



Facultad de Odontología
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



**La fluorescencia cuantitativa de la dentina
inducida por laser ($\lambda=655\text{nm}$) VS dureza
clínica, para la preparación de cavidades
mínimamente invasivas. Un estudio ex-vivo
con marcadores de ADN**

**TRABAJO DE INVESTIGACION FIN DE
GRADO DE ODONTOLOGIA**

Autor: Jaime Cohen Ovelar

Directores: Amparo Jiménez-Planas y Camilo M. Ábalos Labruzzo

Fecha de entrega: 27 de Mayo de 2015

*A mis padres Simón y Lourdes, a mi
hermana Lourdes y especialmente a
Macarena*



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

C./Avicena s.n. Sevilla 41009

Dña. Amparo Jiménez Planas, Doctora en Medicina y Cirugía, Especialista en Estomatología por la Universidad de Sevilla y Profesor Titular del Departamento de Estomatología.

D. Camilo M. Ábalos Labruzzi, Licenciado en Medicina y Cirugía, Doctor en Odontología por la Universidad de Sevilla y profesor contratado Doctor del Departamento de Estomatología.

Como directores de esta investigación **HACEN CONSTAR:**

Que el trabajo titulado *“La fluorescencia cuantitativa de la dentina inducida por laser ($\lambda=655nm$) VS dureza clínica, para la preparación de cavidades mínimamente invasivas. Un estudio ex-vivo con marcadores de ADN.”*, ha sido desarrollado por **D. Jaime Cohen Ovelar**, como Trabajo Fin de Grado, durante el quinto año de Grado en Odontología de la Universidad de Sevilla; bajo nuestra dirección, supervisión y cumpliendo con los requisitos para ser presentado para su lectura, defensa y ser juzgado por el Tribunal que en su día se designe.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firman el presente documento en Sevilla a 27 de Mayo de 2015.

Fdo. Camilo Manuel Ábalos Labruzzi

Fdo. Amparo Jiménez Planas

| AGRADACIMIENTOS

Tras varios meses de mucho esfuerzo y un trabajo apasionante me gustaría dar las gracias a varias personas sin las cuales este trabajo de investigación no hubiera sido posible:

De una manera especial a la Dra. Amparo Jiménez Planas, por la excelente dirección de este trabajo de investigación, su dedicación, enseñanza en la metodología investigadora y proporcionarme los medios necesarios, además de su apoyo y su continua supervisión.

Al Dr. Camilo Manuel Ábalos Labruzzo, por compartir sus ideas en esta línea de investigación, sus consejos, conocimientos, y por el tiempo dedicado a lo largo de todo el proyecto.

A D. Marco Rodríguez Vázquez, por su ayuda a la hora de manejar el microscopio de Epifluorescencia y por ser capaz de enseñarme lo necesario para el desarrollo de esta parte de la investigación.

Y por último quiero agradecer a mis compañeros de investigación Jose M^a Santana Miralles y Daniel Castilla Naranjo por su compañerismo y colaboración en este proyecto.

| ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN – ABSTRACT.....	6-9
2. INTRODUCCIÓN.....	10-11
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA (OBJETIVOS).....	12
4. MATERIAL Y MÉTODO.....	13
A) Preparación de las Muestras.....	13-14
B) Medición de la Fluorescencia.....	15
C) Validación mediante marcadores de ADN.....	15-17
D) Análisis Estadístico.....	18
5. RESULTADOS.....	19
6. DISCUSIÓN.....	20-22
7. CONCLUSIONES.....	23
8. BIBLIOGRAFÍA.....	24-26

| 1. RESUMEN

La Fluorescencia Inducida por Láser (LIF) es capaz de identificar la actividad metabólica bacteriana y, por tanto, diferenciar el tejido sano del enfermo. Actualmente, los métodos convencionales (dureza dentinaria y detector de caries) son subjetivos o no específicos en la determinación del Límite Cavitario sano (LC). La LIF se basa en excitar al tejido dental mediante una luz roja visible ($\lambda = 655\text{-nm}$) producida por un semiconductor láser, después de unos nano/micro segundos el tejido genera una respuesta fluorescente que es captada y medida. En el caso de existir fluoróforos bacterianos (protopofirina-IX) la respuesta del tejido enfermo es mayor y el aparato LIF detecta radiación fluorescente $\geq 680\text{ nm}$. Esta es la base de los aparatos que miden la fluorescencia de un modo cuantitativo (0-99).

El **objetivo** de esta investigación es determinar el rendimiento diagnóstico de la LIF cuantitativa (LIFc) en la determinación del LC, en comparación con la dureza clínica. Además de identificar la cantidad mínima de fluorescencia necesaria para que se active la LIF.

