

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



TESIS DOCTORAL

**Efectividad de pastas dentales a base de calcio, fosfato y flúor
en la remineralización de lesiones iniciales de caries**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Julissa Amparo Dulanto Vargas

Directoras

**Gloria Saavedra Marbán
María Rosa Mourelle Martínez**

Madrid
Ed. electrónica 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología IV (Profilaxis, Odontopediatría y Ortodoncia)



TESIS DOCTORAL

Efectividad de pastas dentales a base de calcio, fosfato y flúor en la remineralización de lesiones iniciales de caries

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADO POR

Julissa Amparo Dulanto Vargas

DIRECTORAS

Gloria Saavedra Marbán

María Rosa Mourelle Martínez

Madrid, 2018

**Departamento de Estomatología IV
Facultad de Odontología
Universidad Complutense de Madrid**



**EFFECTIVIDAD DE PASTAS DENTALES A BASE DE CALCIO, FOSFATO Y FLÚOR EN LA
REMINERALIZACIÓN DE LESIONES INICIALES DE CARIES**

Julissa Amparo Dulanto Vargas

Tesis Doctoral

Dirigida por:

Profa. Dr. D. Gloria Saavedra Marbán

*aw kuntur llaqtay urqupi tiyaq
maymantam qawamuwachkanki,
kuntur, kuntur...kuntur
apallaway llaqtanchikman, wasinchikman
chay chiri urqupi, kutiytam munani,
kuntur, kuntur...kuntur*

“El cóndor pasa – zarzuela Andes Perú”

Dedicado a mis padres *Julio y Bety*;
mis hermanos *Marcia, Carla, Galo y Vale*;
mis sobrinos *Julito, Matías, Mateo, Santiago, Isabel y Gabriel*;
mis amigos sanmarquinos *Fany, Iván, Jiuli, Marco, Paty y Santos*;
mis amigos huachanos *Jéssica, Nena, Patricia, Víctor, Thaís e Ysabel*;

...y a Kilder Maynor.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a todas las personas que de uno u otro modo, desde cuatro años atrás en que pisé tierra española, me brindaron su confianza para poder mejorar día a día y culminar así este proyecto:

Profa. Gloria Saavedra Marbán, como Co-Directora de la tesis, siempre me demostró su disposición absoluta para desarrollar la tesis. Sobretudo, le agradezco que el proyecto haya sido agradable gracias a su guía y su confianza.

Profa. M^a Rosa Mourelle Martínez, como Co-directora de la tesis, me demostró su apoyo efectivo para lograr los objetivos del proyecto. Sobretudo, quiero resaltar que vuestra ayuda ha permitido que el proyecto fluya y culmine a tiempo.

Prof. Edgard Michel Crosato, como responsable de la estancia en la Universidad de São Paulo, me ha brindado hospitalidad y predisposición para llevar a cabo los aprendizajes para mejorar el proyecto de tesis.

A todos los profesionales de los diferentes laboratorios de la Universidad Complutense de Madrid y a los participantes y coordinadores de instituciones externas que mostraron su hospitalidad para realizar los análisis de los trabajos de campo,

Prof. José M^a Gómez del Departamento de Ingeniería Química y de Materiales – UCM, por proporcionar el microdurómetro para el primer estudio.

Xavi Arroyo Rey, personal del Laboratorio de CAI de Técnicas Geológicas – UCM, por realizar el análisis SEM-EDS del segundo estudio.

Ana O’Conor, personal del Laboratorio de Investigación 1 de la Facultad de Odontología – UCM, por ayudar en la logística de los experimentos del estudio 1 y 2.

Mg. Ruth Quirita Pizarro, Sub-Directora Nivel Primario, I.E. Inca Garcilaso de la Vega, Cusco-Perú, por su aprobación y ayuda logística para llevar el trabajo del tercer estudio.

Asimismo, la plana docente, padres de familia y niños del centro educativo, por su paciencia y colaboración demostrada durante tres semanas de trabajo clínico del estudio 3.

También quiero agradecer el apoyo emocional y significativo que he recibido de parte de:

Mis padres, quienes no necesitan estar a mi lado para sentir que cuento con su amor.

Mis hermanos, son y serán siempre mi recuerdo de una infancia bonita.

Mis amigos sanmarquinos, son un gran pedazo afectivo de vida compartida.

Mis amigos huachanos, son otro gran pedazo que me llena de alegrías.

Mi compañero de la vida, mi esposo Maynor, más que una mención en papel, eres el día a día.

Mis profesores, amigos y compañeros de los diferentes programas de estudios que compartí y despertaron en mi la curiosidad por investigar, mi alma mater la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el postgrado de Estomatología y Estadística de la Universidad Cayetano Heredia y el Máster de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid.

Mis coordinadores, compañeros de profesorado y alumnado, quienes me brindaron una oportunidad única y valiosa de enseñar a aprender en el mundo maravilloso de la docencia, la Universidad Alas Peruanas, la Universidad Señor de Sipán y la Universidad César Vallejo.

Finalmente, Pronabec – Perú, por haber financiado mi estancia con una beca doctoral. Un apoyo clave de oportunidad de estudiar para el que no puede y lo desea.

Gracias a todos por leer este aporte científico.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	Resumen	06
II.	Introducción	09
	II.1. Lesiones iniciales de caries	09
	II.2. Terapia preventiva convencional	11
	II.3. Nanotecnología aplicada a productos remineralizantes	14
	II.4. Pastas dentales formuladas con calcio, fosfato y flúor como tratamiento	18
III.	Justificación	21
IV.	Hipótesis	22
V.	Objetivos	23
VI.	Material y Métodos	24
	 Estudio 1: Efecto remineralizador de cuatro diferentes pastas dentales a base calcio, fosfato y flúor sobre lesiones artificiales de caries dental: Un análisis de microdureza y morfología.	
	 Estudio 2: Análisis SEM-EDS del efecto remineralizador de cuatro pastas dentales formuladas con calcio, fosfato y flúor sobre el contenido y deposición de minerales de en esmaltes sometidos a desmineralización.	
	 Estudio 3: Eficacia de cuatro dentífricos a base de calcio-fosfato-flúor en la regresión de lesiones de manchas blancas en niños: Un ensayo clínico randomizado.	
VII.	Resultados	36
VIII.	Discusión	46
IX.	Conclusiones en español	65
X.	Conclusiones en portugués	66
XI.	Referencias	67
XII.	Anexo: Figuras	71
XIII.	Anexo: Resumen en inglés	75
XIV.	Anexo: Resumen en portugués	79

I. RESUMEN

Antecedentes: Las lesiones de manchas blancas (WSL) representan el primer signo de caries dental producto del desequilibrio de la desmineralización (des) - remineralización (re). Los agentes fluorados son comúnmente usados como tratamiento de WSL, sin embargo, se han introducido otras terapias con tecnologías de nanopartículas. Entre los productos que usan complejos de calcio [Ca], fósforo [P] y flúor [F] encontramos Remin Pro®, hidroxiapatita fluorada (HA+F); Mi Paste Plus™, fosfopéptido de caseína - fosfato de calcio amorfo fluorado (CPP-ACPF); Clinpro™ Tooth Crème, fosfato tricálcico fluorado (f-TCP) y Sensodyne® Repair&Protect, fosfosilicato de calcio y sodio fluorado (CSPS+F). Se cree que esta combinación de minerales es capaz de detener lesiones activas por medio de la acción compleja de iones. La hipótesis de estudio fue que las pastas dentales basadas en calcio-fosfato-flúor son efectivas para el tratamiento de lesiones iniciales de caries.

Objetivo: El objetivo de esta serie de trabajos fue evaluar la efectividad de cuatro pastas dentales a base de calcio-fosfato-flúor en la remineralización de lesiones iniciales de caries observadas en la microdureza y morfología (Estudio 1), el perfil mineral-ultraestructural (Estudio 2), la regresión y descalcificación (Estudio 3).

Material y Métodos:

Estudio 1. *Diseño:* Experimental *in vitro*. *Ética:* Aprobación del CE Hospital San Carlos (CI 17/203-E). *Muestra de estudio:* 104 especímenes (e) de esmalte. *Cálculo tamaño muestral:* Si. *Criterio de exclusión:* $250 < \text{Microdureza inicial} < 365$. *Randomización:* Aleatoria simple. *Grupos de estudio:* Experimentales G1 (HA+F), G2 (CPP-ACPF), G3 (f-TCP), G4 (CSPS+F) [n=21 e/g]. Controles G5 (Control+) y G6 (Control-) [n=10 e/g]. *Instrumentación:* Especímenes en bloques acrílicos (4 e/b) expuestos en solución des (pH 4.4x5 días). Ciclo de pH (des-re) e incubación (37°C) por 30 días. *Intervención:* G1-4. Tres usos diarios de pasta dental (0.1ml) con (i) Aplicación tópica (4'x15 días) y (ii) Cepillado eléctrico (1'x15 días); en un ciclo de pH (3h des, 2h re, 3h des). G5. Solo ciclo pH (6h re, pH 7.0; 18h H₂O desionizada). G6. Solo ciclo de pH (2h des; 22h H₂O desionizada). *Mediciones:* Microdureza (\bar{X} de 3 indentaciones, 100 g, 5") usando técnica Vickers (VHN; Future-Tech, FM-700, Japan) y morfología de esmalte (n=4 e/g; Scores de Ferreira) observadas a 1000× usando la microscopía de electrónica de barrido (SEM; Jeol model JSM-820), sin técnica de oro.

Cegamento y calibración: Sí, del examinador de mediciones. *Variables:* (a) Microdureza: VHN, reconversión (%SMHR), cambio (%SMHC). (b) *Morfología:* scores SEM. *Observaciones:* Inicio, post-des, 15 días y 30 días post-remineralización.

Estudio 2. *Diseño:* Experimental *in vitro*. *Ética:* Aprobación del CE Hospital San Carlos (CI 17/203-E). *Muestra de estudio:* 240 especímenes de esmalte. *Cálculo tamaño muestral:* Si. *Randomización:* Bietápica (i) Dientes: grupos de estudio y (ii) Superficies: tiempos de observación. *Grupos de estudio:* HA+F, CPP-ACPF, f-TCP, CSPS+F (n=15 e/g). *Instrumentación:* Especímenes (3x3mm) expuestos en solución des (pH 4.4; 5 días). Ciclo de pH (3h des, 2h re, 3h des) e incubación (H₂O desionizada, 16h; 37°C) por 30 días. *Intervención:* Tres usos diarios de pasta dental (0.1ml) con (i) Aplicación tópica (4'x15 días) y (ii) Cepillado eléctrico (1'x15 días). *Mediciones:* Perfil mineral de [Ca-P-F] (%Peso; \bar{X} de 3 mediciones) usando espectroscopia de energía dispersiva (EDS; Oxford Link Isis Inca) y la ultraestructura de esmalte (Scores Gupta) observadas a 5000× usando microscopía de electrónica de barrido (SEM; Jeol model JSM-820), con técnica de oro. *Cegamento y calibración:* Sí, del examinador de mediciones. *Variables:* (a) Perfil mineral: %Peso (%W) y ganancia mineral (GM). (b) *Perfil ultraestructural:* scores SEM. *Observaciones:* Inicio, post-des, 15 días y 30 días post-remineralización.

Estudio 3. *Diseño:* Ensayo clínico controlado. *Ética:* Aprobación del CE Hospital San Carlos (CI 18/014-E) y de consentimientos informados. *Muestra de estudio:* 52 niños. Criterio de inclusión: niños de 6-7 años con al menos una WSL (Indicador Gorelick “descalcificación”: 1 – 3), en dientes anteriores permanentes. *Cálculo tamaño muestral:* Si. *Randomización:* Aleatoria simple. *Grupos de estudio:* HA+F (n=10), CPP-ACPF (n=10), f-TCP (n=10), CSPS+F (n=11), Control con pasta fluorada convencional 1100 ppm F⁻ (n=11). *Intervención:* Dos usos diarios de pasta dental administradas a las 7h y 11h, 5 días/semana, durante 3 semanas. Tres fases de aplicación: (i) Primera semana: Cepillado manual (3') + tópica en cubetas (4') por 5 días; (ii) Segunda semana: Solo cepillado manual (3') y (iii) Tercera semana: Solo cepillado eléctrico (3'). *Mediciones:* Áreas y regresión de WSL observadas en fotografías dentales usando Software Image-Pro v10. Descalcificación con índice Gorelick (ID) usando examen clínico visual. *Cegamento:* Doble ciego, examinador-participantes. *Calibración:* Sí, del examinador de mediciones. *Variables:* (a) Regresión de lesión: áreas de WSL (%WSL) y regresión de WSL (Δ RW). (b) Descalcificación: scores ID. *Observaciones:* Inicio y 3 semanas post-remineralización.

Resultados:

Estudio 1. Todos los dentífricos aumentaron significativamente los valores de VHN de las muestras después de 30 días de aplicación. Los tratamientos con HA+F y CSPS+F también fueron significativamente efectivos a los 15 días. Se observó un valor significativamente mayor de %SMHR y %SMHC con HA+F, f-TCP y CSPS+F en la primera remineralización y CPP-ACPF en la segunda remineralización en comparación con los grupos controles. Las imágenes SEM revelaron que todos los grupos fueron capaces de reparar la morfología de las superficies.

Estudio 2. Todos los dentífricos recuperaron significativamente el contenido de las muestras después de 15 días de aplicación, con excepción de HA+F que recuperó el contenido de calcio a los 30 días de tratamiento. La ganancia mineral fue positiva y no se mostró diferente entre grupos. Las imágenes SEM revelaron que todos los grupos fueron capaces de reducir la permeabilidad del esmalte después de la desmineralización formando un revestimiento mineral.

Estudio 3. Los grupos experimentales mostraron una disminución significativa post-tratamiento de WSL, valores más altos de ΔRW y disminución de la severidad del ID, en comparación con el grupo control. La disminución ID se asoció significativamente a HA+F, CPP-ACPF y f-TCP ($OR < .23$) a diferencia del grupo de control ($OR > 4.9$). Aunque el tratamiento con CSPS+F fue más efectivo que el grupo control en disminuir el ID ($OR = .56$ vs $OR = 2.1$), no fue estadísticamente diferente.

Conclusiones: Tras el análisis de los tres estudios, puede concluirse que las pastas dentales basadas en calcio-fosfato-flúor se presentan efectivos para el tratamiento de lesiones iniciales de caries.

PALABRAS CLAVE: CPP-ACP, fosfato tricálcico, fosfosilicato de calcio y sodio, hidroxiapatita, lesiones de mancha blanca, microdureza, SEM, remineralización.

II. INTRODUCCIÓN

1. Lesiones iniciales de caries

La caries dental se forma a través de una interacción compleja a lo largo del tiempo entre las bacterias productoras de ácido y los carbohidratos fermentables, y muchos factores del huésped, incluidos los dientes y la saliva (Selwitz et al., 2007).

La biopelícula dental es un factor esencial en la etiología de la caries dental. Asimismo, los factores de virulencia claves para la formación de lesiones de caries dental son la absorción de hidratos de carbono, la generación de ácidos y la tolerancia de pH baja para el proceso de formación de caries (Moye et al., 2014).

Un disturbio por mayor consumo de carbohidratos fermentables genera la producción de ácidos. Inicialmente, especies no mutans crean a un ritmo lento un ambiente acidogénico ideal que terminaría por inhibir a las especies ácido tolerables (Mclean et al., 2012).

La disminución crítica de los niveles de pH (< 5.5) potencia a los ácidos del medio a disolver la hidroxiapatita del esmalte dental, no obstante, la variación del pH es dinámica y en el proceso pueden intervenir la combinación de otros iones (Yu et al., 2017).

La acidificación del medio bucal genera cambios en la expresión del fenotipo y genotipo de la microbiota oral. Como resultado ocurre un desbalance continuo de las estructuras minerales y orgánicas, y posterior disolución detectable como lesión (Marsh, 2004).

La disolución química del esmalte se caracteriza por su desintegración molecular. Es localizada y progresiva, por lo que si no se detiene su avance natural, afecta a todos los tejidos dentarios y provoca una lesión irreversible (Kidd & Fejerskov, 2013).

La saliva dirige su capacidad tampón para mantener el pH a niveles no críticos. Esto se explica por su alto contenido en bicarbonatos, quienes intentan restablecer el equilibrio del medio evitando la disolución de hidroxiapatita (Shimazaki et al., 2017).

Los componentes inorgánicos de la saliva, sobretodo iones calcio y fosfato, coadyuvan a neutralizar los ácidos. La acción del calcio se considera 20 veces más potente para inhibir la disolución de la hidroxiapatita en comparación a los fosfatos (Shellis et al., 2004).

Los factores de caries actúan como una cascada de eventos. Un pH bajo por aumento del consumo de carbohidratos, provoca la pérdida neta de minerales. En tanto, las bacterias acidogénicas y acidúricas desarrollan la lesión (Aas et al., 2008).

Este rol no es exclusivo de los *Streptococcus*, ya que en ausencia de estas bacterias otros microorganismos *S. no mutans* y *Actinomyces* pueden iniciar la caries. Un espesor de placa de 1000 μm es comparado al de una situación de higiene oral deficiente (Yu et al., 2017).

La lesión inicial de caries o mancha blanca es una porosidad del esmalte subsuperficial producto de periodos de desmineralización. Se observa clínicamente como una opacidad “blanca lechosa” un poco más suave al esmalte sano (Paula et al., 2017).

WSL se caracterizan por pérdida del mineral superficial pero con conservación de la capa envolvente. Es decir, son áreas de descalcificación local del esmalte sin formación de cavidades. Clínicamente se observan clínicamente como una mancha blanca opaca. El área es un poco más suave que el esmalte de sonido circundante (Sundararaj et al., 2015).

A nivel estructural, la red de nano-cristales de la lesión inicial de esmalte tiene menor dureza y mayor porosidad. La primera disolución de la superficie ocurre en el plano central también conocido como línea oscura central o línea de Dark (Kakei et al., 2009).

La línea central de Dark es un espacio de 1 a 1.5 nm muy susceptible a defectos estructurales. Tiene una elevada concentración de calcio que forma un interfaz en la hidroxiapatita y el fosfato octocálcico débil de energía y suave de dureza (Gasga et al., 2008).

En una lesión inicial de caries, se observan la capa superficial y el cuerpo de la lesión como áreas de desmineralización. La capa superficial envuelve al cuerpo de la lesión. Ambas son observadas ante lesiones iniciales y/o pH 4.5 en periodos cortos (De Medeiros et al., 2012).

En la primera etapa de desmineralización, la capa superficial de WSL se conserva casi intacta con un grosor de 20-100 μm y es la única con propiedades ópticas de birrefringencia negativa. También resulta más porosa y con mayor pérdida mineral de 5% (ten Cate, 2008).

En una segunda etapa de desmineralización, la capa subsuperficial de WSL se encuentra en la zona más profunda de esmalte. Es poroso pero aún conserva minerales que cubren el cuerpo de la lesión. Esta última con una pérdida mineral de 18-50% (Ilie et al., 2014).

2. Terapia preventiva convencional

El Seminario de la Academia Europea de Pediatras realizado en Bruselas en 2015, recomienda que las terapias no invasivas son eficaces en la prevención de caries y el tratamiento de lesiones con microcavitación. Algunas terapias son con agua fluorada, pasta dental fluorada, barniz de flúor y material restaurador no invasivo de fosas y fisuras (Kühnisch et al., 2016).

Si bien las terapias no invasivas pueden ser eficaces para detener el avance de la lesión no cavitada, es posible que el éxito dependa, en gran medida, de los cambios de comportamiento del hábito de cepillado de los pacientes (van Loveren et al., 2016).

Medidas no invasivas o mínimamente invasivas podrían ayudar también a remineralizar lesiones de caries cavitadas, por tanto, evitaría un tratamiento restaurador temprano (Rechmann et al., 2016). Cabe destacar las siguientes terapias preventivas de caries:

a) Agentes fluorados

Son agentes remineralizantes y antimicrobianos tradicionales por excelencia. Son usados como terapia preventiva y de tratamiento de lesiones iniciales de caries. Busca inhibir la desmineralización al disminuir el valor del pH crítico. Su adhesión a los cristales de hidroxiapatita aumenta el contenido mineral del mismo, consecuentemente, lo hace menos soluble al proceso de caries (Mei et al., 2016).

Existen agentes fluorados sistémicos y tópicos a diferentes concentraciones. La vía sistémica considera la incorporación de flúor en el agua, sal (250 mg/kg) y leche (2.5-5 mg/kg). También pueden estar contenidos en suplementos como comprimidos (0,25 mg/día), chicles y gotas (Iheozor-Ejiofor et al., 2015).

Existe controversia sobre la fluoración artificial de aguas. Para el consenso europeo, este medio es efectivo en la reducción de caries a nivel comunitario. Los programas de incorporación artificial de flúor en aguas se aplican considerando el comportamiento de la población hacia el uso de pastas dentales (Ran et al., 2016).

El flúor en leche y sal aunque con evidencia limitada pueden reducir la caries. En niños preescolares, la leche fluorada es efectiva; sin embargo, la sal no lo es tanto debido al

consumo limitado recomendado en estos grupos (Fabruccini et al., 2016).

Los suplementos fluorados se asocian a una reducción de caries en dentición permanente, sin embargo, no hay evidencia suficiente de su aplicación en dentición decidua. Su uso está más enfocado a niños con alto riesgo de caries dental y en condiciones de deficiencia de flúor en agua potable (Takahashi et al., 2017).

El agente fluorado de autoaplicación más usado es la pasta dental fluorada. Otro de uso complementario que puede incorporar flúor es el colutorio (NaF del 0.05 – 0.2%). También están los de aplicación profesional como los geles (flúor fosfato acidulado al 1.23% o NaF al 2%) y barnices.

Una revisión reciente sobre pastas fluoradas confirma su eficacia en la prevención de caries de niños (Wright et al., 2014). En cuanto a estudios sobre colutorios fluorados en niños y adolescentes, han mostrado gran reducción de placa cariogénica en dientes permanentes (Marinho et al., 2016).

La revisión de estudios sobre la acción del gel flúor muestra gran efecto inhibitor de caries, no obstante, la evidencia fue de calidad moderada sobre dentición permanente y de calidad limitada sobre dentición decidua. Si bien hay poca evidencia sobre su riesgo de toxicidad, no se recomienda a niños menores de 6 años (Marinho et al., 2015).

Considerando la evidencia científica sobre los barnices de flúor, estos representan una importante terapia preventiva de caries. Son recomendados como adyuvantes al tratamiento de lesiones de manchas blancas activas tanto en dentición decidua como en permanente (Lenzi et al., 2016).

Una revisión sistemática reciente señala que el uso de barnices de flúor sobre un tiempo de seis semanas puede ser efectiva para prevenir la formación de WSL. No obstante, es una terapia de uso profesional menos accesible al uso de pastas dentales (Benson et al., 2013).

b) Terapias antimicrobianas alternativas

Los agentes antimicrobianos tienen propiedades bioadhesivas protectoras para inhibir la formación de biopelícula y su uso está relacionado a pacientes con alto riesgo de

caries dental. Estos productos suelen estar incorporados a otros compuestos como pastas dentales, geles, barnices y colutorios. Entre los agentes empleados encontramos la arginina, el xilitol, la clorhexidina, la yodo povidona, los probióticos, el triclosán y los extractos de hierbas naturales. Al ser productos relativamente recientes en comparación a compuestos anti-caries tradicionales, no hay información suficiente que demuestre sus beneficios en la salud oral (Twetman & Dhar, 2015).

La evidencia sobre arginina es limitada, pero su combinación con calcio y flúor sugiere un mayor potencial anti-caries en comparación con compuestos que solo contienen flúor (Li et al., 2015). Una revisión sobre la literatura del producto sustenta que no hay pruebas suficientes que respalden su efecto preventivo de caries para que sea incluido en pastas dentales (Richards, 2017).

La evidencia sobre xilitol en pastas fluoradas tampoco es concluyente. Los ensayos clínicos para examinar su efectividad en la incidencia de caries en niños han mostrado una pequeña reducción probar su eficacia a reducción de caries tras su aplicación (Marghalani et al., 2017).

Las revisiones sobre clorhexidina en barniz o gel, yodo povidona y probióticos mostraron un efecto positivo en la prevención de caries. Sin embargo, no hallaron pruebas suficientes de su efecto sostenible sobre la colonización microbiana cariogénica en niños (Li & Tanner, 2015). Otra revisión halló que el barniz de triclosán al 0.3% redujo el desarrollo de caries en dientes temporales, pero la evidencia tuvo un alto riesgo de sesgo (Wang et al., 2017).

Las hierbas naturales han sido estudiadas para ver su efecto sobre biopelícula oral. Una revisión ha evaluado diferentes extractos obtenidos de las plantas como *Vitis vinifera*, *Pinus spp.*, *Coffea canephora*, *Camellia sinensis*, *Vaccinium macrocarpon*, *Galla chinensis*, *Caesalpinia ferrea Martius*, *Psidium cattleianum*, especies de Brasil y miel de Manuka. En general, los resultados fueron positivos en cuanto a la tasa de eliminación de múltiples especies de biopelícula oral cariogénica (Karygianni et al., 2016).

En general, los agentes antimicrobianos fluorados y terapias alternativas generan reducciones temporales en los niveles de colonización de *Streptococcus mutans*, no obstante, las revisiones no hallan pruebas suficientes para indicar que los compuestos

logren reducir o prevenir la caries temprana.

