



Facultad de Odontología



TRABAJO FIN DE MASTER



*AGUDEZA PERCEPTIVA DE LA DUREZA CLINICA EN LA
CARIES RESIDUAL:
un estudio in vitro en dentina humana.*

*TACTILE ACUITY OF THE CLINICAL HARDNESS IN
RESIDUAL CARIES:
In vitro study in human dentine.*

Autora: MARÍA RAIGÓN GIL

TUTOR: Prof. D. Camilo M. Ábalos Labruzzo

Sevilla a 5 de junio de 2021



Departamento de Estomatología
Facultad de Odontología



Medalla y Encomienda
Orden Civil de Sanidad

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

Como director y tutor de este Trabajo Fin de Máster en la Titulación Oficial “Master de Odontología Restauradora, Estética y Funcional”, **CERTIFICA**:

Que el presente trabajo titulado “*Agudeza perceptiva de la dureza clínica en la caries residual: un estudio in vitro en dentina humana*”, ha sido realizado por **Dña. María Raigón Gil**, como Trabajo Fin de Máster, durante el curso académico 2020-2021 en la Facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla; bajo mi dirección y cumple a mi juicio, todos los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como Trabajo Fin de Master.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firmo el presente documento en Sevilla a 5 de junio de 2021.

Fdo. Camilo Manuel Ábalos Labruzzo
Tutor



Facultad de Odontología



Dña. MARÍA RAIGÓN GIL con DNI 28807576-F, alumna del MASTER EN O.
RESTAURADORA ESTÉTICA Y FUNCIONAL en Odontología de la Facultad de (Universidad de Sevilla), autora del Trabajo Fin de Master titulado:

“Agudeza perceptiva de la dureza clínica en la caries residual: un estudio in vitro en dentina humana”

DECLARA:

Que el contenido de mi trabajo, presentado para su evaluación en el Curso~~20.20.~~/~~20.21~~....., es original, de elaboración propia, y en su caso, la inclusión de fragmentos de obras ajenas de naturaleza escrita, sonora o audiovisual, así como de carácter plástico o fotográfico figurativo, de obras ya divulgadas, se han realizado a título de cita o para su análisis, comentario o juicio crítico, incorporando e indicando la fuente y el nombre del autor de la obra utilizada (Art. 32 de la Ley 2/2019 por la que semodifica el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, BOE núm. 53 de 2 de Marzo de 2019)

APERCIBIMIENTO:

Quedo advertido/a de que la inexactitud o falsedad de los datos aportados determinará la calificación de **NO APTO** y que **asumo las consecuencias legales** que pudieran derivarse de dicha actuación.

En Sevilla a 5 de junio de 2021,

Fdo. María Raigón Gil

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, tengo que agradecer al Prof. D. Camilo Ábalos Labruzzi, tutor y director de este trabajo, por ser mi Maestro en este año tan importante para mí, siendo fundamental en este punto de inflexión en mi vida profesional. Por su paciencia, dedicación, generosidad y absoluta disponibilidad. Por transmitirme inquietudes y despertar en mí el deseo de seguir investigando.

Agradecer también al Dr. D. Luciano Fernández Santiano haber sido mi Mentor desde el principio de mi andadura profesional y haber confiado en mí tan generosamente, considerándome “colega” desde el principio y ayudándome a ser mejor Dentista. Por apoyarme siempre, en lo profesional y en lo personal.

Por último, y no por ello menos importante, agradecer a Pedro, mi marido, su infinito apoyo para que pudiera desarrollar mis inquietudes. Sin él no hubiera sido posible. También tengo que pedir perdón a mis hijos, por todo el tiempo robado, aunque siempre me lo pagaron con cariño. A mis padres, que siempre confiaron en mí y a los que debo todo.

Muchas gracias a todos.

“Lo que caracteriza al hombre de ciencia no es la posesión del conocimiento o de verdades irrefutables, sino la búsqueda desinteresada e incesante de la verdad”

Karl Popper

INDICE

| | |
|-------------------------------------|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| I. INTRODUCCIÓN | 3 |
| ▪ La caries dental | 3 |
| ▪ El Límite cavitario | 6 |
| II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 11 |
| III. MATERIAL Y MÉTODO..... | 13 |
| IV. RESULTADOS..... | 19 |
| V. DISCUSION..... | 21 |
| VI. CONCLUSIONES | 26 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA..... | 27 |

* * *

RESUMEN

Objetivos: Determinar la capacidad perceptiva del dentista para discriminar mediante la dureza clínica las capas de la caries dentinaria, el límite cavitario y conocer la concordancia intraoperador.

Material y método: En un estudio previo se determinó la microdureza de las capas dentinarias de la caries de dentina y el límite cavitario. Se fabricaron muestras de dentina humana homogéneas en cuanto a la microdureza y se desmineralizaron para simular durezas similares al límite cavitario y a la caries de dentina. Los dentistas que formaron parte del estudio eran conocedores de los conceptos actuales de la caries dentinaria y de la forma de medir la dureza.

Resultados: La capacidad discriminativa del dentista es superior a intervalos de 35HV lo que no permite diferenciar aceptablemente entre las capas dentinarias de la caries. La concordancia intraoperador era moderada, según la escala de Landis y Koch.

Conclusiones: La dureza no es una prueba específica para determinar la dureza clínica de la caries dentinaria y debe utilizarse en combinación con otras pruebas que informen del estado del colágeno y la presencia de bacterias.

ABSTRACT

Objectives: To determine the dentist's perceptual ability to discriminate the dentin caries layers by clinical hardness, the cavity limit and to know the intraoperator concordance.

Methods: In a previous study, the microhardness of dentin caries layers and the cavity limit were determined. Homogeneous human dentin samples were fabricated in terms of microhardness and were demineralized to simulate hardnesses similar to the cavity limit and dentin caries. The dentists who were part of the study were knowledgeable about current concepts of dentin caries and how to measure hardness.

Results: The dentist's discriminative ability is higher at intervals of 35HV, which does not allow acceptable differentiation between dentin caries layers. Intraoperator agreement was moderate, according to the Landis and Koch scale.

Conclusions: Hardness is not a specific test to determine the clinical hardness of dentin caries and should be used in combination with other tests reporting collagen status and the presence of bacteria.

I. INTRODUCCIÓN

1. LA CARIES DENTAL.

1.1 Definición actual de caries. Controversia.

A lo largo de la historia, la enfermedad dental ha sido motivo de preocupación, como demuestran registros arqueológicos de primitivos intentos de eliminación de caries hace 14.000 años, aunque sin relleno de la cavidad. Desde los Sumerios, con la teoría vermicular del gusano (5.000 a.C.), hasta la edad moderna, con diversas teorías, todas las civilizaciones han intentado explicar el origen de la caries y el dolor dental.

Actualmente, la teoría aceptada por consenso tras una reunión de 21 expertos de 12 países, en la International Caries Consensus Collaboration (ICCC) en 2015, es que la caries dental se produce como resultado de un cambio ecológico en la biopelícula dental, de una población equilibrada de microorganismos a otra en la que el consumo frecuente de carbohidratos dietéticos fermentables ayuda a desarrollar y mantener una población microbiológica acidógena, acidúrica y cariogénica. Esto se asocia con un desequilibrio entre la desmineralización y la remineralización, que conlleva a una pérdida neta de minerales dentro de los tejidos duros dentales y que es el signo y síntoma de una lesión cariosa (Schwendicke, Frencken, Bjørndal, 2016).