Material y Método: mediante un estudio con dientes permanentes ex-vivo sin pérdida de fluorescencia dental y con ausencia de dentina teñida, se fue eliminando el tejido cariado con incrementos secuenciales de 1 mm. En cada nivel se medía la LIF estimulada mediante longitud de onda ($\lambda = 655\text{nm}$) y la dureza clínica. Se obtuvieron muestras ($n=51$) representativas de todos los estratos de la caries dentinaria. La validación se realizó mediante Microscopía de Epifluorescencia (Microscopio Olympus BX61). Previamente, las muestras se marcaron con Ioduro de Propidio (marcador de ADN). Para conocer la validez y seguridad de las pruebas se analizaron la Sensibilidad (S), Especificidad (E), Valor pronóstico positivo (VPP) y negativo (VPN). También se aplicó el estadístico T de Student ($\alpha \leq 0,05$) para comparar las medias entre las áreas de fluorescencia de dentina sana y enferma.

Resultados: En la determinación del LC la LIFc muestra los siguientes valores con un punto de corte de 19: $S=0,81$ / $S_p=0,76$ / $VPP=0,77$ / $VPN=0,80$. La dureza presenta unos resultados de $S=0,55$ / $S_p=1,0$ / $VPP=1,0$ / $VPN=0,71$. Con un área media $> 126 \mu\text{m}^2$ se activa la LIF en relación con dentina enferma.

Conclusiones: En ausencia de dentina teñida, la LIF cuantitativa puede ser un elemento de ayuda en el diagnóstico del Límite Cavitario sano. Considerándolo un método objetivo y reproducible, que permite explorar la totalidad de la cavidad.

| ABSTRACT

Laser-induced fluorescence (LIF) is able to identify the bacterial metabolic activity and, therefore, differentiate the healthy tissue of the diseased tissue. Now, the conventional methods (dentin hardness and caries detector) are subjective or non-specific in determining the healthy cavity limit (LC). Laser-induced fluorescence is based on dental tissue excitation with visible red light ($\lambda=655$ nm) produced by a semiconductor laser. After a few nano- or microseconds, the tissue generates a fluorescent response that is registered and measured. In the presence of bacterial fluorophores (protoporphyrin IX), the response of the diseased tissue is greater, and the LIF system detects fluorescent radiation with wavelengths of ≥ 680 nm. This is the operating principle of those systems that measure fluorescence on a quantitative basis (with values ranging from 0-99).

The **objective** of this investigation is to determine the diagnostic performance of the quantitative LIF (LIFc) in determining the LC, compared to clinical hardness. In addition to identifying the minimum amount of fluorescence that is necessary to activate the LIF.

Material and method: By a study with permanent teeth ex-vivo without loss of dental fluorescence and absence of stained dentin, the diseased tissue was removing with sequential increments of 1 mm. At each level the LIF was measured stimulated by wavelength ($\lambda=655$ nm) and the clinical hardness. Representative samples (n=51) from all strata of dentin caries were obtained. Validation was performed by epifluorescence microscopy (Microscope Olympus BX61). Previously, the samples were stained with Propidium Iodide (DNA marker). To know the validity and safety of tests were analyzed the Sensitivity (S), Specificity (E), Positive Prognostic value (VPP) and negative (VPN). Also applied the statistical T of Student ($\alpha \leq 0,05$) to compare the means between the fluorescence areas of healthy and diseased dentin.

Results: In order to determine the LC, LIFc shows the following values with a cutoff of 19: S=0.81 / Sp=0.76 / VPP=0.77 / VPN=0.80. The hardness shows a results of S=0,55 / Sp=1,0 / VPP=1,0 / VPN=0,71. With a measure area $> 126 \mu\text{m}^2$ LIF is activated in connection with the diseased dentin.

Conclusions: In the absence of stained dentin, the LIFc can be an element of aid in the diagnosis of healthy LC. Considering, objective and reproducible method for exploring all the cavity.

| 2. INTRODUCCIÓN

La Fluorescencia Inducida por Láser (LIF) es capaz de identificar la actividad metabólica bacteriana y, por tanto, diferenciar el tejido sano del enfermo¹⁻⁵. Actualmente, los métodos convencionales (dureza dentinaria y detector de caries) son subjetivos o no específicos en la determinación del Límite Cavitario sano (LC)^{6,7}.

La LIF está basada en la excitación del tejido dental con luz roja visible (por ejemplo a una longitud de onda de 655 nm) producida por un semiconductor laser. Después de unos nano/micro segundos el tejido genera una respuesta fluorescente que es captada y medida. En presencia fluoróforos bacterianos (protopofirina-IX) la respuesta del tejido enfermo es mayor y el aparato LIF detecta radiación fluorescente \geq 680 nm. Esta es la base de los aparatos que miden la fluorescencia de un modo cuantitativo (con valores que van de 0 a 99). Los sistemas de LIFc también se han desarrollado con diferentes longitudes de onda ($\lambda=405$ y 450 nm) y están basados en el mismo principio de funcionamiento. Estos dispositivos muestran imágenes con diferentes colores que son asociados con tejido sano (verde) o tejido enfermo (naranja-rojo).

LIF ha mostrado la capacidad para evaluar el estado de la caries bacteriana de dentina en tiempo real durante la eliminación de la lesión en la operatoria dental⁷⁻¹¹. Sin embargo, existe una controversia en la Literatura. Unos estudios muestran a la LIF como eficaz y coadyuvante de los medios convencionales para establecer el punto final de la preparación cavitaria^{12,13}. Contrariamente, otras investigaciones^{1,14} indican como fuentes de fluorescencia no cariogena pueden dar falsos positivos convirtiendo a la LIF en un método no útil.