3. Nanotecnología aplicada a productos remineralizantes

Las pastas dentales son la forma de administración de flúor más simple, accesible al consumidor e universalmente aceptada (Twetman & Dhar, 2015). El desarrollo de la nanotecnología ha permitido modificar los dentífricos con la incorporación de sales tipo fosfatos de calcio para que sean más eficaces en la remineralización. Estos representan un grupo de agentes anticaries usados en el cuidado de la salud oral que pueden considerarse biomiméticos debido al hecho de que la fase mineral de los dientes, especialmente esmalte, se compone del mismo compuesto químico básico. El calcio y fosfato actuarían rellenando los microporos, formando núcleos cristalinos y atrayendo nuevos iones procedentes de la saliva oral. Además de remineralizar, podrían tener características antiadherentes para el control del biofilm (Meyer et al., 2018). La familia de fosfatos de calcio contiene muchos compuestos diferentes, tales como:

- CPP-ACP: fosfopéptido de caseína - fosfato de calcio amorfo (Recaldent®)
- CSPS: fosfosilicato de calcio y sodio (NovaMin®)
- TCP: fosfato tricálcico
- Hidroxiapatita

Historia

En 1920, Albee utilizó el primer material de TCP como sustituto de injertos óseos en conejos hallando su osteoconducción. En 1971, Monroe creó un método para obtener un compuesto a base de TCP y fluorapatita. No fue hasta 1975 que TCP se usó como aplicación dental en perros, posteriormente, diferentes estudios han evaluado su fase beta fosfato tricálcico (β -TCP). Este biomaterial ha tenido un uso extensivo para cubrir defectos periodontales, fijación en implantes, como barrera apical y apexificación (Al-Sanabani et al., 2013)

En 1946, se estudió por primera vez el efecto de la leche sobre la incidencia y extensión de caries dental en ratas. Específicamente, se evaluó la caseína, una fosfoproteína de la leche que representa el 80% del total de proteína. Cuando la concentración de caseína en la dieta fue aumentada de 24% a 50%, generó una reducción de caries (Schweigert & Shaw, 1946). Luego, diversos estudios desarrollaron experimentos en laboratorios con animales sobre

productos lácteos (leche, queso, caseína) para evaluar su efecto anticaries. Desde 1950, se reconoce la importancia fisiológica de la caseína (Schupbach et al., 1996).

En 1960, Aaron Posner realizó una mezcla de compuestos y obtuvo por accidente fosfato de calcio amorfo (ACP) (Boskey, 1997). Eanes en 1965, identificó ACP en hueso humano. ACP fue patentado por la ADA (American Dental Association) en 1991, junto a otros como fluorfosfato cálcico y fosfato cálcico carbonatado. Fue utilizada en la remineralización, exposición radicular y sensibilidad dental basada en la entrega de iones calcio y fosfato por separado y el reforzamiento con flúor o carbonatos sobre la estructura de cristales de hidroxiapatita (Eanes, 1998).

En 1969, la Universidad de Florida presentó el primer vidrio bioactivo bioglass 45S5 con base de CSPS y su efecto sobre la unión del hueso. En 1971, se dio la primera publicación al respecto y en 1981 se evaluó su biocompatibilidad y no toxicidad. Fue aplicado clínicamente como producto médico en 1985. Tras sucesivas evaluaciones de osteoconducción en injertos óseos periodontales – CSPS como material bioactivo dental – fue patentado por Novamin Technology Inc. y la Universidad de Maryland en 1998 (Hench & Jones, 2015).

En 1995, el compuesto CPP obtenido de la caseína de la leche fue estudiado por primera vez. El estudio consideró que estabilizaba al fosfato cálcico formando un compuesto complejo denominado CPP-ACP. El compuesto produjo una reducción de hasta 55% la actividad de caries en molares de ratas previamente inoculadas con *Streptococcus sobrinus*. El efecto fue mayor a más concentración o bajo la acción sinérgica con flúor (Reynolds, 1998).

CPP-ACP fue patentado por la Universidad de Melbourne y la empresa productora de leche Dairy Industry Authority Victoriano en Australia en la marca registrada Recaldent. En 1999, se aceptó como producto seguro por la FDA (Food and Drug Administration). El permiso incluía su incorporación a gomas de mascar hasta un 5% del peso total (Trident White, Cadbury Adams EE.UU., Parsippany, NJ.). También se aprobó su uso como abrasivo en pastas profilácticas, sensibilidad dental y dentífricos (Reynolds et al., 1995).

En 2004, Novamin obtuvo la aprobación de la FDA en el tratamiento de hipersensibilidad y tras ello se incorporaron a dentífricos. Tai et al., en 2006, presentó el primer estudio de este compuesto como vidrio bioactivo y su evaluación se enfocó en remineralizar y tratar la hipersensibilidad sustentada en su acción de partículas <90 µm. Esta acción fue a nivel de

obstrucción de túbulos dentinarios para reducir la irritación pulpar y reforzar la estructura dentinaria con cristales de hidroxiapatita estables (Hench & Jones, 2015).

En 2009, TCP fue patentado como compuesto a base de β -TCP. Fue estudiado por Karlinsey como dentífricos junto al lauril sulfato sódico y el fluoruro de sodio. Se formuló para ser estable y con capacidad de liberación de calcio y fosfato al medio salival. Su estudio se basó en la remineralización dental e hipersensibilidad (Cochrane et al., 2010).

En 2009, se realizó un estudio que demostró que las partículas de nano-hidroxiapatita se depositaban regularmente en las superficies desmineralizadas de esmalte bovino, formando así nuevas capas superficiales. El potencial remineralizador fue calculado en base a una concentración del 10% de nano-hidroxiapatita (Huang et al., 2009). Los estudios en 2011 realizados en esmaltes humanos y en 2014 con pacientes concluyeron que el efecto remineralizador de nano-HA promovieron la remineralización mediante un recubrimiento protector biomimético (Najibfard et al., 2011; Lelli et al., 2014).

Características y mecanismos

HA

La hidroxiapatita tiene como fórmula $[Ca_5(PO_4)_3(OH)]$. Es un elemento mineral que forma parte principal de los tejidos duros como los dientes y huesos. Su uso puede conducir a la formación ósea debido a su potencial de osteoconducción. Asimismo, presenta una excelente biocompatibilidad con los tejidos duros, sin propiedades citotóxicas. Su uso se extiende a cirugías maxilofaciales, defectos óseos y revestimientos de prótesis ortopédicas, así como para el revestimiento con películas en los implantes dentales (Elkassas & Arafa, 2017).

Recientemente, las hidroxiapatitas han sido introducidas en pastas remineralizantes, junto al fluoruro y xilitol. Son recomendados para el tratamiento de hipersensibilidad dentinaria. Su mecanismo se basa en el sellado de túbulos dentinarios y el relleno de esmalte erosionado. Los creadores asumen que actúan previniendo la desmineralización y remineralizando de las áreas subsuperficiales de la lesión de esmalte (Kamath et al., 2013).

CPP-ACP

CPP tiene una secuencia clúster [-Ser (P)-Ser (P)-Ser (P)-Glu-GluSu]. Sus residuos fosfoseril

interactúan con ACP [$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \cdot n\text{H}_2\text{O}$] formando un compuesto bioactivo CPP-ACP que a diferencia de ACP solo, es más estable gracias a péptidos y fosfatasas que mantienen unido sus complejos. Comparte las propiedades como: biodisponibilidad (calcio, fosfato y un par iónico neutral), osteoconductividad, biocompatibilidad (biopelícula, mucina y bacterias), no citotoxicidad y solubilidad. CPP-ACP puede ser adicionado con flúor (CPP-ACPF) para ayudar a mantener altas concentraciones de sus partículas promoviendo la remineralización (Farooq et al., 2013).

El CPP-ACP se mantiene estable gracias a fosfopéptidos de caseína que estabilizan sus complejos CPP y ACP. Pero ante un pH crítico, la carga negativa del medio hace que los complejos se disocien liberando compuestos de calcio y fosfato que sobresaturan la saliva. Esto ayuda a mejorar la amortiguación y la inhibición bacteriana. CPP-ACP una vez en contacto con la superficie dental, interactúa con iones hidrógeno para formar calcio, hidrógeno y fosfato. La gradiente más alta externa hace que se intercambien los iones de CPP-ACP con los de la superficie dañada. Así ingresan calcio-fosfato, se retiran los ácidos, y se produce la recristalización de hidroxiapatita. Por un lado, su efecto bioactivo permite inhibir la desmineralización, y por otro, promueve la remineralización de la lesión subsuperficial del esmalte dental (Farooq et al., 2013).

β -TCP

Es un compuesto denominado fosfato beta-tricálcico (β -TCP) y su fórmula es $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Representa un tipo de fosfato cálcico al igual que la hidroxiapatita. Aunque la hidroxiapatita tiene buena osteoconducción, no es fácilmente reabsorbido. El TCP en cambio tiene buena conducción, específicamente el tipo beta, además de su capacidad para interactuar con el lauril sulfato de sodio. Esta unión tiene potencial en la remineralización de lesiones subsuperficiales y la neutralización del pH salival (Karlinsky et al., 2010).

TCP es un compuesto biocompatible y bioactivo que puede aparecer en la fase de transición de la conversión a la hidroxiapatita. Tiene defectos en su red cristalina pudiendo atraer otros compuestos como fosfatos (Kamitakahara et al., 2008). Junto al lauril sulfato de sodio forman un complejo abrasivo funcional. Remineraliza las lesiones de caries al entregar iones calcio y fosfato al esmalte. Asimismo, β -TCP ha sido funcionalizado con flúor para potenciar su acción remineralizadora (f-TCP) (Cochrane et al., 2010).

CSPS

Es un vidrio de fosfosilicato de calcio y sodio amorfo [CaNaO₆PSi]. Contiene 45% de SiO₂, 24.5% de Na₂O, 24.5% de CaO y 6% de P₂O₅. Este compuesto ante un medio acuoso sufre reacciones que forman hidroxiapatita y apatitas hidrocarbonadas. Es altamente bioactivo en huesos y tejidos blandos, además de compartir similitud con los tejidos duros de la cavidad oral y corporal. CSPS en adición al flúor (CSPS+F), genera fluorapatitas que son ácidos más resistentes (Ali et al., 2014).

Cuando CSPS coincide con un medio ácido de la cavidad oral, reacciona produciendo compuestos insolubles (sodio, calcio y fosfato). Los iones fosfatos liberados del esmalte y el CSPS forman sales inorgánicas de fosfato cálcico (brushita) que se transportan a la superficie dental formando una capa interactiva con capacidad de obliteración de túbulos dentinales. Esto desensibiliza la dentina y en el proceso se forman también compuestos de silanol de la unión de la sílice del CSPS e iones hidroxilo del medio ácido. Estos últimos al ser retirados, dejan los cristales de brushita insolubles que luego son convertidos en cristales de hidroxiapatita (Nganga et al., 2012).

4. Pastas dentales formuladas con calcio, fosfato y flúor como tratamiento

El manejo de la lesión cariosa no cavitada de forma no invasiva es un objetivo de la odontología moderna. La mayoría de las lesiones de caries tempranas necesitan tratamiento no invasivo. En este contexto, la preservación dental es la piedra angular de la odontología preventiva. El uso diario de pastas dentales fluoradas se considera la razón principal de la disminución general de la caries en todo el mundo. El fluoruro es la base en el proceso contra la desmineralización, sin embargo, su capacidad para promover la remineralización neta es limitada (Carvalho, 2014; Pitts et al., 2017; Tickotsky et al., 2017).

La nanotecnología ha abierto nuevas vías de investigación para potenciar la odontología preventiva. Los nuevos materiales biomiméticos con propiedades anticaries prometen disminuir la biopelícula e inhibir la desmineralización, lo que facilitaría el proceso de remineralización al incorporar partículas en las áreas de lesión hasta obtener minerales como hidroxiapatita o similares. Se sugiere que una acción conjunta de calcio, fosfato y fluoruro, puedan combatir la desmineralización (Denis et al., 2013; Clarkson y Exterkate, 2015; Chandna et al., 2016).

Sobre si el reforzamiento con flúor a los agentes biomiméticos podría reducir la biodisponibilidad del flúor también encontramos opiniones contrarias. Algunos consideran que esta combinación podría reducir la biodisponibilidad del fluoruro en su forma iónica. Esto debido a que su aplicación crearía una reacción entre sus componentes derivando en compuestos insolubles como fluoruro de calcio o fluoruropatita, lo que puede afectar negativamente en eficacia clínica (Huang et al., 2009; Martinez-Mier et al., 2018).

La mayoría de estudios sobre agentes remineralizantes sobre calcio y fosfato han seguido un modelo *in vitro* que usualmente ha incluido análisis morfológico de esmalte mediante de imágenes con microscopía de electrónica de barrido (SEM), pruebas de dureza de Vickers (VHN) o Knoop y mediciones de componentes minerales con espectrómetro de energía dispersiva (EDS). Todos los estudios sobre dichos agentes analizados en una reciente revisión sistemática, mostraron un efecto remineralizador en superficies de esmalte visto con aumento de dureza y formación de depósitos minerales (Taha et al., 2017).

Los resultados de estudios *in vitro* previos han demostrado que la aplicación de pastas dentales a base de CPP-ACPF – comercialmente disponible como MI Paste Plus – sugieren evidencia de remineralización de lesiones de caries de esmalte evaluadas a través de la microdureza dental (De Souza et al., 2014; Oliveira et al., 2016; Soares et al., 2017) y el contenido mineral (Sathe et al., 2014; Poggio et al., 2016; Brar et al., 2017; Leila et al., 2017; Soares et al., 2017). Otros estudios realizados en pacientes han demostrado la capacidad de CPP-ACPF para disminuir las áreas de WSL (Llena et al., 2015; Yazicioğlu et al., 2017), sin embargo, también hubieron otras investigaciones que no pudieron demostrar un beneficio concluyente (Rechmann et al., 2018).

La evidencia de la eficacia del f-TCP – disponible comercialmente como Clinpro (3M ESPE) – sugiere su poder remineralizador en términos de microdureza (Balakrishnan et al., 2013; Elkassas & Arafa, 2014) y de características minerales (Patil et al., 2013; Brar et al., 2017). Su efecto se basa principalmente en la mejora de la capacidad natural de la saliva para remineralizar la pérdida de minerales. Clínicamente, hay evidencia de la ganancia mineral de WSL (Karlinsky & Pfarrer, 2012; Vanichvatana & Auychai, 2013).

La reciente revisión sistemática analizó el potencial de la hidroxiapatita desde una perspectiva de salud oral. Se menciona que dicho componente tiene una acción sinérgica

para el tratamiento de caries, sin embargo, el autor sugiere profundizar con estudios *in vivo* para simular mejor la complejidad del medio oral (Enax & Epple, 2018).

Recientemente, se han introducido nuevos productos dentífricos con las marcas Remin Pro y Sensodyne Repair&Protect, como agentes de remineralización. Remin Pro contiene hidroxiapatita potenciada con flúor (HA+F) y xilitol. Los estudios demuestran que Remin Pro puede mejorar la microdureza (Salehzadeh et al., 2015; Heshmat et al., 2016) y los elementos minerales de las superficies de esmalte (Kamath et al., 2017; Jena et al., 2017).

La evidencia sobre la crema dental a base de CSPS+F de la marca Sensodyne Repair&Protect – caracterizada por contener Novamin y flúor – se basa en el depósito de hidroxicarbonato de apatito, un elemento similar a la apatita biológica del diente, que busca mejorar la remineralización del esmalte por medio de la microdureza (Turssi et al., 2011; Narayana et al., 2014; Palaniswamy et al., 2016) y depósito mineral (Lombardini et al., 2014; Poggio et al., 2014; Mockdeci et al., 2017).

No muchos ensayos clínicos sobre las marcas Remin Pro y Sensodyne Repair&Protect han investigado la eficacia sobre la regresión de WSL (Hoffman et al., 2015; Ebrahimi et al., 2017; Heravi et al., 2018). La evidencia general de los beneficios de los vidrios bioactivos y la nanohidroxiapatita requieren de más estudios para confirmar su potencial remineralizador según refieren tres revisiones sistemáticas (Raphael & Blinkhorn, 2015; Elkassas y Arafa, 2017; Taha et al., 2017). Aún más sabiendo que los niños son más susceptibles a la formación de WSL, hay pocos estudios clínicos hasta la fecha que comparen estos métodos preventivos no invasivos en niños pequeños.

En general, existen productos de higiene oral a base de fosfato de calcio solo o combinado con flúor. No obstante, sería importante saber si esta combinación no reduciría la biodisponibilidad del fluoruro iónico en la saliva debido a la formación de compuestos insolubles, tales como fluoruro de calcio o fluoroapatita (van Loveren et al., 2016).

III. JUSTIFICACIÓN

La caries dental sigue siendo una de las enfermedades orales más prevalentes que afectan la salud humana y está relacionada con el estilo de vida, factores socioeconómicos y genéticos, así como con las características del entorno oral. WSL denota el primer signo clínico de caries dental. Este proceso dinámico de desmineralización y remineralización, afecta la superficie del esmalte y el subsuelo sin convertirse en cavitación. Manejar la lesión cariosa no cavitada de forma no invasiva es un objetivo de la odontología moderna. En ese contexto, la preservación dental es la piedra angular en un contexto preventivo.

Si bien existen numerosos agentes remineralizantes, las pastas dentales son más accesibles al manejo de autocuidado de las personas. Aunque los dentífricos fluorados se consideran la principal causa de disminución de caries, podrían tener limitaciones en su biodisponibilidad para promover una remineralización neta. El aporte de la nanotecnología hacia dentífricos con mejores propiedades anticaries, podría facilitar el proceso de remineralización. Esto surgirá en la medida que los dentífricos sean capaces de incorporar partículas para combatir el ataque ácido y a su vez rellenar áreas de lesión.

La acción conjunta del calcio y fosfato reforzado con flúor se sugiere beneficioso para superar las propiedades remineralizantes de las pastas dentales convencionales. La literatura de dicha formulación se halla limitada en cuanto a comparaciones múltiples. Asimismo, hay pocos estudios clínicos hasta la fecha que comparen estos métodos preventivos no invasivos en niños pequeños. En general, la evidencia de los beneficios de estos agentes anticaries biomiméticos requieren más estudios para confirmar la efectividad remineralizadora según refieren tres revisiones sistemáticas.

La limitación en la información disponible sobre la eficacia de las pastas dentales compuestas a base de calcio, fosfato y flúor sobre la remineralización de lesiones tempranas de esmalte, justifican el interés de este trabajo. Por un lado, se pretende evaluar el poder remineralizador de cuatro pastas dentales sobre la microdureza y la morfología de lesiones *in vitro* de caries dental, por otro, evaluar el mismo efecto remineralizador sobre las características minerales en contenido y ultramorfología. Finalmente, conocer clínicamente su poder de regresión sobre WSL luego de manejar un protocolo de cepillado y administración tópica en niños.

IV. HIPÓTESIS

La **hipótesis general** del estudio fue que las pastas dentales a base de fosfato de calcio y flúor se presentan efectivas para reparar las propiedades físicas, químicas y de estructura de lesiones iniciales de caries de esmalte, en comparación con otros medios coadyuvantes como saliva y pastas fluoradas convencionales.

De manera concreta, se plantean las siguientes **hipótesis específicas**:

Hipótesis específicas

1. Las pastas dentales formuladas con calcio, fosfato y flúor son más eficaces en incrementar la microdureza y reparar la morfología de lesiones artificiales de caries de esmalte en comparación con la saliva artificial.
2. Todas las pastas dentales tienen un efecto protector comparable en el aumento de la concentración de minerales y la formación de estructuras minerales en superficies de esmaltes inducidas a desmineralización.
3. Las pastas dentales con calcio, fosfato y flúor son más efectivos en revertir lesiones de manchas blancas en comparación con pastas fluoradas convencionales, a las tres semanas de terapia combinada con cepillado manual-eléctrico y aplicación tópica en cubetas.

V. OBJETIVO

Objetivo general

Estudiar la efectividad de pastas dentales a base de calcio, fosfato y flúor en la remineralización de lesiones iniciales de caries de esmalte en términos de microdureza, morfología, perfil mineral-ultraestructural, regresión y descalcificación.

Objetivos específicos

1. Evaluar el potencial remineralizador de cuatro pastas dentales formuladas con calcio, fosfato y flúor, sobre la microdureza y morfología de lesiones artificiales de caries de esmalte, en comparación a la saliva artificial (Estudio 1).
2. Comparar el efecto remineralizador de cuatro pastas dentales formuladas con calcio, fosfato y flúor sobre el contenido y deposición de minerales en las estructuras de superficies de esmalte sometidas a desmineralización (Estudio 2).
3. Determinar en niños de seis y siete años, si los dentífricos conteniendo calcio-fosfato-flúor son superiores a la pasta fluorada convencional, en la remineralización de manchas blancas, a las tres semanas de terapia (Estudio 3).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

ÉTICA

El estudio fue aprobado por la Comisión Ética del Hospital Clínico San Carlos con registro CI 17/203-E para los estudios 1 y 2 (anexo 1) y con registro CI 18/014-E para el estudio 3 (Anexo 2). Los estudios estuvieron acordes con la Declaración de Helsinki. Para el estudio 3, se obtuvieron los permisos de la Dirección del colegio y los documentos de consentimiento informado del padre / tutor(a) de cada niño / después de una breve explicación de los beneficios previstos y los riesgos potenciales del protocolo del estudio (anexo 3 y 4).

1. ESTUDIO 1

Efecto remineralizador de cuatro diferentes pastas dentales a base calcio, fosfato y flúor sobre lesiones artificiales de caries dental: Un análisis de microdureza y morfología.

1.1. Tamaño muestral

En base a los resultados preliminares de tres muestras de cada grupo, se requirió un tamaño de muestra de 21 por grupo para detectar una diferencia mínima del porcentaje de cambio de VHN superficial (% SMHC) entre tratamientos (P1 inferior = 29%) y saliva artificial (P2 = 2 %) a un nivel de significancia de 5% y una potencia de 0.8.

1.2. Muestra

Fueron recolectadas 104 muestras de esmalte a partir de 26 premolares extraídos, libres de caries y sin algún tipo de grieta. Los dientes estaban limpios de restos de tejidos blandos y almacenados en formalina al 10% (5 ml por diente, pH \approx 7.0).

1.3. Preparación de especímenes

Las superficies bucales se pulieron usando micromotor, pieza de mano contra-ángulo y cepillo de pulido. Se prepararon cuatro muestras de esmalte por cada diente con dimensiones de aproximadamente 3×3 mm utilizando un disco de diamante (Pianotti, Italia; 22x0.6 mm; cambio cada seis dientes). Las muestras se montaron en resina acrílica autocurable (22x18x8 mm) con la superficie bucal hacia arriba (cuatro muestras por

bloque). Las superficies libres dentales se pulieron individualmente utilizando papeles abrasivos (grano 2000, 3000 y 4000, 10 s por cada muestra / grano) para producir superficies planas de esmalte. Todas las otras superficies, con excepción de la bucal, se pintaron con esmalte de uñas resistente a los ácidos.

1.4. Evaluación de la microdureza

Se midió inicialmente VHN de todas las muestras (BASE). La media de tres valores se consideró como el valor de la muestra, uno en el centro y los otros dos a distancias de 100 mm (carga de 100 g, 5 s; Future-Tech, FM-700, Japón) (Elkassas & Arafa, 2014). Solo se incluyeron las muestras que cumplían los criterios de $250 \leq \text{VHN base} \leq 365$.

1.5. Exploración de la morfología

Para la observación morfológica se utilizó SEM a 1000× (Elkassas & Arafa, 2014; Poggio et al., 2014; Oliveira et al., 2016). Un bloque de muestras por cada grupo se montó rígidamente en dos portaobjetos de vidrio con la ayuda de cinta adhesiva de carbono. Fueron luego secados al vacío por un tiempo de 48 horas a temperatura ambiente. En los pasos siguientes, las muestras fueron sujetadas en un trozo de metal con adhesivo. La muestra se evaluó de forma cualitativa mediante SEM (Jeol modelo JSM-820) a 20 kV.

1.6. Formación de lesiones

Cada bloque fue sumergido en ocho ml de solución desmineralizante durante cinco días [CaCl_2 2.0 mM, KH_2PO_4 2.2 mM, ácido acético 0.05, pH ajustado a 4.4 con KOH 1 M; LabKem, Dublin] y en solución remineralizante durante 1 día [CaCl_2 1.5 mM, NaH_2PO_4 0.9 mM, pH ajustado a 7.0 con KCL 0.15 M; LabKem, Dublin], de acuerdo a las formulaciones de Elkassas & Arafa (2014) y Soares et al. (2017). Los bloques se mantuvieron en un recipiente de plástico individual a 37 ° C (Incubig-TFT, S P Selecta®) sin agitación. Se usó un pH digital para verificar el pH durante y después de la preparación de la solución (Crison, micropH 2001, España). Las soluciones fueron reemplazadas diariamente. Después de la desmineralización, los valores de VHN se volvieron a evaluar (DEMI).

1.7. Grupos experimentales

Las muestras se dividieron aleatoriamente en seis grupos de tratamiento:

- Grupo de control negativo (n=10): lesión artificial
- Grupo de control positivo (n=10): saliva artificial
- Grupo HA+F (n=21): Remin Pro (VOCO, Alemania; Lote N °: 1630003)
- Grupo CPP-ACPF (n=21): Mi Paste Plus (GC, Japón; Lote N ° 160808A)
- Grupo f-TCP (n=21): Clinpro Tooth Crème (3M ESPE, USA; Lote N ° 60021)
- Grupo CSPS+F (n=21): Sensodyne Repair&Protect (GSK, UK; Lote N° 62062KWA)

1.8. Ciclo de pH

Los controles negativos y positivos siguieron inmersos en soluciones desmineralizantes y remineralizantes, 2 h y 6 h, respectivamente. Después de ello, se mantuvieron en agua desionizada durante la noche. Otros grupos se sometieron a un ciclo de pH de 30 días. Los bloques se lavaron en agua desionizada entre cada paso (5 s). El ciclo de pH consistió en:

- Primer tratamiento con pastas dentales (4 min)
- Primer tratamiento con solución desmineralizante (3 h)
- Segundo tratamiento con pastas dentales (4 min)
- Tratamiento con solución remineralizante (2 h)
- Segundo tratamiento con solución desmineralizante (3 h)
- Tercer tratamiento con pastas dentales (4 min)

1.9. Aplicación de pastas dentales

En el primer ciclo, las pastas se aplicaron con un micro cepillo por cuatro minutos y tres veces al día durante los primeros 15 días consecutivos (0,1 ml por muestra). En el segundo ciclo, la pasta dental se aplicó con un cepillo de dientes eléctrico (Oral-B Advance Power) a 5 600 golpes por minuto durante un minuto, tres veces al día, durante 15 días. Después de la remineralización, Los valores de VHN se volvieron a medir luego de la primera y segunda remineralización (REMI 15 y REMI 30, respectivamente).

