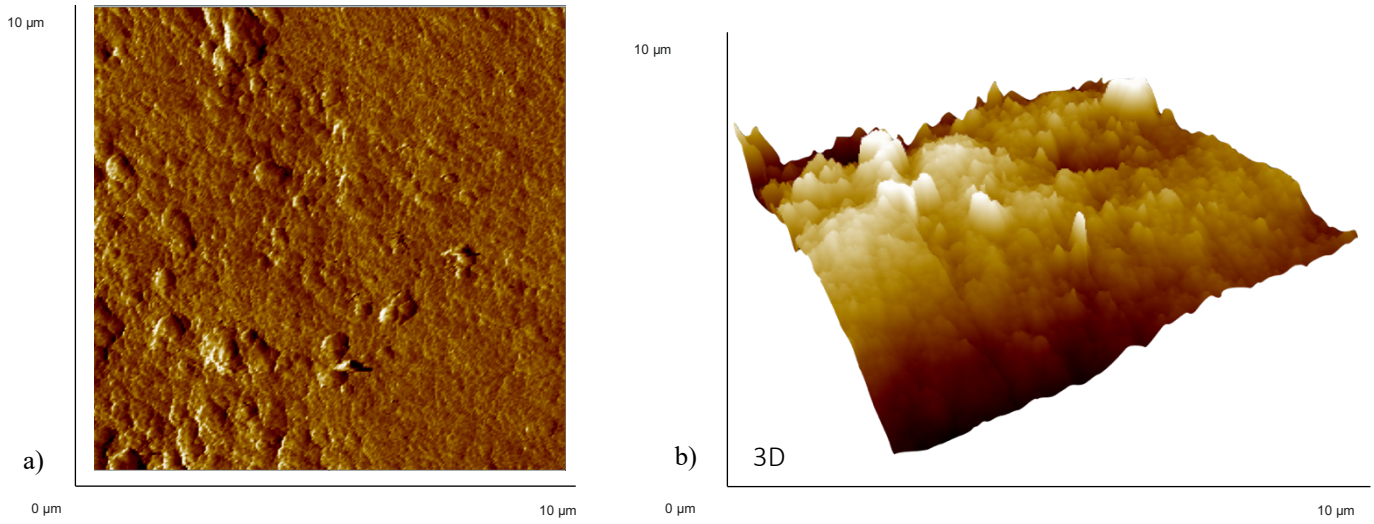


Figura 58. Micrografía de fuerza atómica en área de 10 x 10 µm^2 del grupo control negativo (pasta sin F), imagen a) en 2D y b) en 3D.

5. Regenerate:

El grupo experimental tratado con Regenerate obtuvo valores de rugosidad superficial de 117.75 ± 84.75 nm. Se puede apreciar una topografía irregular, con depresiones poco profundas, presenta numerosos picos, algunos más altos y pronunciados, otros más anchos y redondeados. Se observa un relieve ondulado, posiblemente debido al depósito de minerales en la superficie de la muestra **(ver figura 59)**.

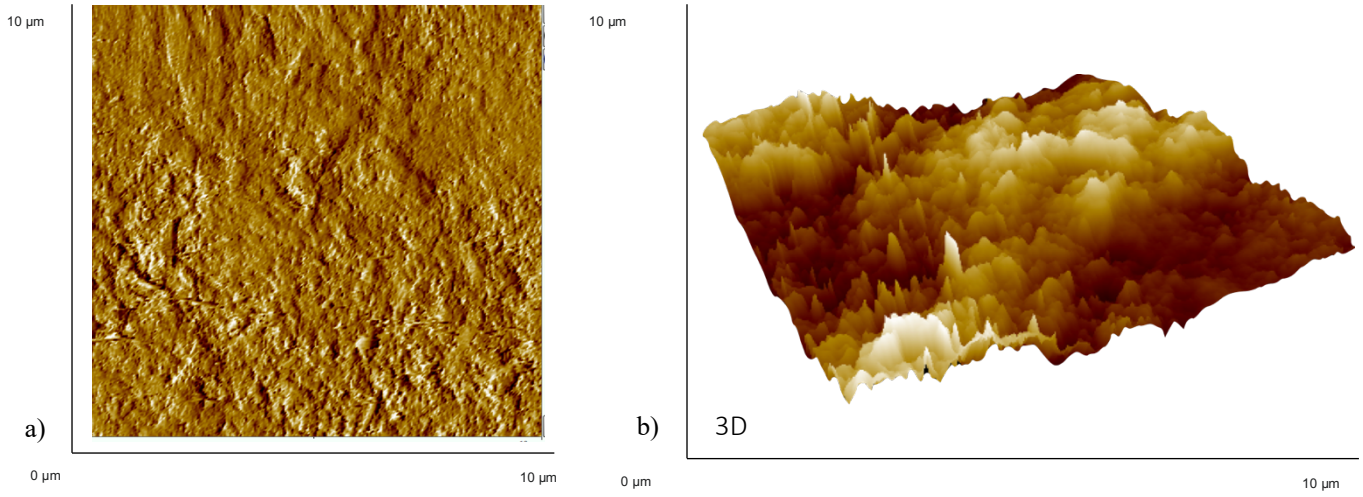


Figura 59. Micrografía de fuerza atómica en área de 10 x 10 µm^2 en 2D imagen a) y 3D imagen b) del grupo tratado con Regenerate.

6. Orthocare:

El grupo experimental tratado con Orthocare presentó un valor de rugosidad superficial medio de 190.20 ± 86.14 nm. Se puede observar una topografía irregular, amorfa, con picos muy numerosos y pronunciados, zonas de depresiones profundas que pueden interpretarse como poros abiertos **(ver figura 60)**.

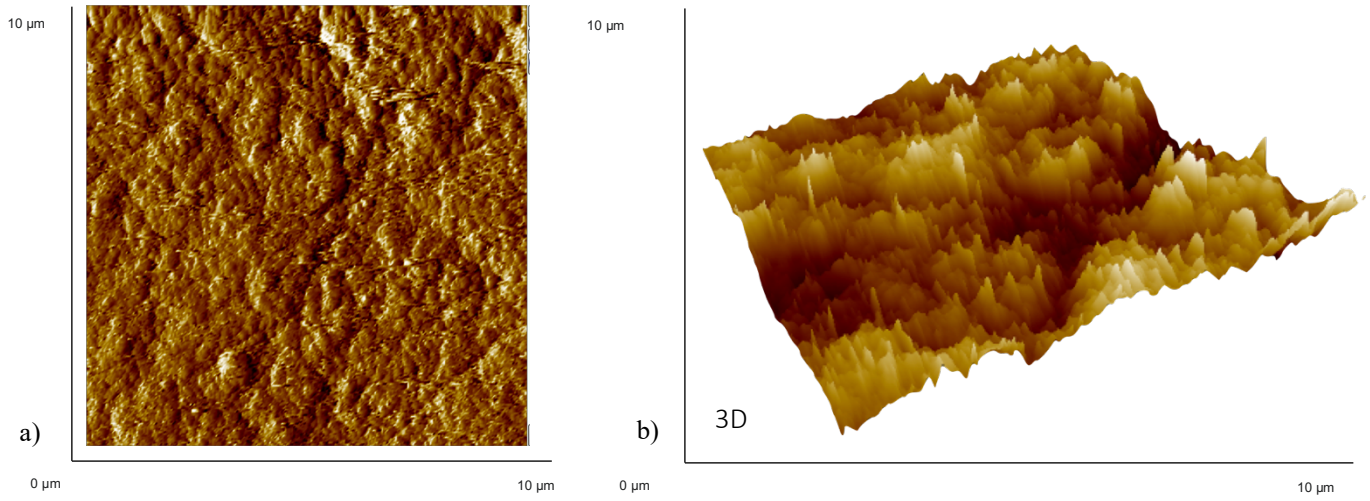


Figura 60. Micrografía de fuerza atómica en área de 10 x 10 µm^2 del grupo tratado con Orthocare, imagen a) en 2D y b) en 3D.

7. Curodont Protect:

El grupo experimental tratado con Curodont Protect presentó valores de rugosidad de 118.24 ± 65.65 nm. En cuanto al aspecto topográfico se puede apreciar una superficie más regular y homogénea, con picos pequeños y redondeados por toda la superficie. Se observan zonas con un relieve más elevado similar a montañas y otras zonas donde hay depresiones con cierta profundidad, similar a poros abiertos **(ver figura 61)**.

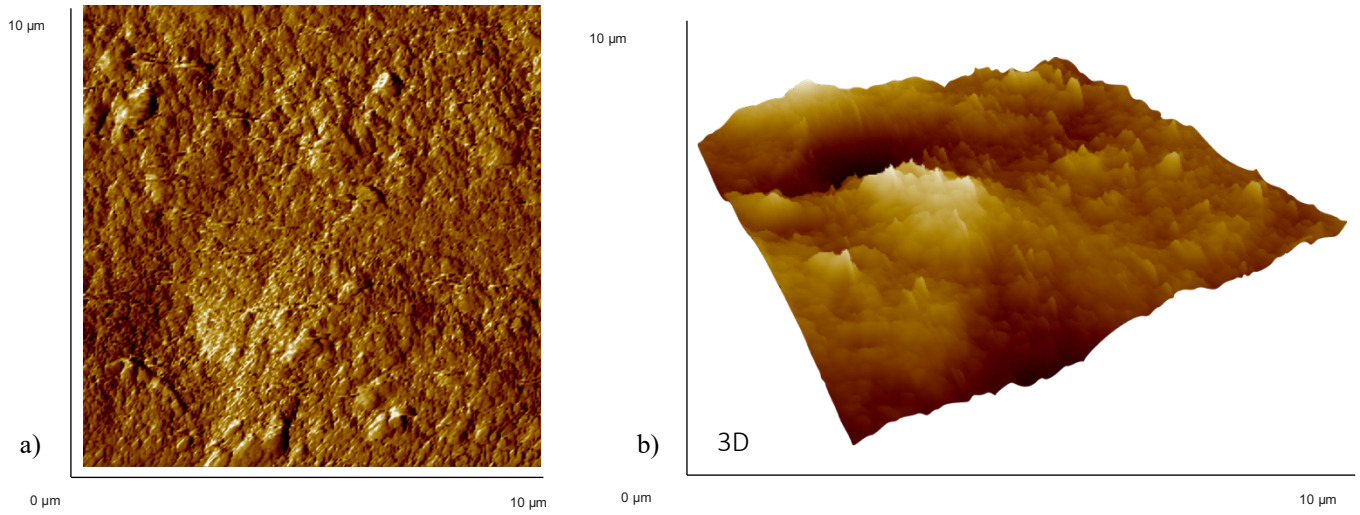


Figura 61. Micrografía de fuerza atómica en área de 10 x 10 µm^2 en 2D imagen a) y 3D imagen b) del grupo tratado con Curodont Protect.

8. Curodont Protect+ Flúor Protector

El grupo experimental tratado con Curodont Protect+ Fluor protector obtuvo valores medios de 197.42 ± 154.03 nm. En cuanto al aspecto topográfico se puede observar una superficie irregular con picos altos y pronunciados y otros más bajos con una forma más redondeada. El relieve es ondulado, presenta áreas de depresiones poco profundas, y otras zonas más altas **(ver figura 62)**.

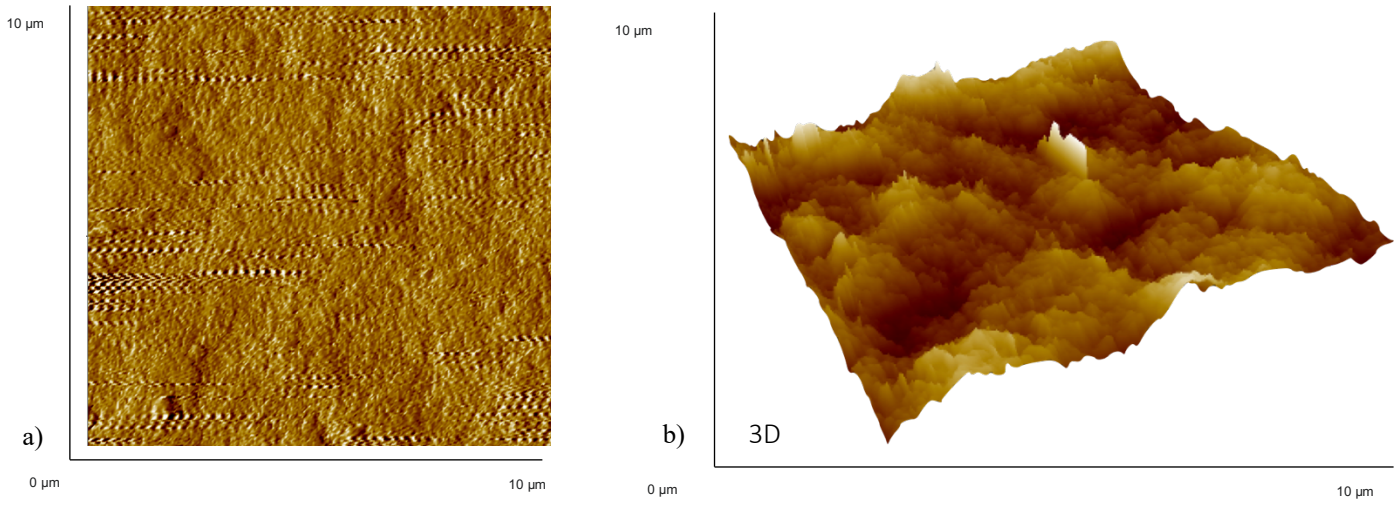


Figura 62. Micrografía de fuerza atómica en área de 10 x 10 µm^2 del grupo tratado con Curodont Protect + Fluor Protector, imagen a) en 2D y b) en 3D.

6. DISCUSIÓN

En este estudio experimental in vitro, hemos evaluado el potencial remineralizante y la resistencia al ataque ácido del péptido P11-4, péptido P11-4 junto a barniz de flúor, nanohidoxiapatita, silicato de calcio/fosfato de sodio y barniz de fluoruro sódico en esmalte bovino previamente desmineralizado; las muestras fueron sometidas a ciclos de pH de 22 horas en solución remineralizante (pH 7,0) y 2 horas en solución desmineralizante (pH 4,4) durante un periodo de 30 días. Posteriormente fue evaluada la microdureza superficial, microanálisis del contenido mineral y análisis de la topografía gracias al escaneado de la superficie del esmalte con AFM y FESEM.

El proceso de remineralización y desmineralización ha sido ampliamente estudiado, considerándose un ciclo continuo y variable que ocurre de forma fisiológica en la cavidad oral y se repite después de la ingesta de alimentos; este ciclo es primordial para la protección contra la caries o para favorecer su formación (37, 67, 70).

6.1. DISCUSIÓN DEL METODO

6.1.1. Desmineralización y remineralización de esmalte

Los modelos in vitro que investigan la remineralización utilizan actualmente dos tipos de modelos para estudiar el proceso de desmineralización/remineralización, los modelos bacterianos, los cuales utilizan bacterias para simular dicho proceso y los químicos, los cuales usan agentes químicos mediante *ciclos de pH* (201), como es el caso de nuestro estudio. Los ciclos de pH se pueden realizar de forma manual o bajo el control informático, aunque existen varios tipos de modelos de boca artificial y replicación del ataque ácido mediante ciclos de pH en nuestro estudio se realizó el modelo químico de ciclos de pH de Bolis (93) y Bijle (195, 196), estos sistemas permiten la exposición de un producto de manera controlada, imitando de esta manera dinámica la pérdida o ganancia de minerales durante la formación de la caries (202), intentando replicar el entorno oral a lo largo del tiempo (66). Normalmente presentan un periodo en solución desmineralizante variable según los estudios, y puede ser de 2 a 8 horas, mientras que el periodo de tiempo en solución remineralizante puede ser de 16 a 22 horas, seguido de la aplicación de tratamientos remineralizante o placebo (199, 200). En nuestro estudio, se ha empleado una solución remineralizante donde se mantuvieron las muestras sumergidas durante 22

horas; esta solución contenía: CaCl2 1,5 mM (cloruro de calcio) (Sigma Aldrich), NaH2PO4 0,9 mM (fosfato monosódico) (Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU.) y 0,15 KCl M (cloruro potásico) (Sigma Aldrich) y el pH se ajustó a 7,0 usando KOH 5,0 M (hidróxido de potasio) (Sigma Aldrich). Posteriormente las muestras fueron lavadas con agua destilada y sumergidas durante 2 horas en una solución desmineralizante la cual contenía: 2,2 mM CaCl2 (cloruro de calcio) (Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU.), 2,2 mM KH2PO4 (fosfato monopotásico) (Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU.); ácido acético 0.05 M (Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU.), y el pH se ajustó a 4,40 usando KOH 5,0 M (hidróxido de potasio) (Sigma Aldrich) (197,198). Se repitió este ciclo de manera continua e ininterrumpida durante 30 días.

Previamente a la realización del modelo químico de ciclos de pH a las muestras se les produjo una lesión de caries incipiente de manera artificial. En este sentido, los ácidos inorgánicos producidos por las biopelículas, por ejemplo, el ácido láctico, acético, propiónico, succínico y fórmico, son el factor principal de formación de caries (205,206). Entre ellos, el utilizado en este estudio experimental in vitro fue el *ácido láctico*; este ácido se ha utilizado durante mucho tiempo para producir lesiones cariosas artificiales (207,208). La solución que se utilizó contenía: 0,1 M de ácido láctico (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) y 50 mg/L de fosfato de calcio (Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU.) en agua destilada y se ajustó el pH a 4,40 usando KOH 5,0 M (Sigma Aldrich, St. Louis, EE. UU) (195, 196).

Cabe destacar que el ácido láctico ha demostrado en comparación con otros ácidos producir una lesión más profunda de caries artificial (209), a diferencia de los ciclos de pH que han demostrado provocar lesiones menos profundas, si las comparamos con las lesiones naturales (210).

En cuanto al tiempo que hay que exponer a las muestras al ácido para la creación de la caries artificial, se recomienda hacerlo durante un periodo de 2 a 4 días (211), en nuestro estudio escogimos 3 días, para estar dentro de este intervalo de tiempo. También, existen estudios donde se han utilizado ciclos de pH para crear lesiones artificiales simulando los ataques ácidos y de reparación natural durante 30 días (212).

El entorno oral real es muy complejo y el pH fluctúa significativamente (206); por lo tanto, se debe tener cuidado al extrapolar los resultados actuales a la situación clínica. Sin embargo, con la composición y pH adecuados, este modelo químico puede proporcionar un medio in vitro eficaz para simular los procesos de desmineralización y remineralización que ocurren en el medio oral y poder evaluar el rendimiento clínico de diversos agentes remineralizantes, proporcionando datos cuantitativos para ensayos clínicos posteriores (213).

6.1.2. Muestras de estudio

La elección del sustrato de tejido duro sigue siendo uno de los problemas pendientes en los modelos de experimentación in vitro. En este trabajo utilizamos el *esmalte bovino* debido a que es un sustrato fácil de obtener en grandes cantidades y en buen estado. Presentan una superficie más plana, uniforme y grande que los dientes humanos (214), la orientación de los cristales de hidroxiapatita coincide con la del esmalte humano (215); el porcentaje de contenido de calcio es equivalente al del esmalte humano y presenta una disminución similar desde la superficie hasta la unión amelodentinaria (216). Sin embargo, también se aprecian algunas diferencias entre el esmalte bovino y humano como la disposición de ojo de cerradura de los prismas, mientras que las formas laminares o de hoja tienden a apreciarse en el esmalte bovino (217); los cristales de hidroxiapatita en el esmalte bovino son en una proporción bovino: humano 1,6: 1 veces más gruesos (218). En cuanto a la resistencia a la erosión entre el esmalte bovino y humano en algunos estudios era inapreciable, mientras que en otros se observó que progresaba dos veces más rápido en el esmalte bovino que en el humano (219). Se ha visto que el esmalte bovino se usa más que el esmalte humano en experimentación in vitro (220). En cuanto a los estudios de microdureza para el esmalte bovino y humano los valores fueron muy similares en ambos sustratos (221).

