



Facultad de Odontología
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**Estudio del color en la Laserfluorescencia a
 $\lambda=450\text{nm}$ y 405nm para el diagnóstico del
Límite Cavitario: un estudio exvivo con
marcadores de ADN**

**TRABAJO DE INVESTIGACION FIN
DE MÁSTER OFICIAL EN
ODONTOLOGÍA RESTAURADORA,
ESTÉTICA Y FUNCIONAL**



Autor: Diego Mauricio Laverde Albarracín
Directores: Camilo M. Ábalos Labruzzo
Fecha: 03-06-2018



Facultad de Odontología
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE ODONTOLOGIA

D. Camilo Manuel Ábalos Labruzzi, Licenciado en Medicina y Cirugía, Doctor en Odontología por la Universidad de Sevilla y Profesor Contratado Doctor adscrito al Departamento de Estomatología,

Como tutor y director del Trabajo Fin de **Máster Oficial de Restauradora, Estética y Funcional**.

CERTIFICO: Que el trabajo titulado “Estudio del color en la Laserfluorescencia a $\lambda=450\text{nm}$ y 405nm para el diagnóstico del Límite Cavitario: un estudio exvivo con marcadores de ADN”, ha sido realizado por **D. Diego Mauricio Laverde Albarracín**, bajo mi dirección y cumple, a mi juicio, todos los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como trabajo de fin de máster.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firmo el presente certificado,
en Sevilla a 3 de junio de 2018.

Fdo. Camilo Manuel Ábalos Labruzzi
(TUTOR)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a D. Camilo Ábalos Labruzzi, tutor y director de este trabajo, por sus conocimientos, paciencia, dedicación y su disponibilidad durante el desarrollo de esta investigación, así como su labor como docente en la asignatura de Materiales Dentales impartida en el Máster.

A Dña. Amparo Jiménez Planas, por el desarrollo de la parte estadística de este trabajo, sin la cual su finalización no hubiese sido posible.

A D. Marco Rodríguez Vázquez por su aportación en la Validación con Epifluorescencia a Dña. María del Carmen Gómez Millán por su aportación a al estudio del color de las muestras.

En último lugar, a mi familia, mis padres Zonnia, Samuel (+), hermanos, Cristian, Emerson, Gabriela y mis sobrinos, Nickole, Leonardo, Paula, Tomas y Luciana, los pilares fundamentales de mi vida, ya que su apoyo, cariño y confianza me han dado las fuerzas para seguir adelante.

“Si camino sígueme, si me detengo empújame y si retrocedo mátame”

Ernesto “El Che” Guevara

ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT.....	1
2. INTRODUCCION.....	3
2.1. CARIES DENTAL.....	3
2.1.1. CONCEPTO	3
2.1.2. MICROBIOLOGÍA	3
2.2. CARIES DENTINARIA.....	4
2.2.1. EL LÍMITE CAVITARIO	4
2.3. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EMPLEADOS EN LA DETECCIÓN DEL LÍMITE CAVITARIO	4
2.3.1. INSPECCIÓN TÁCTIL CON SONDA DE CARIES	4
2.3.2. DETECTOR DE CARIES	5
2.3.3. LÁSERFLUORESCENCIA.....	5
2.4. APARATOS DE LÁSERFLUORESCENCIA.....	6
2.4.1. VISTAPROOF	6
2.4.2. SIROINSPECT.....	6
2.4.3. SOPROLIFE.....	7
2.5. MEDICIÓN DEL COLOR.....	7
2.5.1. ESPACIO DEL COLOR LAB.....	7
2.5.2. MODELO DE COLOR RGB.....	7
2.5.3. CONVERSIONES RGB Y CMYK.....	7
3. OBJETIVOS	9
3.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	9
3.2. OBJETIVOS	10
3.3. HIPÓTESIS NULA.....	10
4. MATERIAL Y MÉTODO	11
5. RESULTADOS	18
6. DISCUSION	25
7. CONCLUSIONES.....	28
8. BIBLIOGRAFIA.....	29

1. RESUMEN

La Laserfluorescencia (LIF) es capaz de discernir entre tejido sano y enfermo y ha sido aplicada a distintos ámbitos dentro de la Odontología. Sin embargo, la laserfluorescencia cualitativa ha sido poco estudiada para determinar el Límite Cavitario.

Objetivo.: El objetivo de este estudio es comprobar si las especificaciones del fabricante, para su uso a este nivel, coinciden con los mejores parámetros de Validez y Seguridad de la Prueba. También, es convertir las variables cualitativas en cuantitativas, para eliminar la posible subjetividad del operador.

Material y método: Se seleccionaron 45 dientes ex-vivo, que presentaban al menos una localización caries dentinaria. Se obtuvieron 83 áreas para el estudio en las que se midió la fluorescencia mediante tres sistemas con diferentes longitudes de onda (405-450nm). Se calculó la seguridad de la prueba con las categorías de color recomendadas por el fabricante y por una escala fruto de la recodificación de las variables, basada en la mejor relación del color con cada estrato de la caries dentinaria. Mediante el software "Pixelmator MAC" se convirtieron las variables RGB del color en valores cuantitativos de la escala CIE L*ab. La validación de las muestras se realizó mediante marcadores de ADN y microscopía de epifluorescencia (Olympus BX61). Los datos obtenidos fueron introducidos en el programa estadístico SPSS 19.0. Se aplicaron pruebas de significación ($\alpha \leq 0,05$)

Resultados: Las categorías de color recomendadas por el fabricante no coinciden con las escalas que muestran la mejor sensibilidad y especificidad. La laserfluorescencia (405nm-450nm) es más específica que sensible. Las variables L*ab son capaces de diferenciar entre dentina recuperable y no recuperable y para la LIF-405 nm discrimina entre las capas que delimitan el límite cavitario.

Conclusiones: La LIF es un método útil para el diagnóstico del límite cavitario, si bien las recomendaciones del fabricante deben ser modificadas. El sistema L*ab puede contribuir a eliminar la interpretación del operador.

1. ABSTRACT

Laserfluorescence (LIF) is capable of discerning between healthy and diseased tissue, and it has been applied to several fields of Odontology. However, qualitative laserfluorescence has been barely studied when it comes to delimiting the cavitary limit.

Objectives: The goal of this study is to test if the manufacturer specifications, for use to this level, coincide with the best validity parameters and test security. Also, converting the qualitative variables into quantitative ones, to eliminate the possible operator subjectivity.

Material and method: 45 ex-vivo teeth presenting at least one dentinary caries location were selected. 83 study areas were obtained in which fluorescence was measured via three systems with different wavelengths (405-450nm). Test security was calculated with the color categories recommended by the manufacturer and by a scale that was a result of the recoding of the variables based on the best relation of color with each stratum of the dentinary caries. With the aid of the "Pixelmator MAC" software, the RGB color variables were converted into quantitative values of the CIE L*ab. Sample validation was performed via DNA markers and epifluorescence microscopy (Olympus BX61). Obtained data were introduced in the statistical analysis software SPSS 19.0. Significance tests were applied ($\alpha \leq 0,05$)

Results: the color categories recommended by the manufacturer do not match with the scales that show best sensitivity and specificity. Laserfluorescence (405nm-450nm) is more specific than sensitive. L*ab variables are able to differentiate between recoverable and non-recoverable dentin and for the LIF-405nm it is able to discriminate between the layers that form the cavitary limit.

Conclusions: LIF is a useful method for the diagnosis of the cavitary limit, even though manufacturer recommendations must be modified. L+ab system can contribute to eliminate operator interpretation.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 CARIES DENTAL

2.1.1 Concepto

La caries dental es una enfermedad infecciosa de etiología multifactorial que se caracteriza por desintegración progresiva de sus tejidos calcificados, debido a la acción de microorganismos sobre los carbohidratos fermentables provenientes de la dieta (1). Se considera un proceso dinámico de desmineralización y remineralización que ocurre en la superficie del diente como producto del metabolismo bacteriano, que con el tiempo puede resultar en una pérdida de minerales (2).

2.1.2 Microbiología

Los microorganismos que constituyen la placa dental establecen una serie de relaciones entre sí que condicionan el ambiente del biofilm, sobreviviendo y proliferando solo aquellos que se adaptan a dicho ambiente, siendo éstos los más virulentos (3) (4).