Según esto, la caries dental no es una enfermedad infecciosa que se pueda “curar” eliminando bacterias, sino que se puede controlar modificando otros factores, como son los carbohidratos fermentables y la presencia y maduración de biopelículas dentales bacterianas. Por lo tanto, tras comprobar en varios estudios (Schwendicke, 2016) que con el sellado hermético de la cavidad el número de bacterias viables, que quedan a largo plazo en las proximidades de la pulpa, no parece aumentar o en comparación con aquellas tratadas de forma tradicional, se considera que la remoción del tejido cariado por la simple eliminación de bacterias es sobretratamiento.

En la misma dirección, la posición de la Sociedad Europea de Endodoncia (ESE) (Duncan et al., 2019) sobre el manejo de la caries profunda y la pulpa expuesta es la de

conservar la pulpa en un estado saludable con vitalidad sostenida, prevenir la periodontitis apical y desarrollar terapias de base biológica mínimamente invasivas.

Sin embargo, hay estudios (Schweickl H, Buchalla W, Krifka S, 2017) (Chin-LoHahn, Frederick R. Liewehr, 2007) que sugieren que, aunque al sellar la caries podría terminar con la acidificación, al verse las bacterias privadas de carbohidratos, las moléculas unidas a su membrana, como el lipopolisacárido (LPS), que se encuentran en organismos gramnegativos o el ácido lipoteicoico (LTA), liberado por bacterias grampositivas, probablemente sean activas independientemente de la vitalidad de los microorganismos. La respuesta inflamatoria de la pulpa frente a las bacterias o estas moléculas (LPS Y LTA), que invaden los túbulos dentinarios, va a depender del espesor de dentina restante y de la permeabilidad tubular. Se ha demostrado experimentalmente (Demant S, Dabelsteen S, Bjørndal L., 2021) que dejar microorganismos, vivos o muertos, puede generar un depósito de endotoxinas que causen una inflamación pulpar crónica, incluso sin haber contacto directo con la pulpa, ya que estos metabolitos pueden difundir a través de los túbulos dentinarios.

Apoyando esta teoría, que contradice a la formalmente aprobada por la ICCC (Schwendicke, 2016), Ricucci (2019) publicó un artículo donde la teoría de dejar dentina blanda infectada en la parte más profunda de la cavidad para evitar la exposición pulpar debe ser cuestionada desde el punto de vista biológico. Ricucci (2019) plantea que dejar dentina blanda infectada es análogo a dejar bacterias o permitir que éstas colonicen la proximidad de una herida quirúrgica, lo que mantendría la inflamación y podría provocar necrosis. Mantiene que la microbiota de las zonas más profundas de la caries está formada por bacterias anaerobias asacarolíticas, que podrían nutrirse a partir de proteínas y glicoproteínas del colágeno desmineralizado de la dentina y de los fluidos del tejido pulpar que se infiltran en los túbulos dentinarios. Las bacterias residuales podrían mantener la inflamación y lesión de la pulpa. Además, la no eliminación completa de la caries impediría la observación de la verdadera extensión de la caries, el aspecto del tejido pulpar expuesto que se eliminaría de forma mecánica con excavadores de caries, excluyendo así la posibilidad de exposición accidental, la presencia de necrosis y la cantidad de sangrado pulpar. La barrera dentinaria sólo se forma cuando disminuyen la infección e inflamación pulpar.

Así mismo, los estudios de Demant S, (2021) de caries profundas o muy profundas, demuestran que, si bien hay presencia de bacterias en dentina primaria en caries profundas, en el caso de caries muy profundas a nivel radiográfico, las bacterias alcanzan la pulpa, con un infiltrado inflamatorio y necrosis parcial posterior.

Existiendo controversia en cuanto al tratamiento de la caries muy profunda por lo anteriormente expuesto y múltiples estudios en los que se pone de manifiesto que un porcentaje alto de odontólogos no sigue el enfoque más conservador vigente (Crespo-Gallardo et al., 2018) (Jeggle LM, Baker SR, Schwendicke F., 2019) (Koopaei MM, Inglehart MR, McDonald N, Fontana M. J Am., 2017) (Schwendicke et al., 2017), parece importante determinar correctamente aspectos como la dureza de la dentina en la determinación del límite cavitario, principalmente en aquellos casos que generan controversia, como son los dientes con caries profundas y diagnóstico de pulpitis reversible.

1.2. Histopatología de la caries dentinaria.

La lesión de caries dentinaria activa se divide, desde el exterior al interior, en cuatro zonas:

- **Zona necrótica:** clínicamente blanda, completamente invadida por microorganismos, causantes de la ausencia de estructura tubular en la misma y presencia de material granuloso correspondiente a restos necróticos tisulares y bacterias.
- **Zona de desmineralización superficial:** también están presentes microorganismos y, aunque suele mantener íntegra la matriz orgánica, la estructura tubular está deformada. En esta zona están presentes los focos de licuefacción, agrupaciones de túbulos dentinarios repletos de bacterias.
- **Zona de desmineralización profunda:** carece de microorganismos y de componentes inorgánicos, siendo ésta última su única desigualdad con la dentina sana.
- **Zona hipermineralizada:** es la más profunda de todas. En ésta, la luz de los túbulos dentinarios está completa o parcialmente obliterada por cristales de hidroxapatita y whitlockita.

La zona necrótica y la zona de desmineralización superficial forman la dentina tradicionalmente no recuperable, caracterizada por su alto contenido de microorganismos; y la zona de desmineralización profunda junto a la zona hipermineralizada constituye la dentina afectada y de dentina recuperable.

2. EL LÍMITE CAVITARIO.

Se puede definir la dureza como la resistencia de un material o cuerpo a ser indentado por otro. Con una sonda exploradora podremos obtener información sobre la dureza de la dentina y establecer una correspondencia con su grado de afectación cariosa. Tanto la ICCC (2015) como la Sociedad Europea de Endodoncia (2019) (ESE), aprueban y definen cuatro estados diferentes de la dentina (Duncan, 2019) (Schwendicke, 2016):

- **Dentina blanda:** se deforma cuando se presiona un instrumento duro sobre ella y se puede levantar fácilmente con poca fuerza. Se corresponde con dentina necrótica.
- **Dentina correosa:** la dentina no se deforma cuando se presiona un instrumento sobre ella, pero sí se puede levantar fácilmente sin mucha fuerza. Puede haber poca diferencia entre la dentina correosa y firme, siendo un estado de transición entre la dentina blanda y la firme, correspondiendo a dentina desmineralizada.
- **Dentina firme:** es resistente a la deformación y hay que ejercer cierta presión para levantarla. Se corresponde con dentina esclerótica.
- **Dentina dura:** debe ser sólida y resistente a la penetración de la sonda y el rayado, teniendo que ser el instrumento empleado afilado para enganchar dentina. Se puede escuchar el chirrido dentinario al pasar la sonda recta sobre ella. Se corresponde con dentina sana.

Según la definición de caries aceptada actualmente por diferentes sociedades mencionadas anteriormente, el límite cavitario va a venir definido según la profundidad de la caries, siendo la definición de caries profunda o muy profunda la siguiente (Duncan, 2019):

- **Caries profunda:** caries que llega al cuarto interno de la dentina, pero con una zona de dentina dura o firme entre la caries y la pulpa, que es detectable

radiográficamente cuando se localiza en una superficie proximal u oclusal. Existe el riesgo de exposición pulpar durante el procedimiento operatorio.