1.10. Indicadores de resultados

Se realizó un análisis cuantitativo de los cambios de VHN. Los valores positivos indicaron la regresión de la lesión, mientras que valores negativos fueron indicativos de desmineralización (Lippert, 2017). Las fórmulas para cada espécimen fueron:

- Porcentaje de superficie de cambio de VHN (%SMHC)

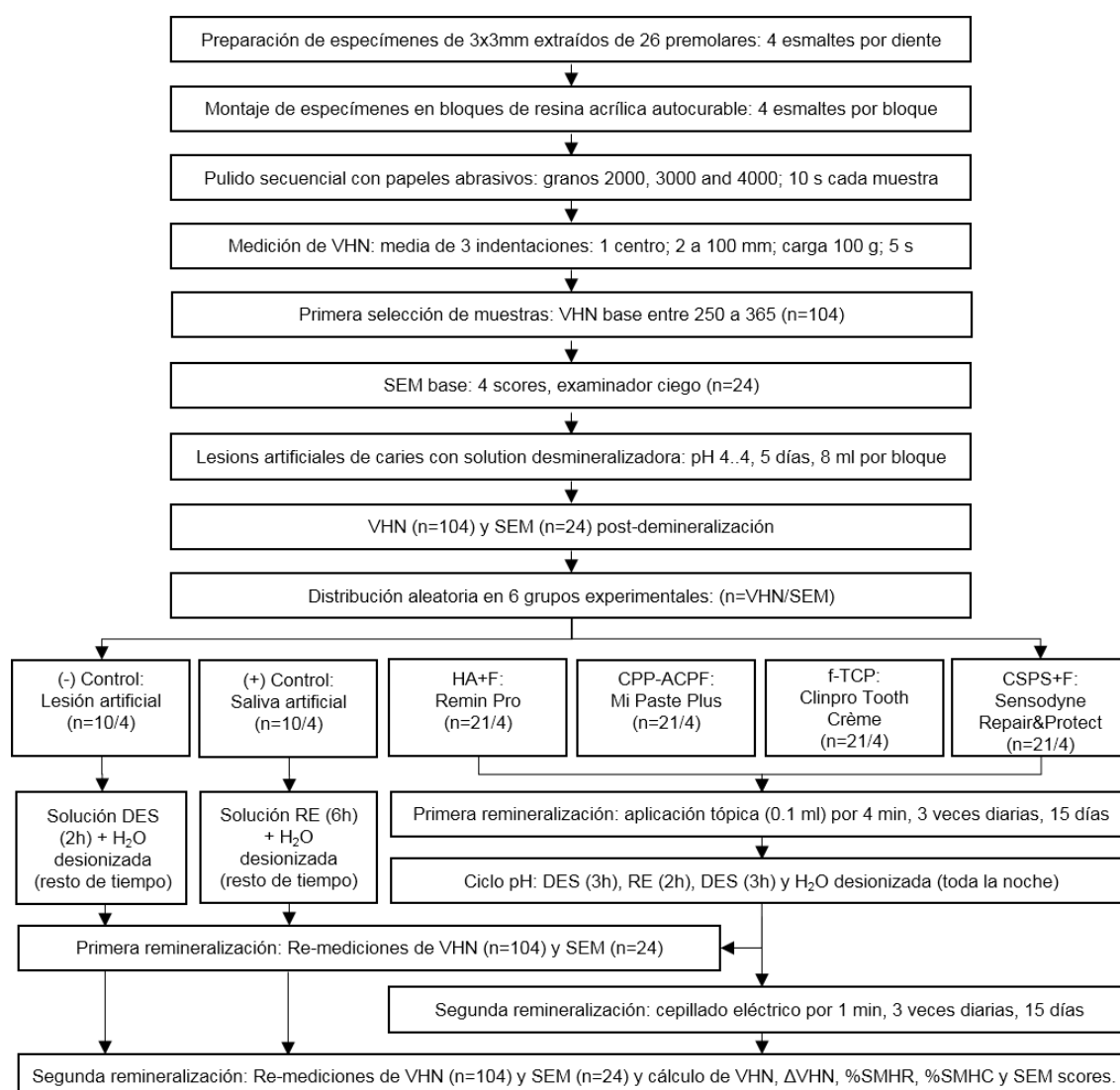
$$\%SMHC = [100 \times (VHN \text{ remi (15:30)} - VHN \text{ demi}/VHN \text{ demi})]$$
- Porcentaje de superficie de recuperación de VHN (%SMHR)

$$\%SMHR = [100 \times (VHN \text{ demi} - VHN \text{ remi}/VHN \text{ demi} - VHN \text{ base})]$$

Para el análisis cualitativo, un examinador ciego y calibrado evaluó la morfología de las superficies de esmalte de acuerdo a los siguientes criterios de Ferreira et al. (2011):

- (0) Esmalte con una morfología superficial lisa.
- (1) Esmalte con ligeras irregularidades.
- (2) Esmalte con irregularidades moderadas.
- (3) Esmalte con irregularidades acentuadas.

El diseño experimental del estudio 1 se resume en la Figura 1.



2. ESTUDIO 2

Análisis SEM-EDS del efecto remineralizador de cuatro pastas dentales formuladas con calcio, fosfato y flúor sobre el contenido y deposición de minerales en esmaltes sometidos a desmineralización.

2.1. Tamaño muestral

El tamaño muestral se calculó a partir de tres muestras por cada grupo para detectar el cambio mínimo del peso del mineral desde la fase de desmineralización y de la primera remineralización. Se calculó 15 muestras por grupo a partir de las diferencias del contenido mineral de fósforo ($\sigma_c^2 = .22$; $d = .42$) a un nivel de significancia del 5% y una potencia de 0.8.

2.2. Muestra

La muestra total fue de 240 superficies de esmalte extraídas a partir de 60 premolares, libres de caries y previamente acondicionados igual que el estudio 1.

2.3. Preparación de especímenes

Se prepararon cuatro muestras de esmalte por cada diente con dimensiones de aproximadamente 3×3 mm utilizando un disco de diamante. Todas las superficies, excepto la bucal, fueron pintadas con esmalte de uñas resistente a los ácidos. Las muestras se guardaron en un recipiente de plástico individual con agua desionizada.

2.4. Aleatorización

Los dientes se dividieron al azar en cuatro grupos de pasta de dientes (15 dientes por grupo). Cada superficie del diente se dividió aleatoriamente en cuatro tiempos de observación: basal (BASE), post-desmineralización (DEMI), primera remineralización (REMI 15) y segunda remineralización (REMI 30).

2.5. Experimento

Las muestras se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos de 15 muestras cada grupo / tiempo de observación según el tratamiento empleado:

- Grupo HA+F: Remin Pro (VOCO, Alemania; Lote N °: 1630004)
- Grupo CPP-ACPF: Mi Paste Plus (GC, Japón; Lote N ° 160901B)
- Grupo f-TCP: Clinpro Tooth Crème (3M ESPE, USA; lote N ° 60021)
- Grupo CSPS+F: Sensodyne Repair&Protect (GSK, UK; Lote N ° 61812KWC)

La creación de lesiones artificiales de caries dental, el ciclo de pH y el tratamiento con pastas dentales fueron realizadas con la misma técnica descrita en el estudio 1.

2.6. Evaluación SEM-EDS

La técnica SEM-EDS fue utilizada siguiendo la técnica descrita en el estudio 1, aunque con técnica de revestimiento en oro a 5000× (Poggio et al., 2016; Brar et al., 2017). La muestra se evaluó cuantitativamente para calcular el perfil de los minerales (calcio, fósforo y flúor) y de forma cualitativa las estructuras de las superficies de esmaltes. El análisis se realizó en la línea base (BASE), luego de la desmineralización (DEMI) y luego de 15 días y 30 días de tratamiento remineralizador con pastas dentales (REMI 15 y REMI 30, respectivamente).

2.7. Indicadores de resultados

Para el análisis cuantitativo, se estimó los porcentajes en peso (%W) del calcio [Ca], fósforo [P] y flúor [F]. La ganancia de minerales se calculó de la siguiente manera:

- Ganancia mineral (GM)

$$(GM) = [100 \times (EDS\ demi - EDS\ remi\ (15:30) / EDS\ demi - EDS\ base)]$$

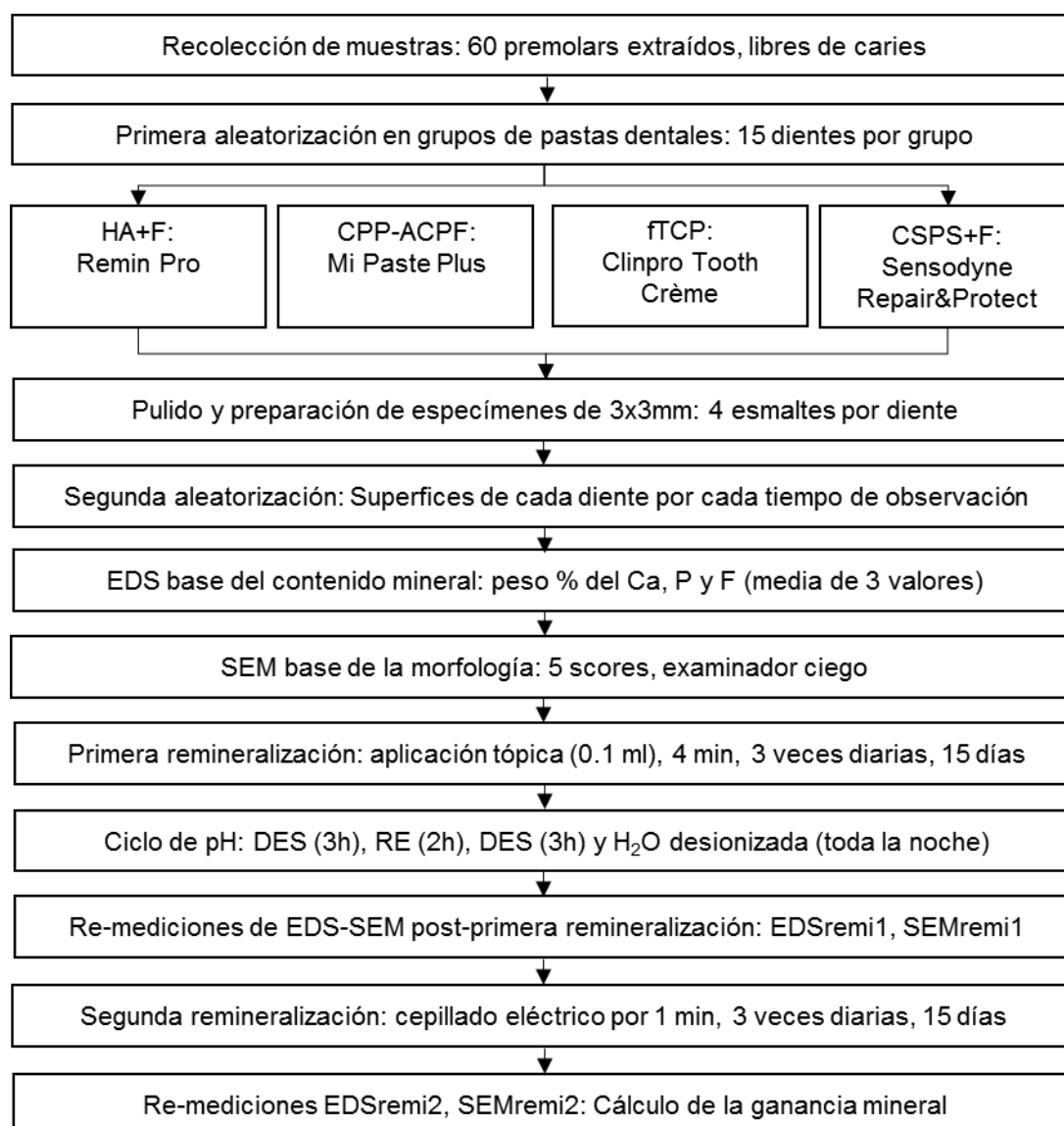
Los valores positivos indicaron regresión de la lesión, mientras que valores negativos indicaron desmineralización.

Para el análisis cualitativo, un examinador ciego y calibrado, evaluó la estructura de las superficies de esmaltes de acuerdo a los siguientes criterios de Gupta et al. (1998):

- (0) Agujeros prismáticos profundos con apariencia típica de panal de abejas y/o uno o varios agujeros focales.
- (1) Depósitos de tamaño variable, granulares, similares a partículas finas con distribución desigual.

- (2) Reducción en la profundidad de los agujeros, con ligera deposición de minerales dentro de los núcleos del prisma de esmalte. Apariencia de panal de abejas todavía presente.
- (3) Fosas de prismas visibles con deposición parcial de minerales en los núcleos. Apariencia de panal no visible.
- (4) Depósitos de precipitado amorfo dispersados irregularmente sobre la superficies o partículas globulares depositadas uniformemente sobre la superficies de esmaltes.
- (5) Superficie lisa homogénea y lisa con sombras prismáticas ligeramente discernibles.

El diseño experimental del estudio se resume en la Figura 2.



3. ESTUDIO 3

Eficacia de cuatro dentífricos a base de calcio-fosfato-flúor en la regresión de lesiones de manchas blancas en niños: Un ensayo clínico randomizado.

3.1. Diseño de estudio

Fue un ensayo clínico de cinco grupos paralelos, doble ciego, aleatorizado y controlado.

3.2. Participantes

Los participantes fueron 52 niños de seis y siete años seleccionados de un centro escolar en Cusco – Perú. Como criterios de inclusión, los participantes presentaban al menos una WSL, desde una descalcificación leve hasta una superficial (Indicador Gorelick: 1 - 3), en las superficies bucales de dientes anteriores permanentes superiores o inferiores. Niños con alergia a la proteína de la leche y/o con dientes con hipoplasia de esmalte, caries dentinaria, restauración o cavidad; fueron excluidos del estudio (Ebrahimi et al., 2017).

3.3. Tamaño muestral

Se calculó una muestra de 50 participantes en base a la comparación de grupos para el cambio medio del índice de descalcificación (ID) de manchas blancas, mostrando una disminución de 1.0 unidad, una desviación estándar de 0.89, un nivel de significancia de 5% y una potencia de 0.8 de acuerdo con un estudio previo (Hoffman et al., 2015). Considerando una pérdida esperada de seguimiento del 10%, el tamaño de la muestra aumentó a 55. Los participantes que interrumpieron el estudio no fueron reemplazados.

3.4. Reclutamiento

De 256 participantes evaluados, se excluyeron 204 participantes; 201 porque no tenían al menos una lesión de mancha blanca, dos por ausencia en los días de las intervenciones y uno por falta de cooperación. Cincuenta y dos niños culminaron el estudio.

3.5. Aleatorización y cegamiento

Los participantes se asignaron aleatoriamente a uno de los cinco grupos experimentales. El muestreo al azar se realizó mediante una tabla de números aleatorios generada por

computadora. Los tubos de pastas dentales fueron cubiertos con etiquetas cegadoras. Un examinador, que no participó en las mediciones, dispensó el contenido de los dentífricos según la asignación aleatoria. Tanto los participantes como el examinador fueron cegados.

3.6. Grupos experimentales

Los participantes se distribuyeron en cinco grupos de tratamiento de pasta de dientes:

- Grupo control positivo (n=11): solo pasta dental fluorada (1100 ppm F-).
- Grupo HA+F (n=10): Remin Pro. Hidroxiapatita + fluoruro (1450 ppm F-) y Xilitol
- Grupo CPP-ACPF (n=10): Mi Paste Plus. Fosfopéptido de caseína - Fosfato de calcio amorfo (Recaldent) + 0.20% p/p de fluoruro de sodio (900 ppm F-).
- Grupo f-TCP (n=10): Clinpro Tooth Crème. Fosfato tricálcico + 0,21% p / p de fluoruro sódico (950 ppm F-)
- Grupo CSPS+F (n=11): Sensodyne Repair&Protect. Fosfosilicato sódico de calcio (Novamin) + 0.31% w/w de fluoruro sódico (1450 ppm F-).

3.7. Protocolo de tratamiento

Los niños recibieron asesoramiento sobre higiene oral antes del experimento. En el lapso de tres semanas, la intervención se aplicó por 15 días a lo largo de tres semanas (cinco días por semana). Las pastas dentales se aplicaron dos veces por día según la guía profesional, durante la primera hora escolar (7-8 h) y después del desayuno escolar (10-11 h). La aplicación de dentífricos se realizó de la siguiente manera:

- a) Primera semana: cepillado manual + aplicación tópica.
- b) Segunda semana: solo cepillado manual.
- c) Tercera semana: solo cepillado eléctrico.

Para el cepillado dental manual o eléctrico, se utilizó una cantidad de pasta de fluoruro similar al tamaño de una lenteja, con una duración de tres minutos bajo la supervisión de un examinador. Para la administración tópica, se aplicó pasta dental usando cubetas de doble arcada con aproximadamente un gramo por arco y con una duración de cuatro minutos. Los participantes recibieron instrucciones de evitar comer, beber y enjuagarse la boca durante los 30 minutos posteriores a la terapia remineralizadora.

3.8. Evaluación de resultados

Los pacientes fueron evaluados en la enfermería tópica del centro escolar al inicio del estudio (T0) y un día después de finalizar la terapia (T1). Los resultados fueron cualquier diferencia del área de WSL y los scores de descalcificación. Para documentar las mediciones, las superficies dentales anteriores se fotografiaron con una cámara digital (Sony Alpha DSLR 390), tomadas a ocho centímetros de distancia del lente del dispositivo. Todas las imágenes de WSL se guardaron como archivos de datos TIFF.

3.9. Tamaño WSL

Se realizó un análisis cuantificado asistido por computadora para determinar el área de WSL (Bock et al, 2017a). Las imágenes intraorales se transportaron a un software de análisis de imágenes (Image-Pro v10) siendo ajustadas en cuanto a brillo y contraste. Luego, los bordes del diente y WSL se calcularon manualmente y el software los midió en tamaño de píxel. Si un diente tenía más de una WSL, se calculó el área acumulada de todos los WSL. El tamaño de WSL se calculó como el área en relación a la superficie total (%WSL). Los valores medios de %WSL se calcularon para cada participante y se consideraron en unidades para el análisis estadístico. La regresión de WSL (ΔRW) fue la diferencia en % WSL de T0 a T1:

$$\text{- Regresión de WSL } (\Delta RW) = [100 \times (\%WSL (T1) - WSL (T0)/WSL (T0))]$$

Para evaluar la calibración, se realizaron 10 mediciones de WSL%, realizadas dos veces por el mismo examinador en un intervalo de tiempo de una semana entre observaciones.

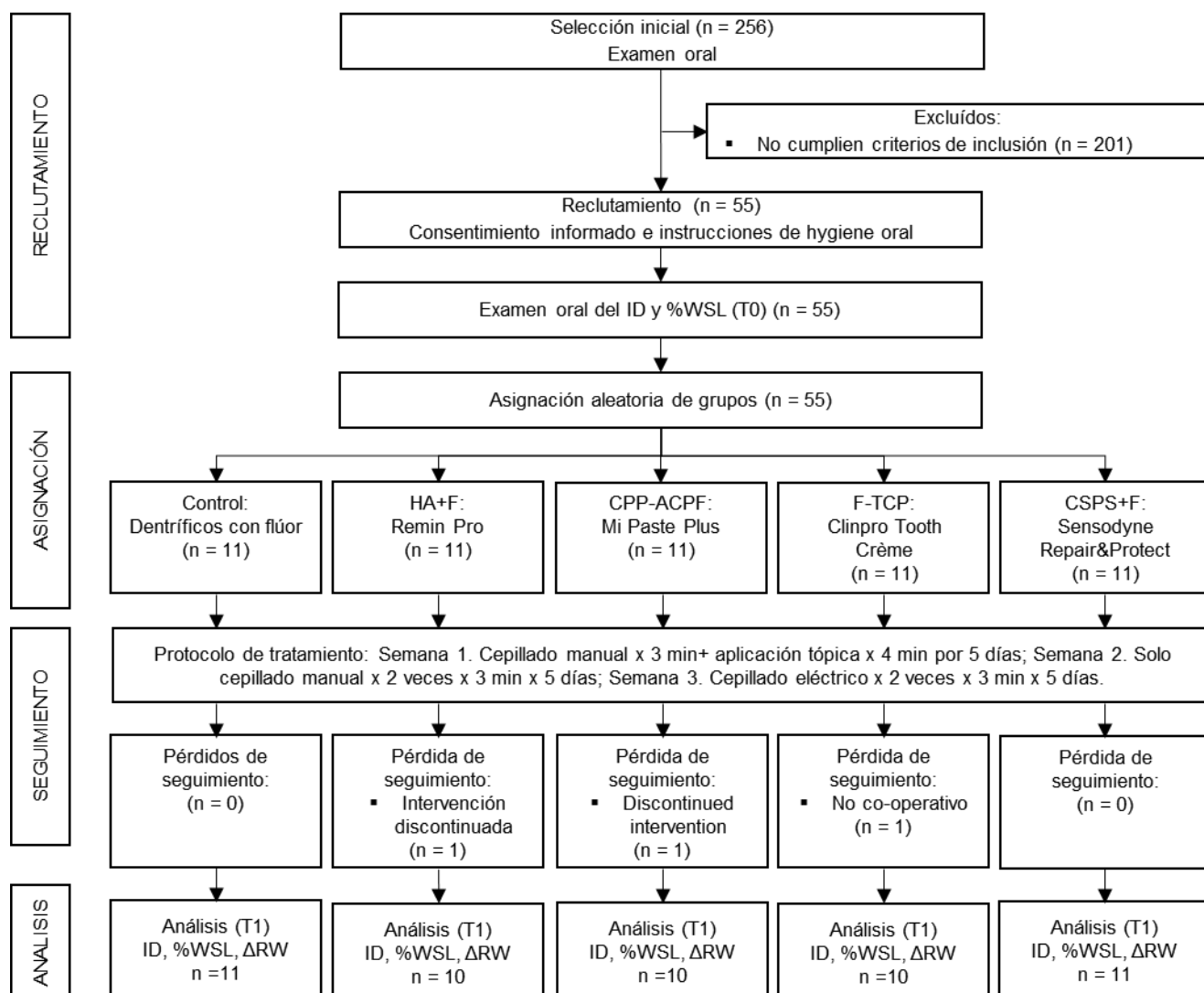
3.10. Índice de descalcificación

Los dientes se limpiaron antes de determinar el examen visual. Se usaron los criterios propuestos por Gorelick et al. (1982):

- (0) ninguna formación de WSL.
- (1) WSL visible sin interrupción superficial (descalcificación leve).
- (2) WSL visible con superficie rugosa pero que no requiere restauración (descalcificación moderada).
- (3) WSL visible con interrupción superficial, sin cavitación (descalcificación severa).

El cambio del ID (Δ DI) se calculó sobre la base de una disminución / no cambio / incremento de los puntajes de descalcificación del tratamiento medido entre el final e inicio del estudio.

El diagrama de flujo del estudio (CONSORT) se resume en la Figura 3.



MÉTODOS ESTADÍSTICOS

El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el software SPSS 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA.). Un $p < .05$ se consideró estadísticamente significativo para toda la evaluación. Se calcularon las medias y desviaciones estándar para las variables cuantitativas (VHN, %SMHR, %SMHC, %W, %WSL). Luego, la mediana y el rango intercuartílico para las variables cualitativas (GM, ID).

Para el estudio 1, el acuerdo intra e inter examinador de los scores SEM según Ferreira se calcularon usando la prueba Kappa de Cohen ($K > .85$). Después la verificación de los supuestos de normalidad (VHN, % SMHR y % SMHC), se aplicó la prueba de ANOVA one-way para la evaluación de datos, seguido de los test Post-hoc de Bonferroni en caso de que hubiera homogeneidad de varianzas y de Tamhane cuando los datos no alcanzaron la homogeneidad. Para la comparación de dos grupos se utilizó la prueba T pareada en caso de homogeneidad de varianzas y prueba de Wilcoxon en caso de no homogeneidad.

En el estudio 2, el acuerdo intra e inter examinador de los scores SEM según Gupta se calcularon usando la prueba Kappa de Cohen ($K = .85$). Se aplicó la prueba de ANOVA one-way y luego los test de Bonferroni y Tamhane. El análisis no paramétrico se analizó con la prueba de Kruskal-Wallis con análisis Post-hoc para múltiples comparaciones y con la prueba U de Mann-Whitney para dos muestras independientes.

En el estudio 3, se calcularon el coeficiente kappa para los scores ID ($K = .83$) y el coeficiente de correlación intraclass para el %WSL ($ICC = 0,93$). El análisis intergrupos del %WSL y ΔRW fue analizado con la prueba de ANOVA one-way y el test Bonferroni. El ID se analizó con la prueba de Kruskal-Wallis. Todos los análisis intragrupos del cambio de %WSL e ID se realizaron con la prueba T de muestras pareadas. Las diferencias de ΔDI entre los grupos experimentales y control se analizaron el test de Chi cuadrado y las razones de Odd.

VII. RESULTADOS

Estudio 1. *Efecto remineralizador de cuatro diferentes pastas dentales a base de calcio, fosfato y flúor sobre lesiones artificiales de caries dental: Un análisis de microdureza y morfología.*

1. Microdureza (VHN)

La tabla 1 mostró que VHN de todos los grupos disminuyeron significativamente luego de la desmineralización y no se mostraron diferentes entre sí ni al inicio ni luego de la desmineralización. Esto indicó que la muestra tuvo las mismas condiciones experimentales con una desmineralización efectiva previa a la terapia remineralizadora. Luego de la desmineralización, se demostró que hubo un aumento significativo del VHN luego de 15 días de remineralización con HA+F y CSPS+F; y luego de 30 días de terapia con CPP-ACPF y f-TCP. La comparación intergrupos mostró que VHN del control (-) fue significativamente inferior a todas las pastas dentales tanto a los 15 días como 30 días de terapia. Sin embargo, el control (+) solo tuvo un VHN inferior al HA+F, f-TCP y CSPS+F a los 30 días de terapia ($p < .05$).

Tabla 1. Resultados de la microdureza en diferentes pasos de la experimentación

Grupos	n	VHN (Media \pm SD)			
		BASE	DEMI	REMI 15	REMI 30
HA+F	21	318.04 \pm 35.79 ^{1,a}	153.14 \pm 63.21 ^{3,a}	204.55 \pm 63.41 ^{2,a}	220.87 \pm 54.87 ^{2,a}
CPP-ACPF	21	319.10 \pm 34.44 ^{1,a}	140.17 \pm 51.35 ^{3,a}	165.90 \pm 65.81 ^{3,a}	176.20 \pm 65.15 ^{2,ab}
f-TCP	21	301.23 \pm 38.08 ^{1,a}	155.35 \pm 65.89 ^{3,a}	184.02 \pm 64.12 ^{3,a}	207.00 \pm 73.73 ^{2,a}
CSPS+F	21	295.18 \pm 27.79 ^{1,a}	132.18 \pm 55.94 ^{3,a}	176.81 \pm 66.75 ^{2,a}	213.15 \pm 78.67 ^{2,a}
Control (+)	10	319.35 \pm 30.48 ^{1,a}	150.03 \pm 71.61 ^{2,a}	153.16 \pm 66.68 ^{2,a}	128.02 \pm 64.37 ^{2,b}
Control (-)	10	300.16 \pm 76.28 ^{1,a}	115.85 \pm 68.66 ^{2,a}	25.53 \pm 20.56 ^{3b}	21.33 \pm 17.71 ^{3c}

Valores en la misma fila con diferentes números superíndices indican diferencias significativas de VHN intragrupos entre fases experimentales (Números en imprenta: prueba de Anova one-way con Test Post-hoc de Bonferroni; números en cursiva: prueba de Anova one-way con Test Post-hoc de Tamhane; $p < .05$).