En **lesiones avanzadas** de caries se ha demostrado la presencia de las siguientes bacterias: (5).

El **S. mutans** no es fundamental ni patognomónico para el inicio ni progresión de la lesión de caries, ya que la lesión se puede desarrollar con o sin su presencia (5).

Los **Actinomyces** son anaerobios facultativos grampositivos, acidógenos, sintetizan polisacáridos extracelulares que poseen fimbrias que les proporciona capacidad de adhesión, agregación y congregación, así como producen enzimas proteolíticas, destacando la neuraminidasa, trascendente en caries avanzadas (6).

Bifidobacterium son anaerobios grampositivos, género de mayor prevalencia presente en lesiones avanzadas de caries (7). Los lactobacilos son anaerobios facultativos, acidógenos, acidofilos, acidúricos. Las especies de **Lactobacillus** aisladas con mayor prevalencia en lesiones de caries dentinaria *L.gasseri* y *L.ultunensis* (8).

Los microorganismos **Prevotella** son anaerobios estrictos gramnegativos no esporulados, Recientemente ha sido demostrada la participación de esta especie en lesiones avanzadas de caries dental (5).

2.2 CARIES DE DENTINA

La lesión del esmalte después de un tiempo se vuelve altamente porosa, esto permite que la caries una vez que se encuentra en el límite amelodentinario, dirija los ácidos hacia el interior de la dentina, provocando una reacción del complejo dentino pulpar (9). Esta respuesta se basa en mecanismos como la esclerosis tubular, dentina esclerótica, entre otros (6).

2.2.1. El límite cavitario

Microscópicamente, la capa superficial externa está infectada por microorganismos. La dureza y el color de la dentina han sido los parámetros utilizados para diferenciar entre la dentina infectada y la no infectada por caries durante el proceso de excavación del tejido cariado (10) (11). Se demostró la existencia de correlación entre los criterios clínicos (dentina dura o blanda/ seca o mojada) y los hallazgos microbiológicos (12). En este estudio indicaban que la dentina blanda presentaba una mayor cantidad de bacterias que la dentina dura, así mismo, obtuvieron una cantidad de lactobacilos significativamente mayor en la dentina blanda y húmeda, que en la blanda y seca. Sin embargo, no ocurría lo mismo con el color de la dentina y la cantidad de microorganismos presentes en ella (12), quedando el criterio clínico del color dentinario para establecer el límite cavitario en desuso.

2.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EMPLEADOS EN LA DETECCIÓN DEL LÍMITE CAVITARIO

Los métodos diagnósticos clínicos convencionales empleados para la detección del límite cavitario son los siguientes: (13).

2.3.1 Inspección táctil con sonda de caries

La exploración de la lesión de caries con la sonda exploradora permite al odontólogo obtener información táctil sobre la dureza de la dentina y su grado de afectación cariosa, pudiendo establecerse cuatro estados diferentes de la dentina (14) (15).

- *Dentina blanda*: se deforma cuando se presiona con un instrumento duro sobre ella y puede ser excavada fácilmente. Histopatológicamente es dentina necrótica contaminada con biofilm.

- *Dentina correosa*: se denomina así por recordar al tacto del cuero cuando se la explora con la sonda; no se deforma a la presión, pero puede ser excavada fácilmente sin precisar mucha fuerza. Desde el punto de vista histopatológico es dentina desmineralizada.

- *Dentina firme*: no se deforma a la presión, es físicamente resistente a la excavación manual, y para levantarla se precisa realizar una gran fuerza y presión con un instrumento. Se corresponde con la dentina esclerótica.

- *Dentina dura*: solo puede ser eliminada usando fresas o instrumentos de corte bien afilados. Al arrastrar la punta de la sonda exploradora sobre la dentina dura se oye un sonido estridente, denominado “chirrido o grito dentinario”. Es la dentina sana normal.

Este método utilizado en la detección del límite cavitario es subjetivo, pues depende del operador, del tipo de sonda utilizada y no nos permite realizar una exploración de toda la superficie de la cavidad.

2.3.2 Detector de caries

La solución de tinte original, Caries Detector (Kuraray Noritake Dental) se compone de rojo ácido 1 % en propileno glicol. La dentina infectada por caries se tiñe de color rojo, la afectada de color rosa claro y la dentina sana no se mancha. Sin embargo, tomar una decisión sobre los límites de la dentina afectada por caries por el color de teñido es muy subjetivo. Además, el detector de caries no es capaz de detectar la proteína específica de la matriz orgánica dañada para establecer correctamente este límite (16).

2.3.3 Láserfluorescencia (LIF)

Los equipos utilizados para el diagnóstico de lesiones cariosas funcionan mediante un diodo de láser que genera un rayo de luz con una longitud de onda definida, la cual incide sobre el diente, adquiriendo un aspecto fluorescente que puede ser cuantificado, en presencia de fluoróforos bacterianos (protoporfirina IX). Este es el principio operativo de los sistemas de laser- fluorescencia cualitativos (λ 405-450nm). Estos sistemas generan una imagen con diferentes colores, que están asociados a tejido sano (verde) o tejido enfermo (naranja- rojo) (17).

Existen discrepancias con la utilidad de la LF para diagnóstico debido a que en la zona del tejido pulpar la fluorescencia resultante es parecida a la no cariogena, por lo que podría dar falsos positivos (18).

2.4 APARATOS DE LÁSERFLUORESCENCIA

2.4.1 LIF $\lambda=405$ nm (Vistaproof®)

Es un programa de gestión de imágenes en el que se analizan las imágenes obtenidas a través de una cámara intra-oral que emite y recibe haces de luz de diferentes longitudes de onda (Dürr Dental GmbH & Co. KG, Höpfigheimer Strasse 17, 74321, Bietigheim-Bissingen, Germany). Éste haz de luz tiene una longitud de onda de 405 nm producida por seis LEDs y que estimula a las porfirinas, metabolitos específicos de las bacterias cariogénicas, que a su vez, emiten luz roja, la cual contiene menos energía. En el caso del esmalte sano, la luz que emite se correspondería con el color verde. Estas señales luminosas son recogidas a través de un sensor CCD de 1/4" y analizadas por el software.

En la pantalla, la imagen fluorescente de las porfirinas aparece en un color rojo brillante que se puede detectar fácilmente. Cuanto más densa es la colonia de bacteria cariogénica, más intenso será el tono de color rojo. La ventaja con respecto a la inspección visual y táctil es que con esta técnica podemos ver diferentes estadios de la caries. El software diferencia hasta los distintos estadios de la caries dándole un valor numérico que va desde 0 a 5.

2.4.2 LIF $\lambda=405$ nm (Siroinspect®)

Este aparato emite y recibe haces de luz de diferentes longitudes de onda. Éste haz de luz tiene una longitud de onda de 405 nm producida por LEDs y que estimula a las porfirinas, metabolitos específicos de las bacterias cariogénicas, que a su vez, emiten luz roja, la cual contiene menos energía. En el caso de tejido sano, la luz que emite se correspondería con el color verde.

2.4.3 LIF $\lambda=450$ nm (Soprolife®)

El software Sopro Imaging es la interfaz del usuario del sistema Sopix PSPIX, SOPROLIFE y de las cámaras Sopro© que permite adquirir, procesar y archivar imágenes radiográficas tomadas con el sistema Sopix o PSPIX.

Dentro de sus múltiples funciones la que nos ofrece, la cámara intraoral Soprolife® utiliza dos grupos de LEDs que pueden iluminar las superficies del diente tanto con la función luz diurna (luz blanca) como la función luz azul (longitud de onda de 450 nm con un ancho de banda de 20 nm, centrada a ± 10 nm de la onda de excitación).

2.5 MEDICIÓN DEL COLOR

2.5.1 Espacio del color Lab

Lab es el nombre abreviado de dos espacios de color diferentes. El más conocido es CIELAB (estrictamente CIE 1976 $L^*a^*b^*$) y el otro es Lab es una abreviación informal, y puede confundirse con uno u otro espacio de color. Los espacios de color están relacionados en intención y propósito, pero son diferentes entre sí (19).