En cuanto a su composición química, Bisaz y cols., (1968) se encontraron cantidades detectables de pirofosfato inorgánico en el esmalte y la dentina tanto de dientes humanos como en dientes bovinos (222). En otro estudio se demostró que la relación Ca/P del mineral eliminado de las superficies del esmalte durante la desmineralización, así como las características de remineralización, eran las mismas en el esmalte humano y bovino (223). También se ha observado que el esmalte bovino presenta un menor contenido

mineral, lo cual puede favorecer una aparición más rápida de lesiones cariosas (224). Davidson y cols., (1973) (216), y Mellberg y Loertscher., (1973) (225) demostraron que la absorción de flúor por el esmalte sano permanente humano y el esmalte primario bovino eran diferentes. Sin embargo, en otros estudios no se encontraron diferencias significativas en la captación de flúor (226). En otros estudios descubrieron que el contenido de calcio del esmalte dental bovino y humano era del 37,9% y 36,8% respectivamente, y que la distribución del calcio era más homogénea en el esmalte bovino que en el humano (227).

En cuanto a la concentración de carbono no se mostraron diferencias significativas entre el esmalte humano y el bovino. Spitzer y Bosch., (1975) descubrieron que los índices de refracción no eran significativamente diferentes. Sin embargo, el pico de absorción a 270 nm en el espectro del esmalte bovino era tres veces mayor que en el espectro del esmalte humano (228).

En general, las diferencias morfológicas, de composición química y de propiedades físicas deben tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos en cualquier experimento con sustrato de dientes bovinos (225, 226).

6.1.3. Estudios in vitro: características

Los *estudios in vitro* presentan numerosas ventajas ya que se pueden ejecutar en un corto período de tiempo, requieren menos personal que los estudios in situ, evitan problemas de cumplimiento de los participantes y son relativamente más económicos. Sin embargo, no puede replicar el entorno oral con todas las variaciones biológicas que se sabe que influyen en el proceso de desmineralización y remineralización (231).

La temperatura es un factor importante que debe controlarse. En nuestro estudio se mantuvo una temperatura estable de 37 grados durante 30 días en una estufa de laboratorio (P Selecta®, JP Selecta S.A, Barcelona, España) (232), para simular la temperatura de la cavidad oral. Se ha descrito que la pérdida de estructura dental aumenta con el aumento de la temperatura (206, 217, 218), por ello es importante tener un control de la temperatura en los estudios experimentales in vitro. En resumen, aunque son

sistemas simples sin las complejas interacciones que se encuentran in vivo o in situ, los modelos in vitro tienen una serie de ventajas que permiten aportar datos para definir la trayectoria que el investigador debe seguir y perfeccionar antes de realizar estudios en el entorno clínico. Se puede probar un número grande de muestras y se puede analizar la variación entre las muestras sin las variables de confusión del sujeto y el entorno oral (231).

Una vez que se ha establecido una dirección clara para una investigación adicional a través de estudios in vitro, puede continuarse por estudios in situ, que están más cerca de las condiciones naturales y, por lo tanto, producen resultados más relevantes desde el punto de vista clínico. Es poco probable que las investigaciones in vitro estén totalmente de acuerdo cuantitativamente con los hallazgos de los estudios in situ o in vivo, pero, los hallazgos in situ generalmente siguen las tendencias observadas in vitro (234–237).

En cuanto a la duración del estudio para obtener resultados tras la administración de sustancias remineralizantes, destacar el estudio de Von Der Fehr y cols.,(1970) donde las lesiones cariosas se remineralizaron y desaparecieron tras tres semanas de utilización de agentes (238). En diversos estudios 4 semanas es el tiempo establecido para poder tratar la caries incipiente y poder observar sus resultados de una forma más objetiva (224, 225). En vista de esto, escogimos el período experimental de cuatro semanas para nuestra investigación.

6.1.4. Agentes remineralizantes empleados

Barniz de Fluoruro sódico (Duraphat® 2,26% F; Colgate-Palmolive Company, Madrid. España)

El barniz contiene un 50 mg de fluoruro sódico (5% peso/volumen) equivalente a 22,6 mg de fluoruro (2,26% peso/peso) en una solución alcohólica de resinas naturales, es muy fácil y rápido de aplicar y cuando se endurece en la superficie del esmalte deja una película amarillenta que se mantiene durante aproximadamente 12 horas fue aplicado una sola vez, al inicio de la experimentación.

El flúor es la piedra angular del tratamiento preventivo y mínimamente invasivo de las lesiones cariosas incipientes. Los iones de flúor favorecen la remineralización de las zonas desmineralizadas si se dispone de iones de calcio y fosfato salivales o de placa adecuados cuando se aplica el flúor (241). Por lo tanto, en la aplicación tópica de flúor la disponibilidad de iones de Ca y P es muy importante, ya que se requiere un número determinado de iones para la formación de fluorhidroxiapatita $Ca10(PO4)_6(OHxFy)$ y fluorapatita ($Ca10(PO4)_{6F2}$) (70, 227).

Se ha demostrado que el flúor produce una remineralización substancial de las lesiones y que e incluso puede llegar a penetrar en la dentina subyacente en estudios in vitro con ciclos de pH (228, 229). En este estudio se pretende evaluar la remineralización del esmalte bovino mediante la aplicación de barniz de fluoruro sódico y analizar la resistencia después de 30 días sometido a ciclos de pH.

Silicato de calcio y fosfato de sodio (<u>Pasta dental</u>: Regenerate Advance Toothpaste ™ (Unilever, Reino Unido) y <u>sérum:</u> Advance Enamel Serum™ (Unilever, Reino Unido)

El dentífrico Regenerate Advance Toothpaste ™ (Unilever, Reino Unido) y el sérum: Advance Enamel Serum™ (Unilever, Reino Unido) que se obtiene tras la mezcla de dos componentes: el NR-5 Serum™ y el Gel Activador™. Esta novedosa formulación de pasta dental incorporando silicato de calcio y fosfato de sodio intenta avanzar en cuanto a las tradicionales formulaciones de dentífricos.

Se cree que los iones de calcio en el silicato de calcio se intercambian con H^+ en el líquido circundante, lo que conduce a la formación de silanol (Si-OH) en la capa superficial. Esto provoca un aumento en el pH y la formación de una superficie cargada negativamente con el grupo funcional Si-O. Por esta razón, la solución en las inmediaciones de la superficie debe estar agotada de protones y enriquecida con calcio. Cuando se combina con los iones fosfato de la saliva circundante, se precipita la hidroxiapatita en la superficie del silicato de calcio (66). El mecanismo de protección y remineralización se debe a una combinación de liberación de calcio, amortiguación de

pH y formación de hidroxiapatita (245). Wood y cols.,(2018) utilizando un modelo interproximal in vitro, encontraron una mayor prevención de la desmineralización con la aplicación combinada de pasta y sérum a base de silicato de calcio en comparación con una pasta de dientes con flúor convencional (1450 ppm F-), y con una pasta de dientes sin fluoruro (246).

Se ha puesto de manifiesto que las partículas de Ca_3SiO_5 depositadas se transformaban en HAP tras una semana de incubación en saliva artificial y formaban una densa capa superficial sobre la dentina con un grosor de unas 3 micras (66).

Actualmente existe pruebas considerables en la bibliografía de que existe una relación lineal entre los niveles de calcio y flúor en la placa (232, 233) y se ha planteado la hipótesis de que la capacidad de la placa para retener flúor durante periodos más largos viene determinada principalmente por la concentración de calcio en la placa (249).

En nuestro estudio se utilizó la pasta dental 2 veces al día durante 30 días y la aplicación del sérum durante los tres primeros días de la experimentación, tras el último cepillado del día, dejándolo actuar durante 3 minutos, como indicaba el fabricante, con esto se pretende evaluar su efecto respecto a su potencial remineralizante y resistencia al ataque ácido.

Nanohidroxiapatita (Orthocare nHAp™ Toothpaste y Orthocare nHAp™ Boost Sponge (Prevdent® International B.V, Países Bajos):

La nanohidroxiapatita es un compuesto de fosfato de calcio con una estructura similar a la de la parte mineralizada de la dentina y el esmalte (250). Es bioactiva y biocompatible. El uso de materiales basado en nanotecnología es una estrategia interesante para la remineralización. Las investigaciones proponen que la nanohidroxiapatita puede reparar el esmalte dañado mediante la fijación de moléculas a la superficie del tejido o incluso la posibilidad de rellenar defectos y microporos en los dientes desmineralizados (251). Por esto se utiliza junto con el flúor para tratar la hipersensibilidad dental ya que gracias a estos depósitos sellan los túbulos dentinarios y mejoran la sintomatología,

aunque son necesarios más estudios clínicos para demostrar su eficacia (98). Existen artículos que lo promueven como alternativa al flúor, debido a la toxicidad sistémica y a que puede provocar tinciones amarillas en los dientes conocido como fluorosis (235, 237).

En este estudio se pone a prueba este agente remineralizante utilizando la pasta dental Orthocare nHAp^{TM} Toothpaste 2 veces al día durante 30 día y el sérum Orthocare nHAp^{TM} Boost Sponge, se aplicó cada 5 días de tratamiento tras el último cepillado del día, dejándolo actuar durante 3 minutos; con el objetivo de poder valorar sus efectos en el esmalte bovino previamente desmineralizado.

Péptido P11-4 (Curodont^{TM} Protect; Credentis AG, Dorfstrasse, Windisch, Switzerland):

Este agente biomineralizador compuesto principalmente por el oligopéptido 104 y monofluorfosfato sódico 900 ppm, se ha utilizado en este estudio 2 veces por semana dejándolo actuar durante 2 minutos, durante un periodo de 30 días.

Según los estudios logra una efectiva remineralización de la dentina, reponiendo los componentes minerales tanto en el colágeno extrafibrilar como en el intrafibrilar (253). El mecanismo de acción del péptido P11-4 radica en la formación de una matriz 3D que atraería iones Ca^{2+} y sería capaz de nuclear una nueva hidroxiapatita (136). Debido a que la remineralización y la eficacia del P11-4 depende del contenido mineral de la saliva, la solución remineralizadora utilizada en este estudio, proporciona los iones necesarios que permitirían la formación de una nueva hidroxiapatita.

Se ha demostrado que el P11-4 aumenta la resistencia de las fibras de colágeno tipo I frente a la actividad proteolítica de las colagenasas. Además, que las diferentes concentraciones de P11-4 inducen la deposición mineral, siendo mayor en 1 µg/mL del péptido que en 0.5 µg/mL (254).

Los resultados del ensayo clínico realizado por Brunton y cols., (2013) concluyen que una sola aplicación se asocia con una regeneración significativa del esmalte (40). Debido

a que Curodont Protect tiene 10 mg/mL, y dos aplicaciones semanales durante 30 días se esperaría una mayor remineralización por parte este agente remineralizante.

En uno de nuestros grupos experimentales utilizamos el Curodont™ Protect (Credentis AG, Dorfstrasse, Windisch, Switzerland) más el Fluor Protector® al 1,5% (Ivoclar, Vivadent S.L.U, Schaan, Liechtenstein) siguiendo los mismos pasos que el Curodont™ Protect y después de 5 min aplicamos una fina capa de Fluor Protector® dejándolo secar durante 60 seg y luego se aplicó aire, con el objetivo de valorar el efecto de péptido p 11-4 solo y en combinación con el flúor.

6.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

6.2.1. Microdureza superficial del esmalte

La resistencia del esmalte bovino fue evaluada mediante microdureza utilizando el Microdurómetro se sobremesa Vickers KMHV-1000Z (Kansert, S. L. Navarra, España).

La microdureza es el método más útil para evaluar el reblandecimiento del esmalte causado por la desmineralización (240, 241). Esta, es una prueba de laboratorio sencilla y no destructiva que permite valorar los cambios en la microestructura dental tras la desmineralización y remineralización (257–259). En nuestro estudio la media de microdureza inicial fue similar en todos los grupos, y estos valores se encuentran dentro de un rango de valores similares si lo comparamos con estudios anteriores (242, 244). Sin embargo, hubo una excepción con el grupo de esmalte desmineralizado donde la microdureza inicial fue inferior y estadísticamente significativa con respecto al resto de grupos experimentales, debido a que este grupo fue sometido previamente a una desmineralización con ácido láctico y por lo tanto tuvo valores inferiores de microdureza.

Al evaluar la microdureza superficial después de 30 días de experimentación sometiendo las muestras a ciclos de pH, se obtuvieron resultados estadísticamente significativos al comparar el antes y después, observando a nivel general una disminución de la microdureza en los grupos experimentales. También se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos de agentes remineralizantes, aunque todos

presentaron una disminución de la microdureza inicial, el resultado no se produjo por igual en los diferentes grupos. En este sentido, el grupo tratado con de barniz de flúor al 2.26% NaF (Control positivo (Duraphat) fue el que mejor resistió el ataque ácido. En diversos estudios comprobaron que las lesiones cariosas incipientes o manchas blancas pueden controlarse y reducirse mediante el tratamiento de remineralización con una aplicación de barniz fluorado al 5% semanal durante un mes, evitando de esta manera tratamientos invasivos de operatoria (260–262).

En otro artículo realizado por Paredes Quintana y Álvarez Velasco (2021), se obtuvo una mayor microdureza tras la aplicación del barniz de flúor en una concentración de 2.26% en comparación con el barniz de flúor en concentración inferior de 0.1%, y ambos tratamientos fueron más efectivos que no aplicar ningún sistema fluorado (263).

Esta mayor resistencia y menor pérdida de microdureza puede deberse a que durante el tratamiento tópico con flúor a concentraciones superiores a 1.000 ppm, la formación de CaF2 se produce rápidamente. Los depósitos de CaF2 pueden retenerse durante meses, liberando trazas de flúor en los momentos en que desciende el pH y manteniendo una concentración constante en la cavidad oral, al tiempo que aumentan la resistencia del diente a los ataques ácidos y potencian la remineralización (264–266).

Oliveira y cols., (2019) emplearon distintas concentraciones de flúor y observaron que todas ellas eran capaces de aumentar la microdureza y promover cambios morfológicos en el esmalte tras 7 y 14 días de aplicación y permanecieron estables 1 semana después de 28 días de tratamiento. Sin embargo, el barniz de flúor (Duraphat) demostró la mayor estabilidad, mostrando una menor reducción de la microdureza entre la evaluación inicial y después de la inducción de la caries, así como un aumento significativo de la microdureza una semana después del final del tratamiento (267).

Resultados similares fueron descritos por Godoi y cols., (2019) (268), donde observaron que los barnices tenían un efecto limitado en la remineralización de la superficie del esmalte, ya que los valores de microdureza de la superficie después de los tratamientos no regresaban a sus valores iniciales. Compararon barnices de Enamelato y Duraphat tuvieron un efecto remineralizante en la superficie del esmalte, pero ningún barniz fue capaz de remineralizar la lesión subsuperficialmente. Aunque los niveles de

concentración de fluoruro insoluble y soluble no correspondían a los declarados por el fabricante, el esmalte tratado con Duraphat tenía una concentración de fluoruro más alta que los otros barnices (268). Al igual que en nuestro estudio, los valores de microdureza no regresaron a sus valores iniciales, pero si hubo un efecto remineralizante evitando sobre todo en el grupo tratado con Duraphat una pérdida de microdureza.

El sistema de silicato de calcio y fosfato de sodio (Regenerate) fue el segundo en cuanto a resistencia y menor pérdida de microdureza superficial, resultados similares a los descritos en un estudio experimental realizado por Vicente A. y cols., (2021) donde este tipo de pasta de dientes presentaba valores de microdureza superiores si se comparaba con otras pastas dentales fluoradas, aunque no presentó diferencias significativas (269).

En otro estudio se observó que la pasta dentífrica de silicato cálcico/fosfato fluorado inhibió la desmineralización en mayor medida que las pastas dentífricas de control y promovió la remineralización más que el dentífrico de control de fluoruro sódico a los 3 y 7 días, obteniendo resultados significativos. La adición del tratamiento de gel de fase dual de silicato cálcico/fosfato fluorado produjo una remineralización significativamente mayor en comparación con el tratamiento de pasta dentífrica de silicato cálcico/fosfato fluorado y concluyeron que este dentífrico protege significativamente al esmalte frente a la desmineralización in vitro causada por el ácido láctico o cítrico, en comparación con el dentífrico de control (270).

Joiner y cols.,(2014) demostraron que cepillarse con una pasta de dientes con silicato de calcio y fosfato de sodio y 1450 ppm de ion de fluoruro como monofluorofosfato de sodio era capaz de volver a endurecer el esmalte dental debilitado con ácido en una medida significativamente mayor que una pasta de dientes convencional (271).

Estudios in vitro han demostrado que las pastas de dientes que contienen silicato de calcio, sales de fosfato de sodio y fluoruro aumentan la dureza de la superficie debido a la formación de hidroxiapatita en la superficie del esmalte (255, 256).

En otro estudio, se evaluó el efecto protector contra la erosión tras el tratamiento con la pasta dentífrica de silicato cálcico y fosfato sódico, y lo compararon con pastas

fluoradas, mostrando una mejor resistencia a la erosión que las formulaciones con fluoruros (246).

En tercer lugar, en cuanto a resistencia al ataque ácido y menor pérdida de microdureza se encuentra, el péptido 11-4 (Curodont Protect y Curodont + Fluor Protector). Esto puede deberse a que el esmalte se protege con el péptido autoensamblante P11-4 antes o después de la exposición a entornos ácidos (272). Ralentiza el deterioro del esmalte y ayuda con la remineralización (273). Sin embargo, Attin y cols., (2017) en su estudio informaron que no hubo ninguna diferencia significativa con respecto al grupo de control no tratado (274).

Un estudio realizado por Kirkham y cols., (2007) in vitro, demostró que el tratamiento con P11-4 mejora la remineralización y favorece la formación de una nueva hidroxiapatita (275). Osman E. y cols., (2021), en un ensayo controlado tipo boca partida, demostró el potencial de regeneración del p 11-4 en lesiones post-ortodoncicas (276).

Doberdoli y cols., (2020) en un ensayo clínico aleatorizado en 2020, han observado que el péptido P11-4 combinado con barniz de fluoruro dos veces a la semana, presenta una protección superior frente a la caries en vez de una sola aplicación con barniz de fluoruro (277). Esto no es lo que se ha observado en nuestro estudio, ya que el flúor ha sido claramente superior en cuanto a resistencia a los ciclos de pH, incluso en el grupo que combinamos Curodont + Fluor Protector se encontraron diferencias significativas con respecto a Duraphat y Regenerate.

No se han encontrado estudios que evalúen su microdureza superficial para determinar su resistencia al ataque ácido, ya que el péptido autoasamble P11-4 ha surgido recientemente en la odontología como un biomaterial muy prometedor para la regeneración biomimética debido a su potencial para imitar la matriz extracelular del esmalte. En general, P11-4 muestra resultados favorables para el tratamiento mínimamente invasivo de las lesiones cariosas iniciales. Sin embargo, se necesita más investigación para determinar su eficacia a largo plazo en diversas condiciones. Este estudio es de los primeros en la evaluación de la microdureza superficial del péptido P11-

4 y por tanto es difícil cotejar los resultados obtenidos con la bibliografía existente hasta la fecha.

En último lugar en cuanto a resistencia al ataque ácido y pérdida de microdureza se encuentra la nanohidroxiapatia (Orthocare), la cual obtuvo valores de microdureza inferiores al grupo de Esmalte intacto. Sin embargo, en el estudio realizado con pastas de dientes GC Tooth Mousse™ (CPP-ACP), Acclaim™ (nano-HAP) y EnaFix™ (fosfato de sacarosa de calcio) mostraron un aumento en los valores de microdureza de la superficie del esmalte con el empleo de Acclaim™. El grupo III (Acclaim) tuvo una mayor microdureza posterior a la remineralización en comparación con el grupo II (GC Tooth Mousse) (278).

En el estudio de Carvalho FG y cols., (2014) se llevó a cabo una comparación de microdureza del esmalte de la pasta de dientes CPP-ACP y nano-(HAP) mostrando un aumento significativo en la microdureza en el grupo tratado con nano-(HAP) en comparación con CPP-ACP (279).