- **Caries extremadamente profunda:** caries que penetra en todo el espesor de la dentina, detectable radiográficamente cuando se localiza en una superficie proximal u oclusal. La exposición de la pulpa es inevitable durante el procedimiento operatorio.

Las teorías actuales mantienen que debe hacerse una extracción selectiva del tejido cariado, dejando dentina blanda o firme sobre la cara pulpar de la caries y eliminando hasta dentina dura en dentina cariada periférica, para conseguir un correcto sellado de la cavidad. Hoy día, la extirpación no selectiva de la caries no está considerado tratamiento de elección en el manejo de lesiones cariosas profundas, siendo considerado sobretratamiento (Duncan, 2019) (Schwendicke, 2016).

2.1 Métodos diagnósticos empleados en la detección del límite cavitario.

2.2.1. Inspección táctil con sonda de caries.

El hecho de que las bacterias que producen la caries ocasionen la desmineralización de la dentina, con la consecuente pérdida de dureza, permite establecer una correspondencia entre la percepción táctil de la dureza de la dentina y la zona de la caries a nivel histopatológico. Es el método más usado en odontología, ya que no requiere el uso de equipos sofisticados ni otras sustancias, siendo un método de bajo costo y fácil aplicación. Sin embargo, este método de detección del límite cavitario es subjetivo, ya que depende del operador, del tipo de sonda utilizada y habitualmente no se realiza una exploración de toda la superficie de la cavidad, con lo que constituye un método de escasa reproductibilidad entre operadores e incluso en el mismo operador.

2.2.2. Detector de caries.

Fusayama (1972) desarrolló una técnica de tinción, en la que en principio utilizó fucsina, que teñía de rojo la dentina infectada, permitiendo, en principio, diferenciarla de la afectada. Más tarde, se vio que la fucsina era un compuesto cancerígeno y se

cambió por rojo ácido al 1% en propilenglicol (Caries Detector, Kurakay Noritake Dental). Con esta técnica, la dentina infectada se tiñe de rojo, la afectada de rosa claro y la dentina sana no se mancha. Sin embargo, esto puede resultar subjetivo e impreciso.

El detector de caries se basa en la unión molecular a las proteínas de las fibras de colágeno expuesto y roto tras la desmineralización de la hidroxiapatita por el ataque ácido de las bacterias, no pudiéndose remineralizar la dentina (Fusayama T., 1979). Sin embargo, el detector de caries no es específico de esta unión y puede dar falsos positivos. Hay estudios (Lennon AM, Attin T, Buchalla W., 2007) que informan de una eliminación excesiva de dentina con el empleo de este método y generalmente, se recomienda dejar dentina teñida de rosa claro. Sin embargo, es ambigua esa discriminación de color. Para evitar esto, se ha propuesto el uso de detectores de caries con polipropilenglicol, que tiene un peso molecular más alto (300 frente a 76), permitiendo una menor difusión del producto a través de superficies porosas y obteniendo mejores resultados (Hosoya Y, Taguchi T, Arita S, Tay FR., 2008). El detector de caries parece controlar la capacidad de teñido de la dentina basándose en la viscosidad del disolvente (Kobayashi et al., 2019).

2.3.3. *Laserfluorescencia (LIF).*

Según la longitud de onda empleada para hacer la medición, distinguimos tres tipos de dispositivos (Macey et al., 2020):

- Fluorescencia roja: estos dispositivos utilizan un pequeño láser con una longitud de onda de excitación superior a 655 nm. La punta del dispositivo emite la luz de excitación y recoge la fluorescencia resultante. El tejido cariado presenta productos metabólicos bacterianos (porfirinas) que son fluoróforos, generando más fluorescencia emitida que los tejidos sanos. Un ejemplo de este tipo de dispositivos es el DIAGNOdent[®], que es una LIF cuantitativa (0-99).
- Fluorescencia azul: estos dispositivos operan a longitudes de onda entre 400 nm y 450 nm en el extremo azul / violeta del espectro de luz visible y crean luminiscencia en regiones donde hay actividad bacteriana que a menudo es indicativa de caries dental; mientras que las áreas sanas o sanas del diente

continúan con una fluorescencia verde. Un ejemplo es el VistaProof® o Siroinspect®, que una LIF cualitativa.

- Fluorescencia verde: incluye dispositivos que usan QLF, que se basan en las características de la fluorescencia en el extremo verde-amarillo del espectro (370 nm). Esto se emite o refracta al dispositivo y se toma una medición, que por definición es la "fluorescencia cuantitativa inducida por la luz" del diente y se puede medir en términos de una pérdida promedio de fluorescencia que denota la profundidad de la lesión. Es una LIF cualitativa.

Debemos tener en cuenta ciertas limitaciones de la LIF: mayor fluorescencia de los dientes oscuros frente a los blancos; los restos de placa, que pueden producir fluorescencia roja (Macey et al., 2020), o de contenido orgánico, las manchas, el grado de deshidratación en el diente, obturaciones de composite o restos de pasta de pulido pueden aumentar las lecturas de LIF, por ser fuentes de fluorescencia no cariogena y, por tanto, causar falsos positivos. También, el modo de colocar y rotar la punta de la sonda sobre la superficie oclusal y el calibrado tiene que ser cuidadoso, pues afecta a las mediciones, en este caso con falsos negativos. Además, en los estudios in vitro, variables como el modo de conservación de los dientes o las alteraciones en el contenido orgánico tras la extracción de los dientes son factores importantes en la alteración de la fluorescencia del tejido dental por lo que presentan resultados no extrapolables a las condiciones in vivo. Es preciso, por tanto, calibrar el sistema de LIF antes de la medición.

En el tratamiento de la caries existe controversia sobre la utilidad de la LIF como método diagnóstico para la detección del límite cavitario real, zona entre la dentina superficial desmineralizada (enferma) y dentina desmineralizada profunda (sana). Por otra parte, sabemos que la proximidad del tejido pulpar puede dar a lugar a fluorescencia no cariogena y de esta forma conducir al error en las medidas de la LIF cuando la técnica es usada para establecer el límite cavitario real de la preparación. Por este motivo, se considera la laserfluorescencia una técnica coadyuvante en la detección de la caries (Ábalos, 2015).

Por tanto, en todas estas cuestiones respecto al límite cavitario y a la caries residual, nos planteamos las siguientes preguntas, respecto a la dureza clínica:

- ¿Es detectable por el observador las distintas durezas de las diferentes zonas de la caries dentinaria, para poder determinar la zona de la caries residual?
- Si existen diferentes durezas entre las diferentes zonas, ¿qué magnitud tiene cada capa y, por tanto, por cuánto se diferencian?
- ¿Tiene el odontólogo la suficiente agudeza perceptiva de la dureza clínica en la dentina humana?

Para responder estas preguntas, planteamos un estudio piloto de investigación in vitro con muestras de dentina humana, para valorar la agudeza perceptiva del operador al testar la dentina clínicamente.

* * *

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La dureza de la dentina está relacionada con su grado de mineralización, sin tener relación directa con el número de bacterias, ni con el grado de afectación del colágeno. Si bien los ácidos del metabolismo bacteriano producen desmineralización y afectación del colágeno. Es aceptado universalmente que durante la eliminación del tejido cariado la dureza de la dentina es el signo clínico para determinar el estado de dentina recuperable/no recuperable (Límite Cavitario). Sin embargo, existen varios inconvenientes, relacionados con el operador, el instrumento y la forma de explorar, que se deben tener en cuenta:

1. La percepción subjetiva entre los diferentes grados de dureza de la dentina puede variar entre clínicos.
2. Una sonda afilada puede dar una percepción diferente, al explorar la dureza, que una sonda roma. No existiendo, habitualmente, homogenización del instrumento para la exploración.
3. Cuando se explora con la sonda de caries una cavidad se hace en una zona pequeña respecto a la totalidad de la superficie, no es un scanner, por lo que quedan zonas sin explorar.