El propósito de ambos espacios es producir un espacio de color que sea más "perceptivamente lineal" que otros espacios de color (19).

Las siglas LAB se refieren al espacio de color tridimensional, en donde L o L^* es luminosidad de negro a blanco, A o a^* va de rojo a verde y B o b^* al azul (20).

2.5.2 Modelo de color RGB

RGB es un modelo de color basado en la síntesis aditiva, con el que es posible representar un color mediante la mezcla por adición de los tres colores de luz primarios. El modelo de color RGB no define por sí mismo lo que significa exactamente rojo, verde o azul, por lo que los mismos valores RGB pueden mostrar colores notablemente diferentes en distintos dispositivos que usen este modelo de color.

2.5.3 Conversiones RGB y CMYK

Los valores RGB o CMYK deben ser transformados a un espacio de color absoluto específico, tal como sRGB o RGB de Adobe. Estos espacios serán dependientes del dispositivo permitiendo que estos datos sean transformados al espacio de color CIE 1931 y luego en L*a*b*.

* * *

3. OBJETIVOS

3.1. Planteamiento del problema

La *Fluorescencia Inducida por Láser* (LIF) es capaz de diferenciar el tejido sano del enfermo. Así, durante la eliminación del tejido cariado, puede ser una prueba diagnóstica valiosa ya que es objetiva, no depende del operador estrictamente, es reproducible, monitorizable y da información de toda la dentina. En la actualidad la dureza de la dentina es el signo clínico más relevante y aceptado universalmente para diferenciar el tejido recuperable del no recuperable. Sin embargo, esta prueba clínica es subjetiva, depende del operador, de la punta del instrumento y de la técnica empleada. La LIF es considerada como un método complementario a la Dureza Clínica, debido a la presencia de fuentes de fluorescencia no cariogénica que inducen a falsos positivos.

En el desarrollo de la investigación de la LIF para el diagnóstico del Límite Cavitario (LC) sano existen lagunas que deben ser estudiadas, si queremos conocer la verdadera dimensión, alcance y limitaciones de esta prueba. La LIF-Cuantitativa ha sido estudiada en algunos aspectos. Sin embargo, la LIF-Cualitativa solo se ha investigado para el diagnóstico de la caries oculta de dentina, pero muy escasamente o nualmente como prueba en la determinación del LC. Estas investigaciones no han incluido todas las longitudes de onda de los aparatos existentes y no han analizado la validez de las recomendaciones del fabricante.

Según el fabricante, los colores verdes son sinónimos de salud y los colores anaranjados/rojizos sinónimo de dentina no recuperable. Sin embargo, la validez de esta prueba se ha realizado con estas categorías recomendadas por el fabricante sin ponerlas en cuestión. Además, la estimulación con luz láser a diferentes longitudes de onda puede inducir distintas coloraciones y en otras escalas, que pueden tener una interpretación muy diferente entre distintos sistemas y aparatos. Por todo ello, nos hemos planteado los siguientes objetivos para esta investigación.

3.2 Objetivos:

- a) Determinar si la escala de colores recomendada por el fabricante es la adecuada para establecer la correlación de la LIF-Cualitativa con las distintas capas de la caries dentinaria y el Límite Cavitario.
- b) Determinar la escala de colores adecuada para la LIF-Cualitativa a diferentes longitudes de onda ($\lambda=450\text{nm}$ y 405nm).
- c) Determinar la escala de colores adecuada con una longitud de onda ($\lambda=405\text{nm}$), pero para distintos aparatos (Siroinspect® vs Vitaproof®).
- d) Determinar si otros parámetros que definen el color (Lab) son más precisos que la escala de guía de colores.

3.3 Hipótesis Nulas:

1. *“La escala de colores recomendada por el fabricante tiene la misma Validez que cualquier otra escala recodificada en el diagnóstico del LC”*
2. *“La escala de colores es la misma para la LIF-Cualitativa $\lambda=450\text{nm}$, que para la LIF-Cualitativa $\lambda=405\text{nm}$ ”; también “Es igual para distintos sistemas dentro de la misma longitud de onda en el diagnóstico del LC”*
3. *“Los valores numéricos que definen el color en la escala “Lab” son igual de válidos que la escala de guía de colores como variables para el diagnóstico del LC”*

* * *

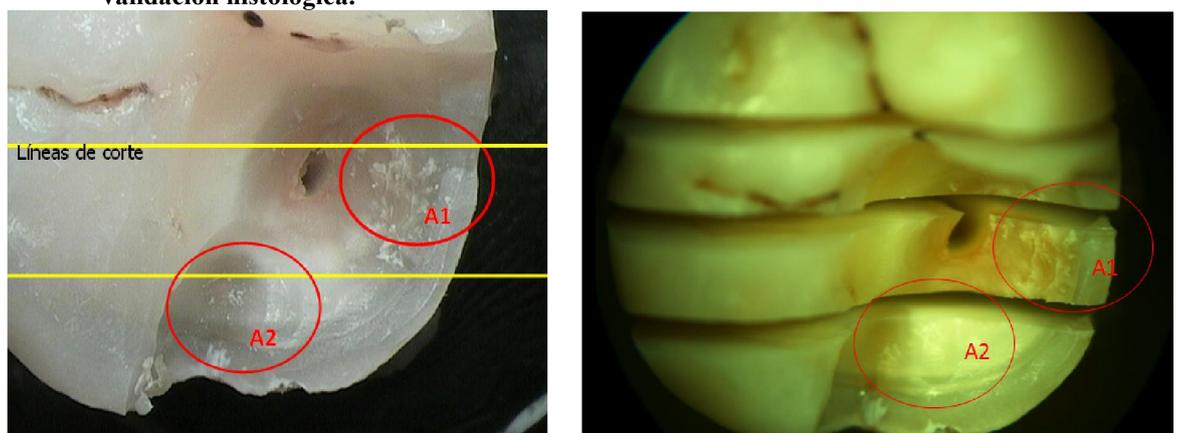
4. MATERIAL Y METODO

Este estudio, dentro de la línea de investigación diagnóstico de caries, cuenta con la aprobación del Comité Ético de la Universidad de Sevilla. Se utilizaron para la selección de la muestra 45 dientes ex-vivo, premolares y molares de diferentes pacientes, que presentaban al menos una localización caries dentinaria sin invasión pulpar. Los dientes fueron conservados a 4°C en suero fisiológico para evitar la desecación de la dentina y preparados antes de siete días para evitar la pérdida de fluorescencia del tejido dental.

4.1 Preparación de las muestras

Se fue eliminando el tejido cariado con incrementos secuenciales de 1 mm hasta alcanzar distintos niveles y áreas de exploración (Fig. 1). El tejido cariado se eliminó con los medios habituales, cucharilla de caries y fresas de carburo de tungsteno. Se prepararon, como máximo, dos áreas por cada diente y a distintos niveles de profundidad, con el fin de obtener límites cavitarios en las distintas capas de la dentina cariada, excepto para la capa necrótica. Se obtuvieron 90 áreas para el estudio. Entre cada área se dejaba espacio suficiente para permitir cortes independientes del diente sobre cada área (Fig. 1).

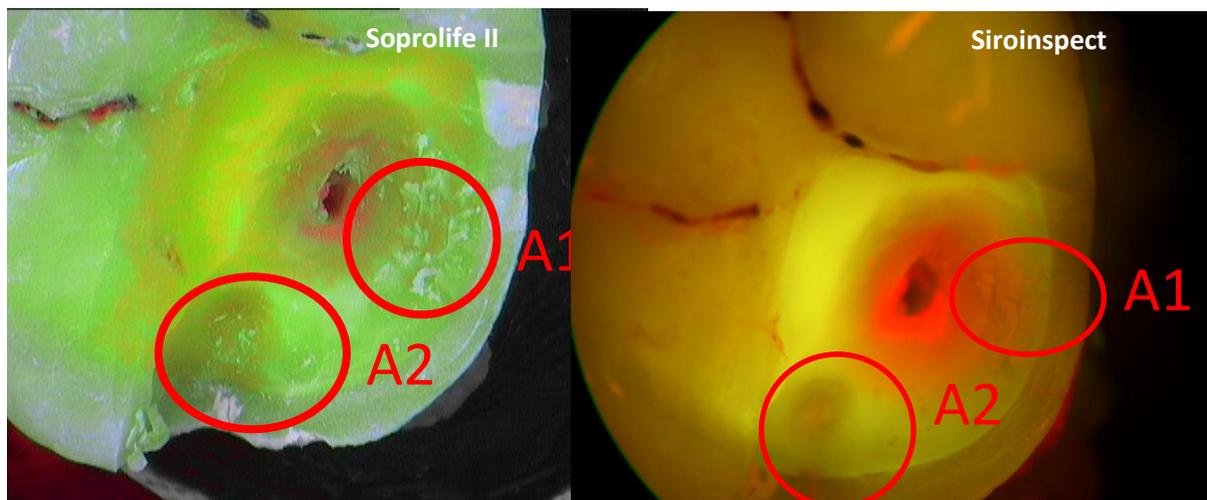
Figura 1. Áreas de estudio seleccionadas y planificación de líneas de corte para la validación histológica.