Sumado a lo anterior y revisando la literatura, la mayoría de los estudios están realizados con LIF cuantitativa a una longitud onda de 655 nm. Aunque existen algunos estudios^{2,15,16} que relacionan los valores de LIF con la presencia de mayor o menor de cantidad de bacterias, no hemos encontrado estudios que determinen el punto crítico del

nivel bacteriano necesario para que la LIF, en sus diferentes longitudes de onda, detecten la presencia actividad bacteriana para determinar el punto final de la preparación cavitaria.

Con ello podríamos ayudar a entender las limitaciones y aplicaciones de la LIF en la eliminación del tejido cariado. También su valor, como método objetivo, frente a la subjetividad del operador en la interpretación de la dureza como signo de tejido sano.

| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante la eliminación del tejido cariado disponemos actualmente de métodos subjetivos y con gran diferencia entre operadores. Por otra parte el uso de sondas con diferentes diámetros en su punta activa pueden detectar dentina blanda, donde el mismo operador, con otra sonda menos afilada, la mediría como dura. En decir, es un método con escasa reproductibilidad tanto intraoperador, como interoperador. Si añadimos que la exploración con sonda no actúa como un *scanner* de toda la superficie, sino que explora una pequeña parte deducimos que hay zonas que se quedan sin explorar. Normalmente el Clínico resuelve estos problemas extendiendo sus preparaciones a la zona de dentina hipermineralizada⁷, no correspondiendo con el Límite Cavitario real. Por tanto, preparando cavidades que rompen la máxima de la odontología mínimamente invasiva.

Con la aparición de la Fluorescencia Inducida por Láser podemos explorar en tiempo real toda la preparación cavitaria, siendo un método más objetivo y dependiendo en menor parte del operador¹⁷. Así, **el objetivo** de este estudio es investigar la presencia mínima de actividad bacteriana necesaria para que la LIF cuantitativa (655 nm), Para ello, consideramos como **hipótesis nula** que con mínima presencia de ADN bacteriano (epifluorescencia), los dispositivos de LIF cuantitativos se activan de la misma forma.

Un segundo objetivo de este estudio es valorar la Validez y Seguridad de la LIF cuantitativa en comparación con la dureza en la determinación del Límite Cavitario real, entendiendo como tal donde la actividad bacteriana es nula o mínima. Como **Hipótesis nula** formulamos que la LIF cuantitativa a $\lambda = 655$ tiene igual rendimiento diagnóstico que la dureza en la determinación del Límite Cavitario real.

| 4. MATERIAL Y MÉTODO

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 29 dientes ex-vivo, premolares y molares de diferentes pacientes, que presentaban en al menos una localización caries dentinaria sin invasión pulpar bacteriana (Fig. 1). Estas localizaciones presentaban todas las capas de la caries dentinaria, particularmente las capas que delimitan el LC: Dentina desmineralizada superficial (Infectada) y dentina profunda desmineralizada (afectada). Los dientes fueron conservados a 4°C y preparados antes de 7 días para evitar la pérdida de fluorescencia del tejido dental.



Figura 1. Capas de la caries dentinaria.

A. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Se fue eliminando el tejido cariado, con incrementos secuenciales de aproximadamente 1 mm, por el Operador 1 (OP1-JCO) hasta alcanzar distintos niveles y áreas de exploración (Fig. 2). Se obtuvieron 51 muestras representativas de los diferentes estratos de la caries dentinaria (n=51). Se midió la dureza por dos operadores experimentados OP2 y OP3, con un explorador de

caries de punta fina. Posteriormente, se midió la LIF cuantitativa a la longitud de onda de 655 nm (OP1), desconociendo el operador los valores de dureza, y se cortaron las muestras mediante una recortadora Struers Accutom-2 a nivel de las áreas de exploración (Fig. 3).

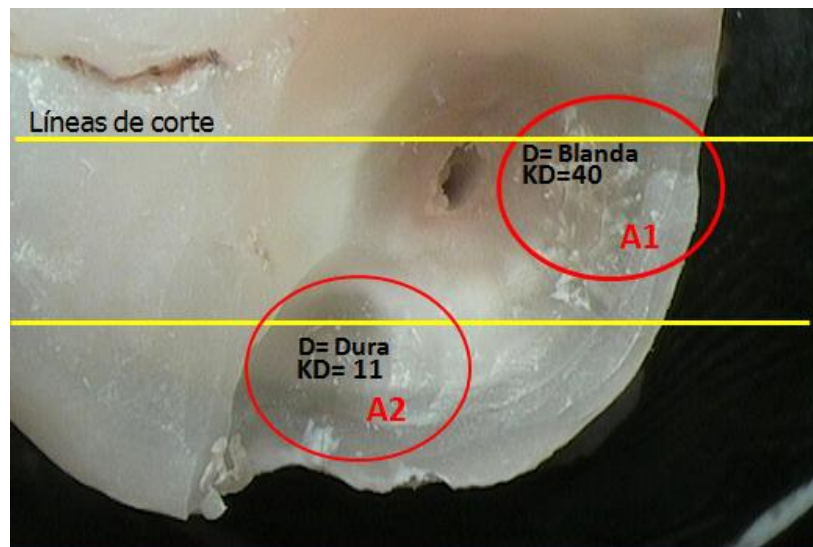


Figura 2. Áreas de estudio (A1 y A2) para medición de la dureza clínica y LIF cuantitativa ($\lambda=655$ nm) mediante el aparato KavoDIAGNODENTpen®