Estas cuestiones deben ser tenidas en cuenta y deben estudiarse. Además de aquellos factores que influyan en la dureza y en su interpretación clínica. En esta dirección, un estudio previo por el grupo de investigación CTS-397 de esta Facultad, ha identificado las capas de caries dentinaria mediante un estudio con epifluorescencia y marcadores de ADN con yoduro de propidio. Midiéndose objetivamente, en estas capas, la microdureza Vickers mediante un microdurómetro y los intervalos de microdureza entre capas de la caries dentinaria. Posteriormente, se estableció la agudeza perceptiva de Dentistas experimentados versus no experimentados (Ramírez Ruiz, B. 2018) para saber si podrían discriminar las durezas entre capas y, por tanto, su identificación con

esta prueba clínica. Sin embargo, este último estudio se realizó con muestras de composite de distintas durezas, similares a las encontradas en las capas de la caries dentinaria.

Este estudio previo indicaba el grado de percepción táctil, mediante sonda de caries, para detectar los intervalos de dureza. Sin embargo, el discriminar distintos grados de dureza en muestras de composite podría establecer un sesgo al no hacerse en dentina humana con textura diferente. Es por lo que este Trabajo de Fin de Máster, a modo de estudio piloto, está justificado y destinado a comprobar si los resultados obtenidos en composite son similares a los obtenidos en dentina humana exvivo.

Los **objetivos** de este estudio son los siguientes:

1. Determinar el grado de percepción táctil, mediante sonda, de la dureza clínica dentinaria en dentina hipermineralizada, desmineralizada profunda y superficial por Dentistas.
2. Determinar la agudeza perceptiva discriminativa para intervalos de dureza de 15, 20 y 35 HVN en dentina humana.
3. Determinar la capacidad para detectar la capa del límite cavitario libre de bacterias en dentina humana.
4. Conocer la concordancia intraoperador en la determinación de la dureza clínica de las capas de la caries dentinaria y del límite cavitario en dentina humana.

Para ello, hemos desarrollado la siguientes **Hipótesis Nulas**:

- 1.- “La percepción clínica de la dureza es igual para determinar las distintas capas dentinarias de la caries dental. También, es igual a intervalos de dureza de 15, 20 y 35 HVN”.
- 2.- “La percepción clínica de la dureza de la capa del límite cavitario –dentina profunda desmineralizada, es igual al resto de las capas”.
- 3.- “Las mediciones por el mismo operador de la dureza clínica, son iguales en mediciones realizadas con una diferencia de tiempo de una semana”.

* * *

III. MATERIAL Y MÉTODO

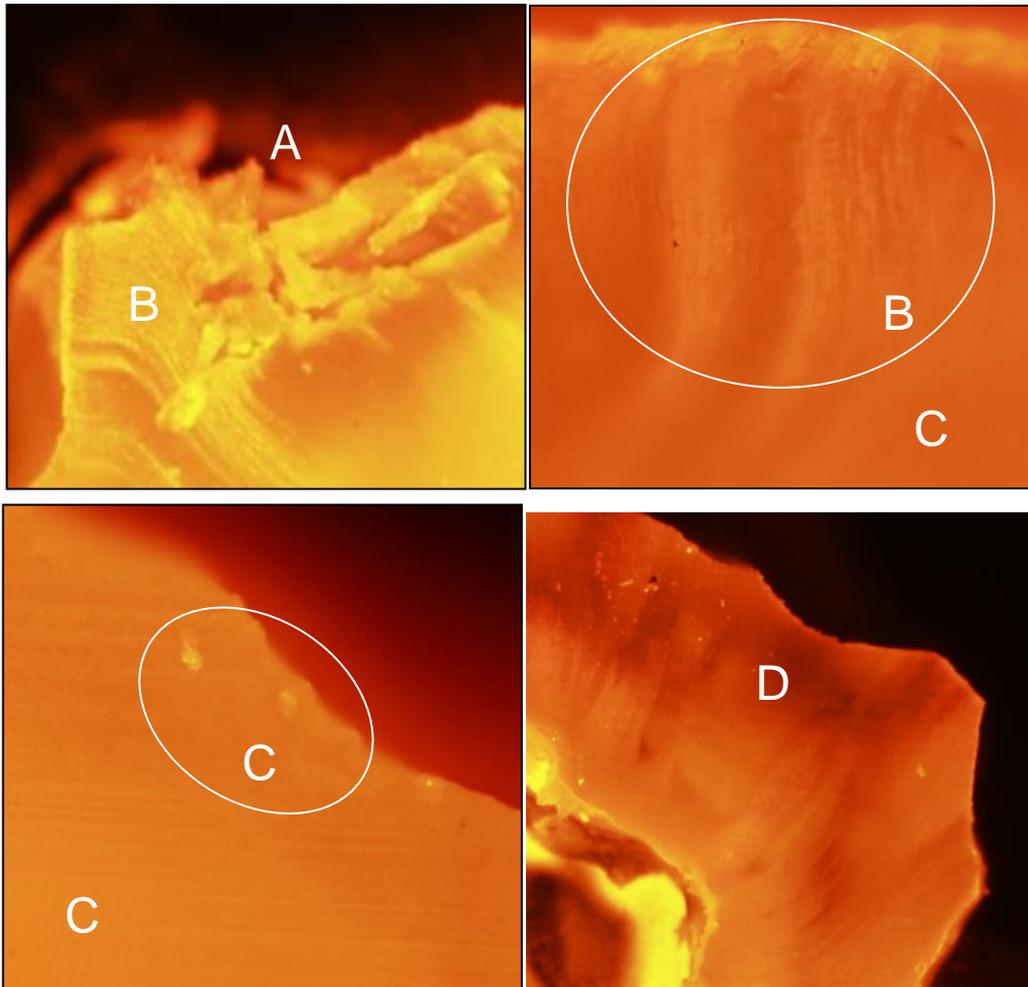
Este estudio, dentro de la Línea de investigación diagnóstico y tratamiento de la caries por el grupo de investigación CTS-397, cuenta con la aprobación del Comité Ético de la Universidad de Sevilla.

1. HISTOLOGÍA

En un estudio previo se determinaron las capas de caries dentinaria mediante un marcador de ADN- Ioduro de Propidio 10 mg/ml [1:500]. Las muestras marcadas fueron analizadas usando un microscopio de epifluorescencia OLYMPUS BX61, x10 en aire. Un observador experimentado selecciono en cada muestra las áreas correspondientes a las cuatro capas de la caries bacteriana (Fig. 1), según los siguientes criterios:

- **Zona necrótica:** área superficial de la caries desestructurada y sin fluorescencia.
- **Zona desmineralizada superficial (Ds):** 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 (Dp):** área contigua a la capa anterior con una marcada pérdida de fluorescencia o sin ella. Ausencia de corpúsculos y ausencia de patrón tubular visible.
- **Zona hipermineralizada (Dm):** zona contigua a la anterior, más profunda, con total ausencia de fluorescencia y de coloración oscura.

Figura 1. 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).