4.2 Medición de la Láserfluorescencia cualitativa (LIF-CL)

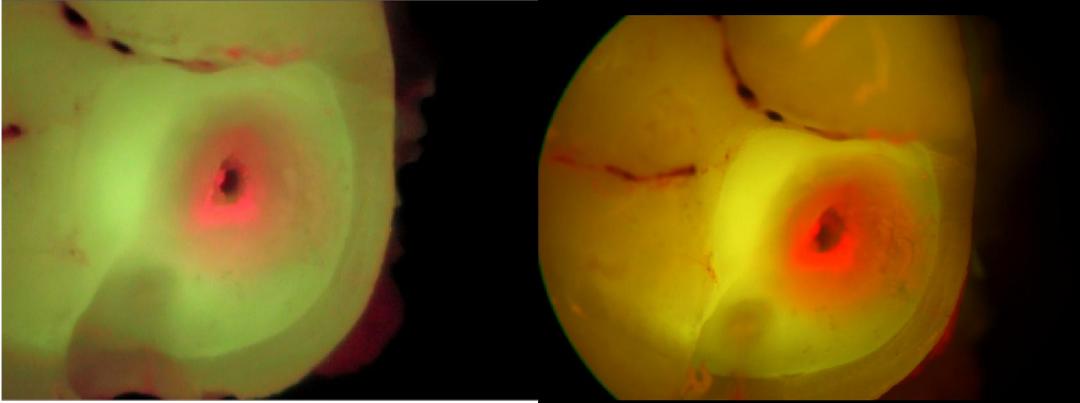
En las áreas de estudio, se midió la fluorescencia mediante tres sistemas de LIF-CL: **Soprolife®** (Acteon, La Ciotat, France) a $\lambda = 450 \text{ nm}$. (Fig.2); el aparato **Siroinspect®** (Sirona Dental Systems Fabrikstrasse 31. 64625 Bensheim. Alemania) a $\lambda = 405 \text{ nm}$ (Fig. 2); y con el Sistema **Vistaproof®** (Dür Dental SE, 74321, Bietigheim-Bissingen, Alemania) a $\lambda = 405 \text{ nm}$. La valoración de las imágenes, producidas por su software, fue realizada por dos operadores que no habían intervenido en la preparación de las muestras. Se analizaron independientemente en la pantalla de un PC (Toshiba, mod. Satellite Pro) y en una habitación con el mismo grado de iluminación. Sólo hubo discrepancias entre los operadores en dos muestras que fueron eliminadas del estudio (n=88).

Figura 2. Medición con fluorescencia cualitativa a $\lambda=450 \text{ nm}$ y 405 nm en dos áreas de estudio.



Las categorías de colores correspondían a la escala: [blanco-gris-negro /verde-amarillo-naranja-rosa-rojo], a las que se añadieron *rosa* y *rojo vivo*, por presentarse fundamentalmente con los aparatos a $\lambda = 405 \text{ nm}$. Estos colores se diferencian en la luminosidad de los que hemos denominado *rosa* y *rojo apagado* (Fig.3).

Figura 3. Colores rosa vivo (Vistaproof®) y rojo vivo (Siroinspect®)



4.3 Determinación de las variables del color en el sistema RGB y CIE L*a*b*

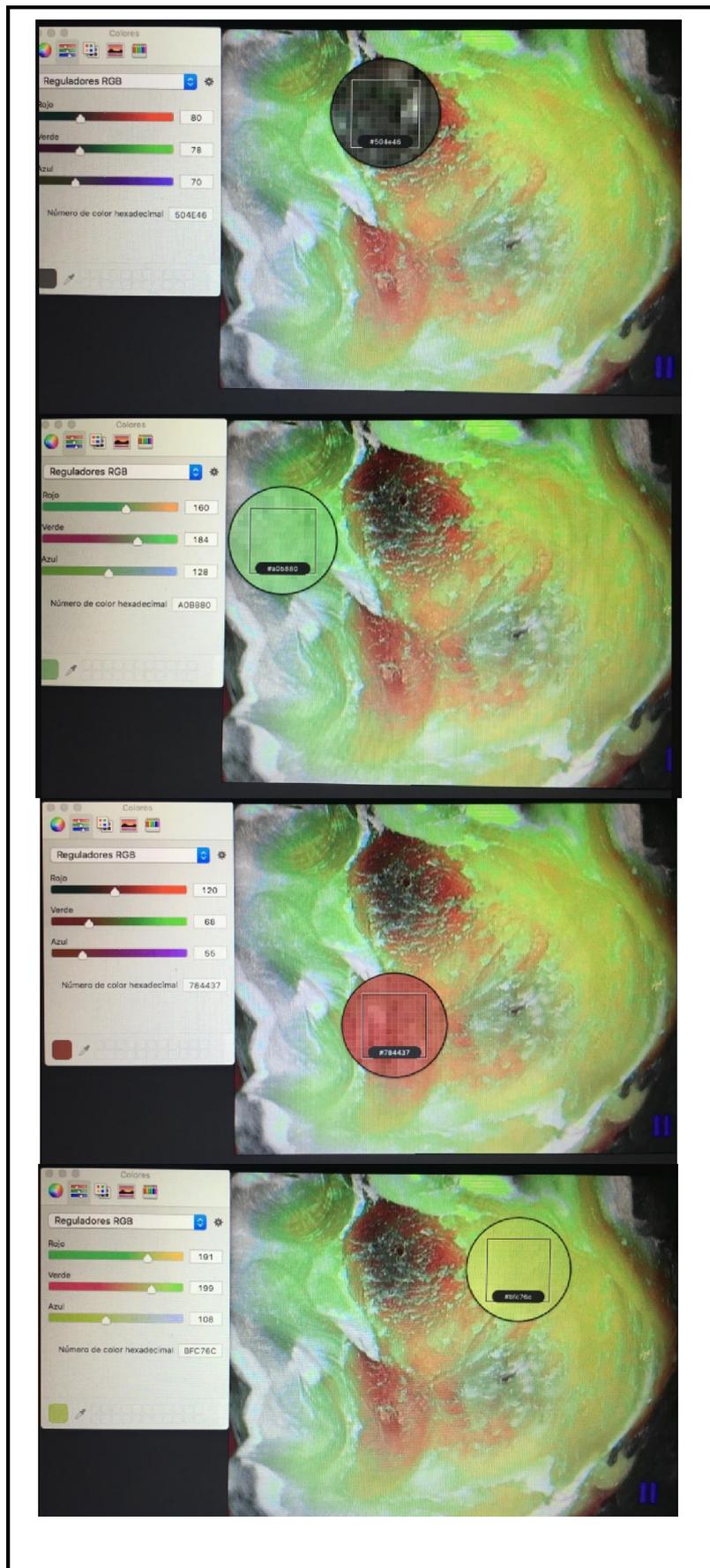
En cada área de estudio de la muestra, mediante la selección de *pixeles* con la aplicación “*Cuentagotas*” del software Pixelmator MAC, determinábamos los valores de las variables RGB del color (Fig. 4). Para cada color se tomaban tres mediciones y el valor promedio se tomaba como resultado. Este procedimiento se aplicó para la LIF a $\lambda=450\text{nm}$ y a la LIF a $\lambda=405\text{nm}$ (Vistaproof®).