Varios investigadores informaron sobre el efecto de remineralización de la nano (HAP) en las lesiones de la caries (263, 265, 266). En este sentido, Huang S y cols., (2011) propusieron que el aumento de la remineralización con el empleo de pastas con nanohidroxiapatita se debe a su reservorio de fosfato de calcio, que ayuda a mantener un estado de sobresaturación con respecto a los minerales del esmalte (282).

Por lo tanto en nuestro estudio se esperaba que la pasta dental con nanohidroxiapatita, al contener partículas de hidroxiapatita con características similares a la apatita dental, tuviera la capacidad de proporcionar calcio y fosfato en una concentración y velocidad adecuadas para reaccionar con la estructura dental (282), reparando o promoviendo el crecimiento de cristales de hidroxiapatita (69) y resistiendo al ataque ácido, sin embargo no ocurrió así. Se ha sugerido que nano-(HAP) conduce a más depósitos minerales en la capa exterior que en la lesión corporal. Por lo tanto, la difusión mineral podría ser inhibida por la capa superficial altamente mineralizada, lo que hace que la remineralización completa no se logre mediante la aplicación de nano-(HAP) (235, 267) demostrando que la aplicación regular de pastas de nano-(HAP) no son capaces de evitar la desmineralización, independientemente de la concentración de nano-(HAP) y la profundidad de la lesión.

Además, las pastas experimentales presentaban un bajo contenido de calcio y fosfato en el agua que podría estar relacionado con su baja solubilidad; por lo tanto, no pueden reaccionar adecuadamente con el diente. Existe otro posible mecanismo de acción de la nano-(HAP), el cual sería una imbricación mecánica de las pastas en la superficie dental porosa debido al tamaño de las partículas; sin embargo, las pastas experimentales no evitaron la desmineralización (166). Por otro lado, el único tratamiento capaz de reducir la desmineralización del subsuelo dental fue la pasta con flúor, que disminuyó su efecto positivo cuando se incorporó a la pasta de nano-(HAP). Esto puede deberse puede a una posible reacción entre NaF y HAP, lo que reduce la cantidad de fluoruro soluble (69).

Por tanto, podemos rechazar la hipótesis nula (H0) número 1, afirmando que la aplicación de los agentes remineralizantes péptido P11-4, nanohidroxiapatita, barniz de flúor 2.26% NaF y sistemas de silicato de calcio y fosfato de sodio afectan a la microdureza del esmalte bovino previamente desmineralizado. En este sentido el grupo de esmalte desmineralizado obtuvo valores de microdureza muy por debajo que el resto de los grupos y, tras la fase experimental, se encontraron diferencias significativas entre los diferentes agentes remineralizantes, siendo el grupo tratado con barniz de flúor al 2.26%, el sistema de silicato de calcio/fosfato de sodio y el péptido P11-4 los más resistentes y los que menor perdida de microdureza superficial obtuvieron. El grupo con más pérdida de microdureza fue el tratado con nanohidroxiapatita, presentando valores inferiores al grupo de esmalte intacto.

6.2.2. Contenido mineral porcentual en peso (%) del esmalte

En el estudio presentado se evaluó el contenido mineral mediante el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM/EDX) (JEOL-6100, Tokyo, Japón) y se obtuvieron diferentes resultados después de realizar el microanálisis, valorando los siguientes elementos químicos: Ca, P, C, O, F, Na, Mg, Si, Cl). Se han relacionado diferentes oligoelementos con varias funciones, incluida la protección y promoción de la caries (283). Cambiar incluso pequeñas concentraciones de los elementos que componen la

parte inorgánica del esmalte afecta el tamaño y la organización de los cristales de apatita, lo que a su vez afecta a su dureza (284). Por ello en este estudio se ha analizado el contenido mineral después de someter las muestras ciclos de pH durante un periodo de 30 días.

Los valores de *Ca* entre los grupos experimentales se mantuvieron estable, excepto en el esmalte desmineralizado que presentó un menor contenido de Ca, siendo estadísticamente significativo si se compara con el resto de los grupos. Por otro lado, en el grupo tratado con Curodont Protect se detectó una mayor concentración de Ca que en Duraphat, arrojando valores estadísticamente significativos. En diversos estudios se observaron que los valores relativos de Ca fueron inferiores en la dentina desmineralizada y mayores donde existe más remineralización (270, 271). Correspondiéndose con los valores obtenidos en este estudio, ya que el esmalte desmineralizado presentó el menor valor de contenido en Ca. Los valores elevados que se han observado en el grupo Curodont Protect, podría deberse a una mayor deposición de este elemento y por tanto una remineralización en la superficie del esmalte.

En cuanto al contenido en *P,* se encontraron diferencias significativas con el grupo esmalte desmineralizado y el resto de los grupos experimentales, presentando valores mínimos de este elemento químico. Los valores máximos se obtuvieron en el grupo tratado con Regenerate. Los niveles de P en el grupo de Curodont Protect fueron superiores al grupo tratado con Orthocare, siendo estadísticamente diferentes. En otros estudios se observaron que los valores relativos de P fueron inferiores en la dentina desmineralizada y mayores donde existe más remineralización (270, 271). Coincidiendo una vez más con el grupo de esmalte desmineralizado donde existe un menor contenido de P demostrando que existe desmineralización; a su vez hubo un mayor contenido en Regenerate y Curodont Protect, favoreciendo la remineralización.

Se ha demostrado que el análisis de la composición química del esmalte el P y Ca son elementos dominantes (con promedios del 24,32 % y 12,53 %, respectivamente). Siendo crucial para que ocurran los fenómenos de desmineralización y remineralización (287).

La ratio *Ca/P* fue relativamente homogénea en todos los grupos con algunas diferencias sobre todo en el grupo de Esmalte intacto que presentó una Ratio Ca/P inferior

al grupo Control negativo (pasta sin flúor). Tambien en los grupos Control negativo (pasta sin F), Orthocare y Curodont Protect donde la ratio fue mayor que el Control positivo (Duraphat), siendo estadísticamente significativo. En un estudio realizado por Vicente y cols., (2021); mostraron que el porcentaje de peso de Ca y la relación Ca/P en el grupo que usaba pasta de dientes y suero Regenerate fueron significativamente más altos que con la pasta de dientes Vitis anticaries y Remin Pro y el grupo de control. Por lo tanto, el sistema Regenerate evitó la pérdida de minerales del esmalte (269). En este estudio la ratio Ca/P en Regenerate se mantuvo con un valor homogéneo respecto al resto de grupos sin diferencias significativas entre ellos.

En otro estudio, se observó que la composición de Ca y P en saliva completa y estimulada se encontró en los pacientes con baja frecuencia de caries una mayor cantidad de iones de Ca y P en comparación con aquellos con mayor prevalencia de caries, lo que también coincide con nuestros resultados, obteniendo los menores valores de Ca y P en el grupo de esmalte desmineralizado (288).

También se han evaluado los valores medios de Ca, P, O, C y la relación Ca/P no eran significativamente diferentes desde el punto de vista estadístico en el esmalte hipomineralizado que en el esmalte sano de los HSPM. Sin embargo, en otros estudios en esmalte hipomineralizado sí que existe una disminución del Ca y P una media del 23,0 al 21,8% en las zonas sanas e hipomineralizadas, respectivamente (una caída relativa del 7,8% sobre una base percentil) (289).

En una revisión publicada en 2007, Markowitz y Pashley., (2007) propusieron aumentar la densidad mineral de la superficie de la dentina expuesta sellando con un material parecido a la dentina, que contenga calcio y fosfato, y esto podría incrementar su resistencia al desgaste, así como al ataque erosivo, bloqueando la difusión a través de los túbulos abiertos en la subsuperficie dentinal (290).

El contenido de *C* fue similar en la mayoría de los grupos, sin diferencias significativas excepto en el grupo de esmalte desmineralizado donde se observó el valor mínimo, siendo estadísticamente diferente si se compara con el resto de los grupos. El valor máximo se obtuvo en el Control positivo (Duraphat), seguido de Curodont P + Fluor Protector, pero no fue significativo.

En el estudio realizado por Malmberg y cols., (2019) se observó que este aumento de C denota más restos de componentes orgánicos en el esmalte hipomineralizado, y supone la presencia de un mayor número de proteínas y fosfolípidos (291).

Hamlin D. y cols., (2009) en su estudio aplicaron un producto para la hipersensibilidad dental que contenía arginina al 8% y carbonato cálcico, e inmediatamente después de la aplicación y cuatro semanas después, el tratamiento con Arginina-carbonato de calcio proporcionó reducciones estadísticamente significativas en la hipersensibilidad dentinaria con respecto al promedio ajustado de la línea base para el chorro de aire y en los registros promedio de hipersensibilidad comparados con el tratamiento control, todo ello debido a un mayor depósito de minerales en la superficie y por consiguiente el sellado de los túbulos dentinarios (292).

En un estudio realizado en Canadá durante 8 semanas, observaron que la pasta dental con Arginina al 8%, carbonato cálcico y 1450 ppm de Flúor proporcionó reducciones estadísticamente significativas en la hipersensibilidad dentinaria en respuesta a estímulos táctiles y al chorro de aire comparada con la crema dental para la sensibilidad de referencia comercial a las dos, cuatro, y ocho semanas, respectivamente (293).

Por lo tanto, este elemento químico está relacionado con un mayor sellado de los túbulos dentinarios y deposición del mineral en la superficie del diente. Esto explicaría lo observado en nuestro estudio donde el menor contenido se encontró en el esmalte desmineralizado, el cual presenta una menor microdureza y mayor desmineralización, mientras que el resto se mantuvo con valores homogéneos.

El grupo con mayor concentración de flúor fue el Control positivo (Duraphat) siendo estadísticamente significativo si lo comparamos con los valores obtenidos en Esmalte intacto, Curodont Protect y Curodont + Fluor Protector. Por otra parte, el Control negativo (pasta sin flúor) y el grupo Orthocare, presentaron una concentración de F muy similar entre ellos, y a su vez inferior al Control positivo (Duraphat). El segundo valor más elevado lo presentó Regenerate, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con el resto de los grupos. Los valores mínimos se encontraron en el esmalte desmineralizado siendo significativamente diferente al resto de grupos experimentales. En un estudio realizado por Jeng y cols., (2008) se observó una mayor concentración de

flúor, en las muestras tratadas con barniz lo que implica que el flúor penetró profundamente en la capa de esmalte durante el tratamiento y formó una unión firme (294).

En un estudio realizado por Bolis C y cols., (2016) emplearon diversos barnices de Flúor entre ellos Duraphat, y todos mostraron una deposición sustancial de flúor en el esmalte después de 1 hora, la absorción de Duraphat fue más lenta que el resto de los grupos, pero después de 24 horas alcanzó valores similares al resto; se cree que la deposición de flúor en el esmalte es la principal función inhibidora de la caries dental (93). Situación similar ocurre en este artículo, donde la mayor concentración de flúor se obtuvo en el Control positivo tratado con Duraphat alcanzando valores superiores 30 días después de su aplicación.

Los barnices de flúor tienen la gran propiedad de favorecer la formación de compuestos globulares alrededor de las superficies, los cuales actúan como reservorios de lenta liberación por periodos prolongados Los barnices fluorados son altamente eficaces produciendo una remineralización del 93.48% de las manchas blancas, tras 4 aplicaciones en un periodo de 12 semanas (295) . En relación a esto, otro estudio realizado por Castillo J. y cols.,(2001) observó una liberación constante de dos barnices, entre ellos Duraphat durante 28 semanas, esto presenta una similitud a lo encontrado en nuestra investigación ya que después de 30 días se pudo apreciar una remineralización de la zona lo cual no es efecto directo de la aplicación del fluoruro sino se debe al reservorio y la lenta liberación durante los desafíos ácidos (296).

La concentración de *Na* en el grupo de Esmalte intacto fue inferior a la encontrada en el grupo Control negativo (pasta sin F). El Control negativo (pasta sin F) y el grupo Orthocare presentaron las mayores concentraciones de Na, siendo estadísticamente diferente a las encontradas en los grupos Curodont Protect y Curodont Protect + Fluor Protector. El grupo Control negativo (pasta sin F) presentó valores superiores y estadísticamente significativos respecto a los grupos tratados con Regenerate y Control positivo (Duraphat). En un estudio se evaluó la eficacia de las soluciones de fluoruro de sodio frente a fluoruro de estaño al 2% y 8% durante 12 meses en 823 niños obteniendo

una menor incidencia de nuevos dientes cariados en los que utilizaron el fluoruro de sodio y el fluoruro de estaño al 2% (297).

Existen estudios en los que se comprueba que el NaF no logra reducir el número de *Streptococcus Mutans* ni en placa ni en saliva, aunque sí puede incrementar la resistencia del diente a la desmineralización; no obstante, es incapaz de reducir la formación de placa (298). En nuestro estudio el grupo de Esmalte intacto fue el que presento una menor concentración de Na, coincidiendo con los valores de microdureza y presentando una reducción de su microdureza inicial, debido al proceso de desmineralización.

El grupo con mayor contenido en *Mg* fue el Control positivo (Duraphat), siendo estadísticamente diferente a los valores obtenidos en los grupos Esmalte intacto, Control negativo (pasta sin F), Curodont Protect, Curodont Protect + Fluor Protector y Regenerate. Se ha demostrado que magnesio (Mg) puede desempeñar un papel importante en la prevención de la enfermedad periodontal y la caries, ya que tiene la capacidad de reducir la inflamación causada por las toxinas bacterianas (299); sin embargo hay estudios que no ven asociaciones significativas con la caries dental (300). Los valores del contenido mineral y la birrefringencia del esmalte sano revelan que un menor contenido mineral se correlaciona con una menor densidad (301). De forma similar, un menor contenido mineral se correlaciona con un mayor contenido de CO3, tal y como informaron Robinson y cols., (1971) (302), y también con un mayor contenido de magnesio (303).

Esto sugiere que el magnesio y el carbono en los núcleos de cristalitos podrían influir en la susceptibilidad del esmalte a la caries. Una vez producido el ataque ácido, el magnesio liberado en estas áreas podría dificultar la autoreparación, ya que el magnesio parece inhibir la remineralización (304). Posiblemente el magnesio y el carbonato en el esmalte constituyen un talón de Aquiles y si las bolsas de magnesio y esmalte rico en carbonato podrían explicar el progreso rápido de la lesión cariosa (303). Sin embargo, esto entra en controversia con lo detectado en este estudio, ya que el mayor valor fue encontrado en el grupo control Positivo (Duraphat), siendo el grupo con mayor resistencia al ataque ácido y menor pérdida de microdureza.

Se ha observado que la dureza de los dientes se puede mejorar añadiendo zinc, por otro lado, el magnesio, hace que el sustrato sea más poroso, y el fluoruro, hace que la estructura

del diente sea más resistente al ataque ácido (204, 291–293). El contenido de otros elementos como Mg y Na rara vez superaron el 2 %, independientemente del grupo de dientes analizado (287). En nuestro estudio no llegó superar el 0,34%.

La mayor concentración de *Si* se encontró en el grupo tratado con Regenerate, observándose diferencia significativa frente a los valores encontrados en los grupos Esmalte intacto, Control positivo (Duraphat), Control negativo (pasta sin F), Curodont Protect y Curodont Protect + Fluor Protector. El grupo de Esmalte desmineralizado no presentaba Si en su composición, estableciendo diferencias significativas con el resto de los grupos en los que si había presencia de este elemento químico. El grupo tratado con Orthocare se encuentran muy por encima del grupo Control negativo (pasta sin F), siendo estadísticamente significativo. Fogels HR. y cols., (1979) realizaron un ensayo clínico durante 3 años para comparar dos dentífricos con fluoruro de estaño, uno a base de pirofosfato cálcico y otro a base de gel de sílice, con un dentífrico de control sin fluoruro. El dentífrico de prueba, fluoruro de estaño en una base de gel de sílice, redujo la caries de forma significativa en comparación con el dentífrico de control sin fluoruro (308). En otro ensayo clínico con una duración de 2 años. También se puso a prueba una pasta con base de sílice y hubo una protección a nivel oclusal de 22,1 % y en interproximal del 37,1% (309).

Wood N. y cols., (2018) utilizando un modelo interproximal in vitro, encontraron una mayor prevención de la desmineralización con la aplicación combinada de pasta y suero a base de silicato de calcio en comparación con una pasta de dientes con flúor convencional (1450 ppm F-), y con una pasta de dientes sin fluoruro (246).

En nuestro estudio la mayor concentración de sílice se encontró en Regenerate, porque es una pasta y sérum compuesta principalmente por silicato de calcio y fosfato. El grupo del esmalte desmineralizado no presentaba sílice, coincidiendo estos resultados con las pruebas de microdureza obtenidas donde Regenerate obtuvo valores muy superiores al esmalte desmineralizado existiendo diferencias significativas.

En cuanto al contenido en *Cl,* los resultados observados en los grupos de Esmalte intacto y Curodont Protect fueron superiores y estadísticamente significativos respecto a los valores del grupo Regenerate y Control positivo (Duraphat). Las concentraciones de

Cl del grupo Control negativo (pasta sin F), Orthocare y Curodont + Fluor Protector fueron superiores a las encontradas en el grupo Regenerate, existiendo diferencias significativas entre ellos. Y la menor concentración de Cl encontrada fue en el grupo de esmalte desmineralizado. En una tesis doctoral pusieron a prueba dos geles para comprobar su eficacia con respecto a la remoción química de la caries dental, el gel con un contenido mayor en Cl Carisolv tuvo un mayor efecto antibacteriano evitando el crecimiento de las cepas bacterianas en comparación con el que el que no presentaba Cl (310). El cloro actúa rompiendo las uniones moleculares de las bacterias y presenta acción disolvente sobre los restos orgánicos, principalmente el hipoclorito de sodio, considerado un potente agente antibacteriano (311). Al extrapolarlo a nuestros resultados podemos determinar que hubo un mayor control bacteriano en el Esmalte intacto y Curdont Protect. Mientras que el esmalte desmineralizado presentaba la menor concentración hubo una mayor pérdida de microdureza y una mayor desmineralización.

Por todo lo descrito anteriormente, podemos rechazar la hipótesis nula (H0) número 2, demostrando que el contenido neto mineral tras el empleo de cuatro agentes remineralizantes (péptido P11-4, nanohidroxiapatita, barniz de flúor 2.26% NaF y sistemas de silicato de calcio y fosfato de sodio) en esmalte bovino previamente desmineralizado se ha visto afectado en los diversos grupos experimentales. Siendo el grupo de esmalte desmineralizado el de menor contenido mineral. El mayor contenido en flúor se obtuvo en el grupo tratado con barniz de flúor al 2.26% (Duraphat) y en segundo lugar en el sistema de silicato de calcio y fosfato de sodio (Regenerate). En cuanto al calcio los mayores valores se obtuvieron en el Control negativo y Curodont Protect (péptido P11-4). El sistema de silicato de calcio y fosfato de sodio (Regenerate) presentó un mayor contenido en fósforo seguido de Curdodont Protect.

6.2.3 Alteraciones morfológicas del esmalte.

El microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM), es un instrumento que al igual que el SEM es capaz de ofrecer una amplia variedad de información procedente de la superficie de la muestra, pero con mayor resolución y con un rango de energía mucho mayor. El funcionamiento es igual al de un SEM convencional; se barre un haz de electrones sobre la superficie de la muestra mientras que en un monitor se visualiza la información que nos interesa en función de los detectores disponibles. De esta manera obtenemos diferentes imágenes topográficas de la muestra, las más empleadas son las de emisión de electrones secundarios y electrones retrodispersados que proporcionan abundante información morfológica (312). Por ello se ha utilizado en nuestro estudio para captar imágenes de las muestras de los grupos experimentales en distintas resoluciones y observar las diferentes alteraciones morfológicas.