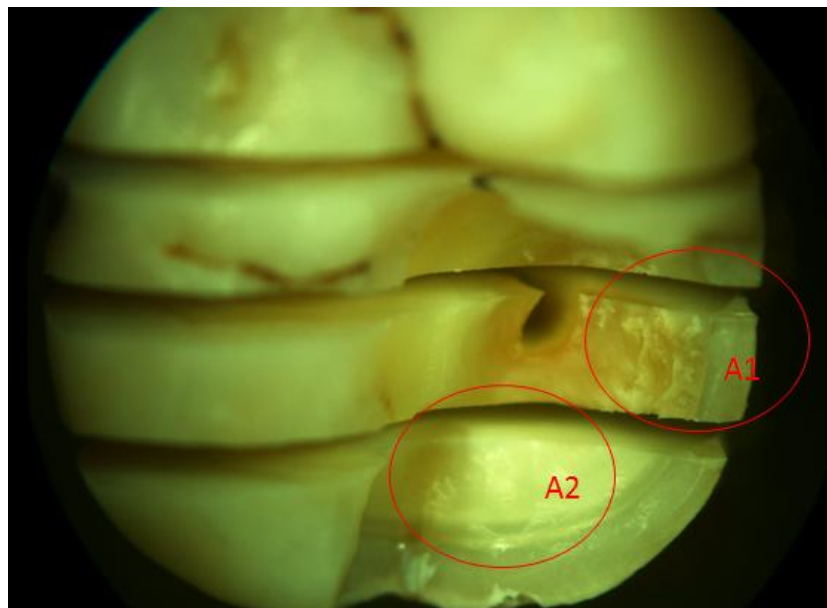


Figura 3. Diente cortado por las Áreas de exploración A1 y A2, diseñadas de la figura 2.

B. MEDICIÓN DE LA FLUORESCENCIA.

A las muestras, una vez preparadas, se les midió la fluorescencia mediante el Sistema LIF con el dispositivo KaVo DIAGNOdent pen,c (Type 2190, SN 06- 1002105) usado para el examen cuantitativo. Las mediciones se tomaron por un operador (OP1), previamente calibrado con un operador experimentado en el uso clínico de LIF (OP2), con 20 muestras que no formaron parte del estudio. Se admitieron como valores correctos ± 3 unidades de discrepancia entre OP1 y OP2. La concordancia según la aplicación del Test de Kappa (Fig. 4) fue del 0,88, acuerdo casi perfecto, según la escala de escala de Ladis y Koch¹⁸.

$$\text{kappa} = \frac{P - P_e}{1 - P_e}$$

(P) Proporción acuerdo observado; (Pe) Proporción acuerdos esperados por el azar

Figura 4. Fórmula de Análisis de concordancia de Kappa

El dispositivo de LIF fue calibrado con un estándar de cerámica proporcionado, como recomendaba el fabricante. Después, la punta periodontal ``P`` del DIAGNOdent-pen® fue posicionada perpendicular al suelo de la cavidad y el OP1 realizó tres mediciones en cada sitio, y fue calculado el valor medio.

C. VALIDACIÓN MEDIANTE MARCADORES DE ADN.

Las muestras se fijaron en alcohol (70% alcohol etílico), enjuagadas repetidamente con solución salina tamponada de fosfato, pH 7.2 (PBS) y manchadas con una concentración 1:500 de 10 mg/ml de Ioduro de Propidio como marcador de ADN. Las muestras fueron retiradas del Ioduro de Propidio, bien enjuagadas con PBS y reemplazadas por una solución de 0.01% de Thymol en la oscuridad. Se analizaron las manchas de las muestras usando un microscopio de epifluorescencia OLYMPUS BX61. Se utilizó magnificación con un objetivo x10 de aire. Mediante el software del microscopio se obtuvieron

las imágenes con distintos grados de fluorescencia correspondientes a la mayor o menor cantidad bacteriana (Fig. 5).