Para convertir los valores RGB a CIE L*a*b* se utilizó el coversor “Colormine” que utiliza el código de conversión siguiente:

```
var rgb = new Rgb()  
var lab = rgb.To<Lab>()
```

Estos valores fueron considerados como las variables numéricas que definían el color en una determinada área de estudio de la caries dentinaria. Posteriormente, mediante estudio con epifluorescencia de las bacterias marcadas, se determinó la capa dentinaria de la caries.

Figura 4. Variables RGB del color de la fluorescencia en la caries dentinaria



4.5 Validación con marcadores de ADN:

Cada diente fue cortado por las líneas de corte seleccionadas en espesores de ≥ 3 mm usando la recortadora Struers Accutom-2 (Roper Technologies, Inc. Florida, USA), obteniendo 88 muestras dobles (mesial y distal del corte). De ellas, se eligió la más representativa del área explorada. Hubo que desechar cinco muestras que se deterioraron por el corte (n=83) Las muestras se pulían usando discos de papel de silicona de carburo con tamaño de grano de 320, 600, 1200. (Struers Silicon Carbure). Posteriormente, fueron fijadas en alcohol (Alcohol etílico al 70%), enjuagadas repetidamente con solución salina de fosfato tamponada, pH 7,2 (PBS), y teñidas con un marcador de ADN- Ioduro de Propidio 10 mg/ml [1:500], lavadas con PBS, introducidas en solución de Timol 1% y mantenidas en oscuridad. Las muestras marcadas fueron analizadas usando un microscopio de epifluorescencia OLYMPUS BX61, x10 en aire. Con el software del microscopio se obtuvieron las imágenes con distinto grado de fluorescencia. (Fig. 5). Un observador experimentado selecciono en cada muestra las áreas correspondientes a las cuatro capas de la caries bacteriana, según los siguientes criterios:

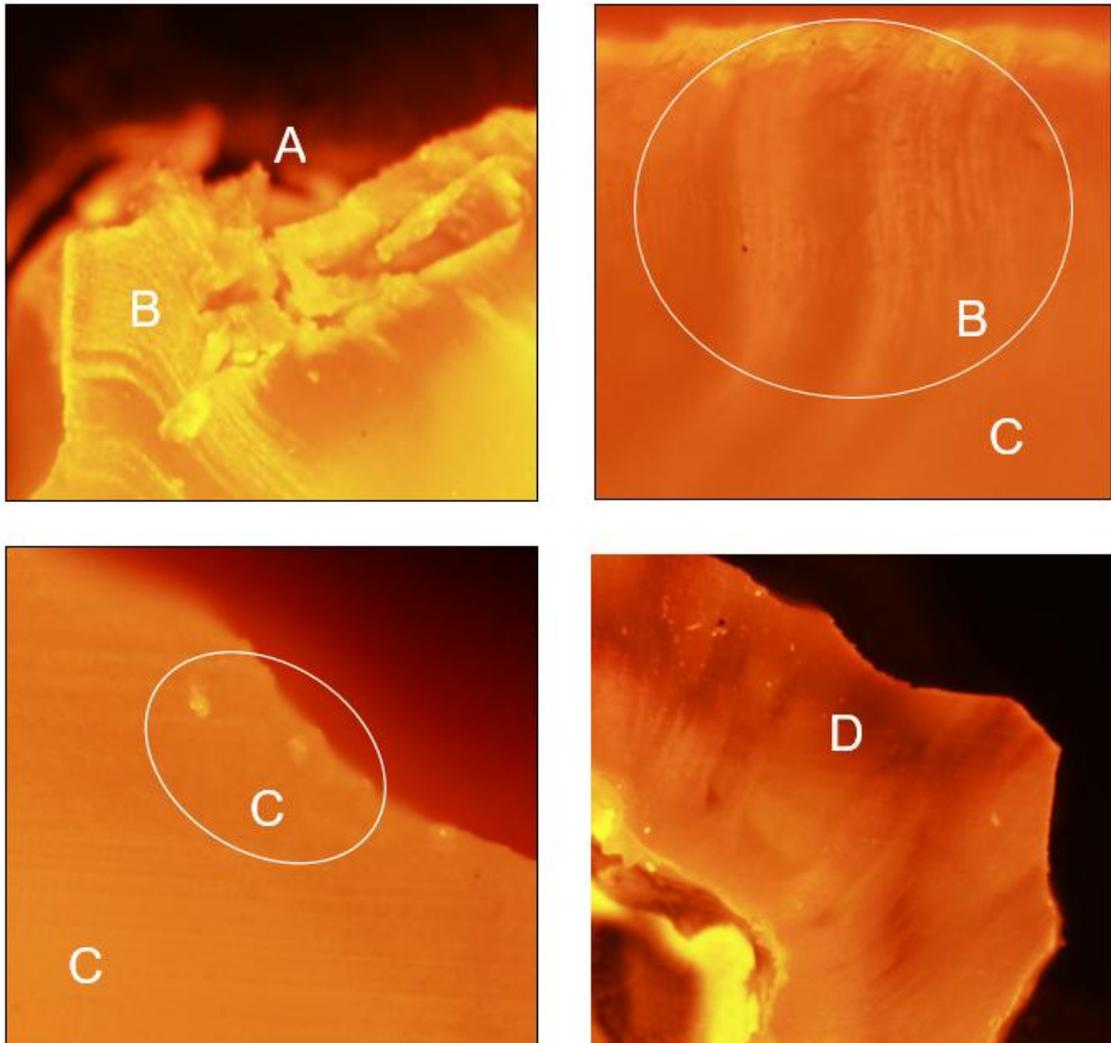
-Zona necrótica: área superficial de la caries desestructurada y sin fluorescencia.

-Zona desmineralizada superficial: área con alta intensidad de fluorescencia inmediatamente por debajo de la zona necrótica. Pudiendo presentar corpúsculos y fluorescencia dentro de túbulos con forma irregular.

-Zona desmineralizada profunda: área contigua a la capa anterior con una marcada pérdida de fluorescencia o sin ella. Ausencia de corpúsculos y patrón tubular visible, en ocasiones.

-Zona hipermineralizada: zona contigua a la anterior, más profunda, con total ausencia de fluorescencia y de coloración oscura.

Figura 5. Imágenes de epifluorescencia de las zonas de la caries dentinaria: Necrótica (A); Desmineralizada superficial con patrón tubular y corpúsculos superficiales (B); Desmineralizada profunda (C) y Hipermineralizada (D).



4.6 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron introducidos en el programa SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se calcularon las frecuencias y porcentajes de cada color LIF-CL respecto a cada capa dentinaria. Según estas frecuencias, se asociaron los colores representativos de la LIF de cada longitud de onda a las capas del estrato de la caries dentinaria, donde la frecuencia era mayor. Con la recodificación de las capas del estrato dentinario en dentina Recuperable (Hipermineralizada + Desmineralizada profunda) y No Recuperable (Desmineralizada superficial) se recodificaron nuevamente las categorías de color para cada longitud de onda. Se tomó como base para la selección de estas categorías el impacto que tenían en la Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos de cada prueba. Aquellas categorías de color que no se distribuían con un porcentaje diferencial mayor al 40%, entre Recuperable/No Recuperable, se excluían como categoría diagnóstica.

Se calcularon las medias y la desviación estándar de cada valor $L^*a^*b^*$ para las capas del estrato dentinario, una vez comprobada que su distribución era normal. Para conocer si existían diferencias significativas entre los valores $L^*a^*b^*$ y las capas del Límite Cavitario se utilizó la prueba *T de Student* fijando su significación en $\alpha \leq 0,05$. Para los valores $L^*a^*b^*$ en relación a la dentina Recuperable/No Recuperable se procedió de igual forma.

* * *

5. RESULTADOS

5.1 Laserfluorescencia $\lambda=450\text{nm}$

La distribución de los colores para las categorías “verde-naranja-rojo/blanco-gris-negro”, entre las distintas capas de la caries dentinaria y entre la dentina Recuperable/No recuperable, están representadas en la Tabla x1. Los colores Blanco-Gris-Negro no han sido incluidos en las categorías de variables de esta prueba y no se emplearán para discriminar entre las capas de la caries dentinaria.