En un estudio realizado por Malmberg P. y cols., (2019) se utilizaron pastas experimentales de CaP, y al analizar las imágenes obtenidas en FESEM se observó una superficie de esmalte lisa y sin manchas, conservando gran parte de las características del esmalte intacto. Con las pastas experimentales de CaP de relativamente menor acidez, por lo tanto, se indujo una interacción conservadora con el esmalte, lo que resultó en un efecto de desmineralización más leve (291). En nuestro estudio, las imágenes obtenidas con la pasta Regenerate permiten observar una superficie más homogénea y densa, con menos irregularidades, se pueden apreciar zonas con diversos poros, estos se encuentran obliterados por una capa de depósitos esferoidales (posibles depósitos de calcio, fosfato y flúor) en la superficie que se alternan con otras zonas más planas y homogéneas. Las áreas planas también presentan depósito de partículas redondeadas y de menor tamaño que las encontradas dentro de los poros debido a la remineralización del esmalte. Esto concuerda con los resultados obtenidos en la microdureza y el análisis del contenido mineral. También podemos apreciar este patrón en el grupo tratado con Curodont Protect donde se observa una superficie con diversas irregularidades y depresiones, numerosos poros obliterados por una capa de aglomerados pequeños y redondeados y, también, por diversas varillas alargadas y finas **(ver figura 51)**. Presenta una superficie similar a la

observada en el grupo tratado con Regenerate, pero, a diferencia de este, también presenta varillas obliterando los poros y no solo partículas redondeadas (remineralización).

En otro estudio realizado por Bidlack F.B y cols., (2014) se analizó el esmalte de roedores y se pudo apreciar una zona con forma de encaje y áreas lisas, determinada por la presencia de material orgánico que se marcó con un contraste, ya que la parte mineral del esmalte se había eliminado por un proceso previo de grabado, exponiendo la matriz orgánica (313). Una situación similar se observó en nuestro estudio en las muestras de Esmalte desmineralizado donde se apreciaba una superficie con diversas irregularidades donde se diferencian zonas con líneas bien marcadas y alargadas, con forma de varillas (puede interpretarse como primas del esmalte), y otras zonas más lisas y aplanadas ubicadas entre las líneas, siguiendo un patrón más esferoidal similar a un encaje (pueden interpretarse como material orgánico presente alrededor de los prismas, substancia interprismática), esto y concuerda con los resultados obtenido en microdureza y contenido mineral demostrando una desmineralización.

En el estudio de Gomes MN. y cols., (2018) se analizó un agente blanqueador in vitro y se analizaron las imágenes de FESEM, al evaluar la superficie del esmalte con peróxido de hidrógeno al 35%, se observó la presencia de zonas erosionadas, zonas aplanadas y una mezcla de zonas lisas y rugosas, todas ellas con una porosidad no uniforme. La eliminación de la capa superficial mostró grandes cantidades de procesos de Tomes en comparación con el grupo de control. Este aumento de la porosidad y la exposición de los procesos de Tomes pueden provocar un aumento de la sensibilidad (314). Se ha observado un aumento de la porosidad superficial, una mayor cantidad de depresiones prismáticas y áreas de erosión superficial en dientes humanos tras la aplicación de peróxido de hidrógeno al 35% (315).

A partir de los cambios estructurales, se produce la exposición del prisma del esmalte. Al interactuar el peróxido con la estructura del esmalte, el nitrógeno y el oxígeno se descomponen y penetran en el esmalte más rápidamente en la fase orgánica. Las conexiones entre los cristales se pierden y los poros se hacen visibles (316). Esto se pudo observar en el grupo Control negativo (pasta sin flúor), se aprecia una superficie muy irregular, con aspecto moteado y rugoso. Se observan múltiples microporos y numerosos cristales en forma de varillas finas y alargadas. Se puede comprobar que existe una

disposición más irregular y desorganizada de dichas varillas y múltiples espacios intercristalinos a lo largo de toda la superficie del esmalte, debido a la degradación de los cristales del esmalte. En el grupo tratado con Orthocare se observó algo similar, una superficie irregular, con numerosas porosidades y pequeñas depresiones, múltiples varillas finas y alargadas las cuales se encuentran formando una especie de entramado desorganizado donde se pueden apreciar los espacios intercristalinos debido a la degradación de los cristales del esmalte **(ver figura 50)**. Son imágenes muy parecidas a las observadas en el grupo Control negativo (pasta sin F) **(ver figura 48).**

Sin embargo, en un estudio realizado por Memarpour M. y cols., (2019) la aplicación de nano-(HAP) 0,15 % creó una capa que cubrió la superficie y penetró en partes del esmalte grabado dando un aspecto más liso y homogéneo (317), esto no concuerda con lo analizado en este artículo. Tanto los resultados de microdureza como del resultado de la ratio Ca/P, se aprecia una mayor desmineralización y una menor resistencia al ataque acido en este grupo experimental.

En el estudio realizado por Gomes MN. y cols., (2018) se observó una mayor deposición de mineral en la superficie en el grupo CPP-ACP. Hay una mayor deposición de iones de calcio (38,4%) en la superficie, obliterando los espacios interprismáticos y cubriendo las áreas de depresión (314). Otros autores encontraron deposición mineral al utilizar agentes oxidantes para el blanqueamiento de autoaplicación, tanto en el esmalte como en la dentina (318). La acción protectora de la superficie provoca la formación de una capa que rellena las cavidades interprismáticas y cubre parcialmente los prismas (319). El proceso de remineralización aún no se comprende totalmente, pero la reparación se describe probablemente por la deposición de minerales en las zonas porosas en lugar del crecimiento de nuevos cristales (320). El esmalte remineralizado por CPP-ACP es más resistente a los cambios de pH debido a la hidroxiapatita con una alta concentración de iones de calcio y fosfato (321).

Algo similar ocurrió en el grupo de Esmalte intacto se aprecia una superficie con zonas homogéneas y otras zonas con pequeñas ondulaciones. Se observan numerosos depósitos alargados en forma de varillas y otros más cortos con forma más cuadrada, debido a la posible degradación de los cristales del esmalte. Estos depósitos, se encuentran formando capas de aglomerados en diversas zonas de la superficie del esmalte. En el

grupo Control positivo (Duraphat) también se aprecia una superficie densa e irregular, con áreas más suaves y onduladas y, otras zonas más irregulares y rugosas, caracterizada por la presencia de diversos poros, los cuales se encuentran en su mayoría obliterados por una capa de conglomerados esféricos (depósitos de fluoruro cálcico) que dibujan un punteado en la mayor parte de la superficie del esmalte, esto concuerda con los resultados obtenido en la microdureza y contenido mineral mostrando una mayor resistencia a los ciclos de pH y una mayor remineralización.

También podemos apreciar este patrón en el grupo tratado con Curodont Protect + Fluor Protector se observa una superficie moteada, con ondulaciones, de aspecto áspero y agrietado. Se aprecian diversos montículos irregulares, los cuales presentan numerosas grietas y poros. Puede observarse a través de la apertura de las grietas unos precipitados en forma de láminas, capas o escamas y algunas varillas de forma aislada en algunos puntos de la superficie del esmalte, debido a una posible remineralización.

Basándonos en estas observaciones, sugerimos una secuencia de los procesos principales que controlan la formación inicial del esmalte: primero, el establecimiento de un microambiente adecuado asociado con la eliminación de la lámina basal y la secreción de material denso en electrones y punteado; y segundo la formación inicial de cristales de fosfato. En general, la formación de cristales requiere una solución sobresaturada y un acontecimiento nucleante. Una solución está sobresaturada cuando la concentración iónica supera su producto de solubilidad (322).

Interpretamos que estos datos apoyan el concepto de que durante la formación inicial del esmalte se forman cristales cortos y desorientados de baja relación de fosfato cálcico. Varios autores han investigado la transformación de fosfatos cálcicos de baja proporción en hidroxiapatitas (309, 310). Proponemos que, en el esmalte inicial, los cristales cortos y orientados aleatoriamente son una fase de fosfato cálcico.

Hay estudios que apoyan la hipótesis de que la nucleación de novo y el crecimiento del cristal HAP del esmalte son independientes de los procesos de mineralización caracterizados para la dentina (322).

En nuestro estudio se puede observar que los primeros cristales de esmalte son pequeños y cortos.

Tras lo expuesto anteriormente, podemos rechazar la hipótesis nula (H0) 3, demostrando que tras el empleo de cuatro agentes remineralizantes como son el péptido P11-4, nanohidroxiapatita, barniz de flúor 2.26% NaF y sistemas de silicato de calcio y fosfato de sodio, se ve afectada la morfología del esmalte previamente desmineralizado en todos los grupos de estudio. En el grupo barniz de flúor 2.26% (Duraphat), silicato de calcio y fosfato de sodio (Regenerate) y péptido P11-4 (Curodont Protect) se observó una superficie con poros obliterados y depósitos de fluoruro calcio, evidenciando una remineralización de la superficie. Mientras que en el grupo tratado con nanohidroxiapatita (Orthocare) se observaron numerosos poros y espacios intercristalinos debido a una desmineralización del esmalte.

6.2.4 Rugosidad superficial del esmalte

Para realizar la valoración de las alteraciones de la rugosidad superficial y de topografía en la superficie de las muestras tratadas con los cuatro agentes remineralizantes, se utilizó el Microscopio de Fuerza Atómica (AFM Nano- Observer, ScienTec Ibérica, Madrid, España)

La microscopía de fuerza atómica (AFM) es una herramienta útil para el estudio y la observación de la superficie dental (325–327) ya que proporciona imágenes en dos dimensiones y tres dimensiones que nos permite hacernos una idea de la situación topográfica de cada muestra, también podemos obtener información cuantitativa como la rugosidad y propiedades mecánicas. Debido a su mecanismo de formación de imágenes, no hay necesidad de tinción, deshidratación, recubrimiento de película fina o un entorno de vacío. Por lo tanto, las muestras de esmalte dental y los túbulos de dentina pueden estudiarse directamente (328).

La microscopía electrónica de barrido también se puede utilizar para evaluar la rugosidad de la superficie, al compararlo con las fotomicrografías FESEM estas son más subjetivas, ya que no proporcionan una evaluación cuantitativa de las superficies y, por lo tanto, no son adecuadas para la evaluación comparativa de la topografía del esmalte (315, 316). Una alternativa a SEM es AFM, ya que esta tecnología genera múltiples escaneos mecánicos de alta resolución en un rango de nano escalas (331).

La principal ventaja de la AFM sobre otras tecnologías es que proporciona datos cuantitativos sobre la rugosidad (332). Recientemente, se han descrito cambios en las superficies del esmalte en función del tratamiento superficial in situ (318, 319), por ello decidimos usar esta prueba para evaluar si existen cambios en la rugosidad superficial entre los distintos grupos experimentales después de 30 días de experimentación.

Las diferencias para la preparación de muestras de esmalte antes de los estudios morfológicos pueden estar relacionadas con la observación de características específicas en la superficie. Algunos estudios relacionan mayor rugosidad superficial con un mayor grado de desmineralización debido a un aumento de la porosidad de la superficie (334–336), sin embrago otros estudios lo relacionan con una remineralización debido al depósito de minerales en la superficie, lo cual conlleva a una mayor rugosidad superficial (240, 323, 324). Por lo tanto, es difícil comparar los estudios sobre el tema. Una definición de los métodos a realizar facilitaría la labor de los investigadores y las asociaciones clínicas; sería recomendable mientras tanto no utilizarlo como una prueba aislada sino como un examen complementario a otros. En este estudio hemos tenido en cuenta no solo el análisis con AFM para llegar a conclusiones, sino también las otras pruebas realizadas de microdureza superficial, EDX para evaluación del contenido mineral y FESEM para obtención de imágenes de las muestras en alta resolución, como se ha descrito anteriormente.

El grupo con mayor rugosidad superficial fue el Control positivo (Duraphat) flúor al 2.26%, seguido del grupo tratado con Curodont Protect + Fluor Protector (péptido P11-4 + F) y en tercer lugar la nanohidroxiapatita.

Debido al análisis de EDX y microdureza superficial, podemos observar que Duraphat y Curodont + Fluor Protector (péptido P11-4 + F) tienen una mayor rugosidad, debido depósito de minerales sobre la superficie del esmalte lo cual favorece una remineralización y no a una desmineralización lo cual concuerda con los estudios (240, 323, 324). En las imágenes en 3D se aprecia una topografía muy similar en ambos grupos. Los agentes fluorados de alta concentración, como el gel y el barniz, se consideran un buen vehículo para la aplicación tópica debido a la formación de una barrera mecánica (325, 326) y han demostrado una reducción de la pérdida de minerales del esmalte y una inhibición del desarrollo de lesiones causadas por la erosión in vitro (327, 328). Además,

los agentes fluorados en gel y barniz han demostrado una mayor protección frente a la erosión dental (325, 329).

Sin embargo, el grupo tratado con nanohidroxiapatita que también presentó una rugosidad superficial elevada, en este caso, analizando los resultados de microdureza y EDX, puede deberse a una desmineralización de la superficie y la formación de microporos, esto se encuentra en relación con lo analizado en los estudios (334–336). También pudo apreciarse un cambio de coloración en la superficie del esmalte tratado con este agente remineralizante volviéndose una superficie más amarillenta que el resto de las muestras. En un estudio de Vieira-Junior W. y cols., (2018) se examinó la correlación entre la alteración de la rugosidad del esmalte y el color dental y se observó el mayor cambio de color en el grupo con mayor aumento de la rugosidad del esmalte. Los autores concluyeron que las alteraciones en la estructura del esmalte pueden tener un efecto sobre los cambios en el color de los dientes (344), esto podría explicar el cambio de coloración a un tono más amarillento del grupo tratado con nanohidroxiapatita, lo cual se relaciona con una mayor desmineralización y rugosidad superficial.

Por otro lado, se encontró menor rugosidad al emplear la pasta sin F, Curodont, Esmalte intacto y Regenerate, en algunos estudios lo señalan como un signo de remineralización (337), ya que la estructura se ha mantenido estable, sin formación de microporos resistiendo al ataque ácido durante 30 días. Sin embargo, si analizamos Regenerate con los datos aportados por la microdureza y EDX, concuerda y es favorable a esta teoría. El esmalte intacto presentó valores de microdureza muy inferiores al resto de grupos y EDX similar al resto de grupos, aquí no se encuentra en concordancia con esta teoría, ya que debería haber presentado valores de rugosidad mayores debido a la desmineralización, aunque esta se pudo ver contrarrestada por el depósito débil de minerales en la superficie, y por ello haber dado una topografía más regular (257). El grupo tratado con Curodont y pasta sin F ocurre algo similar, aunque presentaron valores de microdureza más elevados que Esmalte intacto, pero eran valores bajos en comparación con el resto de los grupos, una rugosidad superficial más baja puede deberse al débil depósito de minerales en las zonas desmineralizadas. Esto sugiere que los precursores minerales se distribuyeron de manera más homogénea a través de la matriz,

lo que permite una interacción más fina con la red orgánica, en lugar de precipitarse en la superficie (338).

Se ha sugerido que, en el tratamiento de las lesiones de mancha blanca del esmalte, el P11-4, gracias a su baja viscosidad, es capaz de penetrar en los microporos de la superficie desencadenando un proceso de autoensamblaje y generando un andamiaje bioactivo (40). El efecto remineralizante del péptido autoensamblante P11-4 evaluado mediante AFM y SEM resultó ser reducido si se aplicaba antes de un ciclo de desmineralización y si se aplicaba sobre esmalte intacto, pero sí que presentaba cierta acción remineralizante (272).

Los resultados de un estudio realizado por Bertassoni LE. y cols., (2010) confirman la hipótesis de que una formación mineral controlada y continua facilita la remineralización y la recuperación mecánica superficial de la dentina desmineralizada (338).

Por lo tanto, podemos rechazar la hipótesis nula (H0) 4, demostrando que la aplicación de péptido P11-4, nanohidroxiapatita, barniz de flúor 2.26% NaF y sistemas de silicato de calcio y fosfato de sodio afectan sobre la rugosidad superficial del esmalte bovino desmineralizado. Se observó una mayor rugosidad superficial en el grupo tratado con barniz de flúor 2.26%, seguido del péptido P11-4 + flúor, debido al depósito de fluoruro cálcico sobre la superficie. En tercer lugar, la nanohidroxiapatita (Orthocare) debido al formación de microporos y desmineralización. Por último, con menor rugosidad superficial se encuentra el péptido P11-4 (Curodont Protect) y el sistema de silicato de calcio y fosfato de sodio (Regenerate), interpretándose como un signo de remineralización ya que se ha mantenido estable la superficie, resistiendo al ataque ácido.

6.3. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

A pesar de que los estudios in vitro presentan numerosas ventajas, no permiten replicar el entorno oral con todas las variaciones biológicas que se sabe que influyen en el proceso de desmineralización y remineralización (231). Es poco probable que las investigaciones in vitro estén totalmente de acuerdo con los hallazgos de los estudios in situ o in vivo (234–237).

Otra limitación importante a tener en cuenta son es la diferencia morfológica, de composición química y de propiedades físicas entre los dientes humanos y los bovinos, las cuales deben tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos en el estudio experimental (229).

Por otro lado, la utilización de un novedoso material biomineralizador como es el Curodont Protect (péptido P11-4), conlleva a la falta de artículos de investigación sobre su microdureza superficial hasta la fecha.

6.4. LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

Se pretende seguir esta línea de investigación analizando los nuevos biomateriales que salgan al mercado introduciendo nuevos sistemas de análisis.

7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos del estudio experimental in vitro reflejan las siguientes conclusiones:

1. Al evaluar la resistencia del esmalte mediante análisis de microdureza, tras la aplicación de cuatro agentes remineralizantes (péptido P11-4, nanohidroxiapatita, barniz de flúor 2.26% NaF y sistemas de silicato de calcio y fosfato de sodio), en esmalte bovino previamente desmineralizado se ha observado que el grupo más resistente fue el tratado con barniz de flúor al 2,26%, seguido del sistema de silicato de calcio y fosfato de sodio; luego el péptido P11-4, y el que menos resistencia tuvo a los ciclos desmineralización/remineralización fue la nanohidroxiapatita, presentando valores inferiores al grupo de esmalte intacto.
2. El contenido neto mineral tras el empleo de cuatro agentes remineralizantes (péptido P11-4, nanohidroxiapatita, barniz de flúor 2.26% NaF y sistemas de silicato de calcio y fosfato de sodio) en esmalte bovino previamente desmineralizado se ha visto modificado en los diversos grupos experimentales. El mayor contenido en flúor se obtuvo en el grupo tratado con barniz de flúor al 2.26% (Duraphat) y en segundo lugar en el sistema de silicato de calcio y fosfato de sodio (Regenerate). En cuanto al calcio los valores fueron homogéneos. El sistema de silicato de calcio y fosfato de sodio (Regenerate) presentó un mayor contenido en fósforo seguido de Curodont Protect. El silicio se encontró en mayor proporción en el grupo Regenerate.
3. Se han observado alteraciones morfológicas del esmalte previamente desmineralizado en todos los grupos de estudio tras la aplicación de cuatro agentes remineralizantes (péptido P11-4, nanohidroxiapatita, barniz de flúor 2.26% NaF y sistemas de silicato de calcio y fosfato de sodio). En el grupo barniz de flúor 2.26% (Duraphat), silicato de calcio y fosfato de sodio (Regenerate) y péptido P11-4 (Curodont Protect) se observó una superficie con poros obliterados y depósitos de fluoruro calcio, evidenciando una remineralización de la superficie. Mientras que en el grupo tratado con nanohidroxiapatita (Orthocare) se observaron numerosos poros y espacios intercristalinos debido a una desmineralización del esmalte.

4. Existen alteraciones de rugosidad superficial tras la aplicación de cuatro agentes remineralizantes (péptido P11-4, nanohidroxiapatita, barniz de flúor 2.26% NaF y sistemas de silicato de calcio y fosfato de sodio) en esmalte bovino previamente desmineralizado, observándose una mayor rugosidad superficial en el grupo tratado con barniz de flúor 2.26%, seguido del péptido P11-4 + flúor, debido al depósito de fluoruro cálcico sobre la superficie. En tercer lugar, la nanohidroxiapatita (Orthocare) debido al formación de microporos y desmineralización. Por último, con menor rugosidad superficial se encuentra el péptido P11-4 (Curodont Protect) y el sistema de silicato de calcio y fosfato de sodio (Regenerate), interpretándose como un signo de remineralización ya que se ha mantenido estable la superficie, resistiendo al ataque ácido.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. GBD 2017 Oral Disorders Collaborators, Bernabe E, Marcenes W, Hernandez CR, Bailey J, Abreu LG, et al. Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions from 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. J Dent Res. abril de 2020;99(4):362-73.