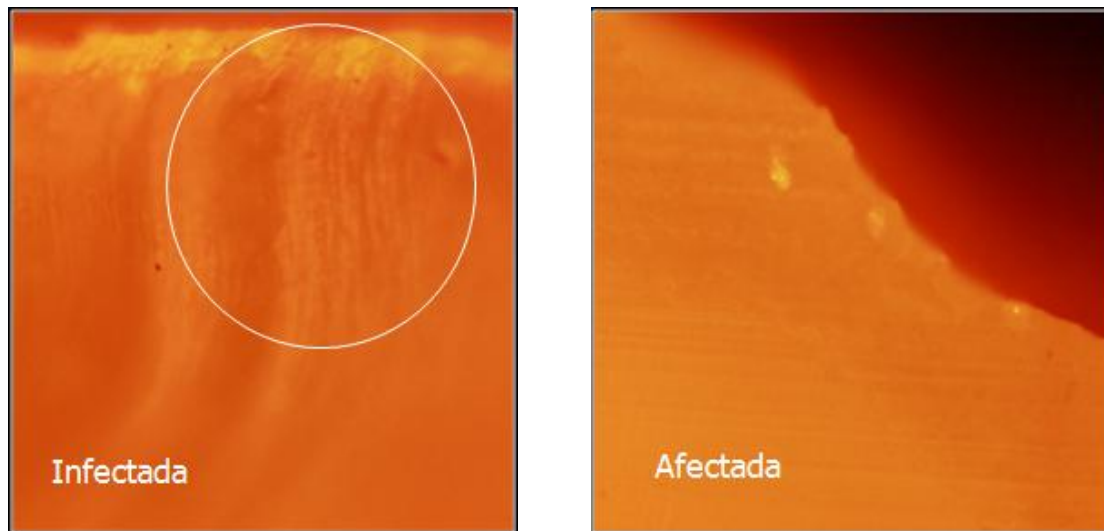


Figura 5. Imágenes del Límite Cavitario (LC) de las muestras marcadas con Ioduro de Propidio (marcador de ADN) en el microscopio de Epifluorescencia. LC con zona infectada (Izquierda); LC sano con dentina afectada (Derecha)

Se midió el área de fluorescencia de alta intensidad del Límite Cavitario mediante la superposición de una cuadrícula con celdas $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ por el OP1 (Fig. 6). Los corpúsculos se midieron por el porcentaje de área que ocupaban en la cuadrícula. Las imágenes fluorescentes lineales (túbulos con bacterias) se midieron multiplicando la longitud de las líneas por su anchura.

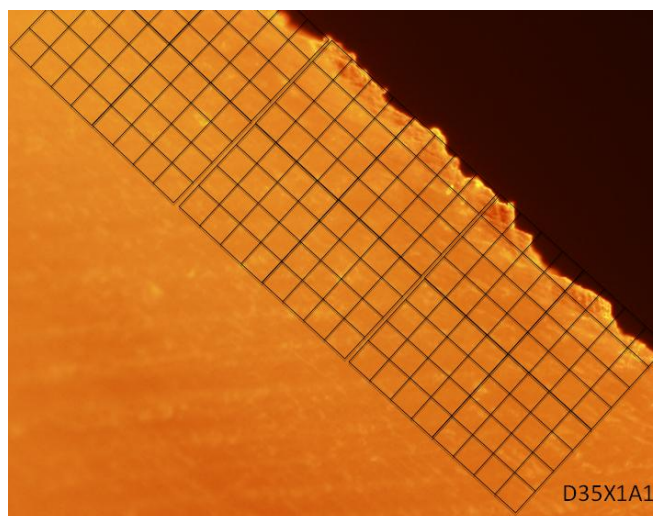


Figura 6. Cuadrícula $4.800\mu\text{m}^2$ con celdas $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ para medición de la fluorescencia corpuscular y del patrón tubular.

Para la determinación de las zonas de caries que estábamos explorando y midiendo se aplicaron los siguientes criterios:

- **Zona necrótica:** Área superficial de la caries desestructurada y sin fluorescencia o fluorescencia en corpúsculos (Fig. 6A).
- **Zona desmineralizada superficial:** Área con alta intensidad de fluorescencia. Pudiendo presentar corpúsculos y fluorescencia dentro de túbulos con forma irregular (patrón tubular). (Fig. 6B).
- **Zona desmineralizada profunda:** Fluorescencia baja o sin ella. Ausencia de corpúsculos y patrón tubular visible (Fig. 6C).
- **Zona hipermineralizada profunda:** Zona con total ausencia de fluorescencia y de coloración oscura (Fig. 6D).