Tabla x1. Distribución de las categorías “verde-naranja-rojo” de la Láserfluorescencia $\lambda=450\text{nm}$ entre las capas de la caries dentinaria.

Soprolife® $\lambda=450\text{nm}$	H1	H2	DENTINA R=(H1+H2)	H3	DENTINA NR= (H3)
Blanco	4	1		2	
Verde claro	1				
Verde Medio	21	15		5	
Verde Oscuro	1	3	41	2	7
Amarillo	2	1		2	
Naranja	4	2	9		2
Rojo Claro		2		4	
Rojo Vivo				1	
Rojo Oscuro			2	1	6
Gris	1			1	
Negro	1				

H1: Hipermineralizada; **H2:** Desmineralizada profunda; **H3:** Desmineralizada Superficial;
R: Dentina Recuperable **NR:** Dentina No Recuperable

Las frecuencias y porcentajes para las categorías Verde-Naranja-Rojo se expresan en la Tabla x2. Según la distribución observada entre la dentina recuperable y no recuperable, el verde y naranja presentan mayor frecuencia en la dentina Recuperable y la categoría rojo en la No recuperable. Los valores de la prueba para la Sesibilidad (S), Especificidad (Sp), Valor Predictivo Positivo (VP+) y Valor Predictivo Negativo (VP-) se muestran en la Tabla x3.

Tabla x2. Escala de colores recodificados y su distribución entre dentina Recuperable y No Recuperable de la Láserfluorescencia $\lambda=450\text{nm}$

VARIABLES MODIFICADAS Soprolife®	DR	DNR
VERDE	41 (85,42%)	7 (14,58%)
NARANJA	9 (81,82%)	2 (18,18%)
ROJO	2 (25%)	6 (75%)

DR: Dentina Recuperable; DNR: Dentina No Recuperable

Tabla x3. Validez de la Láserfluorescencia $\lambda=450\text{nm}$ con la escala de colores recodificada

Validez LIF $\lambda=450\text{nm}$	SANO	ENFERMO	
VERDE/NARANJA	50	9	VPN=0,85
ROJO	2	6	VPP=0,75
	Sp=0,96	S=0,40	

Sp: Especificidad; S: Sensibilidad; VPN: Valor predictivo negativo; VPP: Valor predictivo positivo

5.2 Laserfluorescencia $\lambda=405\text{nm}$ (Siroinspect®)

La distribución de los colores para las categorías “verde-naranja-rojo/Gris”, entre las distintas capas de la caries dentinaria y entre la dentina recuperable/No recuperable, están representadas en la Tabla x1. El color Gris no ha sido incluido en las categorías de variables de esta prueba y no será aplicado para discriminar entre las capas de la caries dentinaria.

Tabla x1. Distribución de colores de la Láserfluorescencia $\lambda=405\text{nm}$ (Siroinspect®) entre las capas de la caries dentinaria.

Siroinspect® LIF $\lambda= 405\text{nm}$	H1	H2	DENTINA R=(H1+H2)	H3	DENTINA NR= (H3)
Verde Claro	24	10		4	
Verde oscuro		1	35		4
Amarillo		1			
Naranja Claro	1				
Naranja Medio	8	9		5	
Rojo	2	1	22		5
Rojo vivo	1	2	3	13	13
Gris	1				

H1: Hipermineralizada; **H2:** Desmineralizada profunda; **H3:** Desmineralizada Superficial;
R: Dentina Recuperable **NR:** Dentina No Recuperable

Las frecuencias y porcentajes para las categorías Verde-Naranja-Rojo-Rojo vivo se observan en la Tabla x2. Según la distribución de las categorías de color entre la dentina recuperable y no recuperable, el verde-naranja-rojo presenta mayor frecuencia en la dentina Recuperable y la categoría rojo vivo en la No recuperable. Los valores de la prueba para la Sensibilidad (S), Especificidad (Sp), Valor Predictivo Positivo (VP+) y Valor Predictivo Negativo (VP-) se muestran en la Tabla x3.

Tabla x2. Escala de colores recodificados y su distribución entre dentina Recuperable y No Recuperable de la Láserfluorescencia $\lambda=405\text{nm}$ (Siroinspect®)

VARIABLES MODIFICADAS Siroinspect®	DR	DNR
VERDE	35 (89,74%)	4 (10,26%)
NARANJA/ROJO	22 (81,48%)	5 (18,52%)
ROJO VIVO	3 (18,75%)	13 (81,25%)

DR: Dentina Recuperable; **DNR:** Dentina No Recuperable

Tabla x3. Validez de la Láserfluorescencia $\lambda=405\text{nm}$ (Siroinspect®) con la escala de colores recodificada

Validez $\lambda=405\text{nm}$	SANO	ENFERMO	VPN=0,86 VPP=0,81
	VERDE/NARANJA/ROJO	57	
ROJO VIVO	3	13	
	Sp=0,95	S=0,59	

Sp: Especificidad; S: Sensibilidad; VPN: Valor predictivo negativo; VPP: Valor predictivo positivo

5.3 Laserfluorescencia $\lambda=405\text{nm}$ (Vistaproof®)

La distribución de los colores para las categorías “verde-naranja-rojo/gris”, entre las distintas capas de la caries dentinaria y entre la dentina recuperable/No recuperable, están representadas en la Tabla x1. El color Gris no ha sido incluido en las categorías de variables de esta prueba y no será empleado para discriminar entre las capas de la caries dentinaria.

Tabla x1. Distribución de colores de la Láserfluorescencia $\lambda=405\text{nm}$ (Vistaproof®) entre las capas de la caries dentinaria

VistaProof LIF $\lambda=405\text{nm}$	H1	H2	DENTINA R=(H1+H2)	H3	DENTINA NR= (H3)
Verde Claro	26	12		3	
Naranja	4	5	47	1	4
Rosa	3	6		5	
Rojo	3		12	4	9
Rosa Vivo				2	
Rojo Vivo		1	1	7	9
Gris	1				

H1: Hipermineralizada; H2: Desmineralizada profunda; H3: Desmineralizada Superficial;
R: Dentina Recuperable NR: Dentina No Recuperable

Las frecuencias y porcentajes para las categorías Verde-Naranja-Rojo-Rojo vivo se observan en la Tabla x2. Según la distribución entre la dentina recuperable y no recuperable, el verde-naranja-rojo presenta mayor frecuencia en la dentina Recuperable y la categoría rojo vivo en la No recuperable. Los valores para la categoría rojo apagado muestran diferencias de aproximadamente del 15% entre dentina recuperable/No Recuperable, por lo que no es considerada una categoría discriminativa. Los valores de la

prueba para la Sesibilidad (S), Especificidad (Sp), Valor Predictivo Positivo (VP+) y Valor Predictivo Negativo (VP-) se muestran en la Tabla x3.

Tabla x2. Escala de colores recodificados y su distribución entre dentina Recuperable y No Recuperable de la Láserfluorescencia $\lambda=405\text{nm}$ (Vistaproof®)

VARIABLES MODIFICADAS Vistaproof®	DR	DNR
VERDE/NARANJA	47(91,49%)	4 (8,51%)
ROJO APAGADO	12 (57,14%)	9 (42,86%)
ROJO VIVO	1 (10%)	9 (90%)

DR: Dentina Recuperable; DNR: Dentina No Recuperable

Tabla x3. Validez de la Láserfluorescencia $\lambda=405\text{nm}$ (Vistaproof®) con la escala de colores recodificada

Validez LIF $\lambda=405\text{nm}$ (VistaProof®)	SANO	ENFERMO	
VERDE/NARANJA	47	4	VPN=0,92
ROJO VIVO	1	9	VPP=0,9
	Sp=0,98	S=0,69	

Sp: Especificidad; S: Sensibilidad; VPN: Valor predictivo negativo; VPP: Valor predictivo positivo

5.4 Valores CIE L*a*b* para la Laserfluorescencia $\lambda=405\text{nm}$

La media y la desviación de estándar de los valores cuantitativos CIE L*a*b* están representados en la Tabla x1. Existe mayor diferencia de medias entre las capas del límite cavitario para los parámetro L* y a*. En la Tabla x2 observamos diferencias estadísticamente significativas para L* y a*, tanto para dentina recuperable/ No recuperable como para las capas del Límite Cavitario.