2. Bravo Pérez M, Almerich Silla JM, Ausina Márquez V, Avilés Gutiérrez P, Blanco González JM, Canorea Díaz E, Casals Peidró E, Gómez Santos G, Hita Iglesias C, Llodra Calvo JC, Monge Tàpies M, Montiel Company JM, Palmer Vich PJ, Sainz Ruiz C. Encuesta de Salud Oral en España 2015. 2016;21(Supl.1):8-48.

3. Llodra Calvo JC, Bourgeois D. Estudio prospectivo Delphi la salud bucodental en España 2020: tendencias y objetivos de salud oral. RCOE. noviembre de 2020;25(4).

4. Glaros AG. Incidence of diurnal and nocturnal bruxism. The Journal of Prosthetic Dentistry. mayo de 1981;45(5):545-9.

5. WHA74.5. Oral health. In: Seventy-fourth World Health Assembly, Geneva, 24 May–1 June 2021. Summary and verbatim records. Geneva: World Health Organization; 2021.

6. Llodra Calvo Juan Carlos, Bravo Pérez Manuel, Cortés Martinicorena Francisco Javier. Encuesta de Salud Oral en España (2000). RCOE. 7 (esp):19-63.

7. Montero-Martín J, Bravo-Pérez M, Albaladejo-Martínez A, Hernández-Martín LA, Rosel-Gallardo EM. Validation the Oral Health Impact Profile (OHIP-14sp) for adults in Spain. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 1 de enero de 2009;14(1):E44-50.

8. Papaioannou W, Oulis CJ, Latsou D, Yfantopoulos J. Oral health related quality of life of Greek adolescents: a cross-sectional study. Eur Arch Paediatr Dent. junio de 2011;12(3):146-50.

9. Moradian-Oldak J. Protein-mediated Enamel Mineralization. Front Biosci. 2012;17(7):1996.

10. Smith CE. Cellular and Chemical Events During Enamel Maturation. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. abril de 1998;9(2):128-61.

11. Cuy JL, Mann AB, Livi KJ, Teaford MF, Weihs TP. Nanoindentation mapping of the mechanical properties of human molar tooth enamel. Archives of Oral Biology. abril de 2002;47(4):281-91.

12. Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML. Dental Enamel Formation and

Implications for Oral Health and Disease. Physiological Reviews. 1 de julio de 2017;97(3):939-93.

13. Goldberg M, Septier D, Lécolle S, Chardin H, Quintana MA, Acevedo AC, et al. Dental mineralization. Int J Dev Biol. febrero de 1995;39(1):93-110.

14. Simmer JP, Fincham AG. Molecular Mechanisms of Dental Enamel Formation. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. abril de 1995;6(2):84-108.

15. Bodier-Houllé P, Steuer P, Meyer JM, Bigeard L, Cuisinier FJG. High-resolution electron-microscopic study of the relationship between human enamel and dentin crystals at the dentinoenamel junction. Cell and Tissue Research. 18 de agosto de 2000;301(3):389-95.

16. Lacruz RS, Nanci A, Kurtz I, Wright JT, Paine ML. Regulation of pH During Amelogenesis. Calcif Tissue Int. febrero de 2010;86(2):91-103.

17. Sasaki S, Takagi T, Suzuki M. Cyclical changes in pH in bovine developing enamel as sequential bands. Archives of Oral Biology. 1991;36(3):227-31.

18. Lyman GE, Waddell WJ. pH gradients in the developing teeth of young mice from autoradiography of [14C]DMO. American Journal of Physiology-Renal Physiology. 1 de abril de 1977;232(4):F364-7.

19. Gómez de Ferraris M, Campos Muñoz A. Histología y embriología bucodental. 2a ed. Madrid: Médica Panamericana; 2002.

20. Boyde A. Microstructure of Enamel. En: Chadwick DJ, Cardew G, editores. Novartis Foundation Symposia. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.; 2007; 18-31.

21. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. The Lancet. enero de 2007;369(9555):51-9.

22. Roy S, Basu B. Mechanical and tribological characterization of human tooth. Materials Characterization. junio de 2008;59(6):747-56.

23. Zhang YR, Du W, Zhou XD, Yu HY. Review of research on the mechanical properties of the human tooth. Int J Oral Sci. junio de 2014;6(2):61-9.

24. Willems G, Noack MJ, Inokoshi S, Lambrechts P, Van Meerbeek B, Braem M, et al. Radiopacity of composites compared with human enamel and dentine. Journal of Dentistry. diciembre de 1991;19(6):362-5.

25. Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW, Balooch M. Mechanical properties of human dental enamel on the nanometre scale. Archives of Oral Biology. febrero de 2001;46(2):173-83.

26. Kodaka T, Debari K, Yamada M, Kuroiwa M. Correlation between Microhardness and Mineral Content in Sound Human Enamel (Short Communication). Caries Res. 1992;26(2):139-41.

27. Abbarin N, San Miguel S, Holcroft J, Iwasaki K, Ganss B. The Enamel Protein Amelotin Is a Promoter of Hydroxyapatite Mineralization. J Bone Miner Res. mayo de 2015;30(5):775-85.

28. Bartlett JD, Simmer JP. New Perspectives on Amelotin and Amelogenesis. J Dent Res. mayo de 2015;94(5):642-4.

29. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The Structural Biology of the Developing Dental Enamel Matrix. Journal of Structural Biology. junio de 1999;126(3):270-99.

30. Bartlett JD. Dental Enamel Development: Proteinases and Their Enamel Matrix Substrates. ISRN Dentistry. 16 de septiembre de 2013;2013:1-24.

31. Moradian-Oldak J. The REGENERATION of TOOTH ENAMEL. Dimens Dent Hyg. agosto de 2009;7(8):12-5.

32. Kärrman Mårdh C, Bäckman B, Simmons D, Golovleva I, Gu TT, Holmgren G, et al. Human ameloblastin gene: genomic organization and mutation analysis in amelogenesis imperfecta patients: Ameloblastin gene structure and mutation analysis. European Journal of Oral Sciences. febrero de 2001;109(1):8-13.

33. Bartlett JD, Simmer JP. Kallikrein-related peptidase-4 (KLK4): role in enamel formation and revelations from ablated mice. Front Physiol. 4 de julio de 2014;5.

34. Lacruz RS, Smith CE, Smith SM, Hu P, Bringas P, Sahin-Tóth M, et al. Chymotrypsin C (Caldecrin) Is Associated with Enamel Development. J Dent Res. octubre de 2011;90(10):1228-33.

35. Weatherell JA, Robinson C, Hallsworth AS. Variations in the Chemical Composition of Human Enamel. J Dent Res. marzo de 1974;53(2):180-92.

36. Mineralization of human premolar occlusal fissures. A quantitative histochemical microanalysis. Histology and Histopathology. 15 de abril de 2000;(15):499-502.

37. Cury JA, Tenuta LMA. Enamel remineralization: controlling the caries disease or treating early caries lesions? Braz oral res. junio de 2009;23(suppl 1):23-30.

38. Reyes-Gasga J. Estudio del Esmalte Dental Humano por Microscopía Electrónica. ICBI. 12 de diciembre de 2021;9(Especial2):1-6.

39. Chen H, Clarkson BH, Sun K, Mansfield JF. Self-assembly of synthetic

hydroxyapatite nanorods into an enamel prism-like structure. Journal of Colloid and Interface Science. agosto de 2005;288(1):97-103.

40. Brunton PA, Davies RPW, Burke JL, Smith A, Aggeli A, Brookes SJ, et al. Treatment of early caries lesions using biomimetic self-assembling peptides – a clinical safety trial. Br Dent J. agosto de 2013;215(4):E6-E6.

41. Kodaka T, Kuroiwa M, Higashi S. Structural and Distribution Patterns of Surface 'Prismless' Enamel in Human Permanent Teeth. Caries Res. 1991;25(1):7-20.

42. Margolis HC, Beniash E, Fowler CE. Role of Macromolecular Assembly of Enamel Matrix Proteins in Enamel Formation. J Dent Res. septiembre de 2006;85(9):775-93.

43. Lynch CD, O'Sullivan VR, Dockery P, McGillycuddy CT, Sloan AJ. Hunter-Schreger Band patterns in human tooth enamel: HSB patterns in human tooth enamel. Journal of Anatomy. 23 de junio de 2010;217(2):106-15.

44. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. Caries Res. 2020;54(1):7-14.

45. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. Nat Rev Dis Primers. 25 de mayo de 2017;3(1):17030.

46. Zero DT. Dental caries process. Dent Clin North Am. octubre de 1999;43(4):635-64.

47. Simón-Soro Á, Tomás I, Cabrera-Rubio R, Catalan MD, Nyvad B, Mira A. Microbial Geography of the Oral Cavity. J Dent Res. julio de 2013;92(7):616-21.

48. Emilson CG, Krasse B. Support for and implications of the specific plaque hypothesis. Eur J Oral Sci. abril de 1985;93(2):96-104.

49. Mira A, Simon-Soro A, Curtis MA. Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. J Clin Periodontol. marzo de 2017;44:S23-38.

50. Fejerskov O. Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. Caries Res. 2004;38(3):182-91.

51. Featherstone J. Dental caries: a dynamic disease process. Australian Dental Journal. septiembre de 2008;53(3):286-91.

52. Takahashi N. Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an

ecological niche and its relationship with oral diseases. International Congress Series. septiembre de 2005;1284:103-12.

53. Featherstone JDB. The Continuum of Dental Caries—Evidence for a Dynamic Disease Process. J Dent Res. julio de 2004;83(1_suppl):39-42.

54. ten Cate JM, Featherstone JDB. Mechanistic Aspects of the Interactions Between Fluoride and Dental Enamel. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. julio de 1991;2(3):283-96.

55. Gugnani N, Pandit IK, Srivastava N, Gupta M, Sharma M. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): A New Concept. Int J Clin Pediatr Dent. 2011;4(2):93-100.

56. Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H, et al. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. Commun Dent Oral Epidemiol. junio de 2007;35(3):170-8.

57. 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. septiembre de 2004;21(3):193-8.

58. Department of Restorative Dentistry, Near East University, School of Dentistry, Nicosia, Cyprus, Sadikoglu IS. White Spot Lesions: Recent Detection and Treatment Methods. Cyprus J Med Sci. 30 de septiembre de 2020;5(3):260-6.

59. Shore RC, Kirkham J, Brookes SJ, Wood SR, Robinson C. Distribution of Exogenous Proteins in Caries Lesions in Relation to the Pattern of Demineralisation. Caries Res. 2000;34(2):188-93.

60. Shellis RP, Hallsworth AS, Kirkham J, Robinson C. Organic material and the optical properties of the dark zone in caries lesions of enamel: *Organic material in enamel caries*. European Journal of Oral Sciences. octubre de 2002;110(5):392-5.

61. Featherstone JDB, Chaffee BW. The Evidence for Caries Management by Risk Assessment (CAMBRA®). Adv Dent Res. febrero de 2018;29(1):9-14.

62. Young DA, Featherstone JDB. Caries management by risk assessment. Community Dent Oral Epidemiol. febrero de 2013;41(1):e53-63.

63. Ramos-Gomez FJ, Crystal YO, Ng MW, Crall JJ, Featherstone JDB. Pediatric dental care: prevention and management protocols based on caries risk assessment. J Calif Dent Assoc. octubre de 2010;38(10):746-61.

64. Kudiyirickal MG, Ivančaková R. Early Enamel Lesion: Part II. – Histo-

morphology and Prevention. Acta Med (Hradec Kralove, Czech Repub). 2008;51(3):151-6.

65. Cury JA, de Oliveira BH, dos Santos APP, Tenuta LMA. Are fluoride releasing dental materials clinically effective on caries control? Dental Materials. marzo de 2016;32(3):323-33.

66. Li X, Wang J, Joiner A, Chang J. The remineralisation of enamel: a review of the literature. Journal of Dentistry. junio de 2014;42:S12-20.

67. Gudiño-Fernández S. Abordaje Clínico Integral de Mínima Intervención de la Lesión de Caries Dental: Diagnóstico, Biomateriales y Tratamiento. 1.ª ed. Medellin: Amolca; 2023. 333 p.

68. Featherstone JDB, Glena R, Shariati M, Shields CP. Dependence of in vitro Demineralization of Apatite and Remineralization of Dental Enamel on Fluoride Concentration. J Dent Res. febrero de 1990;69(2_suppl):620-5.

69. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New Approaches to Enhanced Remineralization of Tooth Enamel. J Dent Res. noviembre de 2010;89(11):1187-97.

70. Featherstone JDB. THE SCIENCE AND PRACTICE OF CARIES PREVENTION. The Journal of the American Dental Association. julio de 2000;131(7):887-99.

71. Abou Neel E, Aljabo A, Strange A, Ibrahim S, Coathup M, Young A, et al. Demineralization-remineralization dynamics in teeth and bone. IJN. septiembre de 2016;Volume 11:4743-63.

72. Gower LB. Biomimetic Model Systems for Investigating the Amorphous Precursor Pathway and Its Role in Biomineralization. Chem Rev. 12 de noviembre de 2008;108(11):4551-627.

73. Xu F, Laguna L, Sarkar A. Aging-related changes in quantity and quality of saliva: Where do we stand in our understanding? Journal of Texture Studies. febrero de 2019;50(1):27-35.

74. Chicharro JL, Lucía A, Pérez M, Vaquero AF, Ureña R. Saliva Composition and Exercise. Sports Med. julio de 1998;26(1):17-27.

75. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. The Journal of Prosthetic Dentistry. febrero de 2001;85(2):162-9.

76. Nagler RM. Salivary Glands and the Aging Process: Mechanistic Aspects, Health-

Status and Medicinal-Efficacy Monitoring. Biogerontology. agosto de 2004;5(4):223-33.

77. Van Nieuw Amerongen A, Bolscher JGM, Veerman ECI. Salivary Proteins: Protective and Diagnostic Value in Cariology? Caries Res. 2004;38(3):247-53.

78. Anderson LA, Orchardson R. The effect of chewing bicarbonate-containing gum on salivary flow rate and pH in humans. Archives of Oral Biology. marzo de 2003;48(3):201-4.

79. Gao X, Jiang S, Koh D, Hsu CYS. Salivary biomarkers for dental caries. Periodontol 2000. febrero de 2016;70(1):128-41.

80. Larsen MJ, Pearce EIF. Saturation of human saliva with respect to calcium salts. Archives of Oral Biology. abril de 2003;48(4):317-22.

81. Schlesinger DH, Hay DI. Complete covalent structure of statherin, a tyrosine-rich acidic peptide which inhibits calcium phosphate precipitation from human parotid saliva. J Biol Chem. 10 de marzo de 1977;252(5):1689-95.

82. Oppenheim FG, Hay DI, Franzblau C. Proline-rich proteins from human parotid saliva. I. Isolation and partial characterization. Biochemistry. 9 de noviembre de 1971;10(23):4233-8.

83. García-Godoy F, Hicks MJ. Maintaining the integrity of the enamel surface. The Journal of the American Dental Association. mayo de 2008;139:25S-34S.

84. Silverstone LM. Remineralization of human enamel in vitro. Proc R Soc Med. octubre de 1972;65(10):906-8.

85. Dawes C. Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. The Journal of the American Dental Association. mayo de 2008;139:18S-24S.

86. Lenander-Lumikari M, Loimaranta V. Saliva and Dental Caries. Adv Dent Res. diciembre de 2000;14(1):40-7.

87. College of Dentistry, University of Baghdad, Baghdad-Iraq, Dawood IM, Sulafa K. El-Samarrai ProfDr, College of Dentistry, University of Baghdad, Baghdad-Iraq. Saliva and Oral Health. Int J Adv Res Biol Sci. 30 de julio de 2018;5(7):1-45.

88. Vitoria Isidro. Fluoride and prevention of dental caries in childhood. Update (II). Acta Pediatr Esp. 2010;68(3):129-34.

89. Clarkson JJ, McLoughlin J. Role of fluoride in oral health promotion. International Dental Journal. junio de 2000;50(3):119-28.

90. Tenuta LMA, Cury JA. Fluoride: its role in dentistry. Braz oral res. 2010;24(suppl 1):9-17.

91. Buzalaf MAR, Pessan JP, Honório HM, ten Cate JM. Mechanisms of Action of Fluoride for Caries Control. En: Buzalaf MAR, editor. Monographs in Oral Science [Internet]. S. Karger AG; 2011 [citado 4 de febrero de 2023]. p. 97-114. Disponible en: https://www.karger.com/Article/FullText/325151

92. Kanduti D, Sterbenk P, Artnik and. Fluoride: a Review of Use and Effects on Health. Mater Sociomed. 2016;28(2):133.

93. Bolis, C., Ha¨rtli, G.P., Lendenmann, U.,. Fluoride Varnishes - Is There a Correlation Between Fluoride Release and Deposition on Enamel? Oral Health and Preventive Dentistry. 6 de enero de 2016;13(6):545-56.

94. Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VC, Shi X. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. Cochrane Oral Health Group, editor. Cochrane Database of Systematic Reviews. 20 de enero de 2010.

95. Marinho VCC, Worthington HV, Walsh T, Clarkson JE. Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. Cochrane Database Syst Rev. 11 de julio de 2013;(7):CD002279.

96. Baez-Quintero LC, Carlos-Botazzo DA, Nagata EM, Pelim-Pessan J. Concentración de flúor en cremas dentales y enjuagues bucales para niños vendidos en la ciudad de Bogotá, Colombia. Rev nac odontol. 19 de mayo de 2016;12(23):41-8.

97. Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A. Topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels or varnishes) for preventing dental caries in children and adolescents. Cochrane Oral Health Group, editor. Cochrane Database of Systematic Reviews. 20 de octubre de 2003.

98. García LC, Hernández AV, Gil RT, Quintanilla DS, Peiró EC, Beneyto YM. Guía de práctica clínica para la prevención y manejo de las lesiones de mancha blanca asociadas al tratamiento de Ortodoncia. 2021;26.

99. Marinho VC, Chong LY, Worthington HV, Walsh T. Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents. Cochrane Oral Health Group, editor. Cochrane Database of Systematic Reviews. 29 de julio de 2016;2021(2).

100. Marinho VC, Higgins JP, Logan S, Sheiham A. Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents. En: The Cochrane Collaboration, editor. Cochrane Database of Systematic Reviews. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2003; CD002284.

101. Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030. Geneva: World Health Organization; 2022.

102. Cury JA, Oliveira MJL de, Martins CC, Tenuta LMA, Paiva SM. Available fluoride in toothpastes used by Brazilian children. Braz Dent J. 2010;21(5):396-400.

103. Pessan JP, Toumba KJ, Buzalaf MAR. Topical Use of Fluorides for Caries Control. En: Buzalaf MAR, editor. Monographs in Oral Science. S. Karger AG; 2011; 115-32.

104. Tenuta LMA, Cerezetti RV, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM, Cury JA. Fluoride Release from CaF $_2$ and Enamel Demineralization. J Dent Res. noviembre de 2008;87(11):1032-6.

105. Cahen PM, Frank RM, Turlot JC, Juno MT. Comparative unsupervised clinical trial on caries inhibition effect of monofluorophosphate and amine fluoride dentifrices after 3 years in Strasbourg, France. Commun Dent Oral Epidemiol. octubre de 1982;10(5):238-41.

106. Marinho VC, Higgins J, Logan S, Sheiham deceased A. Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. Cochrane Oral Health Group, editor. Cochrane Database of Systematic Reviews. 20 de enero de 2003;2016(11).

107. Bergstrand F. A Review on Prevention and Treatment of Post-Orthodontic White Spot Lesions - Evidence-Based Methods and Emerging Technologies. TODENTJ. 16 de septiembre de 2011;5(1):158-62.

108. Matias JB, Azevedo CS, Vale HF do, Rebelo MAB, Cohen-Carneiro F. Fluoride stability in dentifrices stored in schools in a town of northern Brazil. Braz oral res. 2015;29(1).