2. MICRODUREZA

En este estudio previo, se determinó la microdureza de las diferentes zonas de la caries dentinaria: *dentina hipermineralizada*, *profunda desmineralizada* y *dentina superficial desmineralizada*. En el análisis de la microdureza para las distintas capas de la caries de dentina se obtuvieron valores promedio con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), tanto para las capas que diferencian el Límite Cavitario Histológico, como para cada una de las capas en comparación con el resto (Tabla 1).

Tabla 1. Dureza de las capas de la caries dentinaria

| ZONA CRIES DENTINARIA | RECUPERABLE (R) NO RECUPERABLE (NR) | MEDIA | SD* | ANOVA ** Sig. con: |
|--------------------------------|--|-------|-----|-----------------------|
| 1. Necrótica | NR | 16,9 | 7,1 | 2, 3 y 4 |
| 2. Desmineralizada Superficial | NR | 40,5 | 6,6 | 1, 3 y 4 |
| 3. Desmineralizada Profunda | R | 54,3 | 6,6 | 1. 2 y 4 |
| 4. Hupermineralizada | R | 73,9 | 5,4 | 1, 2 y 4 |

* (SD)Desviación Standard / **Significación estadístico ANOVA, Corrección Bonferroni (p<0,05)

3. MEDICIÓN DE LA DUREZA CLÍNICA.

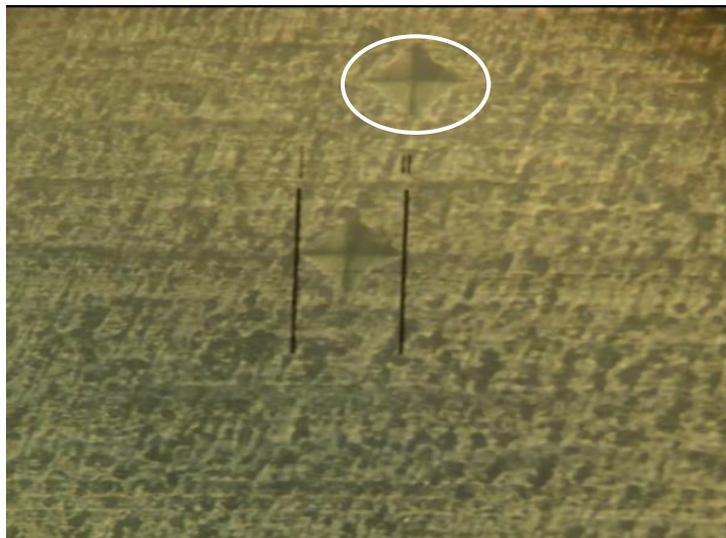
Una vez determinados los valores de microdureza para las distintas capas de la caries dentinaria, se fabricaron muestras de dentina con durezas similares a las capas Ds, Dp y Dm.

Para la fabricación de las muestras, dientes exvivo fueron introducidos en bloques de resina y cortados por líneas de corte seleccionadas en espesores de ≥ 3 mm usando la recortadora Struers Accutom-2 (Roper Technologies, Inc. Florida, USA), hasta obtener las muestras visualmente aceptables (Fig. 2). Las muestras se pulían usando discos de papel de silicona de carburo con tamaño de grano de 320, 600, 1200. (Struers Silicon Carbure). Las muestras se sometieron al test de microdureza de Vickers, mediante el durómetro Duramin Struers (Roper Technologies, Inc. Florida, USA), cada muestra se indentó con una punta piramidal y con una carga de 490,3 mN durante 15sg. Las indentaciones se realizaron en 5 áreas diferentes y con tres indentaciones por área. Posteriormente, previa calibración del test de medida, se medían las diagonales vertical y horizontal (Fig. 3).

Figura 2. Muestras incluidas en bloques de resina para la selección de áreas.



Figura 3. Identaciones piramidales tipo Vickers sobre dentina. Medida de la longitud de la línea horizontal en la indentación inferior.



Se incluyeron aquellas muestras con una dureza homogénea en las cinco áreas ($<\pm 3$ HV entre áreas). Las muestras se sumergieron en peróxido de hidrógeno 4,9% p/p en tiempos arbitrarios y secuenciales hasta obtener 3 dientes con dentina expuesta y

con una dureza promedio de 39,9 HV (SD= 2,1), 53,6 HV (SD=2,4) y 74,2 (SD:2,8), respectivamente.

4. OPERADORES.

La promoción 2020-21 de Dentistas del Master Oficial de Odontología Estética y Funcional de la Facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla (n=18), se les pidió que midieran la dureza de las muestras seleccionadas con una sonda doble Hu-Friedy extu 17/23 (Mfo.Co.ILL, USA) por su extremo #23, señalando la dureza de mayor a menor. También, se les pidió que identificaran la capa de Dentina Profunda Desmineralizada. La misma operación se les pidió con una semana de diferencia para medir la concordancia intraoperador. Los odontólogos que han formado parte de este estudio tiene conocimientos actualizados en la definición actual de caries y el consenso existente en la determinación del Límite Cavitario.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para conocer la capacidad de discriminación clínica de la dureza se calculó el porcentaje de aciertos/errores para cada intervalo desde el 15HV, 20HV y 35 HV. Estos valores se corresponden con las capas Ds, Dp y Dm, calculándose el porcentaje aciertos/errores para cada capa. Para la determinación del límite cavitario en la zona ausente de bacterias (Dp) también se calculó el porcentaje de aciertos/errores. La misma operación se les pidió con una semana de diferencia para medir la concordancia intraoperador de acuerdo a la siguiente fórmula del Análisis de concordancia de Kappa de Cohen.

$$\text{Kappa} = \frac{P - Pe}{1 - Pe}$$

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

Para interpretar la concordancia intraoperador se aplicó la escala de la escala de escala de Ladis y Koch (1977) (Tabla 2).

Tabla 2. Escala de Ladis y Koch (1977) para la interpretación de la concordancia intraoperador.

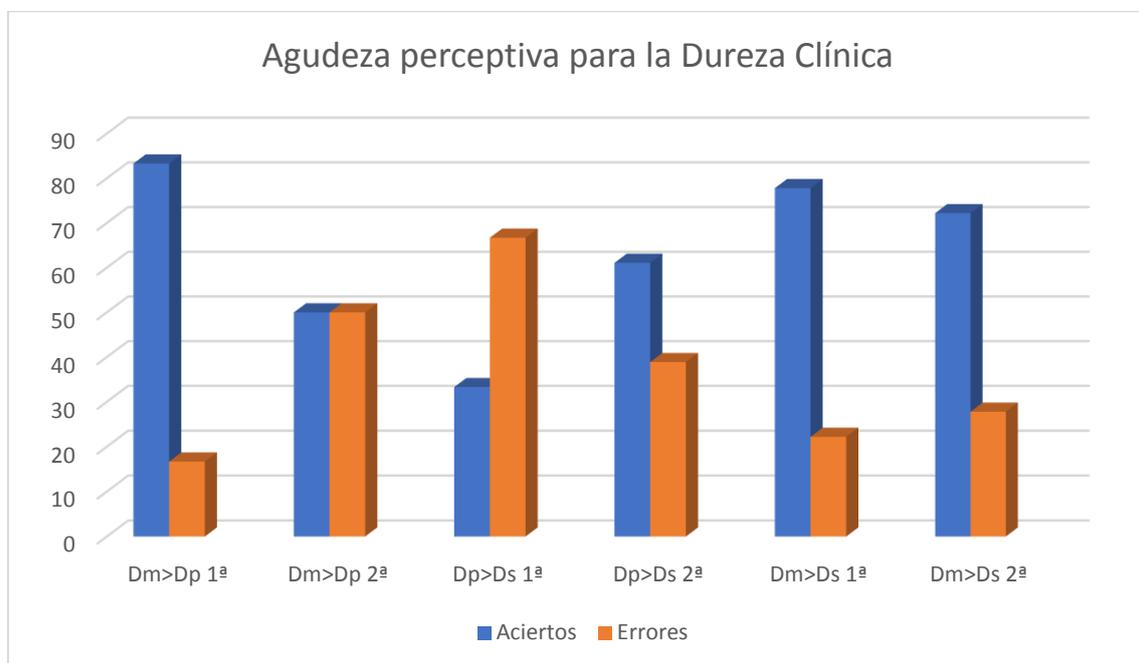
| Kappa | Estimación del grado de acuerdo |
|--------------|--|
| <0.0 | No acuerdo |
| 0.0-0.2 | Insignificante |
| 0.2-0.4 | Bajo |
| 0.4-0.6 | Moderado |
| 0.6-0.8 | Bueno |
| 0.8-1.0 | Muy bueno |