Valores en la misma columna con diferentes letras superíndices indican diferencias significativas de VHN entre los grupos (Prueba Anova one-way con Test Post-hoc Tamhane; $p < .05$)

2. Porcentaje de superficie de recuperación de microdureza (%SMHR)

La Tabla 2 mostró resultados significativamente superiores del %SMHR con todas las pastas dentales respecto al control negativo y del HA+F, f-TCP y CSPS+F en comparación al control positivo, a los 15 días de remineralización (HA+F > CPP-ACPF). A los 30 días de terapia, todos los dentífricos mostraron mayores %SMHR que en relación a todos los controles (CSPS+F y HA+F > CPP-ACPF). La comparación intragrupos mostró que el %SMHR solo fue superior a los 30 días que a los 15 días de remineralización en el grupo CSPS+F ($p < .05$).

Tabla 2. Comparación del porcentaje de superficie de recuperación de microdureza a los 15 días y 30 días de remineralización

Grupos	N	%SMHR (Media \pm SD)	
		REMI 15	REMI 30
HA+F	21	33.74 \pm 24.30 ^{1,a}	45.13 \pm 38.37 ^{1,A}
CPP-ACPF	21	17.45 \pm 18.61 ^{1,bc}	22.22 \pm 33.06 ^{1,B}
f-TCP	21	22.95 \pm 46.40 ^{1,ab}	31.47 \pm 61.00 ^{1,AB}
CSPS+F	21	24.81 \pm 47.04 ^{1,ab}	58.28 \pm 41.16 ^{2,A}
Control (+)	10	-9.33 \pm 58.89 ^{1,c}	-25.53 \pm 42.74 ^{1,C}
Control (-)	10	-103.95 \pm 139.26 ^{1,d}	-108.24 \pm 144.84 ^{1,D}

Valores en la misma fila con diferentes números superíndices indican diferencias significativas del %SMHR intragrupos (Números en imprenta: prueba de T pareada; números en cursiva: Prueba de Wilcoxon; $p < .05$).

Valores en la misma columna con diferentes letras superíndices indican diferencias significativas del %SMHR intergrupos (Mayúsculas: Prueba de Anova one-way con Test Post-hoc de Bonferroni; Minúsculas: Prueba de Anova one-way con Test Post-hoc de Tamhane; $p < .05$)

3. Porcentaje de superficie de cambio de microdureza (%SMHC)

La Tabla 3 mostró que %SMHC del control negativo fue estadísticamente inferior a todas las pastas dentales tanto a los 15 días como 30 días de terapia remineralizadora (CSPS+F y HA+F > f-TCP y CPP-ACPF). Mientras el control positivo tuvo un %SMHC significativamente inferior al HA+F, f-TCP y CSPS+F a los 15 días de remineralización y a todas las pastas dentales a los 30 días de remineralización.

La comparación intragrupos demostró que a los 30 días de remineralización, el %SMHR aumentó en el grupo CSPS+F y disminuyeron en los grupos controles ($p < .05$).

Tabla 3. Comparación del porcentaje de superficie de cambio de microdureza a los 15 días y 30 días de remineralización

Grupos	n	%SMHC (Media \pm SD)	
		REMI 15	REMI 30
HA+F	21	47.06 \pm 59.35 ^{1,a}	69.84 \pm 100.27 ^{1,A}
CPP-ACPF	21	18.51 \pm 24.20 ^{1,ab}	30.71 \pm 39.94 ^{1,A}
f-TCP	21	39.55 \pm 76.63 ^{1,a}	75.55 \pm 145.57 ^{1,A}
CSPS+F	21	46.59 \pm 68.83 ^{1,a}	72.59 \pm 63.60 ^{2,A}
Control (+)	10	8.20 \pm 29.91 ^{1,b}	-11.50 \pm 22.71 ^{2,B}
Control (-)	10	-76.01 \pm 11.64 ^{1,c}	-80.44 \pm 8.68 ^{2,C}

Valores en la misma fila con diferentes números superíndices indican diferencias significativas del %SMHC intragrupos (Números en imprenta: prueba de T pareada; números en cursiva: Prueba de Wilcoxon; $p < .05$).

Valores en la misma columna con diferentes letras superíndices indican diferencias significativas del %SMHC intergrupos (Mayúsculas: Prueba de Anova one-way con Test Post-hoc de Bonferroni; Minúsculas: Prueba de Anova one-way con Test Post-hoc de Tamhane; $p < .05$)

4. Morfología SEM 1000×

La Figura 4 muestra las imágenes SEM de la morfología de las superficies de esmalte evaluadas en los grupos de estudio a lo largo del ciclo de pH. Se observó que toda la muestra inició el experimento con superficies lisas y/o con ligeras irregularidades (scores SEM 0 - 1). Luego de la desmineralización, todos los grupos presentaron superficies irregulares o cavitadas (Scores SEM 3). Luego de la terapia remineralizadora, solo los grupos de pastas dentales mostraron una disminución de los scores SEM, así las irregularidades pasaron de graves a moderadas a los 15 días de remineralización (Scores SEM 2) y de irregularidades moderadas a leves luego de 30 días de remineralización (Scores SEM 1). No obstante, las superficies continuaron desmineralizadas con irregularidades graves y/o severas en los especímenes del control negativo (Score SEM 3) y con irregularidades moderadas o graves en los especímenes del control positivo (Scores SEM 2-3).

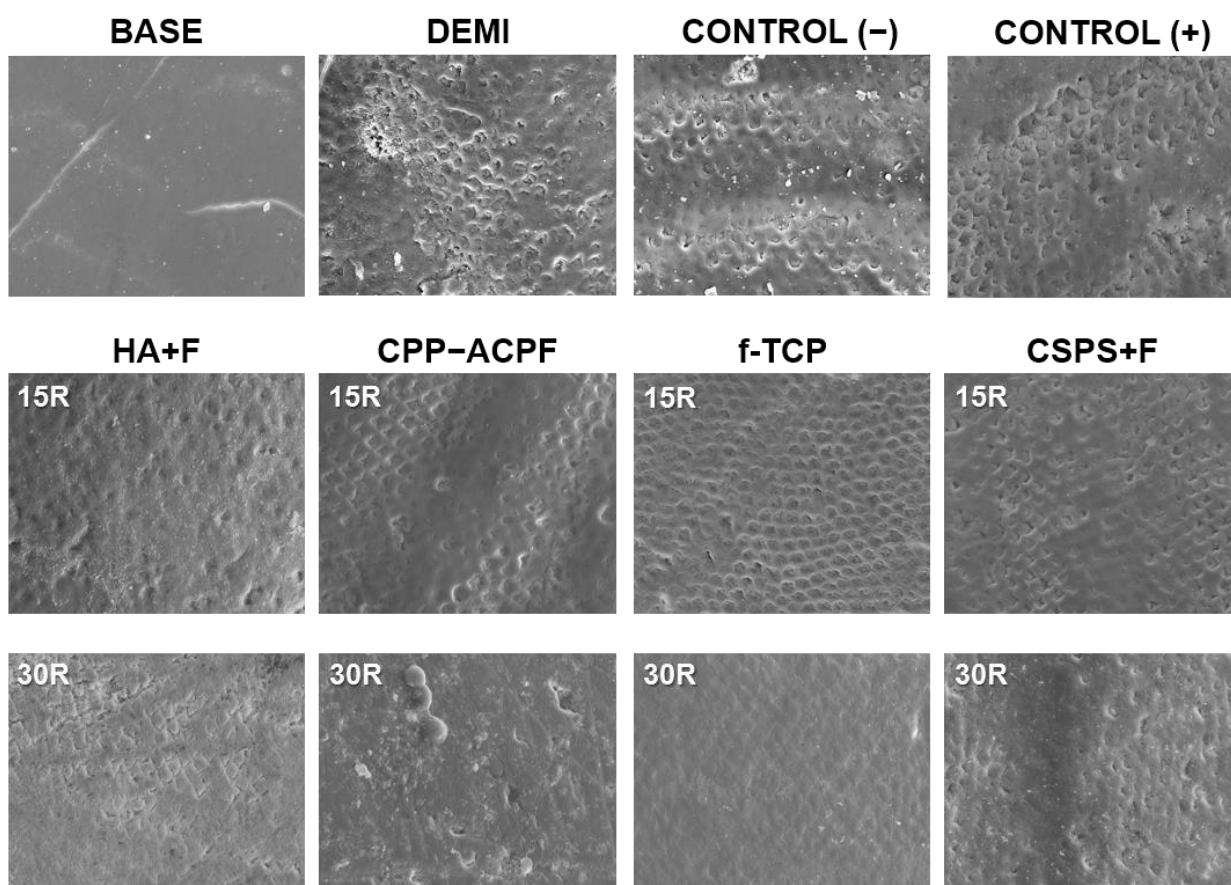


Figura 4. Imágenes SEM 1000× de superficies de esmalte al inicio (BASE), post-desmineralización (DEMI), CONTROL (-) y CONTROL (+) a los 30 días, HA+F, CPP-ACPF, f-TCP y CSPS+F a los 15 días (15R) y a los 30 días de remineralización (30R)

ESTUDIO 2. *Análisis SEM-EDS del efecto remineralizador de cuatro pastas dentales formuladas con calcio, fosfato y flúor sobre el contenido y deposición de minerales en esmaltes sometidos a desmineralización.*

5. Perfil mineral (%W)

La tabla 4 mostró que los grupos de pastas dentales no tuvieron diferencias significativas del %W de minerales estudiados al inicio y post-desmineralización; por tanto, hubieron las mismas condiciones experimentales del contenido de [Ca], [P] y [F], previo al tratamiento remineralizador ($p > .05$). A los 15 días de terapia remineralizadora, se demostró que hubo un aumento significativo del contenido del [Ca] con los grupos CPP-ACPF, CSPS+F y HA+F; del contenido del [P] con los grupos de pastas dentales f-TCP, CPP-ACPF y CSPS+F; y del contenido del [F] con todos los grupos de pastas dentales. A los 30 días de terapia remineralizadora, f-TCP y HA+F aumentaron significativamente el peso del [Ca], [P] y [F], respectivamente ($p < .05$).

Las comparaciones intergrupos mostraron diferencias estadísticamente significativas a los 15 días de remineralización, mostrando un mayor peso del peso del [Ca] con CPP-ACPF y CSPS+F en comparación al HA+F, y un mayor peso del peso del [P] con f-TCP en relación al CSPS+F ($p < .05$).

Tabla 4. Resultados porcentuales del peso mineral en diferentes pasos de la experimentación

Elementos (W%)	Grupos	n	EDS (Media \pm SD)			
			BASE	DEMI	REMI 15	REMI 30
Calcio	HA+F	15	42.12 \pm .75 ^{2,a}	40.44 \pm .54 ^{4,a}	40.56 \pm .65 ^{3,b}	42.94 \pm 1.14 ^{1,a}
	CPP-ACPF	15	42.55 \pm .83 ^{1,a}	40.66 \pm 1.12 ^{2,a}	42.69 \pm 2.11 ^{1,a}	43.71 \pm 2.25 ^{1,a}
	f-TCP	15	42.28 \pm .77 ^{12,a}	41.07 \pm .45 ^{3,a}	41.43 \pm .69 ^{23,ab}	42.48 \pm .78 ^{1,a}
	CSPS+F	15	42.97 \pm 1.34 ^{1,a}	41.09 \pm .72 ^{2,a}	42.58 \pm 1.08 ^{1,a}	42.72 \pm 1.00 ^{1,a}
Fósforo	HA+F	15	18.33 \pm .60 ^{2,A}	17.54 \pm .87 ^{3,A}	17.97 \pm .39 ^{23,AB}	19.05 \pm .24 ^{1,a}
	CPP-ACPF	15	18.12 \pm .38 ^{1,A}	17.21 \pm 1.09 ^{2,A}	17.87 \pm .63 ^{1,AB}	18.51 \pm .45 ^{1,b}
	f-TCP	15	18.06 \pm .33 ^{1,A}	17.08 \pm .76 ^{2,A}	18.33 \pm .44 ^{1,A}	18.45 \pm .63 ^{1,b}
	CSPS+F	15	17.92 \pm .44 ^{1,A}	16.95 \pm .75 ^{2,A}	17.84 \pm .52 ^{1,B}	18.28 \pm .35 ^{1,b}
Flúor	HA+F	15	.80 \pm .45 ^{1,a}	.29 \pm .30 ^{2,a}	1.11 \pm .57 ^{1,A}	1.21 \pm .47 ^{1,A}
	CPP-ACPF	15	.70 \pm .24 ^{1,a}	.20 \pm .31 ^{2,a}	1.02 \pm .37 ^{1,A}	1.12 \pm .67 ^{1,A}
	f-TCP	15	.68 \pm .44 ^{1,a}	.10 \pm .14 ^{2,a}	.85 \pm .42 ^{1,A}	1.00 \pm .50 ^{1,A}
	CSPS+F	15	.81 \pm .42 ^{1,a}	.21 \pm .34 ^{2,a}	1.04 \pm .55 ^{1,A}	1.25 \pm .49 ^{1,A}

Valores en la misma fila con diferentes números superíndices indican diferencias significativas del peso de minerales EDS intragrupos entre fases experimentales (Números en imprenta: prueba de Anova one-way con Test Post-hoc de Bonferroni y/o Tamhane; números en cursiva: prueba de Kruskal-Wallis con Test Post-hoc; $p < .05$).

Valores en la misma columna con diferentes letras superíndices indican diferencias significativas del peso de minerales EDS intergrupos (Letras mayúsculas: prueba de Anova one-way con Test Post-hoc de Bonferroni; letras minúsculas en imprenta: prueba de Anova one-way con Test Post-hoc de Tamhane; letras minúsculas en cursiva: prueba de Kruskal-Wallis con Test Post-hoc; $p < .05$).

6. Ganancia mineral (GM)

En la tabla 5 se mostró que no hubo diferencias significativas entre los grupos de pastas dentales de la ganancia mineral calculada desde el inicio del estudio de todos los elementos minerales [Ca], [P] y [F] ni a los 15 días ni a los 30 días de terapia remineralizadora. La comparación intragrupos mostró que la ganancia mineral aumentó a los 30 días de terapia remineralizadora en los grupos HA+F y f-TCP respecto al calcio, y CPP-ACPF respecto al [P] ($p < .05$).

Tabla 5. Resultados de la ganancia mineral del calcio, fósforo y flúor a los 15 días y 30 días de remineralización

Elementos (W%)	Grupos	n	Ganancia mineral (Mediana \pm IQR)	
			BASE - REMI 15	BASE - REMI 30
Calcio	HA+F	15	10.15 \pm 47.71 ^{1,a}	118.31 \pm 147.68 ^{2,a}
	CPP-ACPF	15	89.16 \pm 112.83 ^{1,a}	114.22 \pm 199.26 ^{1,a}
	f-TCP	15	53.02 \pm 103.37 ^{1,a}	97.41 \pm 218.18 ^{2,a}
	CSPS+F	15	94.07 \pm 96.99 ^{1,a}	75.41 \pm 102.40 ^{1,a}
Fósforo	HA+F	15	52.54 \pm 283.78 ^{1,a}	142.62 \pm 371.88 ^{1,a}
	CPP-ACPF	15	95.00 \pm 132.79 ^{1,a}	143.61 \pm 215.57 ^{2,a}
	f-TCP	15	131.29 \pm 195.50 ^{1,a}	102.59 \pm 91.04 ^{1,a}
	CSPS+F	15	89.32 \pm 107.36 ^{1,a}	125.4 \pm 113.73 ^{1,a}
Flúor	HA+F	15	87.37 \pm 184.77 ^{1,a}	108.33 \pm 337.84 ^{1,a}
	CPP-ACPF	15	179.66 \pm 160.99 ^{1,a}	174.58 \pm 248.44 ^{1,a}
	f-TCP	15	145.00 \pm 231.39 ^{1,a}	153.68 \pm 195.07 ^{1,a}
	CSPS+F	15	115.63 \pm 274.73 ^{1,a}	161.05 \pm 268.98 ^{1,a}

Valores en la misma fila con diferentes números superíndices indican diferencias significativas de la ganancia mineral intragrupos (Prueba de U de Mann-Whitney, $p < .05$)
Valores en la misma columna con diferentes letras superíndices indican diferencias significativas de la ganancia mineral intergrupos (Prueba de Kruskal-Wallis, $p < .05$)

7. Ultramorfología SEM 5000x

Imágenes SEM de las superficies de esmalte son presentadas en la Figura 5. La muestra inició el experimento con una morfología de superficies lisas homogéneas o con ligeras irregularidades (scores SEM 4 - 5). Luego, los scores post-desmineralización disminuyeron (scores SEM 0 y 1) mostrando una pérdida de la integridad de las superficies. Con la terapia remineralizadora de 15 días, los scores más prevalentes fueron los 2 y 3; por tanto, hubo una disminución de la profundidad de las cavidades con restablecimiento parcial de la integridad de la superficie en todos los grupos de pastas dentales. Finalmente, los scores 3 y 4 fueron los más prevalentes luego de 30 días de remineralización, observándose depósitos de precipitado y/o zonas con leves irregularidades ($p < .05$).

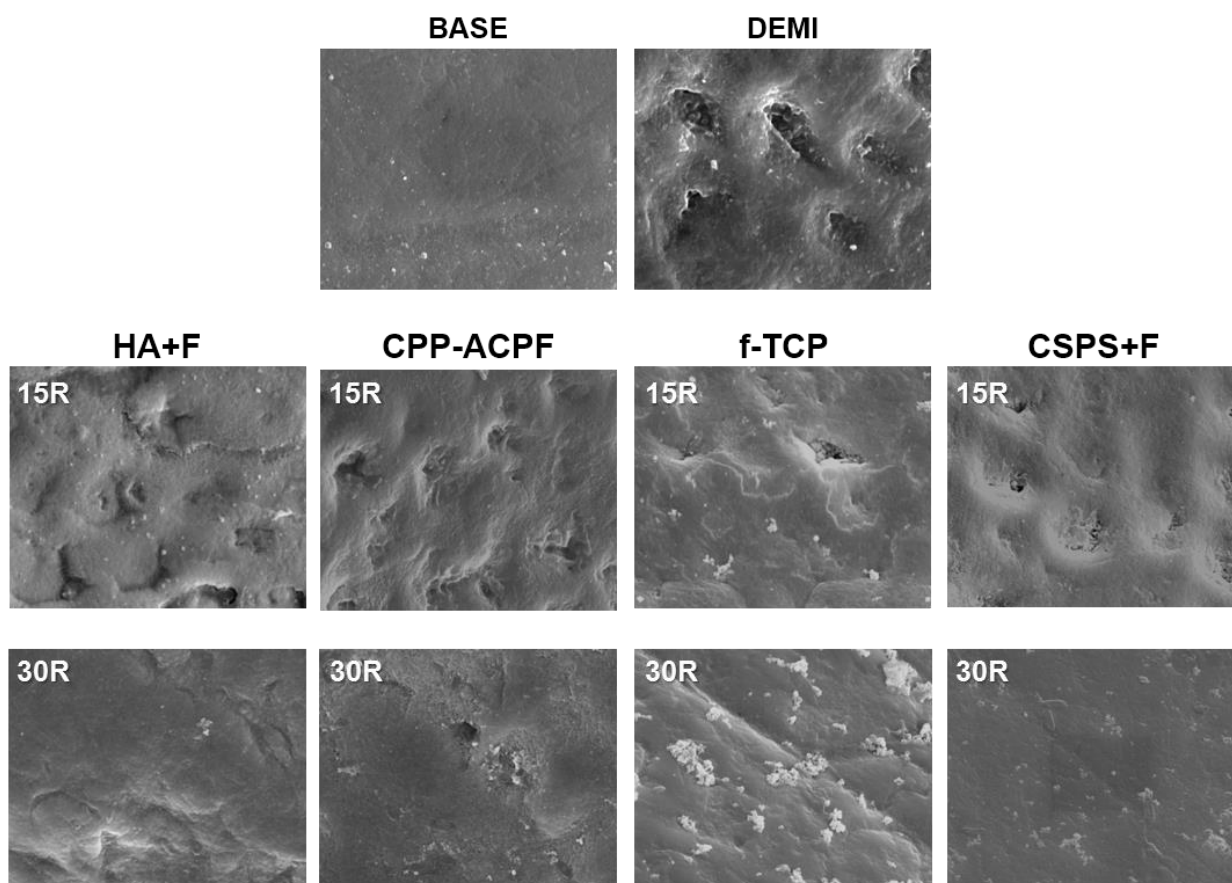


Figura 5. Imágenes SEM 5000× de superficies de esmalte al inicio (BASE), post-desmineralización (DEMI), grupos de pastas dentales HA+F, CPP-ACPF, f-TCP y CSPS+F a los 15 días (15R) y a los 30 días de remineralización (30R)

8. Distribución scores SEM

Los scores SEM de la morfología de las superficies de esmaltes fueron evaluados en la Figura 6. El aumento de la gravedad de los scores SEM desde la fase inicial a la fase desmineralizadora fue estadísticamente significativa (Scores SEM 4 y 5 a scores 0 y 1), al igual que la disminución de la gravedad de los scores desde la fase desmineralizadora a los 15 días de terapia remineralizadora (Scores SEM 0 y 1 a scores 2 y 3). A los 30 días de terapia remineralizadora, solo CPP-ACPF siguió con una recuperación significativa de la remineralización de superficies (Scores SEM 2 y 3 a scores 3 y 4) ($p < .05$). Luego, todas las pastas dentales culminaron con scores SEM similares a la línea base ($p > .05$). La comparación intergrupos mostró que las puntuaciones SEM no fueron significativamente diferentes en los diferentes ciclos de pH ($p > .05$).

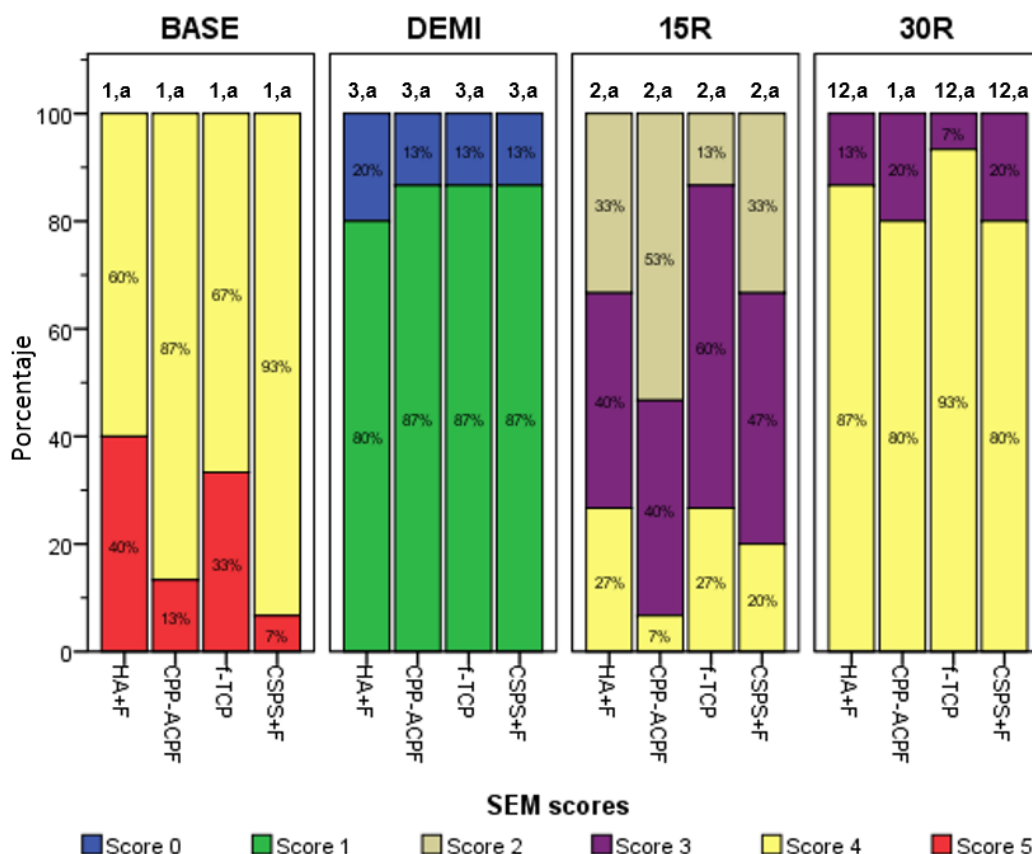


Figura 6. Distribución de scores SEM de la morfología de superficies de esmaltes. Diferentes números y letras indican diferencias estadísticamente significativas intra e intergrupos, respectivamente (Prueba de Kruskal-Wallis con Post-hoc, $p < .05$)

ESTUDIO 3. Eficacia de cuatro dentífricos a base de calcio-fosfato-flúor en la regresión de lesiones de manchas blancas en niños: Un ensayo clínico randomizado.

9. Área WSL (%WSL)

La Tabla 6 mostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas del %WSL al inicio del estudio (T0) entre los grupos de estudio ($p > .05$), por tanto, los participantes comenzaron el experimento en las mismas condiciones de WSL%. Sin embargo, luego del tratamiento (T1), se observó que solo las pastas remineralizantes mostraron una disminución estadísticamente significativa del % WSL, a diferencia del grupo control que resultó no significativa ($p > .05$). La comparación intergrupos luego del tratamiento mostró que el %WSL de las pastas remineralizantes fueron significativamente inferiores que la del grupo control ($p < .01$).