Tabla x. Distribución de los valores L* a* b* de la Laserfluorescencia (LIF) $\lambda=405\text{nm}$ en las capas de la caries dentinaria

LIF $\lambda=450\text{nm}$ (Soprolife®)	Hipermineralizada		Desmineralizada Profunda		Desmineralizada Superficial	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
L	63,89	12,33	59,96	13,30	51,09	18,77
a	-14,5	17,05	-9,0	19,5	-6,41	16,0
b	31,47	20,55	25,58	18,35	17,27	14,27
n=82	n=36		n=24		n=22	

(*) Escala de color CIE 1976 L a b.

Tabla x. Estadísticos de contraste de los valores L* a* b* de la Laserfluorescencia (LIF) $\lambda=405\text{nm}$ para los estratos de la caries dentinaria.

ESTRATOS COMPARADOS	T de Student ($\alpha \leq 0,05$)		
	L	a	b
H2 - H3	0,007	0,001	0,151
[H1+H2] - H3	0,008	0,001	0,082

(*) Escala de color CIE 1976 L a b.

H1: Hipermineralizada; **H2:** Desmineralizada profunda; **H3:** Desmineralizada Superficial

5.5 Valores CIE L*a*b* para la Laserfluorescencia $\lambda=450\text{nm}$

La media y la desviación de estándar de los valores cuantitativos CIE L*a*b* están representados en la Tabla x1. No existen una marcada diferencias de medias entre las capas del límite cavitario para los parámetro L*a*b*, se observan que el valor disminuye en valores absolutos desde la capa hipermineralizada a la desmineralizada superficial. En la Tabla x2 observamos diferencias estadísticamente significativas para L* entre la dentina recuperable/ No recuperable.

Figura x . Distribución de los valores L* a* b* de la Laserfluorescencia (LIF) $\lambda=450\text{nm}$ en las capas de la caries dentinaria

LIF $\lambda=450\text{nm}$ (Soprolife®)	Hipermineralizada		Desmineralizada Profunda		Desmineralizada Superficial	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
L	63,89	12,33	59,96	13,30	51,09	18,77
a	-14,5	17,05	-9,0	19,5	-6,41	16,0
b	31,47	20,55	25,58	18,35	17,27	14,27
n=82	n=36		n=24		n=22	

(*) Escala de color CIE 1976 L a b.

Figura x . Estadísticos de contraste de los valores L* a* b* de la Laserfluorescencia (LIF) $\lambda=450\text{nm}$ para los estratos de la caries dentinaria.

ESTRATOS COMPARADOS	U de Mann-Whitney ($\alpha \leq 0,05$)		
	L	a	b
H2 - H3	0,69	0,627	0,095
[H1+H2] - H3	0,003	0,183	0,012

(*) Escala de color CIE 1976 L a b.

H1: Hipermineralizada; **H2:** Desmineralizada profunda; **H3:** Desmineralizada Superficial

* * *

6. DISCUSIÓN

La Laserfluorescencia (LIF) es capaz de diferenciar el tejido dental sano del enfermo (22,23) incluso en la valoración del estado de la pulpa y ante una exposición pulpar (24). En este sentido, la LIF Cuantitativa ha sido aplicada en la determinación del Límite Cavitario (LC). Sin embargo, la LIF Cualitativa (LIF-CL) ha sido muy poco estudiada como método para determinar el LC, a pesar de ser un método objetivo, reproducible y que explora la totalidad de la dentina. Por ello, consideramos este estudio pertinente.

Los resultados de la LIF-450nm muestran escasa frecuencia para la categoría de colores “Blanco-Gris-Negro”; para esta categoría, el fabricante no hace indicaciones sobre su aplicación. En nuestro estudio, estos colores, se relacionan con las capas de la dentina recuperable, pero su baja frecuencia implica que estos resultados no sean concluyentes y sólo diremos que cuando aparezcan, serán otras pruebas las que nos guiarán en el diagnóstico. Respecto al resto de categorías de colores concuerdan con el fabricante: VERDE/NARANJA/ROJO. Sin embargo, en la interpretación del color Amarillo-Naranja no lo relacionamos con dentina No Recuperable, como hace el fabricante, por el contrario está asociado a dentina Recuperable y no debe ser eliminada. Los valores de Especificidad (Sp), contemplando la Categoría VERDE-NARANJA como sano, son de 0,96 y el valor pronóstico negativo (VP-) de 0,85. Con estos datos podemos afirmar que ante una LIF-450nm VERDE-NARANJA la dentina no debe ser eliminada, pues corresponde a dentina hipermineralizada o dentina profunda desmineralizada. Ambas capas de dentina tienen pocas bacterias, por ello esta categoría la relacionamos con la ausencia o con pequeña cantidad de bacterias. No obstante, esta prueba debe ser acompañada de la exploración de la dureza clínica ya que nos informa del grado de desmineralización de la dentina. Por ello, ante una dentina correosa, pero dentro de esta categoría de color con LIF-450nm podemos tener más probabilidades de que estamos dejando dentina recuperable. No podemos decir lo mismo respecto a la categoría rojo, ya que la sensibilidad es muy baja (0,40). Sin embargo, el VP+ es de 0,75 que es alto, pero no aceptable. En Ciencias de la Salud que el valor debe ser $\geq 0,8$ para ser aplicable. Por ello, ante un resultado en la categoría rojo podemos estar ante un tejido enfermo, pero en este aspecto esta prueba no es concluyente.

En relación a los conceptos de sensibilidad y especificidad, estos permiten valorar la validez de una prueba diagnóstica. Sin embargo, carecen de utilidad en la práctica

clínica. Tanto la sensibilidad como la especificidad proporcionan información acerca de la probabilidad de obtener un resultado concreto (positivo o negativo) en función de la verdadera condición del enfermo con respecto a la enfermedad. Sin embargo, cuando a un paciente o tejido se le realiza alguna prueba, el clínico carece de información a priori acerca de su verdadero diagnóstico, y más bien la pregunta se plantea en sentido contrario: ante un resultado positivo/negativo en la prueba, ¿cuál es la probabilidad de que el paciente esté realmente enfermo/sano? Así pues, resulta obvio que no puede ser abordado el problema en sola dirección. Por medio de los VP+/- se completa la Validez de la prueba.

La LIF-405nm muestra escala de colores diferentes que para la LIF-450nm. La categoría VERDE-NARANJA debe ser interpretada como dentina recuperable, al igual que para la LIF-450nm, sin embargo el color ROJO no se alinea con la dentina No recuperable. En el caso del Siroinspect® (SI) el rojo puede ser dentina recuperable y en el caso del Vistaproof® (VF) no es una categoría de color discriminativa y estos resultados deben ser excluidos del diagnóstico, representando en nuestro estudio un 25% de los resultados, por lo que un inconveniente para este aparato. Para la LIF-405nm el color ROJO VIVO es el que se corresponde con el tejido dentinario No recuperable, independientemente del sistema utilizado. Con estos antecedentes, podemos afirmar que las recomendaciones del fabricante para el uso de la LIF-CL no se corresponden con los resultados de este estudio, sobre todo para la dentina No recuperable.

Respecto a la Sensibilidad la LIF-405nm son más sensibles que la LIF-450, aunque no alcanzan el 0,8. No obstante el VP+ es de 0,81 para el SI® y de 0,9 para el VF®. Así ante un valor “ROJO VIVO” podemos estar muy probablemente ante dentina No Recuperable. La Especificidad es muy alta, tanto para el SI® (Sp=0,95) como para el VF® (Sp=0,98); con unos valores VP- de 0,86 y 0,92 respectivamente. Con lo que ante un resultado de esta categoría de color asociada a dentina Recuperable, con toda probabilidad estaremos ante ella.