109. Zero DT, Zhang JZ, Harper DS, Wu M, Kelly S, Waskow J, et al. The remineralizing effect of an essential oil fluoride mouthrinse in an intraoral caries test. The Journal of the American Dental Association. febrero de 2004;135(2):231-7.

110. Yu D, Sipos T, Wu MM, Bilbault T, Lynch MC, Naleway C. Effect of fluoride/essential oils-containing mouthrinse on the microhardness of demineralized bovine enamel. Am J Dent. junio de 2004;17(3):216-8.

111. Marinho VC, Worthington HV, Walsh T, Chong LY. Fluoride gels for preventing dental caries in children and adolescents. Cochrane Oral Health Group, editor. Cochrane Database of Systematic Reviews. 15 de junio de 2015;2021(2).

112. Cury JA. Cariologia e Fluoretos em Odontologia: Da Pediatria à Geriatria. Santos

Pub; 2023.

113. Dall Agnol MA, Battiston C, Tenuta LMA, Cury JA. Fluoride Formed on Enamel by Fluoride Varnish or Gel Application: A Randomized Controlled Clinical Trial. Caries Res. 2022;56(1):73-80.

114. Sicca C, Bobbio E, Quartuccio N, Nicolo G, Cistaro A. Prevention of dental caries: A review of effective treatments. J Clin Exp Dent. 2016;0-0.

115. Cervantes Sandoval A, Sánchez Sánchez L, Blanco Villegas A, Serna Vergara AD, De la Cruz Cardoso D. Potencial remineralizante del fluoruro diamino de plata al 38% en dentina de dientes temporales afectada por caries. Revista de la Asociación Dental Mexicana. 2022;79(4):204-8.

116. Seifo N, Robertson M, MacLean J, Blain K, Grosse S, Milne R, et al. The use of silver diamine fluoride (SDF) in dental practice. Br Dent J. enero de 2020;228(2):75-81.

117. Oliveira BH, Rajendra A, Veitz-Keenan A, Niederman R. The Effect of Silver Diamine Fluoride in Preventing Caries in the Primary Dentition: A Systematic Review and Meta-Analysis. Caries Res. 2019;53(1):24-32.

118. Cláudia Rodrigues Chibinski A. The Use of Silver Diamine Fluoride in Pediatric Dentistry. En: Zabokova Bilbilova E, editor. Dental Caries [Internet]. IntechOpen; 2021 [citado 8 de abril de 2023]. Disponible en: https://www.intechopen.com/books/dental-caries/the-use-of-silver-diamine-fluoride-in-pediatric-dentistry

119. Llodra JC, Rodriguez A, Ferrer B, Menardia V, Ramos T, Morato M. Efficacy of Silver Diamine Fluoride for Caries Reduction in Primary Teeth and First Permanent Molars of Schoolchildren: 36-month Clinical Trial. J Dent Res. agosto de 2005;84(8):721-4.

120. Duangthip D, Fung MHT, Wong MCM, Chu CH, Lo ECM. Adverse Effects of Silver Diamine Fluoride Treatment among Preschool Children. J Dent Res. abril de 2018;97(4):395-401.

121. Hamama H, Yiu C, Burrow M. Effect of silver diamine fluoride and potassium iodide on residual bacteria in dentinal tubules. Aust Dent J. marzo de 2015;60(1):80-7.

122. Tiba AA, Tiba A, Horvath F, Huh EY, Ford AA, Arens DK, et al. Effects of a Two-Step Silver Diamine Fluoride Varnish on Shear Bond Strength of Restorations, Dentin and Enamel Hardness, and Biofilm Formation. Military Medicine. 15 de julio de 2022;189(6).

123. Fernández-Mafé M, Armengol-Olivares A, Miralles-Jordá L, Vicente-Escuder Á,

Pérez-Bermejo M, Narciso J, et al. In Vitro Study on the Influence of Silver Diamine Fluoride on the Adhesion Strength of Dental Restorative Materials. Front Mater. 11 de mayo de 2022;9:833427.

124. Turton B, Horn R, Durward C. Caries arrest and lesion appearance using two different silver fluoride therapies on primary teeth with and without potassium iodide: 12-month results. Clinical & Exp Dental Res. agosto de 2021;7(4):609-19.

125. Horst JA, Ellenikiotis H, Milgrom PL. UCSF Protocol for Caries Arrest Using Silver Diamine Fluoride: Rationale, Indications and Consent. J Calif Dent Assoc. enero de 2016;44(1):16-28.

126. Pablo Vargas J, Uribe M, Ortuño D, Verdugo-Paiva F. Silver diamine fluoride compared to atraumatic restorative technique for the treatment of caries in primary and mixed first phase dentition Juan Pablo Vargas, Macarena Uribe. Medwave. 31 de agosto de 2020;20(07):e8002-e8002.

127. Rosenblatt A, Stamford TCM, Niederman R. Silver Diamine Fluoride: A Caries "Silver-Fluoride Bullet". J Dent Res. febrero de 2009;88(2):116-25.

128. Seifo N, Cassie H, Radford JR, Innes NPT. Silver diamine fluoride for managing carious lesions: an umbrella review. BMC Oral Health. diciembre de 2019;19(1):145.

129. Lelli M, Putignano A, Marchetti M, Foltran I, Mangani F, Procaccini M, et al. Remineralization and repair of enamel surface by biomimetic Zn-carbonate hydroxyapatite containing toothpaste: a comparative in vivo study. Front Physiol. 5 de septiembre de 2014;5.

130. Hao J, Zou B, Narayanan K, George A. Differential expression patterns of the dentin matrix proteins during mineralized tissue formation. Bone. junio de 2004;34(6):921-32.

131. George A, Bannon L, Sabsay B, Dillon JW, Malone J, Veis A, et al. The Carboxyl-terminal Domain of Phosphophoryn Contains Unique Extended Triplet Amino Acid Repeat Sequences Forming Ordered Carboxyl-Phosphate Interaction Ridges That May Be Essential in the Biomineralization Process. Journal of Biological Chemistry. diciembre de 1996;271(51):32869-73.

132. He G, Dahl T, Veis A, George A. Nucleation of apatite crystals in vitro by self-assembled dentin matrix protein 1. Nature Mater. 1 de agosto de 2003;2(8):552-8.

133. Zheng W, Ding L, Wang Y, Han S, Zheng S, Guo Q, et al. The effects of 8DSS peptide on remineralization in a rat model of enamel caries evaluated by two

nondestructive techniques. Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials. enero de 2019;17(1):228080001982779.

134. Hsu CC, Chung HY, Yang JM, Shi W, Wu B. Influence of 8DSS Peptide on Nano-mechanical Behavior of Human Enamel. J Dent Res. enero de 2011;90(1):88-92.

135. Yang Y, Lv X, Shi W, Zhou X, Li J, Zhang L. Synergistic Inhibition of Enamel Demineralization by Peptide 8DSS and Fluoride. Caries Res. 2016;50(1):32-9.

136. Kind L, Stevanovic S, Wuttig S, Wimberger S, Hofer J, Müller B, et al. Biomimetic Remineralization of Carious Lesions by Self-Assembling Peptide. J Dent Res. julio de 2017;96(7):790-7.

137. Jablonski-Momeni A, Nothelfer R, Morawietz M, Kiesow A, Korbmacher-Steiner H. Impact of self-assembling peptides in remineralisation of artificial early enamel lesions adjacent to orthodontic brackets. Sci Rep. 15 de septiembre de 2020;10(1):15132.

138. Hojabri N, Kaisarly D, Kunzelmann KH. Adhesion and whitening effects of P11-4 self-assembling peptide and HAP suspension on bovine enamel. Clin Oral Invest. mayo de 2021;25(5):3237-47.

139. Aggeli A, Bell M, Carrick LM, Fishwick CWG, Harding R, Mawer PJ, et al. pH as a Trigger of Peptide β-Sheet Self-Assembly and Reversible Switching between Nematic and Isotropic Phases. J Am Chem Soc. 1 de agosto de 2003;125(32):9619-28.

140. Palmer LC, Newcomb CJ, Kaltz SR, Spoerke ED, Stupp SI. Biomimetic Systems for Hydroxyapatite Mineralization Inspired By Bone and Enamel. Chem Rev. 12 de noviembre de 2008;108(11):4754-83.

141. Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI. Self-Assembly and Mineralization of Peptide-Amphiphile Nanofibers. Science. 23 de noviembre de 2001;294(5547):1684-8.

142. Ghaly YS, El-Wassefy NA, Shamaa MS, Tawfik MA. Effect of self-assembling peptide and other remineralizing agents on preventing initial enamel lesions around orthodontic brackets: An in vitro comparative study. International Orthodontics. junio de 2023;21(2):100751.

143. Jablonski-Momeni A, Korbmacher-Steiner H, Heinzel-Gutenbrunner M, Jablonski B, Jaquet W, Bottenberg P. Randomised in situ clinical trial investigating self-assembling peptide matrix P11-4 in the prevention of artificial caries lesions. Sci Rep. 22 de enero de 2019;9(1):269.

144. Dawasaz AA, Togoo RA, Mahmood Z, Azlina A, Thirumulu Ponnuraj K. Effectiveness of Self-Assembling Peptide (P11-4) in Dental Hard Tissue Conditions: A

Comprehensive Review. Polymers. 18 de febrero de 2022;14(4):792.

145. Gibson CW, Yuan ZA, Hall B, Longenecker G, Chen E, Thyagarajan T, et al. Amelogenin-deficient Mice Display an Amelogenesis Imperfecta Phenotype. Journal of Biological Chemistry. agosto de 2001;276(34):31871-5.

146. Dissanayake SSM, Ekambaram M, Li KC, Harris PWR, Brimble MA. Identification of Key Functional Motifs of Native Amelogenin Protein for Dental Enamel Remineralisation. Molecules. 14 de septiembre de 2020;25(18):4214.

147. Yuan ZA, Collier PM, Rosenbloom J, Gibson CW. Analysis of amelogenin mRNA during bovine tooth development. Archives of Oral Biology. febrero de 1996;41(2):205-13.

148. Paine ML, Wang HJ, Snead ML. Amelogenin self-assembly and the role of the proline located within the carboxyl-teleopeptide. Connect Tissue Res. 2003;44 Suppl 1:52-7.

149. Le Norcy E, Kwak SY, Wiedemann-Bidlack FB, Beniash E, Yamakoshi Y, Simmer JP, et al. Leucine-rich Amelogenin Peptides Regulate Mineralization in vitro. J Dent Res. septiembre de 2011;90(9):1091-7.

150. Wiedemann-Bidlack FB, Kwak SY, Beniash E, Yamakoshi Y, Simmer JP, Margolis HC. Effects of phosphorylation on the self-assembly of native full-length porcine amelogenin and its regulation of calcium phosphate formation in vitro. Journal of Structural Biology. febrero de 2011;173(2):250-60.

151. Fréchet JMJ. Dendrimers and supramolecular chemistry. Proc Natl Acad Sci USA. 16 de abril de 2002;99(8):4782-7.

152. Abbasi E, Aval SF, Akbarzadeh A, Milani M, Nasrabadi HT, Joo SW, et al. Dendrimers: synthesis, applications, and properties. Nanoscale Res Lett. diciembre de 2014;9(1):247.

153. Zhang F, Zhou ZH, Yang SP, Mao LH, Chen HM, Yu XB. Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanorods in the presence of anionic starburst dendrimer. Materials Letters. mayo de 2005;59(11):1422-5.

154. Chen L, Yuan H, Tang B, Liang K, Li J. Biomimetic Remineralization of Human Enamel in the Presence of Polyamidoamine Dendrimers in vitro. Caries Res. 2015;49(3):282-90.

155. Liang K, Weir MD, Xie X, Wang L, Reynolds MA, Li J, et al. Dentin remineralization in acid challenge environment via PAMAM and calcium phosphate

composite. Dental Materials. noviembre de 2016;32(11):1429-40.

156. Vasile E, Serafim A, Petre D, Giol D, Dubruel P, Iovu H, et al. Direct Synthesis and Morphological Characterization of Gold-Dendrimer Nanocomposites Prepared Using PAMAM Succinamic Acid Dendrimers: Preliminary Study of the Calcification Potential. The Scientific World Journal. 2014;2014:1-15.

157. Wu D, Yang J, Li J, Chen L, Tang B, Chen X, et al. Hydroxyapatite-anchored dendrimer for in situ remineralization of human tooth enamel. Biomaterials. julio de 2013;34(21):5036-47.

158. Xiang KZ, Chen L, Yang DQ. [Research progress on the biomimetic remineralization of hard tooth tissues based on polyamide-amine dendrimer]. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 1 de diciembre de 2020;38(6):692-6.

159. González-Cabezas C, Fernández CE. Recent Advances in Remineralization Therapies for Caries Lesions. Adv Dent Res. febrero de 2018;29(1):55-9.

160. Pitts NB, Wright JP. Reminova and EAER: Keeping Enamel Whole through Caries Remineralization. Adv Dent Res. febrero de 2018;29(1):48-54.

161. Kutuk ZB, Ergin E, Cakir FY, Gurgan S. Effects of in-office bleaching agent combined with different desensitizing agents on enamel. J Appl Oral Sci [Internet]. 8 de noviembre de 2018 [citado 4 de febrero de 2023];27(0). Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1678-77572019000100406&lng=en&tlng=en

162. Okada M, Furuzono T. Hydroxylapatite nanoparticles: fabrication methods and medical applications. Science and Technology of Advanced Materials. diciembre de 2012;13(6):064103.

163. de Melo Alencar C, de Paula BLF, Guanipa Ortiz MI, Baraúna Magno M, Martins Silva C, Cople Maia L. Clinical efficacy of nano-hydroxyapatite in dentin hypersensitivity: A systematic review and meta-analysis. Journal of Dentistry. marzo de 2019;82:11-21.

164. Anil A, Ibraheem WI, Meshni AA, Preethanath RS, Anil S. Nano-Hydroxyapatite (nHAp) in the Remineralization of Early Dental Caries: A Scoping Review. IJERPH. 5 de mayo de 2022;19(9):5629.

165. Hammad SM, El-Wassefy NA, Alsayed MA. Evaluation of color changes of white spot lesions treated with three different treatment approaches: an in-vitro study. Dental Press J Orthod. enero de 2020;25(1):26-7.

166. Comar LP, Souza BM, Gracindo LF, Buzalaf MAR, Magalhaes AC. Impact of Experimental Nano-HAP Pastes on Bovine Enamel and Dentin Submitted to a pH Cycling Model. Braz Dent J. junio de 2013;24(3):273-8.

167. Reynolds E. Calcium phosphate-based remineralization systems: scientific evidence? Australian Dental Journal. septiembre de 2008;53(3):268-73.

168. Reynolds EC. Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: A review. Special Care in Dentistry. enero de 1998;18(1):8-16.

169. Holt C, Sawyer L. Primary and predicted secondary structures of the caseins in relation to their biological functions. Protein Eng Des Sel. 1988;2(4):251-9.

170. Castellanos JE, Marín LM, Úsuga MV, Castiblanco GA, Martignon S. La remineralización del esmalte bajo el entendimiento actual de la caries dental. Univ Odontol. diciembre de 2013;32(69):49-59.

171. Kargul B, Altinok B, Welbury R. The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on enamel surface rehardening. An in vitro study. Eur J Paediatr Dent. junio de 2012;13(2):123-7.

172. 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 Biomaterialia. marzo de 2010;6(3):969-78.

173. Karlinsey RL, Pfarrer AM. Fluoride Plus Functionalized β-TCP: A Promising Combination for Robust Remineralization. Adv Dent Res. septiembre de 2012;24(2):48-52.

174. 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. julio de 2010;21(7):2009-20.

175. Jones JR. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. Acta Biomaterialia. enero de 2013;9(1):4457-86.

176. Vahid Golpayegani M, Sohrabi A, Biria M, Ansari G. Remineralization Effect of Topical NovaMin Versus Sodium Fluoride (1.1%) on Caries-Like Lesions in Permanent Teeth. J Dent (Tehran). 2012;9(1):68-75.

177. Gjorgievska E, Nicholson J. Prevention of enamel demineralization after tooth bleaching by bioactive glass incorporated into toothpaste: Enamel demineralization prevention by Bioglass®. Australian Dental Journal. junio de 2011;56(2):193-200.

178. Gillam DG, Tang JY, Mordan NJ, Newman HN. The effects of a novel BioglassR dentifrice on dentine sensitivity: a scanning electron microscopy investigation. J Oral Rehabil. abril de 2002;29(4):305-13.

179. Du Min Q, Bian Z, Jiang H, Greenspan DC, Burwell AK, Zhong J, et al. Clinical evaluation of a dentifrice containing calcium sodium phosphosilicate (novamin) for the treatment of dentin hypersensitivity. Am J Dent. agosto de 2008;21(4):210-4.

180. McGaughey C, Stowell EC. Effects of polyphosphates on the solubility and mineralization of HA: relevance to a rationale for anticaries activity. J Dent Res. junio de 1977;56(6):579-87.

181. Danelon M, Takeshita EM, Peixoto LC, Sassaki KT, Delbem ACB. Effect of fluoride gels supplemented with sodium trimetaphosphate in reducing demineralization. Clin Oral Invest. mayo de 2014;18(4):1119-27.

182. Danelon M, Pessan JP, Souza-Neto FN, de Camargo ER, Delbem ACB. Effect of fluoride toothpaste with nano-sized trimetaphosphate on enamel demineralization: An in vitro study. Archives of Oral Biology. junio de 2017;78:82-7.

183. Chandna P, Srivastava N, Ali S. Remineralizing Agents: The Next Frontier. CCP. 20 de septiembre de 2016;11(3):211-20.

184. Zhang T, Chu J, Zhou X. Anti-carious Effects of *Galla chinensis* : A Systematic Review: Anti-carious Effects of *Galla chinensis* : A Systematic Review. Phytother Res. diciembre de 2015;29(12):1837-42.

185. Hiraishi N, Sono R, Islam MS, Otsuki M, Tagami J, Takatsuka T. Effect of hesperidin in vitro on root dentine collagen and demineralization. Journal of Dentistry. mayo de 2011;39(5):391-6.

186. Philip N. State of the Art Enamel Remineralization Systems: The Next Frontier in Caries Management. Caries Res. 2019;53(3):284-95.

187. VanWuyckhuyse BC, Perinpanayagam HER, Bevacqua D, Raubertas RE, Billings RJ, Bowen WH, et al. Association of Free Arginine and Lysine Concentrations in Human Parotid Saliva with Caries Experience. J Dent Res. febrero de 1995;74(2):686-90.

188. Nascimento MM, Gordan VV, Garvan CW, Browngardt CM, Burne RA. Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience: Alkali-generation in plaque and saliva. Oral Microbiology and Immunology. 12 de febrero de 2009;24(2):89-95.

189. Burne RA, Zeng L, Ahn SJ, Palmer SR, Liu Y, Lefebure T, et al. Progress Dissecting the Oral Microbiome in Caries and Health. Adv Dent Res. septiembre de 2012;24(2):77-80.

190. Cummins D. The development and validation of a new technology, based upon 1.5% arginine, an insoluble calcium compound and fluoride, for everyday use in the prevention and treatment of dental caries. Journal of Dentistry. agosto de 2013;41:S1-11.

191. Koopman JE, Hoogenkamp MA, Buijs MJ, Brandt BW, Keijser BJF, Crielaard W, et al. Changes in the oral ecosystem induced by the use of 8% arginine toothpaste. Archives of Oral Biology. enero de 2017;73:79-87.

192. Zheng X, Cheng X, Wang L, Qiu W, Wang S, Zhou Y, et al. Combinatorial Effects of Arginine and Fluoride on Oral Bacteria. J Dent Res. febrero de 2015;94(2):344-53.

193. Li J, Huang Z, Mei L, Li G, Li H. Anti-Caries Effect of Arginine-Containing Formulations in vivo: A Systematic Review and Meta-Analysis. Caries Res. 2015;49(6):606-17.

194. Dorri M, Martinez-Zapata MJ, Walsh T, Marinho VC, Sheiham Deceased A, Zaror C. Atraumatic restorative treatment versus conventional restorative treatment for managing dental caries. Cochrane Oral Health Group, editor. Cochrane Database of Systematic Reviews. 28 de diciembre de 2017; 12(12):CD008072.