* * *

IV. RESULTADOS

Los porcentajes de aciertos/ errores para la diferenciación entre capas, tanto en la primera medida como en la segunda, están representadas en la Figura 4.

Figura 4. Porcentaje de aciertos/errores (1ª y 2ª medida) en la discriminación de distintos intervalos de dureza clínica.



Dentina hipermineralizada (Dm), Dentina Profunda (Dp) y Dentina superficial (Ds).

La concordancia entre la primera medida y la segunda medida para los distintos intervalos de dureza está representada en la Tabla 3. Presentando un acuerdo moderado, según la escala de Ladis, J. y Koch, G. (1977).

Tabla 3.
Coefficiente kappa de Cohen intraoperador entre las medidas de los distintos intervalos de dureza clínica

| INTERVALO DUREZA CLINICA | ACUERDO OBSERVADO | ACUERDO AL AZAR | VALOR KAPPA (k) |
|--------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| Dm > Dp | 0,67 | 0,33 | 0,51 |
| Dp > Ds | 0,72 | 0,33 | 0,58 |
| Dm > Ds | 0,72 | 0,33 | 0,58 |

Dentina hipermineralizada (Dm), Dentina Profunda (Dp) y Dentina superficial (Ds).

Si establecemos el límite entre zona con presencia de bacterias (Ds) y la zona sin bacterias (Dp), el 50% de los Dentistas señalaban el límite en Dp y el 66,7% en dentina Sin bacterias (Dp+Dm). La concordancia intraoperador para establecer el límite cavitario es del 0,51 [acuerdo moderado – Escala Ladis, J. y Koch, G. (1977), Tabla 4].

Tabla 4. Límite cavitario según la dureza clínica y acuerdo intraoperador.

| LIMITE CAVITARIO | 1ª medida (nº casos) | 2ª Medida (nº casos) | Acuerdo Intraoperador |
|---------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| Dentina Superficial | 6 | 7 | |
| DENTINA PROFUNDA | 9 | 7 | 0,51 |
| Dentina Hipermineralizada | 3 | 4 | |

* * *

V. DISCUSIÓN

En la actualidad, es comúnmente aceptado que la dureza de la dentina es el criterio empleado con mayor frecuencia para determinar el límite de la cavidad y, en particular, durante la excavación de las lesiones de caries profundas (Crespo-Gallardo, 2018). Así, En este trabajo, nos hemos planteado si el odontólogo tiene suficiente agudeza perceptiva de la dureza clínica de las distintas zonas histológicas de la dentina.

Partimos de la base de un estudio previo (Ramírez Ruiz, 2018) en el que se estableció que la dentina necrótica tenía una dureza de 17 HV, la desmineralizada superficial de unos 40 HV, la desmineralizada profunda de 54 HV y la dentina hipermineralizada de 74 HV. Estos valores concuerdan con otros estudios (Fusayama, Okuse, Hosoda, 1966) en los que evalúan que la dentina primaria tiene un valor de dureza igual a 56 HV, la dentina reparadora igual a 67 HV, mientras que la dentina cariada presenta valores de dureza de 14 HV, lo cual concuerda con los valores tomados de referencia para nuestro estudio, desviándose un poco en el caso de la dentina desmineralizada.

En un estudio (Joves, 2014) se determinó que los tejidos de dentina afectados por caries naturales y artificiales eran superficialmente comparables en nanodureza, por lo que podríamos trasladar los resultados de este estudio a la determinación de la dureza clínica “in vivo”.

La dureza clínica es una prueba diagnóstica subjetiva, ya que depende el operador. También, depende del filo del instrumento y no es una prueba que explore la totalidad de la dentina. Otra dificultad la constata Fusayama (1966), que plantea como la dentina intacta también presenta una variación de la dureza según la profundidad. De esta forma, la dureza de la dentina más superficial es mayor y hay una disminución

gradual conforme se profundiza, variando de 57 HV cerca de la unión esmalte-dentina, a 15 HV a 100µm de la pulpa, siendo este valor tan bajo como en la dentina infectada. De esta forma, se plantea la dificultad para diferenciar la dentina blanda patológica de la dentina correspondiente a las capas más profundas. La dentina sana en áreas profundas se considera blanda (Joves, 2014). El hecho de que la dureza de la dentina disminuya de la superficial a la profunda, se debe a la disminución del contenido de minerales y el aumento del contenido de carbonatos que se asociarían con una disminución de la cristalinidad de la dentina superficial a la profunda (Seyedmahmoud R, McGuire JD, Wang Y, Thiagarajan G, Walker MP., 2017). También, se ha demostrado un aumento de la dureza de la dentina coronal externa y media en dientes de pacientes más mayores con respecto a los jóvenes (Montoya C, Arango-Santander S, Peláez-Vargas A, Arola D, Ossa EA. 2015). Por ello, la dureza clínica como prueba para determinar el límite cavitario tiene sus limitaciones.

Una vez conocidas las durezas medias de cada capa de la caries dentinaria, ¿tiene el dentista capacidad discriminativa para diferenciarlas? En nuestro estudio, sólo existen resultados casi aceptables en la detección de la dentina hipermineralizada respecto a la desmineralizada superficial. Es decir, poder discriminar entre la capa con bacterias y la hipermineralizada, donde existe una diferencia de 40 HV. En este caso, más del 70% de los dentistas la identifican, tanto en la primera medida como en la segunda. Entendiendo en ciencias de la salud la cifra del 80% de aciertos como el mínimo para considerar una prueba aceptable, deducimos que la agudeza perceptiva de la dureza clínica está en cifras algo superiores a los 35 HV. No pudiendo discriminar el dentista intervalos entre 15HV o 20HV, que también fueron medidos. Estos resultados indican como no es posible diferenciar entre dentina con bacterias y sin bacterias mediante la dureza clínica, cuando ambas están desmineralizadas (Ds vs DP), o lo que es lo mismo establecer el límite cavitario. Tampoco, es posible diferenciar entre Dentina hipermineralizada (Dm) y Dentina profunda desmineralizada, aun siendo las dos sin bacterias es lógico pensar que muchas preparaciones se dejen en Dm, debido a la ausencia de sensibilidades y recidivas en la mayoría de los casos. El dejar la preparación en zona sin bacterias es de gran importancia clínica, dada la acción negativa de las metaloproteinasas sobre la fibra de colágeno tipo I y la adhesión (Favetti, 2017), aún en ausencia de recidiva.