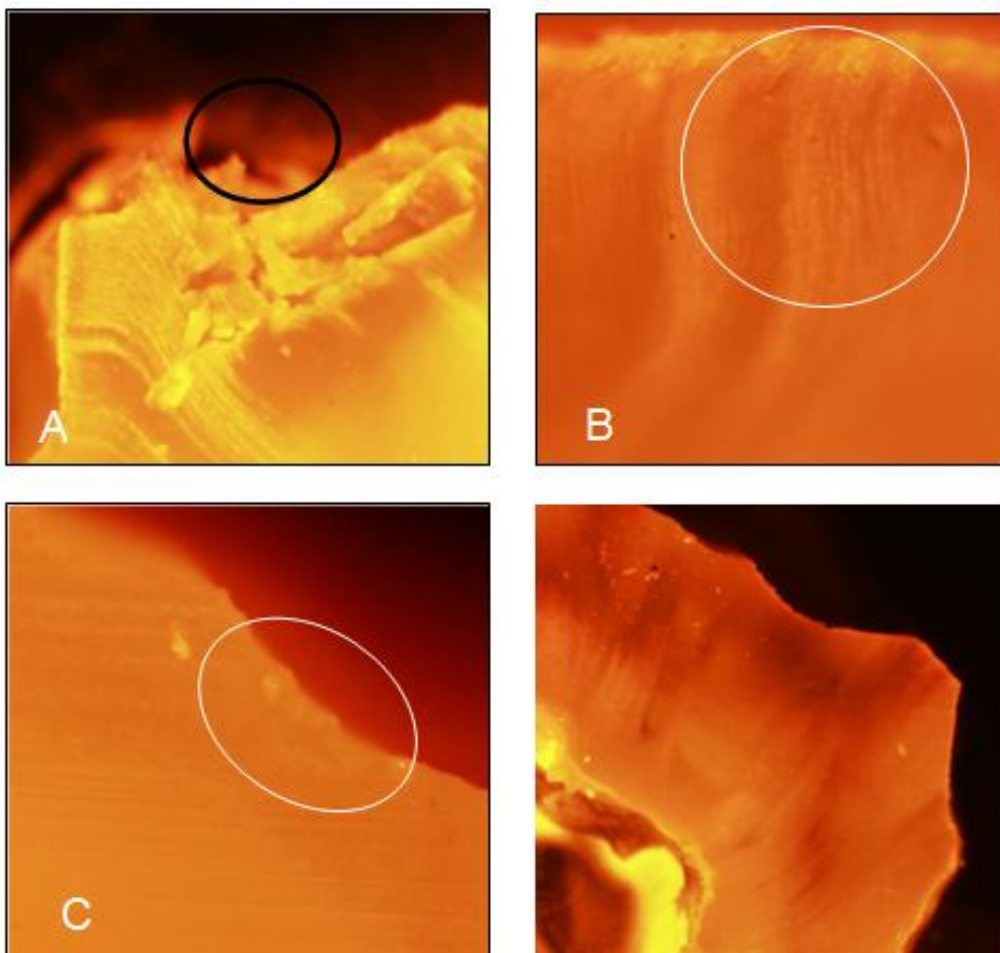


Figura 6. Imágenes de epifluorescencia de las zonas de la caries dentinaria: (A) Necrótica; (B) Desmineralizada superficial con patrón tubular y corpúsculos superficiales; (C) Desmineralizada profunda y (D) Hipermineralizada.

D. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Una vez determinado el mejor punto de corte (valor 19) para la LIF cuantitativa entre las muestras sanas y enfermas, se utilizó el análisis estadístico Test de Student para ver si existían diferencias estadísticamente significativas ($\alpha \leq 0.05$) entre las medias de las áreas con fluorescencia de las 15 muestras con menor LIFc de dentina superficial desmineralizada (infectada) y media de las 15 muestras con mayor LIFc de dentina profunda desmineralizada (afectada).

Para conocer la validez y seguridad de la pruebas se analizaron la Sensibilidad (S), Especificidad (E), Valor pronóstico positivo (VPP) y negativo (VPN). En la determinación del LC la LIFc se consideró como mejor punto de corte el valor que con la suma de la S+E presentara el valor más alto, sin pérdida substancial de la Especificidad.

| 5. RESULTADOS

Los resultados obtenidos para el primer objetivo: mínima actividad bacteriana para que la LIF cualitativa marque valores > 19 (dentina infectada), se relacionaron con un área media de $873 (45,2) \mu\text{m}^2$. La media del área ocupada por fluorescencia de las muestras con valores de $\text{LIF} \leq 19$ (dentina afectada) fue de $126 (\text{SD}=23,2) \mu\text{m}^2$, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,018$).

Respecto a la Validez y Seguridad de la LIF cuantitativa (valor de corte 19) y la Dureza Clínica para la detección de la dentina sana y enferma los resultados están expresados en la Tabla 1.

Rendimiento Diagnóstico	S	SP	VPP	VPN
Dureza*	0,55	1,00	1,00	0,71
LIF cuantitativa	0,81	0,76	0,77	0,80

(*) Hubo que descartar del estudio 12 muestras (23,5%) por falta de concordancia entre el OP2-OP3.

Tabla 1. Validez y Seguridad de las pruebas de LIF cuantitativa y Dureza Clínica en el diagnóstico del Límite Cavitario Histológico.

| 6. DISCUSIÓN

Está aceptado universalmente que la dureza de la dentina clínica es el medio para detectar en la clínica el punto final de las preparaciones cavitarias¹⁹. Este método es subjetivo y depende de la sonda de exploración empleada⁷. En este estudio observamos como la sensibilidad de la dureza es de 0,55, lo que significa que hay muestras que se interpretan como sanas, cuando realmente están enfermas. Es decir, existen un número elevado de falsos negativos. A esto hay que añadir, que hubo que descartar el 24% de las muestras pues no hubo acuerdo entre el OP2 y OP3, siendo ambos operadores expertos. No obstante, la dureza tiene una especificidad de 1, lo cual significa que todas las muestras duras eran interpretadas como sanas.