Tabla 6. Comparación del área de WSL en todos los grupos en la línea base y en el tratamiento

Grupos	n	%WSL (T0)		%WSL (T1)		P-valor ^a
		Media	SD	Media	SD	
HA+F	10	51.755	8.690	32.841	8.225	p = .003*
CPP-ACPF	10	50.113	10.890	34.317	9.304	p = .001*
f-TCP	10	47.740	13.696	26.755	12.787	p = .000*
CSPS+F	11	46.235	13.462	29.136	8.973	P = .025*
Control	11	38.531	12.427	34.674	9.411	P = .167
P-valor ^b		p = .120 NS		P = .000**		

(a) P-valor intragrupos. (*) Indican diferencias significativas de WSL% entre la línea base (T0) y el tratamiento (T1) de cada grupo (Prueba de T pareada; $p < .05$).

(b) P-valor intergrupos. (NS) No significativo. (**) Indican diferencias significativas de WSL% entre los grupos de tratamiento respecto al grupo control (Anova one-way con Test Post-hoc Bonferroni; $p < .01$).

10. Regresión WSL (ΔRW)

La Figura 7 muestra la regresión del WSL en todos los grupos de pastas dentales. Luego del tratamiento, todas las pastas remineralizantes mostraron valores significativamente superiores del ΔRW en comparación al grupo control. Asimismo, no hubo diferencias del ΔRW entre los grupos de pastas remineralizantes ($p < .05$).

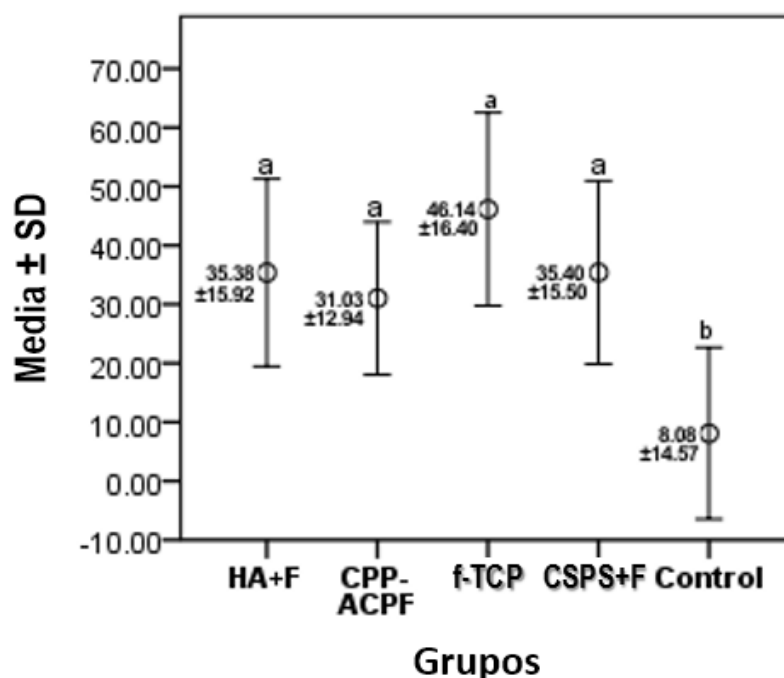


Figura 7. Comparación de la regresión de WSL en todos los grupos después del tratamiento. Diferentes letras indican una diferencia significativa de ΔRW entre los grupos (Prueba de Anova one-way y Test Post-hoc de Bonferroni, $p < .01$)

11. Índice de descalcificación (ID)

La Figura 8 mostró que al inicio del estudio (T0), todos los grupos de estudio mostraron descalcificaciones severas y moderadas (Scores 3 y 2, respectivamente). Mientras que al final del tratamiento (T1), la severidad de las descalcificaciones disminuyeron a los scores moderados a leves (Scores 2 y 1, respectivamente) en todos los grupos de estudio.

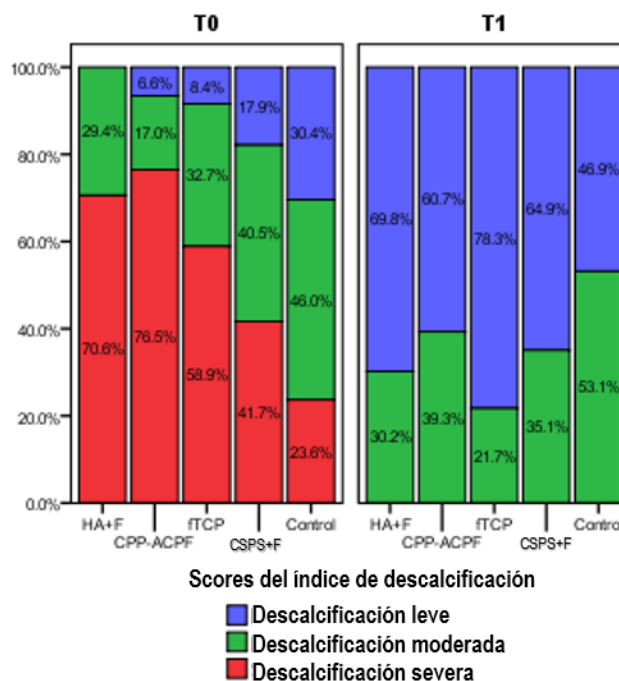


Figura 8. Distribución del índice de descalcificación al inicio y post-tratamiento

La Tabla 7 demostró que la gravedad de la descalcificación disminuyó significativamente luego del tratamiento (T1) en todos los grupos experimentales pero no en el grupo control ($p > .05$). Cuando se realizaron las comparaciones intergrupos, no se encontró diferencias significativas del ID ni al inicio ni post-tratamiento ($p < .05$).

Tabla 7. Comparación del índice de descalcificación al inicio y post-tratamiento

Grupos	n	Scores ID (T0)		Scores ID (T1)		p-valor ^a
		Media \pm SD	Mediana \pm IQR	Media \pm SD	Mediana \pm IQR	
HA+F	10	2.40 \pm .52	2.0 \pm 1.0	1.40 \pm .52	1.0 \pm 1.0	P = .004*
CPP-ACPF	10	2.40 \pm .70	2.5 \pm 1.0	1.50 \pm .53	1.5 \pm 1.0	P = .007*
f-TCP	10	2.20 \pm .63	2.0 \pm 1.0	1.30 \pm .48	1.0 \pm 1.0	P = .003*
CSPA+F	11	2.00 \pm .63	2.0	1.45 \pm .52	1.0 \pm 1.0	P = .034*
Control	11	1.82 \pm .60	2.0 \pm 1.0	1.64 \pm .50	2.0 \pm 1.0	P = .157
P-valor ^b		P = .151 NS		P = .633 NS		

(a) P-valor intragrupos. (*) Indican diferencias significativas del ID entre la línea base (T0) y el tratamiento (T1) de cada grupo (Prueba de T pareada; $p < .05$).

(b) P-valor intergrupos. (NS) No diferencias significativas del ID entre los grupos de estudio (Prueba de Kruskal-Wallis, $p > .05$).

12. Cambios de scores del ID (Δ ID)

En la Tabla 8 se examinó el cambio en los scores del índice de descalcificación desde la línea de base. Los valores de las odds ratio fueron inferiores a 0.56 en todos los grupos de pastas remineralizantes en comparación al grupo control. Por lo tanto, fue más probable que los participantes que disminuyeron los scores del índice de descalcificación pertenecieran a los grupos de pastas dentales remineralizantes (OR 0.12 – 0.56) que al grupo control de solo pasta fluorada (OR 2.1 – 4.95). Con excepción del CSPS+F, estas asociaciones fueron estadísticamente significativas ($p < .05$).

Tabla 8. Cambios de los scores del índice de descalcificación post-tratamiento

Grupos	n	Δ ID (%)			Odds ratio [IC 95%]	p-valor
		Disminución	No cambio	Incremento		
HA+F	10	90	10	0	.122 [.019; .801]	.001
CPP-ACPF	10	80	20	0	.227 [.062; .827]	.005
f-TCP	10	90	10	0	.122 [.019; .801]	.001
CSPS+F	11	50	60	0	.560 [.257; 1.218]	.17
Control	11	18.18	81.82	0	Referencia: 2.1 - 4.95	

IC interval de confianza. P-valor (*) indican diferencias significativas (Test de Chi cuadrado, $p < .05$)

VIII. DISCUSIÓN

La presente investigación analizó la capacidad remineralizadora sobre las lesiones iniciales de caries de pastas dentales con una composición elemental similar (calcio, fosfato y flúor) pero que difieren en su formulación, mecanismo de acción y comportamiento clínico. Para ello, se desarrollaron tres estudios de manera sucesiva.

Los estudios tienen como base científica los mecanismos básicos de remineralización de los dentínicos explicados por la difusión de iones calcio y fosfato que interactúan con el flúor en la saliva; y la consecuente formación de cristales de fluoroapatita que hace que las superficies de esmalte sean más resistentes al ataque ácido en comparación con los otros restos de cristales existentes en las lesiones de caries (Balakrishnan et al., 2013). El rol específico que se señala para el calcio y fosfato es su acción en forma de núcleos cristalinos para el llenado de los microporos de las lesiones; mientras que para el flúor, es la inhibición de la desmineralización y la disminución de la producción de ácido de la placa bacteriana. Estas acciones conducirían a la formación de 20-40 micras de una capa superficial de esmalte intacto caracterizada por un contenido mineral más alto que respecto al cuerpo de la lesión (Palaniswamy et al., 2016).

El mecanismo mencionado antes, apoyó la hipótesis sobre la efectividad de las pastas dentales con calcio, fosfato y flúor (HA+F, CPP-ACPF, f-TCP y CSPS+F) para reparar las propiedades físicas, químicas y estructurales del esmalte lesionado con caries incipiente, que en comparación con otros medios coadyuvantes como saliva y pasta fluorada convencional. Esto fue un hallazgo por los resultados (la hipótesis nula fue rechazada). Las superficies de lesiones de caries tratadas con todas las pastas dentales remineralizantes aumentaron significativamente en microdureza, redujeron la permeabilidad, generaron ganancia mineral, formaron depósitos minerales, revirtieron áreas de lesión y disminuyeron la descalcificación. Es posible extrapolar los resultados al tratamiento de niños de 6 años con una terapia combinada a partir de 20 días con cepillado manual-eléctrico y aplicación tópica.

Potencial remineralizador de calcio, fosfato y fluoruro disponible en pastas dentales

En las últimas cuatro décadas se han formulado nuevas estrategias terapéuticas anticaries para tratar de solventar las limitaciones, especialmente en el campo de la remineralización, que presenta las pastas dentales fluoradas desde el punto de vista epidemiológico y clínico,

y así tratar de evitar o reducir las necesidades de los procedimientos de restauraciones invasivas especialmente en niños pequeños (Meyer et al., 2018). El estudio toma en consideración los avances presentados en el Workshop de la Academia Europea de Odontopediatría (2015) donde se revisó ampliamente las base clínica para detectar y diagnosticar lesiones de caries tempranas / no cavitadas, la evaluación de riesgos y el manejo de tratamientos (Kühnisch et al., 2016). Asimismo, las pautas mencionadas del Workshop de la Organización Europea para la Investigación de Caries - ORCA (2015) donde se realizó un análisis crítico del flúor en pastas de dientes (Martinez-Mier et al., 2018). Algunas conclusiones de las reuniones de trabajo relacionados al tema de la presente investigación fueron:

- La detección y el manejo de las caries no cavitadas es un aspecto esencial de la odontología preventiva.
- Las lesiones de caries no cavitadas pueden ser tratadas de forma no invasiva en la mayoría de los casos.
- El uso de agentes anticaries – biomiméticos – es un campo emergente en la atención oral moderna.
- El fluoruro potencialmente disponible en sistemas abrasivos a base de calcio y fósforo puede afectar su biodisponibilidad como agente anticaries.
- La efectividad de las pastas dentales fluoradas que ejercen como agentes anticaries solo puede determinarse indirectamente a través de ensayos clínicos de caries.
- Las investigaciones sobre la eficacia de las pastas fluoradas deben evaluar la edad de las muestras antes de extraer conclusiones.

En este contexto, en la presente tesis se llevó a cabo dos estudios experimentales con modelos *in vitro* en dientes humanos y un ensayo clínico aleatorizado en un grupo etario específico para evaluar la eficacia de la remineralización sobre lesiones de caries tempranas de cuatro pastas dentales con formulaciones específicas que contenían calcio, fosfato y flúor. El efecto remineralizador *in vitro* se analizó desde una mejora física de dureza y morfología en el primer estudio, y una mejora química en la composición mineral y ultraestructural en el segundo estudio. Finalmente, con las limitaciones que supone la recreación artificial de lesiones de caries dental, saliva y demás factores frente al real ambiente oral, el tercer estudio se enfocó en la mejora clínica en relación a un estándar existente de pasta dental convencional (solo fluoruada).

Con la limitada información en relación a la efectividad de los agentes biomiméticos potenciados con flúor para inducir la remineralización, se tratará que el enfoque de la discusión se enmarque en investigaciones realizadas con agentes remineralizantes cuya forma de administración sea tipo pastas dentales, con las mismas formulaciones que las estudiadas en la presente tesis, y que evalúen dientes humanos (Estudio 1 y 2) y/o pacientes niños (Estudio 3) con alguno de los parámetros de medición mencionados. Por tanto, el análisis respecto al tratamiento preventivo con agentes de únicamente calcio y fosfato, solo flúor u otros agentes remineralizantes considerados en la introducción, no se comentarán en esta discusión.

Efecto remineralizador de pastas dentales a base calcio, fosfato y flúor sobre lesiones artificiales de caries dental: Un análisis de microdureza y morfología (Estudio 1).

La primera parte de la tesis evaluó la terapia de cuatro dentífricos con calcio, fosfato y flúor a los 15 y 30 días de aplicación sobre lesiones iniciales de caries, en comparación a la saliva. Para ello, se llevó a cabo un experimento *in vitro* en superficies de esmalte desmineralizadas, tratadas con terapia combinada tópica y cepillado eléctrico, con control positivo de saliva artificial y control negativo de caries artificial. La evaluación de la eficacia de esta terapia se estudió desde el punto de vista de los análisis de microdureza y de morfología de superficies.

Se utilizó un modelo de ciclo de pH para simular las condiciones de la cavidad oral. En ese contexto, el hallazgo expresado en la medición de la dureza puede ser muy sensible a los cambios en la densidad mineral. Condiciones como la subsaturación, pueden provocar alteraciones en la difusión de calcio, fosfato y fluoruro y, por lo tanto, en la formación de hidroxiapatita. Para evitar que los resultados se vean afectados en el modelo de ciclado, se llevó a cabo lo siguiente:

- Las superficies externas de los especímenes se pulieron previamente, en un intento de estandarizar las respuestas a la disolución de ácido. Se seleccionaron dientes humanos, ya que responden mejor al modelo de pH en comparación a dientes bovinos (Lippert & Juthani, 2015; Taha et al., 2017).
- Se conformaron dos grupos controles, positivo (modelo de saliva artificial) y negativo (modelo de caries artificial), que utilizaron soluciones preparadas con saliva artificial y solución ácida, respectivamente.

- La solución desmineralizante (pH 4.4) y solución remineralizante (pH 7.0), tuvieron una composición similar a la saturación de la saliva humana y fueron renovadas después de cada ciclo (Elkassas & Arafa, 2014).
- La saliva artificial se usó también para simular las condiciones de pH, iones y enzimas de la cavidad oral, pudiendo contribuir con un ligero aumento de VHN después de la desmineralización (Elkassas & Arafa, 2014; Oliveira et al., 2015; Palaniswamy et al., 2016; Krishnam et al., 2017; Jagga et al., 2018).
- Las superficies de esmalte se enjuagaron después del tratamiento con pastas dentales, para imitar las condiciones orales.
- La frecuencia de aplicación de pastas dentales fue de tres veces a día, ya que esto se considera un cepillado frecuente en diversas investigaciones (Tinanoff, 2017).
- Se realizaron aplicaciones tópicas y con cepillo eléctrico en dos fases, para tratar de simular diferentes formas de técnicas de cepillado.

Bajo estas condiciones se ha tratado de lograr que cualquier efecto del tratamiento del experimento se deba a la unión de los ingredientes activos en el esmalte, incluso con las limitaciones de los aspectos biológicos relevantes.

Respecto al método de mediciones, el estudio empleó una prueba de medición de dureza, un método cuantitativo indirecto para evaluar el contenido mineral mediante los perfiles de dureza. Numerosos modelos de laboratorio de tratamientos de caries lo utilizan, teniendo en cuenta que no destruyen los dientes y, como tal, permiten mediciones repetidas, reduciendo así la variación experimental (Elkassas & Arafa, 2017; Soares et al., 2017). La microdureza se puede evaluar con Knoop (De Souza et al., 2014; Oliveira et al., 2015) o Vickers (Balakrishnan et al., 2013; Kamath et al., 2013; Elkassas & Arafa, 2014; Heschmat et al., 2016; Palaniswamy et al., 2016; Krishnam et al., 2017; Rao et al., 2017; Soares et al., 2017; Jagga et al., 2018). Ambas técnicas se muestran efectivas y están mejor correlacionadas a las mediciones de VHN en dientes humanos que en dientes bovinos (Lippert & Juthani, 2015).

Este estudio aplicó la técnica Vickers y para obtener resultados precisos, fue relevante controlar algunos factores de procedimientos que podrían ser susceptibles de alteraciones como las siguientes:

- Los especímenes pertenecieron a un solo tipo de dientes (premolares) y su acondicionamiento previo en superficies planas fue llevada a cabo para estandarizar las mediciones repetidas de VHN (Balakrishnan et al., 2013; Palaniswamy et al., 2016; Rao et al., 2017; Soares et al., 2017; Jagga et al., 2018).
- Después de las medidas iniciales de dureza, solo las muestras con valores estándar de 250 a 365 VHN, permanecieron en el experimento ((De Souza et al., 2014; Elkassas & Arafa, 2014; Salehzadeh et al., 2015).
- Se calculó el promedio de tres valores de indentaciones por un examinador cegado, para evitar cualquier sesgo operacional (Heschmat et al., 2016; Jagga et al., 2018).
- Los cambios de la mineralización con VHN se midieron desde la línea base (%SMHR) y desde de la fase post-desmineralizadora (%SMHC) (De Souza et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Rao et al., 2017; Soares et al., 2017).

Los procedimientos iniciales sirvieron para comprobar que toda la muestra comenzó en condiciones homogéneas de VHN (295.18 a 319.35) y sin diferencias entre grupos de estudio. El siguiente procedimiento de desmineralización sirvió para la formación de lesiones artificiales de caries. En esta fase, el VHN disminuyó significativamente un promedio de 62% de los valores iniciales. Los nuevos rangos de microdureza oscilaron entre 115.85 y 155.35 VHN, manteniéndose sin diferencias entre los grupos de pastas dentales y mostrando que la muestra se mantuvo en las mismas condiciones para iniciar el experimento remineralizador en sí mismo.

Las lesiones reversibles se encontraron a partir de los 15 días de tratamiento en todos los grupos incluidos el control positivo de saliva artificial, sin embargo, solo los aumentos de VHN fueron significativos en los grupos de pastas dentales HA+F y CSPS+F. Aunque los incrementos de VHN en los grupos de dentífricos f-TCP y CPP-ACPF solo fueron significativos luego de 30 días de tratamiento, siempre mantuvieron un aumento positivo de principio a fin. Una explicación de este hallazgo puede deberse al hecho de que los dentífricos HA+F y CSPS+F tienen concentraciones más altas de iones fluoruro (1450 ppm F-) en comparación a los otros grupos de CPP-ACPF (900 ppm F-) y f-TCP (950 ppm F-). Curiosamente, la evidencia del uso de dentífricos con altas concentraciones de fluoruro se han relacionado con la prevención de caries (Sonesson et al., 2014; Pretty, 2016).

Otro hallazgo encontrado fue que el control de saliva artificial no logró aumentar el VHN a los 30 días de terapia, por tanto, no mostró efecto remineralizador. Esta limitación encontrada podría explicarse por la ausencia del ion flúor en su composición. Por otro lado, el control negativo, como era de esperar, mostró una desmineralización continua hasta que apenas se pudo registrar las longitudes de dureza. Fue lógico encontrar mejores resultados en la saliva artificial que en control negativo de caries artificial. Los valores de %SMHR y %SMHC también se encontraron significativamente inferiores en el grupo de saliva artificial con respecto a HA+F, f-TCP y CSPS+F a los 15 días de tratamiento y a todas las pastas (incluida CPP-ACPF) a los 30 días de tratamiento. Teniendo en cuenta la relación entre el contenido mineral y la microdureza superficial, el diseño del modelo con aplicación tópica y cepillado eléctrico fue eficaz para observar la remineralización de lesiones iniciales de caries mostradas por todos los dentífricos a base de calcio-fosfato-flúor usadas en este estudio.

Un límite de evidencia es que no hay estudios de laboratorio en dientes que compare, al mismo tiempo, agentes remineralizantes tipo dentífricos a base de calcio-fosfato, reforzados con flúor, como son HA+F, CPP-ACPF, f-TCP y CSPS+F. No obstante, nuestros resultados parciales de VHN de dentífricos versus saliva artificial se apoyan en algunos estudios encontrados en la literatura para el grupo HA+F por Kamath et al. (2013) y Rao et al. (2017) en 5 días de terapia. Para el grupo CPP-ACPF por los autores Oliveira et al. (2015), Elkassas & Arafa (2014) y Soares et al. (2017) a los 18, 21 y 30 días de terapia, respectivamente. El grupo f-TCP por las investigaciones de Rao et al. (2017), Jagga et al. (2018), Krishnam et al. (2017) y Balakrishnan et al. (2013) en 5, 10, 15 y 30 días de terapia, respectivamente. Finalmente, CSPS+F por el estudio de Jagga et al. (2018) en 10 días de terapia.

Hay un limitado número de estudios respecto a HA+F, mientras CPP-ACPF es la pasta fluorada con sales que más se ha investigado. Pero, aunque los resultados del presente estudio concuerdan con la mayoría de estudios que investigaron las mismas marcas comerciales de los dentífricos de esta investigación, también hubieron estudios que no encontraron diferencias significativas de mayor microdureza entre el grupo control respecto a Remin Pro (Heshmat et al., 2016), con Mi Paste Plus (Heshmat et al., 2016) y Clinpro Tooth Crème (Krishnam et al., 2017). Las diferencias encontradas pueden estar relacionadas con la metodología aplicada por este estudio en los ciclos de pH para reproducir el proceso dinámico de desarrollo de la lesión de caries. También podría deberse al proceso de selección previo en el rango normal de microdureza realizado en este estudio a diferencia de

Heshmat et al. (2016) y Krishnam et al. (2017). Otra razón sería, el número de aplicaciones diarias de pastas (tres) que difirió con Heshmat et al. (2016) y Krishnam et al. (2017).

Sobre los resultados de la morfología con SEM analizados de forma cualitativa según los scores de Ferreira et al. (2011) en este estudio, se encontró que el tratamiento con las pastas dentales mejoró las condiciones de las superficies luego de una situación de desmineralización. Es decir, se pasó de tener superficies con túbulos abiertos severos hasta el punto de observar irregularidades leves caracterizadas por depósitos formados, quizás, por la reacción del calcio y fosfato sobre las superficies de esmaltes.

Los resultados encontrados son corroborados por otros estudios como el de Kamath et al. (2017), realizado en seis muestras por grupo donde mostró que el dentífrico Remin Pro tuvo mejores resultados para restablecer la integridad de las superficies en comparación a un dentífrico fluorado (1000 ppm F⁻). Los estudios de Oliveira et al. (2016) y Elkassas & Arafa (2014) realizados en tres bloques por grupo de estudio, mostraron que Mi Paste Plus tuvo una disminución superior de la porosidad o del patrón de “escama de pescado” en comparación a la saliva artificial. Este último resultado fue similar al de Sathe et al. (2014), quien observó a 1500× cristales diseminados a lo largo de los bordes prismáticos en el grupo CPP-ACPF. Clinpro Tooth Crème fue analizado por Elkassas & Arafa (2017), quien mostró que dicho dentífrico tuvo un efecto en la formación de un revestimiento mineralizado sobre lesiones de caries artificiales en esmalte. La investigación de Poggio et al. (2014) fue realizada en cinco muestras de superficies de dentina. Aunque no evaluó a superficies de esmalte, el estudio mostró que luego de la terapia con cepillado, la pasta Sensodyne Repair&Protect tuvo un efecto protector superior al de una pasta dental con 1450 ppm F⁻.

En resumen, a pesar de las limitaciones de este primer estudio *in vitro*, se observaron diferencias estadísticamente significativas de las cuatro pastas dentales de calcio y fosfato reforzados con flúor en comparación con la saliva artificial, en términos de potencial de remineralización según lo determinado por indicadores mecánicos (VHN, %SMHR y %SMHC) y morfológicos (Scores SEM 1000×) en lesiones de caries artificiales, a los 30 días de tratamiento. No obstante, los dentífricos HA+F y CSPS+F se mostraron más efectivos para remineralizar a los 15 días de tratamiento en comparación al f-TCP y el CPP-ACPF. Esta diferencia podría reflejar que una mayor concentración de fluoruro en sinergia con el calcio y el fosfato crearía un efecto sinérgico para remineralizar.

Análisis SEM-EDS del efecto remineralizador de cuatro pastas dentales formuladas con calcio, fosfato y flúor sobre el contenido y deposición de minerales en esmaltes sometidos a desmineralización (Estudio 2).

La segunda parte de la tesis comparó la terapia de cuatro dentífricos con calcio, fosfato y flúor a los 15 y 30 días de aplicación sobre lesiones iniciales de caries. Para ello, se llevó a cabo un experimento *in vitro* en superficies de esmalte desmineralizadas, tratadas con terapia combinada tópica y cepillado eléctrico. La comparación de la eficacia de esta terapia se estudió desde el punto de vista de los análisis de perfil mineral y ultraestructural.

Como parte de los procedimientos metodológicos de este segundo estudio, los especímenes no se montaron en aditamentos de acrílico como los realizados en el estudio 1, aunque si se desarrollaron las mismas estrategias metodológicas sobre la preparación de las muestras, la formación de lesiones artificiales de caries, las características del ciclo de pH y la aplicación de pastas dentales. En general, las únicas variaciones fueron en las cantidades de las soluciones desmineralizadoras y remineralizadoras administradas conforme al tamaño de los especímenes de esmalte. Como se comprobó en el estudio 1 que la acción de la solución desmineralizadora era adecuada, se optó por no utilizar un control negativo. Asimismo, tampoco se consideró un control positivo debido a que ya se había demostrado en el estudio 1, su inferioridad para remineralizar, en comparación a las pastas dentales de estudio. Se enfocó entonces que el segundo estudio fuese la comparación de pastas bajo nuevos análisis más potentes en mediciones como los son la cuantificación de minerales y la observación a gran escala (5000×) de depósitos minerales.