En la detección de una mayor dureza clínica de la dentina hipermineralizada sobre la dentina desmineralizada profunda (20 HV), no es posible la discriminación. No obstante, son dentinas sin bacterias o en escaso número. La diferenciación exacta en el límite cavitario es del 50%, siendo la probabilidad de acierto la misma que tirar una moneda al aire. Sin embargo, si incluimos la dentina hipermineralizada llegamos al 67%, resultados similares a la prueba de discriminación “Dm>Ds”. Por ello, mediante la dureza podemos exigir al dentista que termine sus preparaciones en dentina sin bacterias, pero cualquier otro requerimiento está por encima de la capacidad perceptiva táctil.

Estos resultados coinciden plenamente con los obtenidos en muestras de composite por Ramirez, B. (2018). En este estudio los dentistas podían discriminar en un intervalo de 40HV, pero para intervalos de 30 HV los aciertos eran del 74%. Estos resultados comparados con los estudios de Terashima S. (1969), que evaluó en cavidades preparadas por dentistas experimentados la dureza del límite cavitario, reflejan cómo las durezas encontradas son bajas. Los valores de dureza encontrados en las paredes de cavidades preparadas con curetas fue de 17HV, mientras que los valores en las cavidades preparadas con fresas a baja velocidad, fue de 22 HV. Teniendo en cuenta que los valores a alcanzar están en torno a 56 HV, diferencias de 35 HV pueden ser esperadas, poniendo de manifiesto la incapacidad del odontólogo de discriminar clínicamente la dureza. En nuestro estudio, el 33.3% de los odontólogos marcaron el límite cavitario en dentina desmineralizada superficial, capa con bacterias.

No hemos encontrado estudios que midan la concordancia intraoperador en la determinación de la dureza de la caries dentinaria. Este estudio observa un acuerdo moderado (0,51-0,58), según la escala de Ladis y Koch (1977). Hay estudios que miden la concordancia en el diagnóstico de la caries entre operadores con otros medios diagnósticos. Iram Zaidi (2016) indica que con fluorescencia inducida por láser (LIF) (DIAGNOdent) es alta. Esto tiene repercusión, ya que las directrices actuales de odontología mínimamente invasiva sobre el manejo de la caries recomiendan, en caries profundas, marcar el límite cavitario en dentina correosa. Sin embargo, con esta baja capacidad de discriminación y la falta de concordancia intraoperador ¿Es lo mismo una dentina blanda y necrótica que una dentina blanda correosa sin capa necrótica, pero con bacterias? ¿una blanda correosa, pero con menos cantidad de bacterias? ¿Podemos los

odontólogos seguir dichas directrices sin tener la suficiente agudeza perceptiva en la discriminación de las distintas zonas de la caries en dentina y la suficiente concordancia inter e intraoperador?

La determinación de la dureza de la dentina tiene importancia clínica, siempre que podamos determinarla eficazmente. Según un estudio reciente (Lavigne O, Vu AM, Richards L, Xie Z., 2018) en el que se realizó una desmineralización artificial de la dentina y una posterior remineralización (con ionómero de vidrio), se llegó a la conclusión de que, si bien los efectos en cuanto a la absorción de minerales Ca, P y Sr de la dentina desmineralizada fueron muy positivos, incluso cuando comprometía a capas más profundas, no era así en lo que respecta a las propiedades mecánicas y módulo de Young, que sólo fueron recuperables en el caso de desmineralización más superficial. Debemos plantearnos entonces si el hecho de no dejar el Límite Cavitario en dentina sana, como hicieron un tercio de los dentistas de este estudio, puede tener repercusiones mecánicas en los dientes afectados a pesar de lograr la remineralización. Sobre todo, por la ya comentada acción de las metaloproteasas en el colágeno de la capa híbrida adhesiva (Favetti, 2017).

Por nuestros resultados, podemos deducir que serían necesarios otros métodos de diagnósticos coadyuvantes en la detección de la dentina cariada. Si bien existen muchos, citemos los que están al alcance del dentista. El detector de caries y la LIF (Iram Zaidi, 2016) ayudarían a mejorar el diagnóstico, ya que nos van a informar del estado del colágeno y de la presencia de metabolismo bacteriano.

En una publicación (Y. HosoyaaT.TaguchibS. AritacF.R.Tayd., 2008) indican que el detector de caries, como prueba diagnóstica no es efectivo, ya que demuestran que se tiende a producir sobretratamiento, eliminación de tejido sano. Es debido a que la baja tensión superficial y la naturaleza de mayor difusión del propilenglicol pueden provocar una tinción excesiva de la dentina sana o afectada por caries debajo de la dentina blanda infectada por caries. Sin embargo, hoy hay nuevos tintes, que emplean polipropilenglicol, en lugar de propilenglicol con el rojo ácido al 1% (Caries Check) o incluso azul brillante al 1% también en polipropilenglicol (Caries Check Blue), que han resultado ser más eficaces para eliminar la dentina infectada por caries y evitar la extracción excesiva de la dentina sana o afectada por caries.

Pruebas que nos informen de la presencia de bacterias o su metabolismo es un pilar importante en la determinación del límite cavitario. Chin-Lo Hahn (2007) indica que las bacterias anaerobias Gram-negativas asacarolíticas, que suelen colonizar en caries profundas -como la *Prevotella Intermedia*, producen amoníaco al metabolizar proteínas, que es el inductor del dolor más potente. Esto podría explicar parcialmente por qué la presencia de este tipo de bacterias y la cantidad de lipopolisacáridos en la caries, se pueden relacionar positivamente con la sensibilidad al calor o el dolor. Siendo bacterias asacarolíticas tienen la capacidad de seguir viviendo al metabolizar las proteínas del colágeno desmineralizado de la propia dentina. Así, lo indica Ricucci (2019), independientemente de la privación de carbohidratos y del sellado superficial propuesto por la odontología mínimamente invasiva vigente. Según la cual el dejar dentina blanda y por tanto infectada podría conducir a que fuera recuperable, pero no podemos olvidar estos daños colaterales en la zona adhesiva. En esta dirección, podemos poner en valor pruebas para la detección de caries como la laserfluorescencia, al detectar productos del metabolismo bacteriano. Estos fluoróforos, metabolitos detectables por LIF, pueden ayudar a determinar el Límite Cavitario con mayor seguridad, eliminando la menor cantidad de tejido sano posible y aportar información adicional coadyuvante al resto de pruebas, dado las limitaciones de cada una de ellas empleadas de forma independiente.

En resumen, con las limitaciones de este estudio, la dureza de la dentina no nos permite discriminar de forma certera el límite cavitario histológico, donde no es fácil para el odontólogo distinguir de forma clara la capa dentinaria que está presente. Además, por las características propias de la dentina, en las que la dureza disminuye conforme se acerca a la pulpa, teniendo valores aproximados la dentina sana próxima a la misma y la dentina necrótica, el empleo de la dureza como único método diagnóstico podría propiciar una información poco real. Sería importante, por tanto, el uso conjunto de los diferentes métodos de detección de caries, donde se analice no solo la desmineralización, sino el estado del colágeno y el metabolismo bacteriano. El combinar pruebas con mayor especificidad con otras, con mayor sensibilidad (LIF), aumenta el rendimiento diagnóstico.

* * *

VI. CONCLUSIONES

PRIMERA. – La percepción táctil del dentista no permite discriminar aceptablemente entre las capas de la caries dentinaria ni en la identificación del límite cavitario libre de bacterias.