Si tenemos en cuenta que la mayoría de las obturaciones realizadas en la clínica diaria no se repiten, ni tienen que cambiarse a medio plazo porque el clínico haya dejado microorganismos viables debajo de la obturación, quiere decir que la dureza funciona. En la actualidad, bien por el empleo de la sonda de caries o por el uso de fresas especiales, que diferencian entre dentina dura y blanda, las preparaciones se dejan en dentina sana. Por lo tanto, aparentemente puede existir una contradicción entre los resultados encontrados y lo que ocurre realmente en la clínica. La explicación para esta controversia es que el Clínico, probablemente, deje sus preparaciones en la dentina hipermineralizada y de mayor dureza, de acuerdo con estudios precedentes⁷. Es decir, la dureza hipermineralizada es siempre interpretada como sana y ello es una garantía para garantizar el Límite Cavitario. Sin embargo, estas preparaciones están sobreextendidas y no reflejan el verdadero Límite Cavitario histológico, pues eliminan la capa de dentina desmineralizada profunda, más blanda, pero recuperable. En este sentido, podemos decir que la Dureza Clínica no es un buen método para determinar el verdadero Límite Cavitario y para hacer preparaciones mínimamente invasivas. Es necesario sobreextender la preparación para que funcione clínicamente la dureza.

Por otro lado, la dureza es una prueba con escasa reproductibilidad, hubo que descartar el 23,5% de las muestras por no haber acuerdo entre los operadores, en concordancia con otros estudios⁷. Durante la preparación de las muestras se dejaban a distintos niveles, dentro de las distintas capas de la caries, y se les pedía a los operadores que midieran la dureza, por ello las discrepancias. Si cada operador hubiera estando preparando la cavidad en un ámbito clínico, el operador que percibía la dureza como blanda hubiera continuado la preparación. Es decir, esta discrepancia implica que los operadores dejan las muestras a distintos niveles, pero ambos hubieran continuado hasta medirlas como duras y sanas. Explicación, en la misma dirección que la expuesta anteriormente, los Clínicos dejan las preparaciones en dentina sana (probablemente hipermineralizada⁷), pero a distintos niveles. Lo que la dureza clínica detecta difícilmente es el Límite Cavitario real, lo que es comprensible porque está entre dos dentinas desmineralizadas y por tanto con diferencias en la dureza de difícil detección clínica.

Los conceptos de sensibilidad y especificidad 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 hasta el momento sólo hemos abordado el problema en una dirección. Por medio de los valores predictivos completaremos esta información.

Cuando detectamos dentina blanda (enferma) las posibilidades de que lo esté son muy altas, ya que el VPP de la prueba es del 100% y el porcentaje de falsos positivos es muy bajo o inexistente. Sin embargo, cuando la dentina se detecta como dura, no siempre es sana. En nuestro estudio, de las muestras interpretadas como sanas sólo el 76% lo eran (VPN). Sin olvidar, que se había descartado el 23,5% de las muestras, posiblemente las más difíciles de diagnosticar, pues eran donde no había acuerdo. Lo que puede indicar que los resultados pueden ser inferiores respecto al VPN.

Como resumen, podemos decir que el Dentista debe en primer lugar tener una buena sonda de exploración con la punta afilada y de calidad. También, debe preparar las cavidades con eliminación de incrementos de dentina pequeños, sin llegar por sistema a la capa hipermineralizada, y mientras detecte dentina blanda debe eliminarla en su totalidad. Cuando llegue en la cavidad, preparada de esta forma secuencial, a encontrar dentina dura debe ayudarse de otros medios diagnósticos para asegurarse la ausencia total de dentina infectada.

Respecto a la LIF cuantitativo es un medio que se ha demostrado reproducible¹⁷ y que permite fácilmente explorar la totalidad de la cavidad. En este estudio descartamos las muestras con dentina teñida²⁰, pues está demostrado que es una fuente de fluorescencia no cariogena e induce a errores con el incremento del falsos positivos. En esto se apoyan los estudios^{1,14} que consideran a la LIF no válida como prueba para determinar el punto final en la eliminación del tejido cariado en las preparaciones cavitarias. Esta prueba, a diferencia de la dureza clínica, presenta valores de Sensibilidad adecuados (0,80) y de especificidad aceptables (0,76), para el conjunto de todas las muestras del estudio (n=51). Estos resultados están en consonancia con estudios³⁻⁵ realizados para detectar dentina enferma en el diagnóstico de caries oculta de dentina. El VPN de la LIF alto (0,80), con lo que valores de LIF por debajo de 19 se pueden considerar como dentina sana.

En resumen, la LIF la consideramos un método adecuado y coadyuvante de la dureza clínica. El clínico una vez eliminada la dentina blanda, debe aplicar la LIF cuantitativa y si obtiene valores inferiores de 19, debe dejar el límite de la cavidad en ese lugar. Sin embargo, ante valores superiores a 19 debe continuar la preparación, siempre que descarte fuentes de fluorescencia exógena como por ejemplo dentina teñida.