Una de las técnicas microanalíticas utilizadas para evaluar la remineralización es SEM-EDS. El detector EDS junto al SEM microanaliza las muestras para cuantificar el contenido de múltiples minerales, a la vez que provee imágenes para una evaluación cualitativa. Para ello, la técnica detecta la cantidad de rayos X emitidos y los compara con el espectro de energía característico del objeto de medición. Se determina así, las características cuantitativas de minerales [en porcentaje atómico o en porcentaje de peso (%W)] y las cualitativas de imágenes usando un programa informático (Sathe et al., 2014). SEM es un método sensitivo para evaluar lesiones tempranas de caries, sobretodo, cuando se utiliza un revestimiento con oro sobre las muestras que ayudan a producir imágenes de alta calidad. No obstante, la técnica de oro es invasiva y no permite hacer mediciones repetidas. Algunos estudios que no

utilizaron este procedimiento con oro fueron de Narayana et al. (2014), Kamath et al. (2017), Leila et al. (2017), Soares et al. (2017) y Manoharan et al. (2018).

En este segundo trabajo nos hemos centrado en el porcentaje de peso de los elementos calcio, fósforo y flúor, que son los elementos principales para la evaluación de la remineralización (Narayana et al., 2014; Sathe et al., 2014; Kamath et al., 2017; Mockdeci et al., 2017). Tres mediciones por muestra fueron realizadas para evitar errores operatorios y realizadas por un examinador cegado de las mediciones de variables principales. Esto último para evitar sesgos de observación. Para la evaluación de imágenes SEM, se escogió el acondicionamiento previo con oro conforme a otros estudios (Poggio et al., 2014, 2016; Brar et al., 2017; Jena et al., 2017). Al no poder realizar medidas repetidas, se trató de estandarizar las muestras, primero, aleatorizando los dientes en los grupos de pastas dentales (15 dientes por grupo). Luego del cual, se obtuvieron las cuatro superficies de esmalte obtenidas de cada diente (bucal, mesial, distal y lingual) y se distribuyeron de forma aleatoria en los cuatro puntos de observación (Línea base, post-desmineralización, primera y segunda remineralización). Con este último procedimiento se trató de que las mediciones, aunque independientes, fueran de muestras lo más homogéneas posibles justificando una medición repetida.

Los resultados de la línea base mostraron que todas las muestras iniciaron el experimento en las mismas condiciones, sin diferencias entre grupos respecto al contenido mineral (%W) del calcio (entre 40.77 a 45.55), del fósforo (entre 17.04 y 19.36) y del flúor (entre 0.12 a 1.78). Luego de la fase desmineralizadora, los pesos de los contenidos minerales variaron significativamente en todos los grupos de pastas dentales, observándose disminuciones de hasta un 10% en el caso del calcio (promedio 4%), hasta un 18% respecto al fósforo (promedio 5%) y hasta un 93% respecto al flúor (promedio 76%). Narayana et al. (2014) trabajó con una muestra similar a este estudio en relación a los pesos de calcio y fósforo, aunque fueron más altos respecto al mineral flúor. Hasta aquí las muestras continuaron sin diferencias entre grupos de la evaluación de los tres minerales de estudio, manteniendo las mismas condiciones para iniciar el experimento remineralizador.

Los resultados del contenido mineral hallados en este segundo estudio, coincidieron con el estudio 1 en mostrar el efecto remineralizador de las pastas dentales a base de calcio-fosfato-flúor. Todas las pastas dentales recuperaron (igual que la línea base: $p > 0.05$) el contenido mineral de calcio, fósforo y flúor, a los 15 días de tratamiento, con excepción del calcio de la

pasta dental HA+F, que lo mostró a los 30 días de tratamiento. Los aumentos fueron significativos en la mayoría de los contenidos minerales a los 15 días de tratamiento, con excepción del contenido de calcio hallado con la pasta dental f-TCP y del contenido de fósforo mostrado por la pasta dental HA+F. Sin embargo, a los 30 días de tratamiento, todos los aumentos fueron significativos y no se observaron diferencias entre una u otra pasta dental. Los resultados del contenido mineral sirvieron para obtener la variable ganancia mineral. Cuya fórmula es una adaptación del %SMHR evaluado en el estudio 1, respecto al %W del calcio, fósforo y flúor [$100 \times (\%W_{\text{demi}} - \%W_{\text{remi}} / \%W_{\text{demi}} - \%W_{\text{base}})$]. Los valores de la ganancia mineral resultaron positivos en todos los grupos de pastas dentales, es decir, hubo una regresión de las lesiones de esmalte. Asimismo, esta variable no resultó estadísticamente diferente entre los dentífricos de estudio.

Hay pocas investigaciones sobre las pastas dentales evaluadas en este estudio que hayan analizado los perfiles minerales con EDS, la mayoría fueron del dentífrico CPP-ACPF. Los resultados hallados del perfil mineral en este segundo estudio, están en concordancia con Narayana et al. (2014), Sathe et al. (2014), Kamath et al. (2017), Mockdeci et al. (2017), Manoharan et al. (2018) y Pinto de Souza et al. (2018). Las pastas dentales HA+F “Remin Pro”, CPP-ACPF “Mi Paste Plus” y f-TCP “Clinpro Tooth Crème” mostraron un aumento significativo de minerales del radio calcio / fósforo y flúor desde la línea base hasta la fase post-tratamiento a los 14 días de terapia según Kamath et al. (2017). No obstante, el mismo autor no halló diferencias de estos agentes respecto a una pasta fluorada convencional (1000 ppm F-). Según Pinto de Souza et al. (2018), dientes bovinos tratados con pastas dentales CPP-ACPF y f-TCP, aumentaron el porcentaje atómico del calcio y fósforo luego de 10 días de remineralización, mostrando mejores resultados que en comparación a una pasta fluorada a 1000 ppm F-. Según Narayana et al. (2014), el dentífrico CPP-ACPF tuvo mejores resultados del contenido del calcio, fósforo y flúor a los 10 días de terapia comparadas con una muestra no tratada. El estudio de Sathe et al. (2014) corroboró un aumento significativo de flúor y un aumento no significativo de calcio en pastas dentales CPP-ACPF a los 10 días de terapia. La investigación de Manoharan et al. (2018) corroboró que el dentífrico CPP-ACPF mostró un radio calcio / fósforo superior que en la saliva artificial a los 21 días de terapia. La pasta dental CSPS+F “Sensodyne Repair&Protect” fue analizada por Mockdeci et al. (2017) en un estudio *ex vivo*, hallando que tuvieron mejores resultados de calcio y fósforo que respecto a un control positivo y negativo a las ocho semanas de tratamiento.

Las conclusiones halladas sobre la recuperación de la composición mineral de los dentífricos estudiados, corroboran también los datos hallados en imágenes SEM según scores Gupta et al. (1998). No hubo diferencias de las estructuras de las superficies de esmaltes entre los grupos de pastas dentales de estudio, en cada tiempo de observación. No obstante, el análisis intragrupo sí evidenció diferencias significativas a lo largo de las cuatro observaciones, desde la línea base hasta los 30 días de tratamiento. La línea base partió de muestras con superficies homogéneas lisas, incluso pequeñas irregularidad debido quizá, al pulido previo para estandarizar las muestras. Luego, se evidenció una transformación estructural en forma de “panal de abeja” producto de la desmineralización. Con los primeros 15 días de tratamiento, se redujo la profundidad de los agujeros y se vieron depósitos de minerales cualificadas en cantidades leves y parciales. Finalmente, a los 30 días de tratamiento, ya no se observó la apariencia de “panal de abeja”, y por el contrario, se observaron partículas globulares de depósitos esparcidos uniformemente en todos los grupos de pastas dentales.

Existen más estudios con evaluaciones cualitativas con SEM, usualmente sobre CPP-ACPF, aunque muchos enfocados al efecto desensibilizante en superficies de dentina. El hallazgo encontrado al respecto, tiene similitudes con algunos autores, quienes no encontraron diferencias entre algunos grupos de pastas dentales. Por ejemplo el estudio de Poggio et al. (2016), es de los pocos que aplicaron comparaciones estadísticas de los scores de SEM al igual que en este estudio. Aunque su evaluación no comprendió un modelo de pH como tal, es decir, desmineralización para formar caries como el realizado en este estudio. Pudo corroborar un efecto protector similar de los dentífricos HA+F y CPP-ACPF, luego de la aplicación de un agente blanqueador. Asimismo, Brar et al. (2017) vio formaciones similares de glóbulos de precipitados de CaF_2 con los dentífricos CPP-ACPF y f-TCP a los 6 meses de terapia. Aunque no coincidimos con Narayana et al. (2014) y Manoharan et al. (2018) en evaluar a por lo menos dos de los dentífricos de este estudio, los autores concluyeron que el grupo CPP-ACPF logró formar prismas de esmaltes definidos a los 10 y 21 días de terapia, respectivamente. En contraste a los resultados de este segundo estudio, Kamath et al. (2017) halló que el dentífrico HA+F fue superior en recubrir superficies desmineralizadas respecto a los dentífricos CPP-ACPF y f-TCP a los 14 días de tratamiento. Mientras que para Leila et al. (2017) y Soares et al. (2017), CPP-ACPF fue más efectivo que HA+F a las 30 días de terapia y para Patil et al. (2013), f-TCP evidenció superficies regulares y mejores al de la pasta dental CPP-ACPF a los 7 días de tratamiento.

En resumen, a pesar de las limitaciones de este segundo estudio *in vitro*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cuatro pastas dentales de calcio y fosfato reforzados con flúor, en términos de potencial de remineralización según lo determinado por indicadores de perfil mineral (Contenido y ganancia mineral) y ultraestructural (Scores SEM 5000×) en lesiones de caries inducidas. Mientras los contenidos minerales se recuperaron con respecto a la línea base a los 15 días de tratamiento, las estructuras de esmaltes fueron formando depósitos minerales a lo largo de 30 días de tratamiento. Este resultado podría reflejar que los fluoruros en sinergia con el calcio y el fosfato crearían un efecto protector para remineralizar.

Eficacia de cuatro dentífricos a base de calcio-fosfato-flúor en la regresión de lesiones de manchas blancas en niños: Un ensayo clínico randomizado (Estudio 3).

La tercera parte de la tesis determinó la eficacia de la terapia de cuatro dentífricos con calcio, fosfato y flúor a las tres semanas de aplicación sobre lesiones de manchas blancas, en comparación a una pasta dental fluorada convencional. Para ello, se llevó a cabo un ensayo clínico randomizado en una muestra de 52 niños de seis y siete años de edad, tratados con terapia combinada tópica con cubetas y cepillado eléctrico. La evaluación de la eficacia de esta terapia se estudió desde el punto de vista de los análisis de regresión y descalcificación de la lesión de mancha blanca.

Como parte de los procedimientos metodológicos de este tercer estudio, los participantes cumplieron unos criterios de inclusión y exclusión específicos, con un tamaño muestral calculado y donde, afortunadamente, la pérdida por falta de seguimiento y/o colaboración respecto al tratamiento, no disminuyó el tamaño mínimo definido para una muestra representativa. Sobre la inclusión de edades de seis y siete años fue debido a que tendrían características dentales similares. En estos grupos, las WSL no estaban relacionadas a historia de tratamientos de ortodoncia; sino a un factor decisivo en el desarrollo de caries como es el déficit en la higiene oral. En la literatura se reporta algunos estudios que correlacionan de forma inversa la prevalencia de WSL y la edad, es decir, los más jóvenes estarían más afectados con WSL que respecto a los adultos (Sundararaj et al., 2015). Esto también coincide con que son los grupos de edades donde existe el primer contacto de azúcares fermentables con la dentición permanente y en un periodo escolar donde suele disminuir el control de hábitos de alimentación.

Las características del grupo etario fue que presentaban un proceso de erupción similar. La mayoría de ellos con incisivos centrales mandibulares con erupción total, incisivos centrales maxilares casi totalmente erupcionados e incisivos laterales mandibulares en proceso de erupción. Aunque solo se pudo estudiar una muestra de varones, se debe considerar que esto no generaría ventajas sobre las mediciones de las variables de este estudio. Si bien las mujeres tienden a exhibir mayor interés por la higiene oral, no se ha podido determinar si existen diferencias del riesgo de WSL entre varones y mujeres (Bock et al., 2017a).

El estado socio-económico no fue considerado, pero se debe tener en cuenta que la muestra procedía de una región geográfica caracterizada por ser oriunda en cuanto a su alimentación y, seguramente, similar respecto al acceso a la salud médico-dental. Asimismo, los participantes pertenecieron a un centro educativo público donde tenían clases a un horario específico y un desayuno escolar igual para todos. Todo esto permitió estandarizar los tratamientos del estudio. Finalmente, al haberse realizado un proceso de aleatorización, la muestra debería ser similar.

Uno de los criterios fundamentales fue la inclusión de por lo menos una WSL. Considerado el eje de la revisión, WSL tenía que estar visible y sin cavitación para que ofrezca la posibilidad de una remineralización (Bock et al., 2017a). Las WSL debían presentarse en dientes anteriores considerando que su evaluación resultaría sencilla en términos de mediciones, gracias a una adecuada visión del campo operatorio. Los dientes anteriores serían un grupo dentario susceptible de WSL, producto de la corta distancia entre el tejido de soporte y el diente que dificulta la higiene oral. La literatura señala la mayor prevalencia en el orden siguiente: incisivos laterales, caninos e incisivos centrales (Hochli et al., 2017).

Ahora, si bien se evaluaron dientes que podrían estar a la mitad de un proceso eruptivo, esto no afectó el cálculo de las variables principales como el porcentaje del área de WSL. Ya que esta última, era calculada en base a la relación de las mediciones del área de WSL versus área del diente. Es decir, las áreas observadas en un momento puntual de medición, no dependían del grado de erupción. La selección, medición y cálculo de variables de WSL fueron llevadas a cabo por un examinador entrenado, calibrado y, también cegado de la aplicación del tratamiento. A pesar que se puede considerar como unidades de medición a los dientes, hemos optado porque sean los pacientes. Esto debido a que cada individuo representaría un aumento medio de WSL de todas las visualizaciones distribuidas en los dientes anteriores.

Los métodos tradicionales para evaluar WSL son la inspección visual, el examen táctil con sonda y el examen con fotografías. No obstante, los estándares de medición son el análisis histológico y la microradiografía transversal (Dulanto, 2015), aunque su uso resultaría no viable por ser invasivo y poco adecuado para la edad de los niños. Existen otros métodos de evaluación que demandan el uso de aditamentos como la fluorescencia inducida por luz (QLF), la fluorescencia láser (DIAGNOdent), la transiluminación con fibra óptica (FOTI), el método de conductibilidad eléctrica (ECM) y tomografía de coherencia óptica (OCT). Incluso hoy se puede encontrar imágenes obtenidas con cámaras de fluorescencia intraorales (Vista Proof y VistaCam iX) (Jablonski-Momeni et al., 2013; Ebrahimi et al., 2017; Heravi et al., 2018). Aunque todos son métodos que resultan prometedores para la odontología moderna, todavía no queda claro su fiabilidad para medir con fines clínicos y de investigación. Ello debido a múltiples factores susceptibles de sesgos por parte del examinador y por las condiciones orales para realizar el examen (Lapeontaine et al., 2016).

En este estudio, se ha optado por realizar un examen oral acompañado de un registro fotográfico de WSL, ya que resultaba accesible, viable y no costoso (Paula et al., 2017). El indicador de Gorelick o índice de descalcificación para este estudio (Gorelick et al., 1982), es el método más usado para registrar WSL en un examen oral en pacientes. Evalúa la extensión horizontal de WSL en forma “semicuantitativa” en una escala de cuatro grados que para este estudio fueron desde una descalcificación leve hasta una severa. Su valoración es viable para el examen clínico, pero aún podría resultar en cierta imprecisión debido a la evaluación cualitativa del examinador (Bock et al., 2017b). Es por ello que en el estudio se ha recurrido a la calibración del examinador que resultó adecuada. Con este índice se registró la severidad de la lesión, no obstante, debido a su limitación para calcular la extensión de WSL, se optó por hacer mediciones en fotografías digitales intraorales (Hadler-Olsen et al., 2012).

El registro fotográfico permitió corroborar si los parámetros clínicos de descalcificación de WSL se relacionaban con las mediciones cuantitativas de su extensión y de su regresión. Debido a los componentes subjetivos de las mediciones que se detallará más adelante, fue necesario estandarizar la toma fotográfica en distancia, luz y ángulo de la cámara. El registro se llevó a cabo en un ambiente acondicionado del tópico de enfermería del centro educativo, ayudados de una cámara digital de alta resolución (14 megapíxeles). Optar por fotografías digitales es aumentar la resolución para brindar mayor detalle de la más mínima anomalía, sin embargo, no siempre es preciso (Hoffman et al., 2015). Obtenidas las imágenes, las áreas

de lesión se obtuvieron por un cálculo semiautomático para brindar mayor precisión de las áreas de lesión, primero, corrigiendo a mano alzada los límites de WSL y del diente, y luego, registrando el resultado del tamaño de pixel brindado por el software Image Pro (Vanichvatana & Auychai, 2013; Bock et al., 2017).

En lo posible se ha tratado de estandarizar el diseño del estudio para reducir los sesgos y aumentar la fuerza de la evidencia (Pereira et al., 2017). Se pudo asegurar un doble ciego. Por un lado, los participantes no estuvieron informados de las características de las pastas de dientes ni de la asignación. Todos los tubos de las pastas dentales fueron cubiertos, la apariencia de la crema fue blanca y los diámetros de las aberturas eran similares. Por otro lado, el examinador de las variables principales no conocía de la asignación. El estudio incluyó un grupo control positivo con otro agente de pasta dental que contenía solo flúor (sin calcio ni fosfato). Por el control de variables mencionado, consideramos que no fue necesario recurrir a un control negativo (sin tratamiento con pastas dentales o con pastas sin flúor, ni calcio, ni fosfato) debido a que no justificaba el riesgo en la salud oral en niños.

Respecto a los resultados, se demostró que todas las pastas dentales disminuyeron significativamente las áreas de WSL y los índices de descalcificación, y mostraron resultados significativamente más altos de regresión de WSL. Asimismo, luego del tratamiento, fue más probable que los niños con scores de descalcificación disminuidos se asociaran más con las pastas dentales de estudio que con la pasta control. Con excepción de CPP-ACPF, esta asociación resultó estadísticamente significativa. Ahora, la mayoría de ensayos clínicos similares han evaluado la pasta dental CPP-ACPF. Mientras que CSPS+F fue más enfocado para la sensibilidad dentaria y Clinpro para ser administrado como barniz.

Si bien la literatura ofrece algunos estudios en los que se evaluaron WSL en fotografías digitales, los diseños del estudio variaron considerablemente en términos de materiales y métodos, la mayoría fueron realizados con Diagnodent, lo que no permite una comparación directa de los resultados. Al respecto coincidimos con algunos estudios como el de Ebrahimi et al. (2017), quien mostró que CPP-ACPF “Mi Paste Plus” y HA+F “Remin Pro” disminuyeron por igual las áreas de WSL visualizados con VistaCam iX en comparación al control sin tratamiento, en una terapia de 10 días con tres cepillados domiciliarios en niños de 7 a 12 años. Estas dos pastas dentales también resultaron efectivas en cuanto a las áreas de WSL en comparación a un control sin tratamiento según Heravi et al. (2018), en una terapia de 12

semanas de autoadministración con cubetas en pacientes de 13 a 23 años, también visualizados con VistaCam iX. El estudio de Llena et al. (2015) también apoyó la disminución de WSL vistos con Diagnodent en el grupo de CPP-ACPF frente a un control de barniz de fluoruro de sodio al 5%, a las 4 semanas de tratamiento con un cepillado domiciliario por día en niños de 6 a 14 años. Otros estudios de Yazicioğlu et al. (2017) y Mendes et al. (2018), avalaron la disminución de áreas de WSL vistos con Diagnodent del dentífrico CPP-ACPF a los 30 días de tratamiento. Los resultados fueron superiores a una pasta dental fluorada (1450 ppmF-) según el estudio de Yazicioğlu et al. (2017) realizado en pacientes de 18 a 30 años con dos cepillados diarios. Mientras que para Mendes et al. (2018), el efecto fue superior frente a una pasta dental placebo en niños de una aplicación tópica profesional por semana en niños de 5 a 13 años.

Hubo otros estudios que no encontraron el efecto remineralizador hallado en este estudio. Por ejemplo Rechmann et al. (2016) no halló diferencias ni disminución de CPP-ACPF y una pasta dental fluorada (1100 ppmF-) en los índices de descalcificación en un tratamiento de 12 meses con una aplicación diaria en pacientes de 13 a 26 años. Huang et al. (2013) tampoco encontró efectivo CPP-ACPF frente a la atención domiciliaria en una evaluación cualitativa de fotografías luego de ocho semanas de tratamiento con dos aplicaciones diarias en pacientes de 12 a 20 años. Estos resultados han sido apoyados por tres recientes revisiones sistemáticas donde se señala que se requieren más estudios clínicos para poder concluir la mayor eficacia de CPP-ACP/ CPP-ACPF frente a una pasta dental placebo y/o fluorada (Raphael & Blinkhorn, 2015; Pereira et al., 2017; Indrapriyadharshini et al., 2018).

Sobre las pasta dentales más recientes como los dentífricos CSPS+F y f-TCP, encontramos que el estudio de Hoffman et al. (2015) no encontró diferencias ni mejoras en los índices de descalcificación entre una pasta dental que contenía CSPS+F "ReNew™" y una pasta fluorada (0.15% flúor), a lo largo de seis meses de tratamiento domiciliario en pacientes de 12 a 25 años. Asimismo, hubieron dos estudios realizados de forma *in situ* donde no hallaron diferencias en las áreas de lesiones mostradas por f-TCP y una pasta dental fluorada (0.1%) en 14 días de tratamiento aplicados con cepillado dos veces al día sobre aditamentos usados por pacientes de 12 a 26 años y visualizados con luz polarizada (Vanichvatana et al., 2013). El otro estudio fue el de Shen et al. (2011) frente a una pasta dental fluorada al 0.1% en 14 días de tratamiento aplicados como enjuagues de cuatro veces al día sobre aditamentos usados por pacientes de 21 a 43 años observados en microradiografías.

Si bien se demostró la eficacia de las pastas dentales a base de calcio, fosfato y flúor en la presente investigación, los resultados fueron significativos más no curativos. Sin embargo, consideramos que el enfoque del tratamiento presentado, con un seguimiento prolongado, sería preferible para investigar resultados de la regresión total de WSL. Una reciente Guía Práctica Basada en Evidencia ha recomendado el uso de flúor acidulado al 1.23% o el barniz de fluoruro de sodio al 5% como terapia prioritaria para lesiones de caries en superficies libres (Slayton et al., 2018). No obstante ello requiere la colaboración de los pacientes, especialmente, si se trata de niños. Al haber poca evidencia de las pastas remineralizantes evaluadas en la presente investigación, es poco probable que se tenga algo concluyente para su uso, sin embargo, evaluando el presente estudio creemos que con más estudios tipo ensayos clínicos de las pastas dentales mencionadas se podrá brindar resultados más concluyentes, añadidos al análisis que se deberá tener sobre el costo-beneficio y la aceptación por parte del paciente sobre la administración en consultorio y el domiciliario.

En resumen, a pesar de las limitaciones de este tercer estudio tipo ensayo clínico randomizado, se observaron diferencias estadísticamente significativas de las cuatro pastas dentales de calcio y fosfato reforzados con flúor en comparación a una pasta dental solo fluorada (1100 ppmF-), en términos de potencial de remineralización según lo determinado por indicadores cuantitativos (área y regresión) visto por medio de registros fotográficos y cualitativos (descalcificación) observados en el examen oral de lesiones de manchas blancas, a las tres semanas de tratamiento, con terapia combinada de aplicación tópica en cubetas y de cepillado manual-eléctrico. Este resultado podría reflejar que las pasta dentales a base de calcio, fosfato y flúor tendrían un efecto regresivo de WSL.

Limitaciones y generalidades.

Se deben considerar las **limitaciones** de los estudios.

Del estudio 1. En primer lugar, se trata de un estudio *in vitro* donde es difícil que el modelo de ciclado imite las mismas condiciones orales. No obstante, los tratamientos respondieron a los objetivos planteados y pudieron compararse con los controles de saliva y caries artificial. También hubo dificultad para repetir las mediciones de VHN bajo las mismas condiciones iniciales (posiciones), sin embargo, como estrategia se calculó el promedio de tres indentaciones para suplir esta imprecisión. Otra limitación fue que el procedimiento

SEM realizado sin recubrimiento de oro, no optimizó la calidad de las imágenes. No obstante, se pudo analizar los scores de la morfología como macroestructura, describiendo de forma cualitativa las irregularidades, más no las formaciones globulares.

Del estudio 2. Al igual que el estudio 1, a pesar de tratarse de un estudio *in vitro* con limitaciones para imitar las condiciones de saliva, el modelo respondió a los objetivos planteados. Luego, otra limitación fue de no contar con grupos controles de saliva y caries artificial, pero nos justificamos por el hecho de la demostración previa del funcionamiento del modelo corroborado en el estudio 1, asimismo, por el poder de mediciones más exactas con SEM-EDS en el seguimiento realizado a muestras “cuasipareadas” por las consideraciones ya explicadas de aleatorización de dientes y superficies.

Del Estudio 3. La muestra fue solo de niños varones, no obstante, no existe evidencia de diferencias entre el riesgo de WSL según género. El tamaño de muestra discreto fue calculado en base a mediciones cualitativas de descalcificación y no del tamaño de WSL. No obstante, los datos tuvieron una distribución normal logrando aplicar estadística paramétrica y con una análisis Post-hoc potente. No fue posible evaluar la actividad de la lesión, sin embargo, esto no impidió realizar el seguimiento y valorar los resultados. Aunque el tiempo de seguimiento fue modesto, hubo resultados significativos, por lo que ponemos en enfoque el modelo de aplicación combinado realizado. Asimismo, no fue posible evaluar los cuidados de higiene oral adicionales que los participantes podrían haber realizado durante el día luego del experimento, como el uso de otro tipo de dentífricos y/o número de cepillados extras. Tampoco sus hábitos alimentarios que podrían contener exceso de azúcares fermentables.