195. International Organization for Standarization. ISO TS 11405. Dental material guidance on testing of adhesion to tooth structure. Geneva: Switzerland; 2015. (s.f).

196. Amaechi BT, Tenuta LMA, Ricomini Filho AP, Cury JA. Protocols to Study Dental Caries In Vitro: Microbial Caries Models. En: Papagerakis P, editor. Odontogenesis. New York, NY: Springer New York; 2019 [citado 9 de septiembre de 2024]. p. 357-68. (Methods in Molecular Biology; vol. 1922).

197. Bijle MN, Abdalla MM, Ashraf U, Siu KW, Tsoi J, Yiu CKY. The acid-resistance potential of arginine-fluoride varnish treated enamel. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. enero de 2022;125:104763.

198. Bijle MN, Abdalla MM, Ashraf U, Ekambaram M, Yiu CKY. Enamel remineralization potential of arginine-fluoride varnish in a multi-species bacterial pH-cycling model. Journal of Dentistry. enero de 2021;104:103528.

199. The jamovi project (2022). jamovi. (Version 2.3) [Computer Software]. Retrieved from https://www.jamovi.org.

200. R Core Team (2021). R: A Language and environment for statistical computing. (Version 4.1) [Computer software]. Retrieved from https://cran.r-project.org.

201. Buzalaf MAR, Hannas AR, Magalhães AC, Rios D, Honório HM, Delbem ACB. pH-cycling models for in vitro evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations. J Appl Oral Sci. agosto de 2010;18(4):316-34.

202. Ten Cate JM, Duijsters PPE. Alternating Demineralization and Remineralization of Artificial Enamel Lesions. Caries Res. 1982;16(3):201-10.

203. Wierichs RJ, Rupp K, Meyer-Lueckel H, Apel C, Esteves-Oliveira M. Effects of Dentifrices Differing in Fluoride Content on Remineralization Characteristics of Dentin in vitro. Caries Res. 2020;54(1):75-86.

204. White DJ. Reactivity of Fluoride Dentifrices with Artificial Caries. Caries Res. 1987;21(2):126-40.

205. Ilie O, Van Loosdrecht MCM, Picioreanu C. Mathematical modelling of tooth demineralisation and pH profiles in dental plaque. Journal of Theoretical Biology. septiembre de 2012;309:159-75.

206. Zhu L, Li Y, Carrera CA, Chen YC, Li M, Fok A. Calibration of a lactic-acid model for simulating biofilm-induced degradation of the dentin-composite interface. Dental Materials. noviembre de 2017;33(11):1315-23.

207. Cardoso CAB, De Castilho ARF, Salomão PMA, Costa EN, Magalhães AC, Buzalaf MAR. Effect of xylitol varnishes on remineralization of artificial enamel caries lesions in vitro. Journal of Dentistry. noviembre de 2014;42(11):1495-501.

208. Issa AI, Preston KP, Preston AJ, Toumba KJ, Duggal MS. A study investigating the formation of artificial sub-surface enamel caries-like lesions in deciduous and permanent teeth in the presence and absence of fluoride. Archives of Oral Biology. agosto de 2003;48(8):567-71.

209. Wong PYW, Lim SL, Loi STY, Mei ML, Li KC, Aziz S, et al. A comparative study of two chemical models for creating subsurface caries lesions on aprismatic and prismatic enamel. J Oral Sci. 2023;65(1):20-3.

210. Marquezan M, Corrêa FNP, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC, et al. Artificial methods of dentine caries induction: A hardness and morphological comparative study. Archives of Oral Biology. diciembre de 2009;54(12):1111-7.

211. Schwendicke F, Eggers K, Meyer-Lueckel H, Dörfer C, Kovalev A, Gorb S, et al.

In vitro Induction of Residual Caries Lesions in Dentin: Comparative Mineral Loss and Nano-Hardness Analysis. Caries Res. 2015;49(3):259-65.

212. Oliveira PHC, Oliveira MRC, Oliveira LHC, Sfalcin RA, Pinto MM, Rosa EP, et al. Evaluation of Different Dentifrice Compositions for Increasing the Hardness of Demineralized Enamel: An in Vitro Study. Dentistry Journal. 4 de febrero de 2019;7(1):14.

213. Walther C, Kreibohm M, Paris S, Meyer-Lueckel H, Tschoppe P, Wierichs RJ. Effect of NaF, AmF, KF gels and NaF toothpaste combined with a saliva substitute on dentin lesions in vitro. Clin Oral Invest. mayo de 2019;23(5):2489-96.

214. Mellberg JR. Hard-tissue Substrates for Evaluation of Cariogenic and Anti-cariogenic Activity in situ. J Dent Res. abril de 1992;71(3_suppl):913-9.

215. A. Boyd.l, M. Fortefius, K.S. Lester & L.B. Martin. Basis of the structure and development of mammalian enamel as seen by scanning electron microscopy. Scanning Microscopy. octubre de 1988;2(3):1479-90.

216. Davidson CL, Boom G, Arends J. Calcium Distribution in Human and Bovine Surface Enamel. Caries Res. 1973;7(4):349-59.

217. Koppe T, Meyer G, Alt KW, editores. Comparative dental morphology: selected papers of the 14th International Symposium on Dental Morphology, August 27-30, 2008, Greifswald, Germany. Basel [Switzerland] ; New York: Karger; 2009. 202 p. (Frontiers of oral biology).

218. Arends J, Jongebloed WL. Crystallites dimensions of enamel. J Biol Buccale. septiembre de 1978;6(3):161-71.

219. Amaechi BT, Higham SM, Edgar WM. Factors influencing the development of dental erosion *in vitro* : enamel type, temperature and exposure time. J of Oral Rehabilitation. agosto de 1999;26(8):624-30.

220. Attin T, Wegehaupt F, Gries D, Wiegand A. The potential of deciduous and permanent bovine enamel as substitute for deciduous and permanent human enamel: Erosion–abrasion experiments. Journal of Dentistry. octubre de 2007;35(10):773-7.

221. Rios D, Honório HM, Magalhães AC, Delbem ACB, Machado MAAM, Silva SMB, et al. Effect of Salivary Stimulation on Erosion of Human and Bovine Enamel Subjected or Not to Subsequent Abrasion: An in situ/ex vivo Study. Caries Res. 2006;40(3):218-23.

222. Bisaz S, Russell RGG, Fleisch H. Isolation of inorganic pyrophosphate from

bovine and human teeth. Archives of Oral Biology. junio de 1968;13(6):683-96.

223. Feagin F, Koulourides T, Pigman W. The characterization of enamel surface demineralization, remineralization, and associated hardness changes in human and bovine material. Archives of Oral Biology. diciembre de 1969;14(12):1407-17.

224. Xu C, Reed R, Gorski JP, Wang Y, Walker MP. The distribution of carbonate in enamel and its correlation with structure and mechanical properties. J Mater Sci. diciembre de 2012;47(23):8035-43.

225. Mellberg IR, Loertscher KL. Fluoride Acquisition in Vitro by Etched Enamel from Acidulated Phosphate-Fluoride Preparations. J Dent Res. mayo de 1973;52(3):447-50.

226. Gwinnett AJ, Buonocore MG, Sheykholeslam Z. Effect of fluoride on etched human and bovine tooth enamel surfaces as demonstrated by scanning electron microscopy. Archives of Oral Biology. febrero de 1972;17(2):271-IN9.

227. Sydney-Zax M, Mayer I, Deutsch D. Carbonate Content in Developing Human and Bovine Enamel. J Dent Res. mayo de 1991;70(5):913-6.

228. Spitzer D, Ten Bosch JJ. The absorption and scattering of light in bovine and human dental enamel. Calc Tis Res. abril de 1975;17(2):129-37.

229. Yassen GH, Platt JA, Hara AT. Bovine teeth as substitute for human teeth in dental research: a review of literature. J Oral Sci. 2011;53(3):273-82.

230. Ortiz-Ruiz AJ, Teruel-Fernández JDD, Alcolea-Rubio LA, Hernández-Fernández A, Martínez-Beneyto Y, Gispert-Guirado F. Structural differences in enamel and dentin in human, bovine, porcine, and ovine teeth. Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger. julio de 2018;218:7-17.

231. West NX, Davies M, Amaechi BT. In vitro and in situ Erosion Models for Evaluating Tooth Substance Loss. Caries Res. 2011;45(Suppl. 1):43-52.

232. Barbour ME, Finke M, Parker DM, Hughes JA, Allen GC, Addy M. The relationship between enamel softening and erosion caused by soft drinks at a range of temperatures. Journal of Dentistry. marzo de 2006;34(3):207-13.

233. West NX, Hughes JA, Addy M. Erosion of dentine and enamel in vitro by dietary acids: the effect of temperature, acid character, concentration and exposure time. J Oral Rehabil. octubre de 2000;27(10):875-80.

234. Hooper SM, Newcombe RG, Faller R, Eversole S, Addy M, West NX. The protective effects of toothpaste against erosion by orange juice: Studies in situ and in

vitro. Journal of Dentistry. junio de 2007;35(6):476-81.

235. Young A, Thrane PS, Saxegaard E, Jonski G, Rölla G. Effect of stannous fluoride toothpaste on erosion-like lesions: an *in vivo* study. European J Oral Sciences. junio de 2006;114(3):180-3.

236. Hannig M, Fiebiger M, Güntzer M, Döbert A, Zimehl R, Nekrashevych Y. Protective effect of the in situ formed short-term salivary pellicle. Archives of Oral Biology. noviembre de 2004;49(11):903-10.

237. West NX, Hughes JA, Parker DM, Newcombe RG, Addy M. Development and evaluation of a low erosive blackcurrant juice drink 2. Comparison with a conventional blackcurrant juice drink and orange juice. Journal of Dentistry. julio de 1999;27(5):341-4.

238. Von Der Fehr FR, Löe H, Theilade E. Experimental Caries in Man. Caries Res. 1970;4(2):131-48.

239. O'Reilly MM, Featherstone JDB. Demineralization and remineralization around orthodontic appliances: An in vivo study. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. julio de 1987;92(1):33-40.

240. de Mello Vieira AE, Botazzo Delbem AC, Takebayashi Sassaki K, Rodrigues E, Cury JA, Cunha RF. Fluoride Dose Response in pH-Cycling Models Using Bovine Enamel. Caries Res. 2005;39(6):514-20.

241. Reynolds EC, Cai F, Cochrane NJ, Shen P, Walker GD, Morgan MV, et al. Fluoride and Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate. J Dent Res. abril de 2008;87(4):344-8.

242. 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. enero de 2014;25(1):47-53.

243. Ten Cate JM, Buijs MJ, Miller CC, Exterkate RAM. Elevated Fluoride Products Enhance Remineralization of Advanced Enamel Lesions. J Dent Res. octubre de 2008;87(10):943-7.

244. Ten Cate JM. Remineralization of Caries Lesions Extending into Dentin. J Dent Res. mayo de 2001;80(5):1407-11.

245. Sun Y, Li X, Deng Y, Sun JN, Tao D, Chen H, et al. Mode of action studies on the formation of enamel minerals from a novel toothpaste containing calcium silicate and

sodium phosphate salts. Journal of Dentistry. junio de 2014;42:S30-8.

246. Wood NJ, Jones SB, Chapman N, Joiner A, Philpotts CJ, West NX. An interproximal model to determine the erosion-protective effect of calcium silicate, sodium phosphate, fluoride formulations. Dental Materials. febrero de 2018;34(2):355-62.

247. Kato K, Nakagaki H, Takami Y, TsugeS. Ando S, Robinson C. A method for determining the distribution of fluoride, calcium and phosphorus in human dental plaque and the effect of a single In vivo fluoride rinse. Archives of Oral Biology. julio de 1997;42(7):521-5.

248. Whitford GM, Buzalaf MAR, Bijella MFB, Waller JL. Plaque Fluoride Concentrations in a Community without Water Fluoridation: Effects of Calcium and Use of a Fluoride or Placebo Dentifrice. Caries Res. 2005;39(2):100-7.

249. Magalhães AC, Furlani TDA, Italiani FDM, Iano FG, Delbem ACB, Buzalaf MAR. Effect of calcium pre-rinse and fluoride dentifrice on remineralisation of artificially demineralised enamel and on the composition of the dental biofilm formed in situ. Archives of Oral Biology. diciembre de 2007;52(12):1155-60.

250. Huang S, Gao S, Cheng L, Yu H. Combined effects of nano-hydroxyapatite and Galla chinensis on remineralisation of initial enamel lesion in vitro. Journal of Dentistry. octubre de 2010;38(10):811-9.

251. Haghgoo R, Rezvani MB, Salehi Zeinabadi M. Comparison of nano-hydroxyapatite and sodium fluoride mouthrinse for remineralization of incipient carious lesions. J Dent (Tehran). julio de 2014;11(4):406-10.

252. Browne D, Whelton H, O'Mullane D. Fluoride metabolism and fluorosis. Journal of Dentistry. marzo de 2005;33(3):177-86.

253. Bertassoni LE. Dentin on the nanoscale: Hierarchical organization, mechanical behavior and bioinspired engineering. Dental Materials. junio de 2017;33(6):637-49.

254. Araújo IJDS, Guimarães GN, Machado RA, Bertassoni LE, Davies RPW, Puppin-Rontani RM. Self-assembly peptide P11-4 induces mineralization and cell-migration of odontoblast-like cells. Journal of Dentistry. junio de 2022;121:104111.

255. Medeiros IC, Brasil VLM, Carlo HL, Santos RLD, De Lima BASG, De Carvalho FG. In vitro effect of calcium nanophosphate and high-concentrated fluoride agents on enamel erosion: an AFM study. Int J Paed Dentistry. mayo de 2014;24(3):168-74.

256. Shellis RP, Ganss C, Ren Y, Zero DT, Lussi A. Methodology and Models in Erosion Research: Discussion and Conclusions. Caries Res. 2011;45(Suppl. 1):69-77.

257. Memarpour M, Soltanimehr E, Sattarahmady N. Efficacy of calcium- and fluoride-containing materials for the remineralization of primary teeth with early enamel lesion: Enamel Remineralization. Microsc Res Tech. septiembre de 2015;78(9):801-6.

258. Attin T. Methods for Assessment of Dental Erosion. En: Lussi A, editor. Monographs in Oral Science. Basel: KARGER; 2006. p. 152-72.

259. Lata S, Varghese N, Varughese J. Remineralization potential of fluoride and amorphous calcium phosphate-casein phospho peptide on enamel lesions: An *in vitro* comparative evaluation. J Conserv Dent. 2010;13(1):42.

260. Ferreira JMS, Aragão AKR, Rosa ADB, Sampaio FC, Menezes VAD. Therapeutic effect of two fluoride varnishes on white spot lesions: a randomized clinical trial. Braz oral res. diciembre de 2009;23(4):446-51.

261. Almeida MQD, Costa OXI, Ferreira JMS, Menezes VAD, Leal RB, Sampaio FC. Therapeutic potential of Brazilian fluoride varnishes: an in vivo study. Braz Dent J. 2011;22(3):193-7.

262. Silva RMD, Ferreira JMS, Silva CDBD, Fontes LDBC, Granville-Garcia AF, Menezes VAD. In vivo evaluation of therapeutic potential of fluoride varnishes. Rev odonto ciênc. 2012;27(3):233-7.

263. Paredes Quintana MC, Álvarez Velasco PDL. Microdureza del esmalte remineralizado mediante el uso de barnices fluorados en premolares desmineralizados con ácido láctico, estudio in vitro. RO. 1 de abril de 2021;23(1):e3277.

264. Tenuta LMA, Zamataro CB, Del Bel Cury AA, Tabchoury CPM, Cury JA. Mechanism of Fluoride Dentifrice Effect on Enamel Demineralization. Caries Res. 2009;43(4):278-85.

265. Marinho VC, Higgins JP, Sheiham A, Logan S. Combinations of topical fluoride (toothpastes, mouthrinses, gels, varnishes) versus single topical fluoride for preventing dental caries in children and adolescents. Cochrane Oral Health Group, editor. Cochrane Database of Systematic Reviews. 26 de enero de 2004;

266. Richards D. Fluoride gel effective at reducing caries in children: Question: Are fluoride gels safe and effective at preventing caries? Evid Based Dent. diciembre de 2015;16(4):108-9.

267. Oliveira MRC, Oliveira PHC, Oliveira LHC, Horliana ACRT, César PF, Moura SK, et al. Microhardness of bovine enamel after different fluoride application protocols. Dental Materials Journal. 28 de enero de 2019;38(1):61-7.

268. Godoi FAD, Carlos NR, Bridi EC, Amaral FLBD, França FMG, Turssi CP, et al. Remineralizing effect of commercial fluoride varnishes on artificial enamel lesions. Braz oral res. 2019;33:e044.

269. Vicente A, Ortiz-Ruiz AJ, González-Paz BM, Martínez-Beneyto Y, Bravo-González LA. Effectiveness of a toothpaste and a serum containing calcium silicate on protecting the enamel after interproximal reduction against demineralization. Sci Rep. 12 de enero de 2021;11(1):834.

270. Hornby K, Ricketts SR, Philpotts CJ, Joiner A, Schemehorn B, Willson R. Enhanced enamel benefits from a novel toothpaste and dual phase gel containing calcium silicate and sodium phosphate salts. Journal of Dentistry. junio de 2014;42:S39-45.

271. Joiner A, Schäfer F, Naeeni MM, Gupta AK, Zero DT. Remineralisation effect of a dual-phase calcium silicate/phosphate gel combined with calcium silicate/phosphate toothpaste on acid-challenged enamel in situ. Journal of Dentistry. junio de 2014;42:S53-9.

272. Ceci M, Mirando M, Beltrami R, Chiesa M, Colombo M, Poggio C. Effect of self-assembling peptide P_{11}-4 on enamel erosion: AFM and SEM studies. Scanning. julio de 2016;38(4):344-51.

273. Suda S, Takamizawa T, Takahashi F, Tsujimoto A, Akiba S, Nagura Y, et al. Application of the Self- Assembling Peptide P11-4 for Prevention of Acidic Erosion. Operative Dentistry. 1 de julio de 2018;43(4):E166-72.

274. Attin T, Becker K, Wiedemeier DB, Schmidlin PR, Wegehaupt FJ. Anti-erosive effect of a self-assembling peptide gel. Swiss Dent J. 2017;127(10):857-64.

275. Kirkham J, Firth A, Vernals D, Boden N, Robinson C, Shore RC, et al. Self-assembling Peptide Scaffolds Promote Enamel Remineralization. J Dent Res. mayo de 2007;86(5):426-30.

276. Osman E, Kobeissi R, Badr SB. Effectiveness of Self-assembling Peptide P11-4 Compared to Tricalcium Phosphate Fluoride Varnish in Remineralization of White Spot Lesions: A Clinical Randomized Trial. International Journal of Clinical Pediatric Dentistry. 27 de enero de 2021;13(5):451-6.

277. Doberdoli D, Bommer C, Begzati A, Haliti F, Heinzel-Gutenbrunner M, Juric H. Randomized Clinical Trial investigating Self-Assembling Peptide P11-4 for Treatment of Early Occlusal Caries. Sci Rep. 6 de marzo de 2020;10(1):4195.

278. Reddy D, Azher U, Paul ST, Sebastian R. Comparison of Remineralization

Potential of Casein Phosphopeptide: Amorphous Calcium Phosphate, Nano-hydroxyapatite and Calcium Sucrose Phosphate on Artificial Enamel Lesions: An In Vitro Study. International Journal of Clinical Pediatric Dentistry. 13 de abril de 2022;15(1):69-73.

279. de Carvalho FG, Vieira BR, Santos RLD, Carlo HL, Lopes PQ, de Lima BASG. In vitro effects of nano-hydroxyapatite paste on initial enamel carious lesions. Pediatr Dent. 2014;36(3):85-9.

280. Lv KL, Zhang JX, Meng XC, Li XY. Remineralization Effect of the Nano-HA Toothpaste on Artificial Caries. KEM. febrero de 2007;330-332:267-70.

281. Tschoppe P, Zandim DL, Martus P, Kielbassa AM. Enamel and dentine remineralization by nano-hydroxyapatite toothpastes. Journal of Dentistry. junio de 2011;39(6):430-7.