SEGUNDA. – La percepción táctil discriminativa del dentista está en valores superiores a 35 HVN. Esta agudeza perceptiva de la dureza clínica, solo permitiría discriminar acertadamente entre dentina necrótica e hipermineralizada. Entre dentina desmineralizada superficial y dentina hipermineralizada está entre el 72-78% de aciertos, por debajo del límite aceptable del 80%.

TERCERA. – La concordancia intraoperador es moderada, siendo un inconveniente más a añadir la subjetividad de la prueba.

CUARTA. - La dureza clínica aisladamente no es un método adecuado para determinar el límite cavitario, por lo que debe complementarse con otros medios que identifiquen el estado del colágeno y la presencia de bacterias.

* * *

VII. BIBLIOGRAFIA

Ábalos C, Herrera M, Bonilla V, San Martín L, Mendoza A. (2015). Laser-induced fluorescence in the diagnosis of pulp exposure and the influence of residual dentin thickness: An in vivo study. *American Journal of Dentistry*, 28(2), 75-80.

Bittar DG, Pontes LR, Calvo AF, Novaes TF, Braga MM, Freitas PM, Tabchoury CP, Mendes FM. (2014) Is the red fluorescence of dental plaque related to its cariogenicity? *Journal of Biomedical Optics*, 19(6):065004. doi: 10.1117/1.JBO.19.6.065004.

Chin-LoHahn, Frederick R. Liewehr. (2007). Relationships between Caries Bacteria, Host Responses, and Clinical Signs and Symptoms of Pulpitis. *Journal of Endodontics*, 33, 213-219.

Crespo-Gallardo I, Hay-Levytska O, Martín-González J, Jiménez-Sánchez MC, Sánchez-Domínguez B, Segura-Egea JJ. (2018). Criteria and treatment decisions in the management of deep caries lesions: Is there endodontic overtreatment? *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. 10(8), 751-760

Demant S, Dabelsteen S, Bjørndal L. (2021). A macroscopic and histological analysis of radiographically well-defined deep and extremely deep carious lesions: carious lesion characteristics as indicators of the level of bacterial penetration and pulp response. *International Endodontic Journal*, 54(3), 319-330.

Duncan HF, Galler KM, Tomson PL, Simon S, El-Karim I, Kundzina R, Krastl G, Dammaschke T, Fransson H, Markvart M, Zehnder M, Bjørndal L. (2019). European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp. European Society of Endodontology (ESE). *International Endodontic Journal*, 52(7), 923-934.

Favetti M, Schroeder T, Montagner AF, Correa MB, Pereira-Cenci T, Cenci MS. (2017). Effectiveness of pretreatment with chlorhexidine in restoration retention: a 36-month follow-up randomized clinical trial. *J Dent*; vol.60, pp.44-49.

Fusayama T., Okuse K., Hosoda H., (1966). Relationship between hardness, discoloration, and microbial invasion in carious dentin. *Journal of Dental Research*, 45(4), 1033-46.

Fusayama T. (1979). Two layers of carious dentin; diagnosis and treatment. *Oper Dent.*, 4, 63-70.

Hosoya Y, Taguchi T, Arita S, Tay FR. (2008). Clinical evaluation of polypropylene glycol-based caries detecting dyes for primary and permanent carious dentin. *Journal of Dentistry*, 36(12), 1041-7.

Iram Zaidi, Rani Somani, Shipra Jaidka, Muhamad Nishad, Shikha Singh, and Divya Tomar. (2016). Evaluation of different Diagnostic Modalities for Diagnosis of Dental Caries: An in vivo Study. *Int J Clin Pediatr Dent.*, 9(4), 320–325.

Jeggle LM, Baker SR, Schwendicke F. (2019). Changing dentists' carious tissue removal behavior: Qualitative study and behavioral change simulation experiment. *Journal of Dentistry*, 81, 43-51

Joves GJ, Inoue G, Sadr A, Nikaido T, Tagami J. *J Mech Behav.* (2014). Nanoindentation hardness of intertubular dentin in sound, demineralized and natural caries-affected dentin. *Biomedical Materials*, 32, 39-45.

Kobayashi M, Inagaki R, Ichikawa K, Niizuma Y, Morisaki H, Kuwata H, Manabe A, Miyazaki T., (2019), Effect of kinematic viscosity on the staining performance of caries detector dyes. *Dental Materials Journal*, 38(1), 120-126.

Koopaei MM, Inglehart MR, McDonald N, Fontana M. *J Am.* (2017). General dentists', pediatric dentists', and endodontists' diagnostic assessment and treatment strategies for deep carious lesions: A comparative analysis. *Dent Assoc.*, 148(2), 64-74

Landis J. R., Koch G. G. (1977). A One-Way Components of Variance Model for Categorical Data. *Biometrics*, 33 (4), 671-679

Lavigne O, Vu AM, Richards L, Xie Z. (2018). Effect of demineralization time on the mineral composition and mechanical properties of remineralized dentin. *Journal of Oral Science*, 60(1), 121-128.

Lennon AM, Attin T, Buchalla W. (2007). Quantity of remaining bacteria and cavity size after excavation with FACE, caries detector dye and conventional excavation in vitro. *Operative Dentistry*, 32(3), 236-41

Macey R, Walsh T, Riley P, Glenny AM, Worthington HV, Fee PA, Clarkson JE, Ricketts D. (2020). Fluorescence devices for the detection of dental caries. *Cochrane Database Syst Rev.* 12, CD013811. doi: 10.1002/14651858.

Montoya C, Arango-Santander S, Peláez-Vargas A, Arola D, Ossa EA. (2015). Effect of aging on the microstructure, hardness and chemical composition of dentin. *Arch Oral Biol.*, 60(12), 1811-20.

Ramírez Ruiz, B. (2018). La Validez de la Láserfluorescencia y la Dureza de la dentina como pruebas para el diagnóstico del límite cavitario: un estudio exvivo con marcadores de ADN. TFG Universidad de Sevilla.

Ricucci D, Siqueira JF Jr, Li Y, Tay FR. (2019). Vital pulp therapy: histopathology and histobacteriology-based guidelines to treat teeth with deep caries and pulp exposure. *J Dent.*, 86, 41-52.

Schweikl H, Buchalla W, Krifka S (2017) Cell responses to cariogenic microorganisms and dental resin material – crosstalk at the dentin-pulp interface? *Journal of Dental Materials* 33, 514– 24.

Schwendicke, F. Frencken, JE. Bjørndal, L. (2016). Managing carious lesions: consensus recommendations on carious tissue removal. *Advances in Dental Research*, 28, 58– 67.

Schwendicke F, Stangvaltaite L, Holmgren C, Maltz M, Finet M, Elhennawy K, Eriksen I, Kuzmishyn TC, Kerosuo E, Doméjean S. (2017). Dentists' attitudes and behaviour regarding deep carious lesion management: a multi-national survey. *Clin Oral Investig.*, 21(1), 191-198.

Seyedmahmoud R, McGuire JD, Wang Y, Thiagarajan G, Walker MP. (2017). The interrelationship of microstructure and hardness of human coronal dentin using reference point indentation technique and micro-Raman spectroscopy. *Dent Mater.*, 33(10), 1069-1074.

Terashima S. et al. (1969) Hardness of dentin remaining after clinical excavation of soft dentin. *Jpn J Conserv Dent.* 11, 115-20.

* * *