Respecto a las **generalidades** de esta investigación:

Con los resultados de los estudios 1 y 2, se puede generalizar a modelos *in vitro* en dientes humanos que empleen modelos de ciclado sobre caries artificiales, cuyo protocolo de tratamiento incluya aplicación tópica sobre el diente y cepillado eléctrico, y para evaluaciones de seguimiento de VHN y SEM-EDS. Con los resultados del estudio 3, se puede generalizar a personas con edades entre seis y siete años, que estén afectados por WSL, desde una gravedad leve hasta severa y cuyo protocolo de tratamiento incluya desde la aplicación profesional de dentífricos con cubetas tópicas, y procedimientos domiciliarios de higiene oral diaria con cepillado.

Consideraciones futuras y razones para justificar el uso de tratamiento con pastas dentales a base de calcio y fosfato, reforzadas con flúor.

Basados en la revisión de la literatura y en los resultados llevados a cabo en esta tesis doctoral se ha demostrado que las pastas dentales formuladas con calcio y fosfato, reforzadas con flúor se muestran efectivos para el tratamiento de lesiones tempranas de caries. Pese a que existen y además están surgiendo nuevas terapias remineralizadoras, los resultados lograron un efecto clínico en pacientes niños, incluso en un modelo de caries dental, respecto al desempeño de la saliva y a un tratamiento con pastas dentales fluoradas convencionales. En ese contexto surgen preguntas que deberán ser explicadas en futuras investigaciones como ¿Serán los resultados del efecto remineralizador de las pastas dentales a base de calcio y fosfato estadísticamente significativos pero no clínicamente relevantes? ¿Será posible justificar como medida preventiva, la adición de calcio y fosfato a todas las pastas fluoradas en pacientes que pudieran o no estar afectados por lesiones activas de caries dental? ¿Cuál será el coste-beneficio del uso de estas medidas preventivas? ¿El efecto sinérgico de calcio y fosfato junto al flúor justificarían concentraciones de flúor inferiores a la mínima legal establecida en ciertos países? ¿La adición de flúor creará diferencias entre de desempeño de las pastas de calcio y fosfato o su desempeño será similar o inferior? Todas estas interrogantes deberán irse contestando en futuras investigaciones.

IX. CONCLUSIONES

Los estudios realizados muestran que las pastas dentales basadas en calcio-fosfato-flúor se presentan efectivas para el tratamiento de lesiones iniciales de caries:

- Las pastas dentales a base de calcio y fosfato potenciadas con fluoruro aumentaron la microdureza y redujeron la permeabilidad del esmalte en comparación con la saliva artificial en un ambiente de caries simulado.
- Las pastas dentales formuladas con calcio-fosfato mostraron un efecto protector comparable al aumentar la concentración de iones [Ca], [P] y [F], y al formar estructuras globulares en las superficies de esmalte bajo un ambiente de caries artificial.
- Las pastas dentales con fosfatos de calcio y flúor fueron más efectivas para reducir el área y mejorar la apariencia de descalcificación de WSL usando la terapia combinada con cepillado y aplicación tópica.

X. CONCLUSÕES

Estudos mostram que os dentifrícios à base de fluoreto de cálcio-fosfato são eficazes no tratamento de lesões iniciais de cárie:

- Os dentifrícios à base de cálcio e fosfato melhorados com flúor aumentaram a microdureza e reduziram a permeabilidade do esmalte em comparação com a saliva artificial em um ambiente simulado de cárie.
- Os cremes dentais formulados com fosfato de cálcio mostraram um efeito protetor comparável, aumentando a concentração de íons [Ca], [P] e [F], e formando estruturas globulares nas superfícies do esmalte sob um ambiente de cárie artificial.
- Pastas dentais com fosfatos de cálcio e flúor foram mais eficazes na redução da área e melhorando a aparência de descalcificação da WSL usando terapia combinada com escovação e aplicação tópica.

XI. REFERENCIAS

- Aas, J. A., Griffen, A. L., Dardis, S. R., Lee, A. M., Olsen, I., Dewhirst, F. E., et al. (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(4), 1407-1417.
- Ali, S., Farooq, I., & Iqbal, K. (2014). A review of the effect of various ions on the properties and the clinical applications of novel bioactive glasses in medicine and dentistry. *The Saudi Dental Journal*, 26(1), 1-5.
- Al-Sanabani, J. S., Madfa, A. A., & Al-Sanabani, F. A. (2013). Application of calcium phosphate materials in dentistry. *International Journal of Biomaterials*, 2013, 876132.
- Balakrishnan, A., Jonathan, R., Benin, P., & Kumar, A. (2013). Evaluation to determine the caries remineralization potential of three dentifrices: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry: JCD*, 16(4), 375-379.
- Benson, P. E., Parkin, N., Dyer, F., Millett, D. T., Furness, S., & Germain, P. (2013). Fluorides for the prevention of early tooth decay (demineralised white lesions) during fixed brace treatment. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (12):CD003809. doi(12), CD003809.
- Bock, N. C., Seibold, L., Heumann, C., Gnandt, E., Roder, M., & Ruf, S. (2017). Changes in white spot lesions following post-orthodontic weekly application of 1.25 per cent fluoride gel over 6 months-a randomized placebo-controlled clinical trial. part I: Photographic data evaluation. *European Journal of Orthodontics*, 39(2), 134-143.
- Boskey, A. L. (1997). Amorphous calcium phosphate: The contention of bone. *Journal of Dental Research*, 76(8), 1433-1436.
- Brar, G. S., Arora, A. S., Khinda, V. I. S., Kallar, S., & Arora, K. (2017). Topographic assessment of human enamel surface treated with different topical sodium fluoride agents: Scanning electron microscope consideration. *Indian Journal of Dental Research: Official Publication of Indian Society for Dental Research*, 28(6), 617-622.
- Carvalho, J. C. (2014). Caries process on occlusal surfaces: Evolving evidence and understanding. *Caries Research*, 48(4), 339-346.
- Chandna, P., Srivastava, N., & Ali, S. (2016). Remineralizing agents: The next frontier. *Current Clinical Pharmacology*, 11(3), 211-220.
- Clarkson, B. H., & Exterkate, R. A. (2015). Noninvasive dentistry: A dream or reality? *Caries Research*, 49 Suppl 1, 11-17.
- Cochrane, N. J., Cai, F., Huq, N. L., Burrow, M. F., & Reynolds, E. C. (2010). New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *Journal of Dental Research*, 89(11), 1187-1197.
- De Medeiros, R. C., Soares, J. D., & De Sousa, F. B. (2012). Natural enamel caries in polarized light microscopy: Differences in histopathological features derived from a qualitative versus a quantitative approach to interpret enamel birefringence. *Journal of Microscopy*, 246(2), 177-189.
- De Souza, C. C., Cury, J. L., Coutinho, T. C., Da Silva, E. M., & Tostes, M. A. (2014). Effect of different application frequencies of CPP-ACP and fluoride dentifrice on demineralized enamel: A laboratory study. *American Journal of Dentistry*, 27(4), 215-219.
- Denis, M., Atlan, A., Vennat, E., Tirlet, G., & Attal, J. P. (2013). White defects on enamel: Diagnosis and anatomopathology: Two essential factors for proper treatment (part 1). *International Orthodontics*, 11(2), 139-165.
- Dulanto Vargas, J. (2016). Validación histológica in-vitro de ICDAS-II y MICRO-CT para la detección de lesiones de caries proximales y oclusales (tesis de máster). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Eanes, E. D. (1998). Historical perspective on the discovery of amorphous calcium phosphate (ACP). *Journal of Dental Research*, 77(1), 6-7.
- Ebrahimi, M., Mehrabkhani, M., Ahrari, F., Parisay, I., & Jahantigh, M. (2017). The effects of three remineralizing agents on regression of white spot lesions in children: A two-week, single-blind, randomized clinical trial. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 9(5), e641-e648.
- Elkassas, D., & Arafa, A. (2014). Remineralizing efficacy of different calcium-phosphate and fluoride based delivery vehicles on artificial caries like enamel lesions. *Journal of Dentistry*, 42(4), 466-474.
- Elkassas, D., & Arafa, A. (2017). The innovative applications of therapeutic nanostructures in dentistry. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13(4), 1543-1562.
- Enax, J., & Epple, M. (2018). Synthetic hydroxyapatite as a biomimetic oral care agent. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 16(1), 7-19.
- Fabbrucini, A., Alves, L. S., Alvarez, L., Alvarez, R., Susin, C., & Maltz, M. (2016). Comparative effectiveness of water and salt community-based fluoridation methods in preventing dental caries among schoolchildren. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 44(6), 577-585.
- Farooq, I., Moheet, I. A., Imran, Z., & Farooq, U. (2013). A review of novel dental caries preventive material: Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) complex doi:<https://doi.org/10.1016/j.ksuids.2013.03.004>
- Ferreira Sda, S., Araujo, J. L., Morhy, O. N., Tapety, C. M., Youssef, M. N., & Sobral, M. A. (2011). The effect of fluoride therapies on the morphology of bleached human dental enamel. *Microscopy Research and Technique*, 74(6), 512-516.
- Gasga, J. R., Carbajal-de-la-Torre, G., Bres, E., Gil-Chavarria, I. M., Rodriguez-Hernandez, A. G., & Garcia-Garcia, R. (2008). STEM-HAADF electron microscopy analysis of the central dark line defect of human tooth enamel crystallites. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(2), 877-882.
- Gorelick, L., Geiger, A. M., & Gwinnett, A. J. (1982). Incidence of white spot formation after bonding and banding. *American Journal of Orthodontics*, 81(2), 93-98.
- Gupta, K., Tewari, A., Sahni, A., Chawla, H. S., & Gauba, K. (1998). Remineralizing efficacy of a mineral enriched mouth rinse and fluoridated dentifrice on artificial carious lesions: An in vivo scanning electron microscopic study. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 16(3), 67-71.
- Hadler-Olsen, S., Sandvik, K., El-Agroudi, M. A., & Ogaard, B. (2012). The incidence of caries and white spot lesions in orthodontically treated adolescents with a comprehensive caries prophylactic regimen--a prospective study. *European Journal of Orthodontics*, 34(5), 633-639.
- Hench, L. L., & Jones, J. R. (2015). Bioactive glasses: Frontiers and challenges. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3, 194.
- Heravi, F., Ahrari, F., & Tanbakuchi, B. (2018). Effectiveness of MI paste plus and remin pro on remineralization and color improvement of postorthodontic white spot lesions. *Dental Research Journal*, 15(2), 95-103.
- Heshmat, H., Ganjkar, M. H., Miri, Y., & Fard, M. J. (2016). The effect of two remineralizing agents and natural saliva on bleached enamel hardness. *Dental Research Journal*, 13(1), 52-57.
- Hochli, D., Hersberger-Zurfluh, M., Papageorgiou, S. N., & Eliades, T. (2017). Interventions for orthodontically induced white spot lesions: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Orthodontics*, 39(2), 122-133.
- Hoffman, D. A., Clark, A. E., Rody, W. J., Jr, McGorray, S. P., & Wheeler, T. T. (2015). A prospective randomized clinical trial into the capacity of a toothpaste containing NovaMin to prevent white spot lesions and gingivitis during orthodontic treatment. *Progress in Orthodontics*, 16, 25-015-0095-8. Epub 2015 Aug 13.

- Huang, G. J., Roloff-Chiang, B., Mills, B. E., Shalchi, S., Spiekerman, C., Korpak, A. M., et al. (2013). Effectiveness of MI paste plus and PreviDent fluoride varnish for treatment of white spot lesions: A randomized controlled trial. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics: Official Publication of the American Association of Orthodontists, its Constituent Societies, and the American Board of Orthodontics*, 143(1), 31-41.
- Huang, S. B., Gao, S. S., & Yu, H. Y. (2009). Effect of nano-hydroxyapatite concentration on remineralization of initial enamel lesion in vitro. *Biomedical Materials (Bristol, England)*, 4(3), 034104-6041/4/3/034104. Epub 2009 Jun 5.
- Iheozor-Ejiofor, Z., Worthington, H. V., Walsh, T., O'Malley, L., Clarkson, J. E., Macey, R., et al. (2015). Water fluoridation for the prevention of dental caries. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (6):CD010856. doi(6), CD010856.
- Ilie, O., van Turnhout, A. G., van Loosdrecht, M. C., & Picioareanu, C. (2014). Numerical modelling of tooth enamel subsurface lesion formation induced by dental plaque. *Caries Research*, 48(1), 73-89.
- Indrapriyadarshini, K., Madan Kumar, P. D., Sharma, K., & Iyer, K. (2018). Remineralizing potential of CPP-ACP in white spot lesions - A systematic review. *Indian Journal of Dental Research: Official Publication of Indian Society for Dental Research*, 29(4), 487-496.
- Jagga, U., Paul, U., Padmanabhan, V., Kashyap, A., Guram, G., & Keswani, K. (2018). Comparative evaluation of remineralizing effect of novamin and tricalcium phosphate on artificial caries: An in vitro study. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 19(1), 109-112.
- Jena, A., Kala, S., & Shashirekha, G. (2017). Comparing the effectiveness of four desensitizing toothpastes on dentinal tubule occlusion: A scanning electron microscope analysis. *Journal of Conservative Dentistry: JCD*, 20(4), 269-272.
- Takei, M., Sakae, T., & Yoshikawa, M. (2009). Mechanism of cadmium induced crystal defects in developing rat tooth enamel. *Proceedings of the Japan Academy, Series B, Physical and Biological Sciences*, 85(10), 500-507.
- Kamath, P., Nayak, R., Kamath, S. U., & Pai, D. (2017). A comparative evaluation of the remineralization potential of three commercially available remineralizing agents on white spot lesions in primary teeth: An in vitro study. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 35(3), 229-237.
- Kamath, U., Sheth, H., Mullur, D., & Soubhagya, M. (2013). The effect of reminpro(R) on bleached enamel hardness: An in-vitro study. *Indian Journal of Dental Research: Official Publication of Indian Society for Dental Research*, 24(6), 690-693.
- Kamitakahara, M., Ohtsuki, C., & Miyazaki, T. (2008). Review paper: Behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition. *Journal of Biomaterials Applications*, 23(3), 197-212.
- Karlinsey, R. L., Mackey, A. C., Walker, E. R., & Frederick, K. E. (2010). Surfactant-modified beta-TCP: Structure, properties, and in vitro remineralization of subsurface enamel lesions. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 21(7), 2009-2020.
- Karlinsey, R. L., & Pfarrer, A. M. (2012). Fluoride plus functionalized beta-TCP: A promising combination for robust remineralization. *Advances in Dental Research*, 24(2), 48-52.
- Karygianni, L., Al-Ahmad, A., Argyropoulou, A., Hellwig, E., Anderson, A. C., & Skaltsounis, A. L. (2016). Natural antimicrobials and oral microorganisms: A systematic review on herbal interventions for the eradication of multispecies oral biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1529.
- Kidd, E., & Fejerskov, O. (2013). Changing concepts in cariology: Forty years on. *Dental Update*, 40(4), 277-8, 280-2, 285-6.
- Kuhnisch, J., Ekstrand, K. R., Pretty, I., Twetman, S., van Loveren, C., Gizani, S., et al. (2016). Best clinical practice guidance for management of early caries lesions in children and young adults: An EAPD policy document. *European Archives of Paediatric Dentistry: Official Journal of the European Academy of Paediatric Dentistry*, 17(1), 3-12.
- Lapenaite, E., Lopatiene, K., & Ragauskaitė, A. (2016). Prevention and treatment of white spot lesions during and after fixed orthodontic treatment: A systematic literature review. *Stomatologija*, 18(1), 3-8.
- Leila, B., Nemati, S., Neda, H., & Khanehmajedi, M. (2017). The effect of MIpaste plus and reminpro on incipient caries using DIAGNOdent and SEM: An invitro study. *Journal of the National Medical Association*, 109(3), 192-197.
- Lelli, M., Putignano, A., Marchetti, M., Foltran, I., Mangani, F., Proccacini, M., et al. (2014). Remineralization and repair of enamel surface by biomimetic zn-carbonate hydroxyapatite containing toothpaste: A comparative in vivo study. *Frontiers in Physiology*, 5, 333.
- Lenzi, T. L., Montagner, A. F., Soares, F. Z., & de Oliveira Rocha, R. (2016). Are topical fluorides effective for treating incipient carious lesions?: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 147(2), 84-91.e1.
- Li, J., Huang, Z., Mei, L., Li, G., & Li, H. (2015). Anti-caries effect of arginine-containing formulations in vivo: A systematic review and meta-analysis. *Caries Research*, 49(6), 606-617.
- Li, Y., & Tanner, A. (2015). Effect of antimicrobial interventions on the oral microbiota associated with early childhood caries. *Pediatric Dentistry*, 37(3), 226-244.
- Lippert, F. (2017). Effect of enamel caries lesion baseline severity on fluoride dose-response. *International Journal of Dentistry*, 2017, 4321925.
- Lippert, F., & Juthani, K. (2015). Fluoride dose-response of human and bovine enamel artificial caries lesions under pH-cycling conditions. *Clinical Oral Investigations*, 19(8), 1947-1954.
- Llena, C., Leyda, A. M., & Forner, L. (2015). CPP-ACP and CPP-ACFP versus fluoride varnish in remineralisation of early caries lesions. A prospective study. *European Journal of Paediatric Dentistry: Official Journal of European Academy of Paediatric Dentistry*, 16(3), 181-186.
- Lombardini, M., Ceci, M., Colombo, M., Bianchi, S., & Poggio, C. (2014). Preventive effect of different toothpastes on enamel erosion: AFM and SEM studies. *Scanning*, 36(4), 401-410.
- Lopatiene, K., Borisovaite, M., & Lapenaite, E. (2016). Prevention and treatment of white spot lesions during and after treatment with fixed orthodontic appliances: A systematic literature review. *Journal of Oral & Maxillofacial Research*, 7(2), e1.
- Manoharan, V., Kumar, R. K., Sivanraj, A. K., & Arumugam, S. B. (2018). Comparative evaluation of remineralization potential of casein phosphopeptide- amorphous calcium fluoride phosphate and novamin on artificially demineralized human enamel: An in vitro study. *Contemporary Clinical Dentistry*, 9(Suppl 1), S58-S63.
- Marghalani, A. A., Guinto, E., Phan, M., Dhar, V., & Tinanoff, N. (2017). Effectiveness of xylitol in reducing dental caries in children. *Pediatric Dentistry*, 39(2), 103-110.
- Marinho, V. C., Chong, L. Y., Worthington, H. V., & Walsh, T. (2016). Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 7, CD002284.
- Marinho, V. C., Worthington, H. V., Walsh, T., & Chong, L. Y. (2015). Fluoride gels for preventing dental caries in children and adolescents. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (6):CD002280. doi(6), CD002280.
- Marsh, P. D. (2004). Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Research*, 38(3), 204-211.
- Martinez-Mier, E. A., Tenuta, L. M. A., Carey, C. M., Cury, J. A., van Loveren, C., Ekstrand, K. R., et al. (2018). European organization for caries research workshop: Methodology for determination of potentially available fluoride in toothpastes. *Caries Research*, 53(2), 119-136.
- McLean, J. S., Fansler, S. J., Majors, P. D., McAteer, K., Allen, L. Z., Shirliff, M. E., et al. (2012). Identifying low pH active and lactate-utilizing taxa within oral microbiome communities from healthy children using stable isotope probing techniques. *PLoS One*, 7(3), e32219.

- Mei, M. L., Chu, C. H., Low, K. H., Che, C. M., & Lo, E. C. (2013). Caries arresting effect of silver diamine fluoride on dentine carious lesion with *S. mutans* and *L. acidophilus* dual-species cariogenic biofilm. *Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal*, 18(6), e824-31.
- Mendes, A. C., Restrepo, M., Bussaneli, D., & Zuanon, A. C. (2018). Use of casein amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) on white-spot lesions: Randomised clinical trial. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 16(1), 27-31.
- Meyer, F., Amaechi, B. T., Fabritius, H. O., & Enax, J. (2018). Overview of calcium phosphates used in biomimetic oral care. *The Open Dentistry Journal*, 12, 406-423.
- Mockdeci, H., Polonini, H., Martins, I., Granato, A. P., Raposo, N., & Chaves, M. G. (2017). Evaluation of ex vivo effectiveness of commercial desensitizing dentifrices. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 9(4), e503-e510.
- Moye, Z. D., Zeng, L., & Burne, R. A. (2014). Fueling the caries process: Carbohydrate metabolism and gene regulation by streptococcus mutans. *Journal of Oral Microbiology*, 6, 10.3402/jom.v6.24878. eCollection 2014.
- Najibfard, K., Ramalingam, K., Chedjieu, I., & Amaechi, B. T. (2011). Remineralization of early caries by a nano-hydroxyapatite dentifrice. *The Journal of Clinical Dentistry*, 22(5), 139-143.
- Narayana, S. S., Deepa, V. K., Ahamed, S., Sathish, E. S., Meyappan, R., & Satheesh Kumar, K. S. (2014). Remineralization efficiency of bioactive glass on artificially induced carious lesion an in-vitro study. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 32(1), 19-25.
- Nganga, S., Zhang, D., Moritz, N., Vallittu, P. K., & Hupa, L. (2012). Multi-layer porous fiber-reinforced composites for implants: In vitro calcium phosphate formation in the presence of bioactive glass. *Dental Materials: Official Publication of the Academy of Dental Materials*, 28(11), 1134-1145.
- Oliveira, P., Fonseca, A., Silva, E. M., Coutinho, T., & Tostes, M. A. (2016). Remineralizing potential of CPP-ACP creams with and without fluoride in artificial enamel lesions. *Australian Dental Journal*, 61(1), 45-52.
- Palaniswamy, U. K., Prashar, N., Kaushik, M., Lakkam, S. R., Arya, S., & Pebbati, S. (2016). A comparative evaluation of remineralizing ability of bioactive glass and amorphous calcium phosphate casein phosphopeptide on early enamel lesion. *Dental Research Journal*, 13(4), 297-302.
- Patil, N., Choudhari, S., Kulkarni, S., & Joshi, S. R. (2013). Comparative evaluation of remineralizing potential of three agents on artificially demineralized human enamel: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry: JCD*, 16(2), 116-120.
- Paula, A. B., Fernandes, A. R., Coelho, A. S., Marto, C. M., Ferreira, M. M., Caramelo, F., et al. (2017). Therapies for white spot lesions-A systematic review. *The Journal of Evidence-Based Dental Practice*, 17(1), 23-38.
- Pinto de Souza, S. C. T., Araujo, K. C., Barbosa, J. R., Cancio, V., Rocha, A. A., & Tostes, M. A. (2018). Effect of dentifrice containing fTCP, CPP-ACP and fluoride in the prevention of enamel demineralization. *Acta Odontologica Scandinavica*, 76(3), 188-194.
- Pitts, N. B., Zero, D. T., Marsh, P. D., Ekstrand, K., Weintraub, J. A., Ramos-Gomez, F., et al. (2017). Dental caries. *Nature Reviews.Disease Primers*, 3, 17030.
- Poggio, C., Grasso, N., Ceci, M., Beltrami, R., Colombo, M., & Chiesa, M. (2016). Ultrastructural evaluation of enamel surface morphology after tooth bleaching followed by the application of protective pastes. *Scanning*, 38(3), 221-226.
- Poggio, C., Lombardini, M., Vigorelli, P., Colombo, M., & Chiesa, M. (2014). The role of different toothpastes on preventing dentin erosion: An SEM and AFM study (R). *Scanning*, 36(3), 301-310.
- Pretty, I. A. (2016). High fluoride concentration toothpastes for children and adolescents. *Caries Research*, 50 Suppl 1, 9-14.
- Ran, T., Chattopadhyay, S. K., & Community Preventive Services Task Force. (2016). Economic evaluation of community water fluoridation: A community guide systematic review. *American Journal of Preventive Medicine*, 50(6), 790-796.
- Rao, R., Jain, A., Verma, M., Langade, D., & Patil, A. (2017). Comparative evaluation of remineralizing potential of fluoride using three different remineralizing protocols: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry: JCD*, 20(6), 463-466.
- Raphael, S., & Blinkhorn, A. (2015). Is there a place for tooth mousse in the prevention and treatment of early dental caries? A systematic review. *BMC Oral Health*, 15(1), 113-015-0095-6.
- Rechmann, P., Bekmezian, S., Rechmann, B. M. T., Chaffee, B. W., & Featherstone, J. D. B. (2018). MI varnish and MI paste plus in a caries prevention and remineralization study: A randomized controlled trial. *Clinical Oral Investigations*, 22(6), 2229-2239.
- Rechmann, P., Domejean, S., Rechmann, B. M., Kinsel, R., & Featherstone, J. D. (2016). Approximal and occlusal carious lesions: Restorative treatment decisions by california dentists. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 147(5), 328-338.
- Reynolds, E. C. (1998). Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: A review. *Special Care in Dentistry: Official Publication of the American Association of Hospital Dentists, the Academy of Dentistry for the Handicapped, and the American Society for Geriatric Dentistry*, 18(1), 8-16.
- Reynolds, E. C., Cain, C. J., Webber, F. L., Black, C. L., Riley, P. F., Johnson, I. H., et al. (1995). Anti cariogenicity of calcium phosphate complexes of tryptic casein phosphopeptides in the rat. *Journal of Dental Research*, 74(6), 1272-1279.
- Richards, D. (2015). Caries prevention - little evidence for use of chlorhexidine varnishes and gels. *Evidence-Based Dentistry*, 16(2), 43-44.
- Richards, D. (2017). Little evidence available for arginine and caries prevention. *Evidence-Based Dentistry*, 18(3), 71.
- Salehzadeh Esfahani, K., Mazaheri, R., & Pischevar, L. (2015). Effects of treatment with various remineralizing agents on the microhardness of demineralized enamel surface. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, 9(4), 239-245.
- Sathe, N., Chakradhar Raju, R. V., & Chandrasekhar, V. (2014). Effect of three different remineralizing agents on enamel caries formation-an in vitro study. *Kathmandu University Medical Journal (KUMJ)*, 12(45), 16-20.
- Schupbach, P., Neeser, J. R., Golliard, M., Rouvet, M., & Guggenheim, B. (1996). Incorporation of caseinoglycomacropeptide and caseinophosphopeptide into the salivary pellicle inhibits adherence of mutans streptococci. *Journal of Dental Research*, 75(10), 1779-1788.
- Schweigert, B. S., & Shaw, J. H. (1946). Dental caries in the cotton rat; the effect of the amount of protein, fat and carbohydrate in the diet on the incidence and extent of carious lesions. *The Journal of Nutrition*, 31(4), 439-447.
- Selwitz, R. H., Ismail, A. I., & Pitts, N. B. (2007). Dental caries. *Lancet (London, England)*, 369(9555), 51-59.
- Shellis, R. P., & Wilson, R. M. (2004). Apparent solubility distributions of hydroxyapatite and enamel apatite. *Journal of Colloid and Interface Science*, 278(2), 325-332.
- Shen, P., Manton, D. J., Cochrane, N. J., Walker, G. D., Yuan, Y., Reynolds, C., et al. (2011). Effect of added calcium phosphate on enamel remineralization by fluoride in a randomized controlled in situ trial. *Journal of Dentistry*, 39(7), 518-525.
- Shimazaki, Y., Fu, B., Yonemoto, K., Akifusa, S., Shibata, Y., Takeshita, T., et al. (2017). Stimulated salivary flow rate and oral health status. *Journal of Oral Science*, 59(1), 55-62.
- Slayton, R. L., Urquhart, O., Araujo, M. W. B., Fontana, M., Guzman-Armstrong, S., Nascimento, M. M., et al. (2018). Evidence-based clinical practice guideline on nonrestorative treatments for carious lesions: A report from the american dental association. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 149(10), 837-849.e19.