En cuanto al primer objetivo del estudio hemos encontrado que con áreas de infección bacteriana (fluorescencia positiva) en torno a $126 \mu\text{m}^2$ la LIF marca valores menores a 19. Es decir, la LIF se activa por encima de estos valores, pero a partir de una presencia pequeña de bacterias. Estos hallazgos están en la línea con estudios en dentina radicular^{21,22} in vitro, donde en dentina esterilizada se iban añadiendo bacterias y se iba midiendo la LIF, observando cómo los valores de LIF se incrementaban. En este estudio, hemos aportado la cuantificación por área contaminada, valores no aportados hasta ahora, a partir de los cuales la LIF indica dentina enferma.

| 7. CONCLUSIONES

- 1.- **La Dureza Clínica no muestra una buena reproductibilidad, incluso entre operadores no experimentados en el diagnóstico del Límite Cavitario.**

- 2.- **Cuando detectamos una dentina blanda podemos asegurar que está enferma y debemos eliminarla. Sin embargo, cuando la detectamos dura no podemos asegurar que está sana. Necesitando otras pruebas diagnósticas como complementarias.**

- 3.- **La Láser Fluorescencia Inducida por Láser (LIF), en ausencia de dentina teñida, es una prueba adecuada para determinar el Límite Cavitario histológico y como mínimo con el mismo rendimiento diagnóstico que la dureza clínica. Aunque debemos considerarlo como prueba coadyuvante de la Dureza Clínica.**

- 4.- **La LIF detecta la presencia de escasas bacterias con actividad metabólica, en ausencia de otras fuentes de fluorescencia no cariogena.**

| 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Lussi A, Hibst R, Paulus R. DIAGNOdent: An optical method for caries detection. *J Dent Res* 2004;83:80-83.
2. Hibst R, Paulus R, Lussi A. Detection of occlusal caries by laser fluorescence: Basic and clinical investigations. *Med Laser Appl* 2001; 16:205-213.
3. Lussi A, Megert B, Longbottom C, Reich E, Francescut P. Clinical performance of a laser fluorescence device for detection of occlusal caries lesions. *Eur J Oral Sci* 2001; 109:14-19.
4. Abalos C, Herrera M, Jimenez-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;43:137-141.
5. 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;25:44-48.
6. Fusayama T. Two layers of carious dentin; diagnosis and treatment. *Oper Dent* 1979; 4: 63-70.
7. Krause F, Braun A, Eberhard J, Jepsen S. Laser fluorescence measurements compared to electrical resistance of residual dentine in excavated cavities in vivo. *Caries Res* 2007;41:135-140.
8. Lennon A, Buchalla W, Switalski L, Stookey G. Residual caries detection using visible fluorescence. *Caries Res* 2002;36:315-319.
9. Yonemoto K, Eguro T, Maeda T, Tanaka H. Application of DIAGNOdent as a guide for removing carious dentin with Er:YAG laser. *J Dent* 2006; 34:269-276.

10. Iwami Y, Shimizu A, Narimatsu M, Hayashi M, Takeshige F, Ebisu S. Relationship between bacterial infection and evaluation using a laser fluorescence device, DIAGNOdent. *Eur J Oral Sci* 2004;112:419-423.
11. Neves AA, Coutinho E, De Munck J, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Does DIAGNOdent provide a reliable caries-removal endpoint? *J Dent* 2011;39:351-360.
12. Lennon ÁM, Buchalla W, Switalski L, Stookey GK. Residual Caries Detection Using Visible Fluorescence. *Caries Res* 2002;36:315-319.
13. Iwami Y, Shimizu A, Narimatsu M, Hayashi M, Takeshige F, Ebisu S. Relationship between bacterial infection and evaluation using a laser fluorescence device, DIAGNOdent. *Eur J Oral Sci* 2004;112:419-423.
14. Iwami Y, Shimizu A, Hayashi M, Takeshige F, Ebisu S. Relationship between colors of carious dentin and laser fluorescence evaluations in caries diagnosis. *Dent Mater J* 2006;25:584-590.
15. Walsh L, Clifford H. Changes in Diagnodent scores in smooth surface enamel carious lesions in primary teeth: A longitudinal clinical study. *J Oral Laser Appl* 2008; 8: 157-164.
16. Markowitz K, Stenvall RM, Graye M. The effect of distance and tooth structure on laser fluorescence caries detection. *Oper Dent* 2012;37:150-160.
17. Lussi A, Imwinkelried S, Pitts N, Longbottom C, Reich E. Performance and reproducibility of a laser fluorescence system for detection of occlusal caries in vitro. *Caries Res* 1999; 33:261-266.
18. Landis, J.R.; & Koch, G.G. (1977). "The measurement of observer agreement for categorical data". *Biometrics* 33 (1): 159–174.
19. Kidd EA, Ricketts DN, Beighton D. Criteria for caries removal at the enameldentine junction: A clinical and microbiological study. *Br Dent J* 1996;180:287-291.
20. Mendes FM, Pinheiro SL, Bengtson AL. Effect of alteration in organic material of the occlusal caries on DIAGNOdent readings. *Braz Oral Res* 2004; 18:141-144.

21. Ho QV, George R, Sainsbury AL, Kahler WA, Walsh LJ. Laser fluorescence assessment of the root canal using plain and conical optical fibers. *J Endod* 2010;36:119-122.
22. Sainsbury AL, Bird PS, Walsh LJ. DIAGNOdent laser fluorescence assessment of endodontic infection. *J Endod* 2009;35:1404-1407.