282. Huang S, Gao S, Cheng L, Yu H. Remineralization Potential of Nano-Hydroxyapatite on Initial Enamel Lesions: An in vitro Study. Caries Res. 2011;45(5):460-8.

283. Sharma V, Rastogi S, Kumar Bhati K, Srinivasan A, Roychoudhury A, Nikolajeff F, et al. Mapping the Inorganic and Proteomic Differences among Different Types of Human Teeth: A Preliminary Compositional Insight. Biomolecules. 11 de noviembre de 2020;10(11):1540.

284. Ghadimi E, Eimar H, Marelli B, Nazhat SN, Asgharian M, Vali H, et al. Trace elements can influence the physical properties of tooth enamel. SpringerPlus. diciembre de 2013;2(1):499.

285. Fathy S. Remineralization ability of two hydraulic calcium-silicate based dental pulp capping materials: Cell-independent model. J Clin Exp Dent. 2019;0-0.

286. Kucukyilmaz E, Savas S, Akcay M, Bolukbasi B. Effect of silver diamine fluoride and ammonium hexafluorosilicate applications with and without Er:YAG laser irradiation on the microtensile bond strength in sound and caries-affected dentin. Lasers Surg Med. enero de 2016;48(1):62-9.

287. Sarna-Boś K, Skic K, Boguta P, Adamczuk A, Vodanovic M, Chałas R. Elemental mapping of human teeth enamel, dentine and cementum in view of their microstructure. Micron. septiembre de 2023;172:103485.

288. Sejdini M, Meqa K, Berisha N, Çitaku E, Aliu N, Krasniqi S, et al. The Effect of Ca and Mg Concentrations and Quantity and Their Correlation with Caries Intensity in

School-Age Children. International Journal of Dentistry. 8 de mayo de 2018;2018:1-8.

289. Alifakioti E, Arhakis A, Oikonomidis S, Kotsanos N. Structural and chemical enamel characteristics of hypomineralised second primary molars. Eur Arch Paediatr Dent. junio de 2021;22(3):361-6.

290. Markowitz K, Pashley DH. Discovering new treatments for sensitive teeth: the long path from biology to therapy. J of Oral Rehabilitation. abril de 2008;35(4):300-15.

291. Malmberg P, Norén JG, Bernin D. Molecular insights into hypomineralized enamel. European J Oral Sciences. agosto de 2019;127(4):340-6.

292. Hamlin D, Williams KP, Delgado E, Zhang YP, DeVizio W, Mateo LR. Clinical evaluation of the efficacy of a desensitizing paste containing 8% arginine and calcium carbonate for the in-office relief of dentin hypersensitivity associated with dental prophylaxis. Am J Dent. marzo de 2009;22 Spec No A:16A-20A.

293. Ayad F, Ayad N, Delgado E, Zhang YP, DeVizio W, Cummins D, et al. Comparing the efficacy in providing instant relief of dentin hypersensitivity of a new toothpaste containing 8.0% arginine, calcium carbonate, and 1450 ppm fluoride to a benchmark desensitizing toothpaste containing 2% potassium ion and 1450 ppm fluoride, and to a control toothpaste with 1450 ppm fluoride: a three-day clinical study in Mississauga, Canada. J Clin Dent. 2009;20(4):115-22.

294. Jeng YR, Lin TT, Wong TY, Chang HJ, Shieh DB. Nano-mechanical Properties of Fluoride-treated Enamel Surfaces. J Dent Res. abril de 2008;87(4):381-5.

295. Aguilar Gálvez D, Ponce García C. Remineralización de las lesiones cariosas activas incipientes después de la aplicación de un barniz fluorado, medida a través de un láser de diagnóstico. Odontol Pediatr. 10(2):95-104.

296. Castillo JL, Milgrom P, Kharasch E, Izutsu K, Fey M. Evaluation of fluoride release from commercially available fluoride varnishes. The Journal of the American Dental Association. octubre de 2001;132(10):1389-92.

297. Frank E. Law, M.P.H., Margareth H. Jeffreys, M.P.H. Y Helen C. Sheary, B.S. Aplicaciones tópicas de soluciones de fluoruro para la prevención y de la caries dental. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. junio de 1962;506-10.

298. Brown LR, White JO, Horton IM, Dreizen S, Streckfuss JL. Effect of Continuous Fluoride Gel Use on Plaque Fluoride Retention and Microbial Activity. J Dent Res. junio de 1983;62(6):746-51.

299. Wasan A. Abid Aun. Inorganic ions level in saliva of patients with chronic

periodontitis and healthy subjects. J Bagh Coll Dentistry. 2012;24(3):93-7.

300. Jawed M, Shahid SM, Qader SA, Azhar A. Dental caries in diabetes mellitus: role of salivary flow rate and minerals. Journal of Diabetes and its Complications. mayo de 2011;25(3):183-6.

301. Theuns HM, Van Dijk JWE, Jongebloed WL, Groeneveld A. The mineral content of human enamel studied by polarizing microscopy, microradiography and scanning electron microscopy. Archives of Oral Biology. 1983;28(9):797-803.

302. Robinson C, Weatherell JA, Hallsworth AS. Variation in Composition of Dental Enamel Within Thin Ground Tooth Sections. Caries Res. 1971;5(1):44-57.

303. Robinson C, Weatherell JA, Hallsworth AS. Distribution of Magnesium in Mature Human Enamel. Caries Res. 1981;15(1):70-7.

304. Thiradilok S, Feagin F. Effects of magnesium and fluoride on acid resistance of remineralized enamel. Ala J Med Sci. abril de 1978;15(2):144-8.

305. Teruel JDD, Alcolea A, Hernández A, Ruiz AJO. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. Archives of Oral Biology. mayo de 2015;60(5):768-75.

306. He LH, Swain MV. Understanding the mechanical behaviour of human enamel from its structural and compositional characteristics. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials. enero de 2008;1(1):18-29.

307. Schofield RMS, Nesson MH, Richardson KA. Tooth hardness increases with zinc-content in mandibles of young adult leaf-cutter ants. Naturwissenschaften. diciembre de 2002;89(12):579-83.

308. Fogels HR, Alman JE, Meade JJ, O'Donnell JP. The relative caries-inhibiting effects of a stannous fluoride dentifrice in a silica gel base. The Journal of the American Dental Association. septiembre de 1979;99(3):456-9.

309. Rule JT, Smith MR, Truelove RB, Macko DJ, Castaldi CR. Caries inhibition of a dentifrice containing 0.78% sodium monofluorophosphate in a silica base. Comm Dent Oral Epid. agosto de 1984;12(4):213-7.

310. Toro Andonayre, Tania Sussethy. Comparación del efecto antibacteriano de geles usados para la remoción química mecánica de la caries dental en cepa estándar de ¨Streptoccocus Mutans¨. [Pimentel- Perú]: Universidad Señor de Sipán; 2018.

311. Pişkin B, Türkün M. Stability of various sodium hypochlorite solutions. Journal of Endodontics. mayo de 1995;21(5):253-5.

312. González R, Ballesteros C, Pareja R. Microscopía electrónica. Madrid: EUDEMA; 1991.

313. Bidlack FB, Huynh C, Marshman J, Goetze B. Helium ion microscopy of enamel crystallites and extracellular tooth enamel matrix. Front Physiol. 10 de octubre de 2014;5.

314. Gomes MN, Rodrigues FP, Silikas N, Francci CE. Micro-CT and FE-SEM enamel analyses of calcium-based agent application after bleaching. Clin Oral Invest. marzo de 2018;22(2):961-70.

315. Spalding M, Taveira LADA, De Assis GF. Scanning Electron Microscopy Study of Dental Enamel Surface Exposed to 35% Hydrogen Peroxide: Alone, With Saliva, and With 10% Carbamide Peroxide. J Esthet Restor Dent. mayo de 2003;15(3):154-65.

316. Hegedüs C, Bistey T, Flóra-Nagy E, Keszthelyi G, Jenei A. An atomic force microscopy study on the effect of bleaching agents on enamel surface. Journal of Dentistry. septiembre de 1999;27(7):509-15.

317. Memarpour M, Shafiei F, Rafiee A, Soltani M, Dashti MH. Effect of hydroxyapatite nanoparticles on enamel remineralization and estimation of fissure sealant bond strength to remineralized tooth surfaces: an in vitro study. BMC Oral Health. diciembre de 2019;19(1):92.

318. Pinheiro HB, Cardoso PEC. Influence of five home whitening gels and a remineralizing gel on the enamel and dentin ultrastructure and hardness. Am J Dent. junio de 2011;24(3):131-7.

319. Poggio C, Lombardini M, Dagna A, Chiesa M, Bianchi S. Protective effect on enamel demineralization of a CPP–ACP paste: an AFM in vitro study. Journal of Dentistry. diciembre de 2009;37(12):949-54.

320. Eisenburger M, Addy M, Hughes JA, Shellis RP. Effect of Time on the Remineralisation of Enamel by Synthetic Saliva after Citric Acid Erosion. Caries Res. 2001;35(3):211-5.

321. Iijima Y, Cai F, Shen P, Walker G, Reynolds C, Reynolds EC. Acid Resistance of Enamel Subsurface Lesions Remineralized by a Sugar-Free Chewing Gum Containing Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate. Caries Res. 2004;38(6):551-6.

322. Diekwisch TGH, Berman BJ, Gentner S, Slavkin HC. Initial enamel crystals are not spatially associated with mineralized dentine. Cell Tissue Res. enero de 1995;279(1):149-67.

323. Eanes ED, Termine JD, Nylen MU. An electron microscopic study of the

formation of amorphous calcium phosphate and its transformation to crystalline apatite. Calc Tis Res. diciembre de 1973;12(1):143-58.

324. Johnsson MSA, Nancollas GH. The Role of Brushite and Octacalcium Phosphate in Apatite Formation. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. enero de 1992;3(1):61-82.

325. Batina N, Renugopalakrishnan V, Casillas Lavín PN, Hernández Guerrero JC, Morales M, Garduño-Juárez R. An atomic force microscopic study of the ultrastructure of dental enamel afflicted with amelogenesis imperfecta. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. enero de 2002;13(3):336-47.

326. Agrawal N, Shashikiran N, Singla S, Ravi K, Kulkarni V. Atomic force microscopic comparison of remineralization with casein-phosphopeptide amorphous calcium phosphate paste, acidulated phosphate fluoride gel and iron supplement in primary and permanent teeth: An in-vitro study. Contemp Clin Dent. 2014;5(1):75.

327. Cheng ZJ, Wang XM, Cui FZ, Ge J, Yan JX. The enamel softening and loss during early erosion studied by AFM, SEM and nanoindentation. Biomed Mater. febrero de 2009;4(1):015020.

328. Sanches RP, Otani C, Damião AJ, Miyakawa W. AFM characterization of bovine enamel and dentine after acid-etching. Micron. junio de 2009;40(4):502-6.

329. Piacentini C, Sfondrini G. A scanning electron microscopy comparison of enamel polishing methods after air-rotor stripping. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. enero de 1996;109(1):57-63.

330. Eliades T. Enamel surface roughness following debonding using two resin grinding methods. The European Journal of Orthodontics. 1 de junio de 2004;26(3):333-8.

331. Verma P, Muthuswamy Pandian S. Bionic effects of nano hydroxyapatite dentifrice on demineralised surface of enamel post orthodontic debonding: in-vivo split mouth study. Prog Orthod. diciembre de 2021;22(1):39.

332. Loyola-Rodriguez JP, Zavala-Alonso V, Reyes-Vela E, Patino-Marin N, Ruiz F, Anusavice KJ. Atomic force microscopy observation of the enamel roughness and depth profile after phosphoric acid etching. Journal of Electron Microscopy. 1 de abril de 2010;59(2):119-25.

333. Mattick CR, Hobson RS. A Comparative Micro-topographic Study of the Buccal Enamel of Different Tooth Types. Journal of Orthodontics. junio de 2000;27(2):143-8.

334. Zhou C, Zhang D, Bai Y, Li S. Casein phosphopeptide–amorphous calcium phosphate remineralization of primary teeth early enamel lesions. Journal of Dentistry. enero de 2014;42(1):21-9.

335. Sorozini M, Dos Reis Perez C, Rocha GM. Enamel sample preparation for AFM: Influence on roughness and morphology. Microscopy Res & Technique. septiembre de 2018;81(9):1071-6.

336. Bilge K, Kılıç V. Effects of different remineralizing agents on color stability and surface characteristics of the teeth following vital bleaching. Microscopy Res & Technique. octubre de 2021;84(10):2206-18.

337. Poggio C, Ceci M, Beltrami R, Lombardini M, Colombo M. Atomic force microscopy study of enamel remineralization. Ann Stomatol (Roma). julio de 2014;5(3):98-102.

338. Bertassoni LE, Habelitz S, Pugach M, Soares PC, Marshall SJ, Marshall GW. Evaluation of surface structural and mechanical changes following remineralization of dentin. Scanning. septiembre de 2010;32(5):312-9.

339. Murakami C, Bönecker M, Corrêa MSNP, Mendes FM, Rodrigues CRMD. Effect of fluoride varnish and gel on dental erosion in primary and permanent teeth. Archives of Oral Biology. noviembre de 2009;54(11):997-1001.

340. Vieira A, Jager DHJ, Ruben JL, Huysmans MCDNJM. Inhibition of Erosive Wear by Fluoride Varnish. Caries Res. 2007;41(1):61-7.

341. Souza JG, Rochel ID, Pereira AFF, Silva TC, Rios D, Machado MAAM, et al. Effects of experimental xylitol varnishes and solutions on bovine enamel erosion in vitro. J Oral Sci. 2010;52(4):553-9.

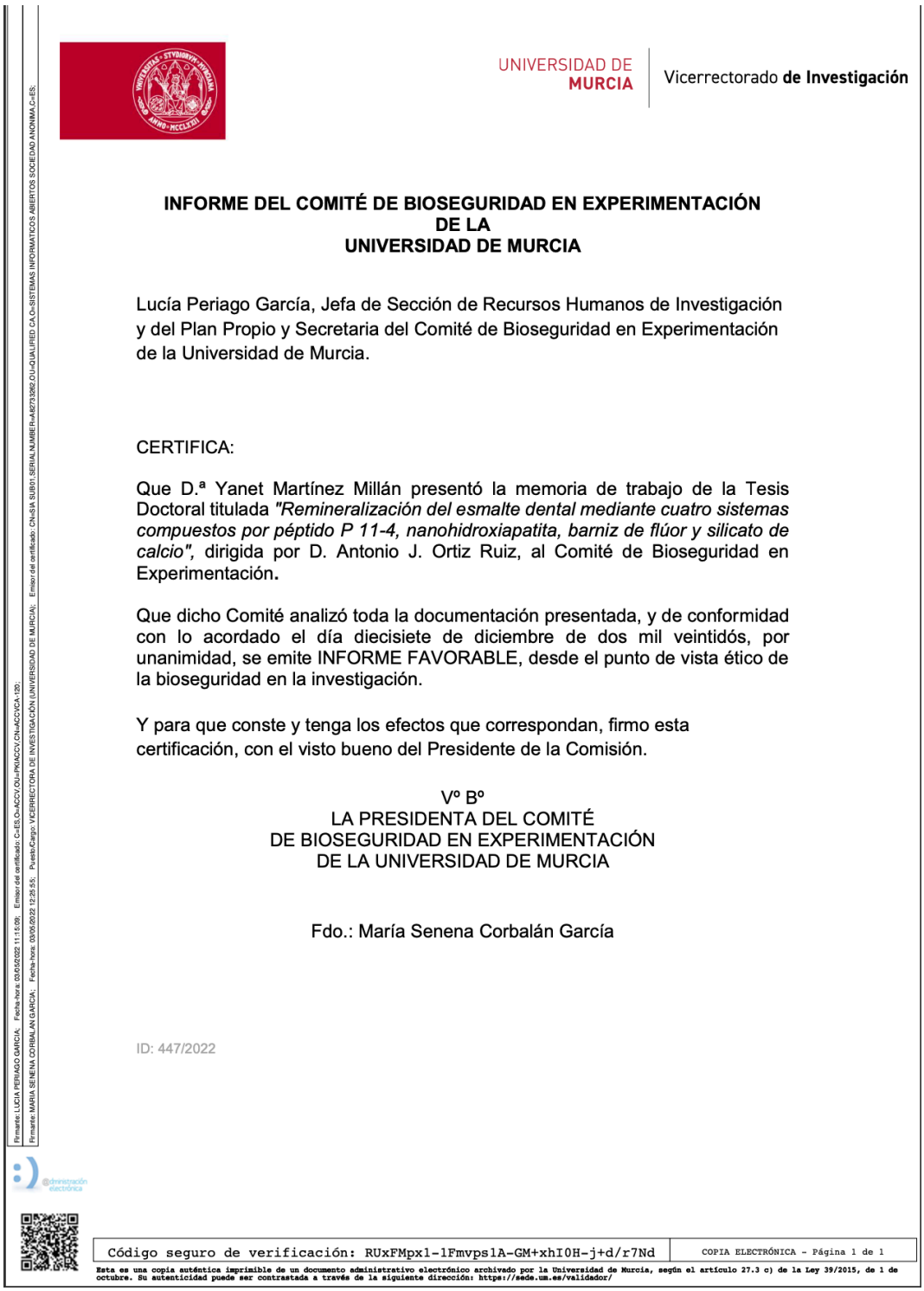
342. Hove L, Holme B, Øgaard B, Willumsen T, Tveit AB. The Protective Effect of TiF_4, SnF_2 and NaF on Erosion of Enamel by Hydrochloric Acid in vitro Measured by White Light Interferometry. Caries Res. 2006;40(5):440-3.

343. Yu H, Attin T, Wiegand A, Buchalla W. Effects of Various Fluoride Solutions on Enamel Erosion in vitro. Caries Res. 2010;44(4):390-401.

344. Vieira-Junior W, Vieira I, Ambrosano G, Aguiar F, Lima D. Correlation between alteration of enamel roughness and tooth color. J Clin Exp Dent. 2018;0-0.

9. ANEXOS

Anexo 1. Informe del Comité de Bioseguridad en Experimentación de la Universidad de Murcia.



UNIVERSIDAD DE MURCIA | Vicerrectorado **de Investigación**

INFORME DEL COMITÉ DE BIOSEGURIDAD EN EXPERIMENTACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Lucía Periago García, Jefa de Sección de Recursos Humanos de Investigación y del Plan Propio y Secretaria del Comité de Bioseguridad en Experimentación de la Universidad de Murcia.

CERTIFICA:

Que D.ª Yanet Martínez Millán presentó la memoria de trabajo de la Tesis Doctoral titulada *"Remineralización del esmalte dental mediante cuatro sistemas compuestos por péptido P 11-4, nanohidroxiapatita, barniz de flúor y silicato de calcio"*, dirigida por D. Antonio J. Ortiz Ruiz, al Comité de Bioseguridad en Experimentación.

Que dicho Comité analizó toda la documentación presentada, y de conformidad con lo acordado el día diecisiete de diciembre de dos mil veintidós, por unanimidad, se emite INFORME FAVORABLE, desde el punto de vista ético de la bioseguridad en 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
LA PRESIDENTA DEL COMITÉ
DE BIOSEGURIDAD EN EXPERIMENTACIÓN
DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA

Fdo.: María Senena Corbalán García

ID: 447/2022

Firmante: LUCIA PERIAGO GARCIA; Fecha-hora: 03/02/2022 11:15:09; Emisor del certificado: C=ES,O=ACCV,OU=PNACCV,CN=ACCVCA-120;
Firmante: MARIA SENENA CORBALAN GARCIA; Fecha-hora: 03/06/2022 12:25:55; Puesto/Cargo: VICERRECTORA DE INVESTIGACIÓN (UNIVERSIDAD DE MURCIA); Emisor del certificado: CN=SIA SUB01,SERIALNUMBER=A82733262,OU=QUALIFIED CA,O=SISTEMAS INFORMATICOS ABIERTOS SOCIEDAD ANONIMA,C=ES;

Código seguro de verificación: RUxFMpx1-1FmvpslA-GM+xhI0H-j+d/r7Nd | 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/