- Soares, R., De Ataíde, I. N., Fernandes, M., & Lambor, R. (2017). Assessment of enamel remineralisation after treatment with four different remineralising agents: A scanning electron microscopy (SEM) study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 11(4), ZC136-ZC141.
- Sonesson, M., Twetman, S., & Bondemark, L. (2014). Effectiveness of high-fluoride toothpaste on enamel demineralization during orthodontic treatment—a multicenter randomized controlled trial. *European Journal of Orthodontics*, 36(6), 678-682.
- Sundararaj, D., Venkatachalapathy, S., Tandon, A., & Pereira, A. (2015). Critical evaluation of incidence and prevalence of white spot lesions during fixed orthodontic appliance treatment: A meta-analysis. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 5(6), 433-439.
- Taha, A. A., Patel, M. P., Hill, R. G., & Fleming, P. S. (2017). The effect of bioactive glasses on enamel remineralization: A systematic review. *Journal of Dentistry*, 67, 9-17.
- Tai, B. J., Bian, Z., Jiang, H., Greenspan, D. C., Zhong, J., Clark, A. E., et al. (2006). Anti-gingivitis effect of a dentifrice containing bioactive glass (NovaMin) particulate. *Journal of Clinical Periodontology*, 33(2), 86-91.
- Takahashi, R., Ota, E., Hoshi, K., Naito, T., Toyoshima, Y., Yuasa, H., et al. (2017). Fluoride supplementation (with tablets, drops, lozenges or chewing gum) in pregnant women for preventing dental caries in the primary teeth of their children. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 10, CD011850.
- ten Cate, J. M. (2008). Remineralization of deep enamel dentine caries lesions. *Australian Dental Journal*, 53(3), 281-285.
- Tickotsky, N., Petel, R., Araki, R., & Moskovitz, M. (2017). Caries progression rate in primary teeth: A retrospective study. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 41(5), 358-361.
- Tinanoff, N. (2017). Individuals who brush their teeth infrequently may be at greater risk for new carious lesions. *The Journal of Evidence-Based Dental Practice*, 17(1), 51-52.
- Turssi, C. P., Maeda, F. A., Messias, D. C., Neto, F. C., Serra, M. C., & Galafassi, D. (2011). Effect of potential remineralizing agents on acid softened enamel. *American Journal of Dentistry*, 24(3), 165-168.
- Twetman, S., & Dhar, V. (2015). Evidence of effectiveness of current therapies to prevent and treat early childhood caries. *Pediatric Dentistry*, 37(3), 246-253.
- van Loveren, C., & van Palenstein Helderman, W. (2016). EAPD interim seminar and workshop in brussels may 9 2015 : Non-invasive caries treatment. *European Archives of Paediatric Dentistry : Official Journal of the European Academy of Paediatric Dentistry*, 17(1), 33-44.
- Vanichvatana, S., & Auychai, P. (2013). Efficacy of two calcium phosphate pastes on the remineralization of artificial caries: A randomized controlled double-blind in situ study. *International Journal of Oral Science*, 5(4), 224-228.
- Wang, Y., Li, J., Sun, W., Li, H., Cannon, R. D., & Mei, L. (2017). Effect of non-fluoride agents on the prevention of dental caries in primary dentition: A systematic review. *PloS One*, 12(8), e0182221.
- Wright, J. T., Hanson, N., Ristic, H., Whall, C. W., Estrich, C. G., & Zentz, R. R. (2014). Fluoride toothpaste efficacy and safety in children younger than 6 years: A systematic review. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 145(2), 182-189.
- Yazicioglu, O., Yaman, B. C., Guler, A., & Koray, F. (2017). Quantitative evaluation of the enamel caries which were treated with casein phosphopeptide-amorphous calcium fluoride phosphate. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 20(6), 686-692.
- Yu, O. Y., Zhao, I. S., Mei, M. L., Lo, E. C., & Chu, C. H. (2017). Dental biofilm and laboratory microbial culture models for cariology research. *Dentistry Journal*, 5(2), 10.3390/dj5020021.

ANEXO 1

Aprobación Comité de Ética de los estudios 1 y 2



CEIC Hospital Clínico San Carlos

Dictamen Favorable
 Proyecto Investigación Biomédica
 C.P. - C.I. 17/203-E_Tesis
 17 de mayo de 2017

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Dra. Mar García Arenillas
 Presidenta del CEIC Hospital Clínico San Carlos

CERTIFICA

Que el proyecto de investigación titulado "**Efectividad de productos a base de fosfato de calcio con flúor en la remineralización de lesiones de caries en esmalte.**" con código interno nº 17/203-E_Tesis del que es autora D^a Julissa Amparo Dulanto Varga y directoras/tutoras la Dra. Gloria Saavedra Marbán y la Dra. María Rosa Mourelle Martínez de la Facultad del Odontología, Departamento de Estomatología IV, (Profilaxis, Odontopediatría y Ortodoncia) de la Universidad Complutense de Madrid, ha sido estudiado por este Comité, no habiéndose realizado objeción alguna al mismo.

Es por ello que el Comité **informa favorablemente** sobre la realización de dicho proyecto.

Lo que firmo en Madrid, a 17 de mayo de 2017



Fdo: Dra. Mar García Arenillas
 Presidenta del CEIC Hospital Clínico San Carlos

ANEXO 2

Aprobación Comité de Ética del estudio 3



Informe Dictamen Protocolo Favorable

C.P. - C.I. 18/014-E_Tesis

19 de febrero de 2018

CEIC Hospital Clínico San Carlos

Dra. Mar García Arenillas
 Presidenta del CEIC Hospital Clínico San Carlos

CERTIFICA

Que el CEIC Hospital Clínico San Carlos en su reunión del día 07/02/2018, acta 2.1/18 ha evaluado la propuesta de Tesis:

Título: "Efectividad de productos a base de fosfato cálcico y flúor en la remineralización de lesiones de manchas blancas: Un ensayo clínico aleatorizado"

Código Interno: 18/014-E_Tesis

Autora: Julissa Amparo Dulanto Vargas

Directoras: Dra. Gloria Saavedra Marbán y Dra. María Rosa Mourelle Martínez. Facultad de Odontología de la UCM

Que en este estudio:

- o Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- o Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- o La capacidad del investigador y los medios disponibles son adecuados para llevar a cabo el estudio.
- o El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto de los postulados éticos.
- o Se cumplen los preceptos éticos formulados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos y en sus posteriores revisiones, así como aquellos exigidos por la normativa legal aplicable en función de las características del estudio.

Es por ello que el Comité **informa favorablemente** sobre la realización de dicha Tesis.

Lo que firmo en Madrid, a 19 de febrero de 2018

Dra. Mar García Arenillas
 Presidenta del CEIC Hospital Clínico San Carlos

ANEXO 3

Consentimiento informado

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

D/Dña.

Y DNI n°:

En calidad de padre del niño(a):

Declaro

Que los Doctores Julissa Amparo Dulanto Vargas y Kilder Maynor Carranza Samanez

RECONOZCO que se me ha informado de que:

El propósito del tratamiento preventivo es eliminar y/o disminuir en lo posible, los dientes dañados por lesiones de manchas blancas producidas por caries. La caries es producida por varios factores y se hace más activa por una dieta excesiva en azúcares y hábitos de cepillado incorrectos.

Para realizar el diagnóstico es necesario realizar una exploración clínica y obtener fotografías científicas para evaluar la lesión de caries. Para el tratamiento restaurador y se realiza a través del uso de pastas dentales remineralizantes en el cepillado dental eléctrico y de aplicación tópica.

La intervención dental es guiada por los odontólogos en las instalaciones del centro educativo. No existe riesgo de ningún tipo para los participantes, ya que la exploración y tratamiento apenas incluirá material estéril no invasivo.

El propósito del tratamiento preventivo es restaurar los dientes dañados por caries, por medio de pastas dentales remineralizantes.

Me han explicado que el tratamiento de las lesiones actuales no evita tener caries posteriormente, sino que el niño(a) y la familia tienen que eliminar las causas que las ha provocado, siendo mi responsabilidad informar para que niño(a) siga, el Programa de Salud Dental para evitar la recidiva de la enfermedad.

Reconozco:

- Que las explicaciones se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo. Que el tratamiento de los pacientes infantiles se extiende con único proceso que abarca tres semanas.
- Que los doctores me han informado sobre el estado de salud oral del niño(a) y las necesidades terapéuticas actuales, se me dado la oportunidad de plantear preguntas y solucionar mis dudas.
- Asimismo, sé que la información se tratará con total privacidad y confidencialidad. En el caso de los registros fotográficos, serán para fines científicos.
- Por ello, manifiesto que estoy satisfecho con la información recibida y comprendo el alcance y los riesgos que se va a practicar en el estudio.

En tales condiciones, suscribo el consentimiento informado y autorizo a los doctores para asistir al niño(a), realizar los procedimientos clínicos, así como para el uso científico y docente de los registros que se me realicen. Este consentimiento puede ser revocado discrecionalmente por mí, sin necesidad de justificación ni explicación alguna, en cualquier momento.

Y para que así conste firmo el presente original en Cusco el día del mes Diciembre de 2017.

Fdo. El Odontólogo

Firma y DNI del padre y/o Apoderado.

ANEXO 4

Hoja informativa

HOJA INFORMATIVA

EFFECTIVIDAD DE PRODUCTOS A BASE DE FOSFATO CÁLCICO Y FLÚOR EN LA REMINERALIZACIÓN DE LESIONES DE MANCHAS BLANCAS

Justificación

La caries es producida por varios factores y se hace más activa por una dieta excesiva en azúcares y hábitos de cepillado incorrectos. La prevalencia de manchas blancas y/o caries incipiente se encuentra elevada en las diferentes edades a nivel mundial, sobretodo, en la etapa de la niñez. Se quiere evaluar las diferentes técnicas no invasivas como pastas dentales remineralizadoras de lesiones de caries a fin de evaluar la prevención que ejercen en las mismas, y así mismo, las técnicas de cepillado manual y eléctrico.

Riesgos

No existe riesgo de ningún tipo para los participantes, ya que la exploración y tratamiento solo incluirá material estéril no invasivo.

Beneficios

Contar, si se desea, con el informe sobre su estado de salud oral del niño para la prevención de caries de sus efectos.

Compromiso

Los investigadores se atenderán en todo momento a proteger los datos de carácter personal. Los investigadores se comprometen a entregar al participante, que lo solicite, un informe con sus resultados.

XIII. ANEXO 5: Resumen en inglés

Background: White spot lesions (WSL) represent the first sign of dental caries due to an imbalance of the demineralization process (des) - remineralization (re). Fluorinated agents are commonly used for the treatment of WSL, however, there are also therapies that have introduced new nanoparticle technologies. Among the products that use complexes of calcium [Ca], phosphate [P] and fluorine [F] we find Remin Pro®), which is hydroxyapatite-fluoride (HA+F); Mi Paste Plus™, which contains casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate fluoride (CPP-ACPF); Clinpro™ Tooth Crème, fluoridated tricalcium phosphate (f-TCP) and Sensodyne® Repair&Protect, calcium sodium phosphosilicate fluoride (CSPS + F). It is believed that this combination of minerals may be able to stop active lesions of caries by means of the complex action of its ions for the mineral gain. The study hypothesis was that toothpastes based on calcium-phosphate-fluoride are effective for the treatment of initial lesions of caries.

Objective: The objective of this series of studies was to evaluate the effectiveness of four toothpastes based on calcium-phosphate-fluorine in the remineralization of initial caries lesions observed in the microhardness and morphology (Study 1), the mineral-ultrastructural profile (Study 2), and regression and decalcification (Study 3).

Material and methods:

Study 1. *Design:* Experimental *in vitro*. *Ethics:* Approval of the San Carlos Clinic Hospital (CI 17/203-E). *Study sample:* 104 specimens (e) of enamel. *Sample size calculation:* Yes. *Exclusion criteria:* Initial Microhardness >365 and <250. *Randomization:* Simple random *Study groups:* Experimental G1 (HA+F), G2 (CPP-ACPF), G3 (f-TCP), G4 (CSPS+F) [n=21 e/g]. Controls G5 (Control+) and G6 (Control-) [n=10 e/g]. *Instrumentation:* Specimens in acrylic blocks (4 e/ b) exposed in solution des (pH 4.4x5 days). PH cycle (des-re) and incubation (37 °C) for 30 days. *Intervention:* G1-4. Three daily uses of toothpaste (0.1ml) with (i) Topical application (4'x15 days) and (ii) Electric brushing (1'x15 days); in a pH cycle (3h des, 2h re, 3h des). G5. Only pH cycle (6h re, pH 7.0, 18h H₂O deionized). G6. Only pH cycle (2h des; 22h H₂O deionized). *Measurements:* Microhardness (\bar{X} of 3 indentations, 100 g, 5'') using Vickers technique (VHN, Future-Tech, FM-700, Japan) and enamel morphology (n= 4 e/g; Ferreira scores) observed to 1000× using scanning electron microscope (SEM; Jeol model JSM-820),

without gold technique. *Blinding and calibration*: Yes, from the measurement examiner. *Variables*: (a) Microhardness: VHN, recovery base-re (%SMHR), change des-re (%SMHC). (b) *Morphology*: SEM scores. *Observations*: Baseline, post-des, 15 days and 30 days post-remineralization.

Study 2. *Design*: Experimental *in vitro*. *Ethics*: Approval of the San Carlos Clinic Hospital (CI 17/203-E). *Study sample*: 240 enamel specimens. *Sample size calculation*: Yes. *Randomization*: Two-stage (i) Teeth in study groups and (ii) Surfaces in observation times. *Study groups*: HA+F, CPP-ACPF, f-TCP, CSPS+F (n= 15 e/g). *Instrumentation*: Specimens (3x3mm) exposed in des solution (pH 4.4, 5 days). PH cycle (3h des, 2h re, 3h des) and incubation (deionized H₂O, 16h, 37°C) for 30 days. *Intervention*: Three daily uses of toothpaste (0.1ml) with (i) Topical application (4'x15 days) and (ii) Electric brushing (1'x15 days). *Measurements*: Calcium mineral profile [Ca], phosphorus [P] and fluorine [F] (% Weight, \bar{X} of 3 measurements) using energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS, Oxford Link Isis Inca) and enamel ultrastructure (Scores de Gupta) observed at 5000× using scanning electron microscope (SEM; Jeol model JSM-820), with gold technique. *Blinding and calibration*: Yes, from the measurement examiner. *Variables*: (a) Mineral profile: %Weight (%W) and mineral gain (MG) of Ca, P, F. (b) *Ultrastructural profile*: SEM scores. *Observations*: Baseline, post-des, 15 days and 30 days post-remineralization.

Study 3. *Design*: Randomized clinical trial. *Ethics*: Approval of the San Carlos Clinic Hospital (CI 18/014-E) and informed consents. *Study sample*: 52 children. Inclusion criteria: children of 6-7 years with at least one WSL (Gorelick indicator "decalcification": 1 – 3) in permanent anterior teeth. *Sample size calculation*: Yes. *Randomization*: Simple randomization. *Study groups*: HA+F (n=10), CPP-ACPF (n=10), f-TCP (n=10), CSPS+F (n=11), Control with conventional fluorinated pulp 1100 ppm F- (n=11). *Intervention*: Two daily uses of toothpaste administered at 7 am and 11 am, 5 days a week, for 3 weeks. Three phases of application: (i) First week: Manual brushing (3') + topical administration (4') for 5 days; (ii) Second week: Only manual brushing (3') and (iii) Third week: Only electric brushing (3'). *Measurements*: Areas and regression of WSL observed in dental photographs using Software Image-Pro v10. Decalcification with Gorelick index (DI) using visual clinical examination. *Blinding*: Double blind, examiner-participants. *Calibration*: Yes, from the measurement examiner. *Variables* (a) Lesion regression: areas of WSL (%WSL) and regression of WSL (Δ RW). (b) Decalcification: scores DI. *Observations*: Baseline and 3 weeks post-treatment.

Results:

Study 1. All toothpastes significantly increased the VHN values of the samples after 30 days of application. Treatments with HA+F and CSPS+F were also significantly effective at 15 days. A significantly higher value of %SMHR and %SMHC was observed with treatments HA+F, f-TCP and CSPS+F in the first remineralization and CPP-ACPF in the second remineralization compared to the two control groups. The SEM images revealed that all groups were able to repair the morphology of the enamel surfaces.

Study 2. All dentifrices recovered significantly the content of the samples after 15 days of application with the exception of HA+F that recovered the content of calcium at 30 days of treatment. The mineral gain was positive in all groups and did not show differences between groups. SEM images revealed that all groups were able to reduce enamel permeability after demineralization.

Study 3. All the experimental groups showed a significant decrease in WSL, higher values of Δ RW and a decrease in the severity of DI from the beginning to the treatment compared to the control group. The decrease in DI was significantly associated with dentifrices HA+F, CPP-ACPF and f-TCP (OR<.23) unlike the control group (OR>4.9). Although treatment with CSPS+F was more effective than the control group in decreasing DI (OR=0.56 vs. OR=2.1), it was not statistically different.

Conclusions: After the analysis of the three studies, it can be concluded that toothpastes based on calcium, phosphate and fluoride are effective for the treatment of initial lesions of caries.

KEYWORDS: CPP-ACP, tricalcium phosphate, calcium and sodium phosphosilicate, hydroxyapatite, white spot lesions, microhardness, SEM, remineralization.

XIV. ANEXO 6: Resumen en portugués. RESUMO

Antecedentes:

As lesões de mancha branca (WSL) representam o primeiro sinal de cárie dentária devido ao desequilíbrio da desmineralização (des) - remineralização (re). Agentes fluorados são comumente usados como tratamento de WSL, no entanto, outras terapias com tecnologias de nanopartículas foram introduzidas. Entre os produtos que utilizam complexos de cálcio [Ca], fósforo [P] e flúor [F] encontramos o Remin Pro®, hidroxiapatita fluorada (HA+F); Mi Paste Plus™, fosfopéptido de caseína - fosfato de cálcio amorfo fluorado (CPP-ACPF); Clinpro™ Tooth Crème, fosfato tricálcico fluorado (TCP-f) e de reparação Sensodyne® Repair&Protect, cálcio fosfosilicato e fluoreto de sódio (DEP + F). Acredita-se que essa combinação de minerais seja capaz de deter as lesões ativas por meio da ação complexa dos íons. A hipótese do estudo foi que os dentifrícios à base de fluoreto de cálcio-fosfato são eficazes para o tratamento de lesões iniciais de cárie.

Objectivo:

O objectivo desta série de estudos foi avaliar a eficácia de quatro dental à base de cálcio-fosfato-fluoreto na remineralização de lesões de cárie iniciais observados na microdureza e morfologia (Estudo 1) cola perfil mineral-ultraestrutural (Estudo 2), regressão e descalcificação (Estudo 3).

Material e Métodos:

Estudo 1. Design: Experimental *in vitro*. Ética: Aprovação do Hospital San Carlos (CI 17/203-E). Amostra de estudo: 104 espécimes (e) de esmalte. Cálculo do tamanho da amostra: sim. Critérios de exclusão: $250 < \text{Microdureza inicial} < 365$. Randomização: randomização simples. Grupos de estudo: G1 Experimental (HA+F), G2 (CPP-ACPF), G3 (F-PCT), G4 (CSPS+ F) [n = 21, E / G]. Controla G5 (Controle+) e G6 (Controle-) [n = 10 e / g]. Instrumentação: Espécimes em blocos acrílicos (4 e / b) expostos em solução des (pH 4,4x5 dias). Ciclo de PH (des-re) e incubação (37 ° C) durante 30 dias. Intervenção: G1-4. Três usos diários de creme dental (0,1ml) com (i) aplicação tópica (4'x15 dias) e (ii) escovação elétrica (1'x15 dias); em um ciclo de pH (3h des, 2h re, 3h des). G5 Apenas ciclo de pH (6h re, pH 7,0, 18h H2O desionizada). G6 Apenas ciclo de pH (2h des; 22h H2O desionizado). As medições de

microdureza: (\bar{X} três entalhes, 100 g, 5"), utilizando técnicas de Vickers (VHN, Future-Tech, FM-700, Japan) e morfologia de esmalte (n = 4 e / g; Pontuações Ferreira) observaram para 1000× usando microscopia eletrônica de varredura (SEM; Jeol modelo JSM-820), sem técnica de ouro. Cegamento e calibração: Sim, do examinador de medição. Variáveis: (a) Microdureza: VHN, reconversão (% SMHR), variação (% SMHC). (b) Morfologia: escores do SEM. Observações: Início, pós-des, 15 dias e 30 dias pós-remineralização.

Estudo 2. Design: Experimental *in vitro*. Ética: Aprovação do Hospital San Carlos (CI 17/203-E). Amostra do estudo: 240 amostras de esmalte. Cálculo do tamanho da amostra: sim. Randomização: Dois estágios (i) Dentes: grupos de estudo e (ii) Superfícies: tempos de observação. Grupos de estudo: HA+F, CPP-ACPF, f-TCP, CSPS+F (n = 15 e / g). Instrumentação: Espécimes (3x3mm) expostos em solução des (pH 4,4, 5 dias). Ciclo de PH (3 horas, 2 horas, 3 horas) e incubação (H2O desionizada, 16 horas, 37 ° C) durante 30 dias. Intervenção: Três usos diários de creme dental (0,1ml) com (i) aplicação tópica (4'x15 dias) e (ii) escovação elétrica (1'x15 dias). Medidas: Perfil de minerais de cálcio [Ca], fósforo [P] e flúor [F] (% em peso; \bar{X} de 3 medições) utilizando espectroscopia de dispersão de energia (EDS, Oxford Link Isis Inca) e a ultra-estrutura do esmalte (Pontuações Gupta) foi observada a 5000× utilizando microscopia electrónica Varredura (SEM; modelo Jeol JSM-820), com técnica de ouro. Cegamento e calibração: Sim, do examinador de medição. Variáveis: (a) Perfil mineral: %Peso (% W) e ganho mineral (MG). (b) Perfil ultraestrutural: escores do SEM. Observações: Início, pós-des, 15 dias e 30 dias pós-remineralização.

Estudo 3. Projeto: Ensaio clínico controlado. Ética: Aprovação do Hospital San Carlos (CI 18/014-E) e consentimento informado. Amostra de estudo: 52 crianças. Critérios de inclusão: crianças de 6-7 anos com pelo menos uma WSL (indicador de Gorelick "descalcificação": 1 - 3), em dentes anteriores permanentes. Cálculo do tamanho da amostra: sim. Randomização: randomização simples. Grupos de estudo: HA+F (n = 10), CPP-ACPF (n = 10), f-TCP (n = 10), CSPS+F (n = 11), o controlo de fluoreto de pasta de dentes convencional 1100 ppm F- (n = 11). Intervenção: Dois usos diários de creme dental administrados às 7h e 11h, 5 dias / semana, durante 3 semanas. Três fases de aplicação: (i) Primeira semana: Escovação manual (3 ') + tópica em baldes (4') por 5 dias; (ii) Segunda semana: Somente escovação manual (3 ') e (iii) Terceira semana: Somente escovação elétrica (3'). Medições: Áreas e regressão da WSL observadas em fotografias dentárias usando o Software Image-Pro v10. Descalcificação com índice de Gorelick (ID) usando exame clínico visual.

Cegamento: duplamente cego, examinador-participantes. Calibração: Sim, do examinador de medição. Variáveis: (a) Regressão de lesões: áreas de WSL (% WSL) e regressão de WSL (Δ RW). (b) Descalcificação: pontuação ID. Observações: Início e 3 semanas pós-remineralização.

Resultados:

Estudo 1. Todos os dentifrícios aumentaram significativamente os valores de VHN das amostras após 30 dias de aplicação. Tratamentos com HA+F e CSPS+F também foram significativamente eficazes aos 15 dias. Um valor significativamente maior de % SMHR e % SMHC foi observado com HA+F, f-TCP e CSPS+F na primeira remineralização e CPP-ACPF na segunda remineralização em comparação com os grupos de controle. As imagens do SEM revelaram que todos os grupos conseguiram reparar a morfologia das superfícies.

Estudo 2. Todos os dentifrícios recuperaram significativamente o conteúdo das amostras após 15 dias de aplicação, com exceção do HA+F que recuperou o conteúdo de cálcio após 30 dias de tratamento. O ganho mineral foi positivo e não foi diferente entre os grupos. As imagens do SEM revelaram que todos os grupos conseguiram reduzir a permeabilidade do esmalte após a desmineralização, formando um revestimento mineral.

Estudo 3. Os grupos experimentais mostraram uma redução pós-tratamento significativa de WSL, maiores valores de Δ RW e diminuição na gravidade do DI, em comparação com o grupo controle. A diminuição ID foi significativamente associada com HA+F, CPP-ACPF e f-TCP (OR < 2.3), ao contrário do grupo controle (OR > 4.9). Embora o tratamento com CSPS + F tenha sido mais eficaz do que o grupo controle em diminuir o DI (OR = 0,56 vs. OR = 2,1), não foi estatisticamente diferente.

Conclusões: Após a análise dos três estudos, pode-se concluir que os dentifrícios à base de fluoreto de cálcio e fosfato são eficazes no tratamento de lesões iniciais de cárie.

PALAVRAS-CHAVE: CPP-ACP, fosfato tricálcico, fosfosilicato de cálcio e sódio, hidroxiapatita, lesões de mancha branca, microdureza, SEM, remineralização.