Así, la LIF-405nm en asociación con la dureza clínica puede ser de gran ayuda en el diagnóstico del LC. Una dentina blanda debe ser eliminada siempre, aunque la LIF-405nm no muestre color Rojo Vivo. Hay que tener en cuenta que la LIF detecta el metabolismo bacteriano y en una capa necrótica no se tiene esta actividad. Ante una dentina correosa, con las salvedades para los Rojos Apagados, puede ser conservada en el caso de VERDE-ANARANJADO y eliminada con la presencia de ROJO VIVO. La dentina dura debe ser conservada siempre. En el caso de dentinas teñidas la LIF-CL positiva no debe ser interpretada como enfermedad, ya que existe una fuente de dentina no

cariogénica.

En esta investigación nos hemos planteado, a pesar de ser la LIF-CL una prueba bastante objetiva, eliminar la subjetividad interpretativa de los colores y para ello hemos analizado el color en el Sistema CIE $L^*a^*b^*$, pudiendo convertir esta prueba en cuantitativa. Para LIF-450nm, la variable L^* tiene capacidad para discriminar entre dentina Recuperable/No recuperable; valores ≥ 60 de media estarían en dentina desmineralizada profunda o dentina hipermineralizada, sin poder diferenciar entre ellas; y valores ≤ 51 corresponderían a dentina desmineralizada superficial. Para la variable b^* se obtienen resultados similares, pero con valores ≥ 25 para dentina recuperable y para valores ≤ 17 para dentina no recuperable. Estos resultados coinciden con los obtenidos dentro de esta línea de investigación (25) en relación a la capacidad de esta LIF para el diagnóstico del LC.

Respecto a la LIF-405nm, no sólo discrimina entre dentina Recuperable/No Recuperable, sino que lo hace entre las capas del Límite Cavitario con las variables L^* y a^* . Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en otro estudio (TFG-Carmen) de esta línea de investigación, donde esta LIF-405nm obtiene resultados similares en cuanto a la diferenciación entre capas con las variables cualitativas del color. En este caso, la variable L^* con valores ≥ 58 estaríamos en dentina profunda desmineralizada o hipermineralizada y con valores ≤ 48 estaríamos en dentina superficial desmineralizada. Para la variable a^* , valores ≤ 10 indicarían dentina Recuperable y valores ≥ 30 estarían asociados a dentina No recuperable.

Con las limitaciones que presentan los estudios in vitro, para su extrapolación clínica, y a la falta de estudios confirmatorios hay que ser cauteloso con estos resultados. Sin embargo, estamos convencidos que para la aplicación de los nuevos conceptos en cuanto a la dentina que hay que eliminar, la Laserfluorescencia debe ocupar un papel relevante en el diagnóstico. A expensas de descartar las fuentes de fluorescencia no cariogena es la única prueba que detecta la presencia de bacterias, explora toda la cavidad y es más objetiva que la dureza clínica. No obstante, debe ser aplicada como coadyuvante de esta.

* * *

7. CONCLUSIONES

- 1ª.- Los colores recomendados por el fabricante, no coinciden con el mejor diagnóstico para la dentina del límite cavitario, por lo que es necesario una recodificación de la escala.**
- 2ª.- La LIF a 450nm es muy específica, ante una coloración verde-naranja de la dentina, ésta no debe ser eliminada pues corresponde a dentina hipermineralizada o dentina profunda desmineralizada. La coloración roja no es específica de la dentina no recuperable.**
- 3ª.- La LIF a 405 nm con colores de la dentina Verde-Naranja, indica que ésta debe ser conservada. Sin embargo con color “rojo vivo” debe ser eliminada, ya que el valor predictivo de estas pruebas es muy alto. Sin embargo, los colores rosa-rojo poco luminosos no son discriminativos.**
- 4ª.- La LIF 450nm y 405nm con las variables de color CIE L*ab discriminan entre dentina recuperable y no recuperable. La LIF a 405nm, incluso puede diferenciar las capas que conforman el límite cavitario.**
- 5ª.- Los nuevos conceptos relacionados con la dentina que hay que eliminar, hacen que la Laserfluorescencia ocupe un papel relevante en este diagnóstico, a expensas de descartar las fuentes de fluorescencia no cariogena.**

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Henostroza G. Caries Dental, principios y procedimientos para el diagnóstico. Primera ed. G H, editor. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2007.
2. Harris Norman O. Odontología preventiva primaria México México: Manual moderno; 2001.
3. Costerton J. Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol.* 1995;15:137-140
4. Scheie A, Petersen F. The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15: 4-12.
5. Figueroa-Gordon M, Acevedo A, Alonso G. Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de Caries dental. *Acta Odontol Venez.* 2009; 47: 1-13.
6. Van Houte J, Jordan H V, Laraway R, Kent R, Soparkar PM, Paola PF. Association of the microbial flora of dental plaque and saliva with human root-surface caries. *J Dent Res.* 1990; 69(8): 1463–8.
7. Becker M, Paster BJ, Leys EL, et al. Molecular Analysis of Bacterial Species Associated with Childhood Caries. *J Clin Microbiol.* 2002; 40: 1001-1009.
8. Byun R, Nadkarni M, Chhour K, Martin F, Jacques N, Hunter N. Quantitative Analysis of Diverse Lactobacillus Species Present in Advanced Dental Caries. *J Clin Microbiol.* 2004; 7: 3128-3136.
9. Lanata E. Operatoria dental: estética y adhesión. Segunda ed. Buenos Aires: Grupo Guía; 2003.
10. Kidd EA, Joyston-Bechal S, Beighton D. The use of a caries detector dye during cavity preparation: a microbiological assessment. *Br Dent J.* 1993; 174(7): 245–8.
11. Banerjee A, Watson TF, Kidd EA. Dentine caries excavation: a review of current clinical techniques. *Br Dent J.* 2000; 188(9): 476–82.
12. Kidd E, Ricketts D, Beighton D. Criteria for caries removal at the enamel-dentine junction: a clinical and microbiological study. *Br Dent J.* 1996; 180: 287-291.
13. Veitía L, Acevedo A, Rojas F. Métodos convencionales y no convencionales para la detección de lesión inicial de caries, revisión bibliográfica. *Acta Odontológica Venezolana.* 2011; 49(2): 1-10.
14. Herrera M, Bonilla Represa V, Segura Egea JJ. Caries enfermedad versus caries lesión: implicaciones diagnósticas y terapéuticas según el International Caries Consensus Collaboration Group. *Endodoncia.* 2016; 34: 204-219.
15. Innes N, Frencken JE, Bjørndal L, Maltz M, Manton DJ, Ricketts D, et al. Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Terminology. *Adv Dent Res.* 2016; 28: 49–57.

16. Fusayama T. Two layers of carious dentin; diagnosis and treatment. *Oper Dent.* 1979; 4: 63-70.
17. Martínez R, Suárez C, Suárez F, Gonzales F. Técnicas de diagnóstico de la caries dental. *Boletín de la sociedad de Pediatría de Asturias.* 2006;(46): 23-31.
18. Kidd E. How “clean” must a cavity be before restoration? *Caries Res.* 2004; 38: 305–313.
19. Margulis D. *Photoshop Lab Color: The Canyon Conundrum and Other Adventures in the Most Powerful Colorspace.* ISBN. ;: p. 0-321-35678-0.
20. Labs H. *Hunter Lab Color Scale. Insight on Color.* 1996.
21. Abalos C, Herrera M, Jiménez-Planas A, Llamas R. Performance of Laser Fluorescence for Detection of Occlusal Dentinal Caries Lesions in Permanent Molars: An in vivo Study with Total Validation of the Sample. *Caries Res.* 2009;43(2):137–41.
22. Abalos C, Mendoza A, Jimenez-Planas A, Guerrero E, Chaparro A, Garcia-Godoy F. Performance of laser fluorescence for the detection of enamel caries in non-cavitated occlusal surfaces: clinical study with total validation of the sample. *Am J Dent.* 2012;25(1):44–8.
23. Abalos C, Herrera M, Bonilla V, San Martin L, Mendoza A. Laser-induced fluorescence in the diagnosis of pulp exposure and the influence of residual dentin thickness: An in vivo study. *Am J Dent.* 2015;28(2):75–80.
24. Gil-Bermejo C. Validez y Seguridad de la Dureza Clínica vs Láserfluorescencia a $\lambda=655\text{nm}$, 450nm y 405nm en el diagnóstico del Límite Cavitario: un estudio exvivo con marcadores de ADN. [TFM) us. 2018.

* * *

