

TRABAJO DE INVESTIGACION FIN DE MASTER

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
ex vivo con marcadores de ADN.

Facultad de odontología

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



Autora: Carmen Gil-Bermejo Bernárdez-Zerpa

Director: Camilo Ábalos Labruzzo

Sevilla, 2017-2018



Departamento de Estomatología
Facultad de Odontología



Medalla y Encomienda
Orden Civil de Sanidad

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

Como director de esta investigación, **HACE CONSTAR:**

Que el trabajo titulado “*Validez y Seguridad de la Dureza Clínica vs Láserfluorescencia a $\lambda=655nm$, $450nm$ y $405nm$ en el diagnóstico del Limite Cavitario: un estudio exvivo con marcadores de ADN*”, ha sido desarrollado por **Dña. Carmen Gil-Bermejo Bernárdez-Zerpa**, como Trabajo Fin de Máster, durante el curso académico 2017-2018 en la facultad Odontología de la Universidad de Sevilla, bajo la 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, firma el presente documento en Sevilla a 1 de junio de 2018.

Fdo. Camilo Manuel Ábalos Labruzzi

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a D. Camilo Ábalos Labruzzi, tutor y director de este trabajo, por sus enseñanzas en el manejo de los distintos aparatos utilizados para el estudio, así como por la ayuda prestada en el desarrollo e interpretación de los resultados estadísticos.

A Dña. Amparo Jiménez Planas, por las labores estadísticas realizadas con una completa disponibilidad de tiempo.

A Marco Rodríguez Vázquez, por su labor realizada en el complejo campo de la epifluorescencia del presente estudio.

En último lugar, a mi familia, el pilar de mi vida.

RESUMEN

Durante la eliminación del tejido cariado, 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 es subjetiva, la Láserfluorescencia nos permite realizar una exploración más objetiva de la cavidad dentaria residual.

Objetivos: Este estudio de investigación tiene como objetivo poner de manifiesto el papel de la Láserfluorescencia (LIF) frente a la dureza clínica como medio para determinar el límite cavitario entre dentina recuperable y no recuperable en la caries de dentina.

Material y métodos: fueron seleccionados 45 dientes exvivo con caries dentinaria, los cuales se prepararon, eliminando el tejido cariado hasta alcanzar distintos niveles y áreas de exploración, obteniendo un total de 83 áreas de estudio. Posteriormente se realizó la medición de la dureza clínica, de la Láserfluorescencia cualitativa (LIF-CL) y la Láserfluorescencia cuantitativa (LIF-C), en las diferentes áreas. Seguidamente, las áreas de estudio con todos los estratos de la caries dentinaria fueron teñidas con marcadores de ADN y analizadas mediante Microscopio de Epifluorescencia Olympus BX61, para localizar las capas de la dentina cariada. En último lugar, se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos con el programa SPSS 19.0 fijando la significación $\alpha \leq 0,05$.

Resultados: Ni la dureza clínica, ni la LIF-CL 450nm presentan la capacidad para diferenciar entre las capas cercanas al límite cavitario (LC), sin embargo, la LIF-C 655nm y LIF-CL 405nm si es capaz de delimitar entre los distintos estratos en los que se establece el LC. La Validez y Seguridad de las pruebas diagnósticas muestran una mayor Especificidad que Sensibilidad, excepto para la LIF-C y LIF-CL(vistaproof®) que son más sensibles que específicas. La LIF Cuantitativa y Cualitativa, muestran valores más altos para los Valores Predictivos negativos y positivos que la Dureza Clínica.

Conclusión: la Láserfluorescencia debe ser un complemento de la dureza clínica, debiendo ser aplicada con mayor frecuencia en el diagnóstico del límite cavitario de las restauraciones dentales.

ABSTRACT

Dentine hardness is accepted by most dentists as the clinical sign to determine residual caries after dental excavation. However, this is a subjective method, because it depends on the operator, and technique employed. Against, laserfluorescence is a reproducible and objective diagnostic method.

Objective: To demonstrate the role of the laserfluorescence as a diagnostic method to determine the limit between carious and healthy dentine on dental caries.

Materials and methods: 45 teeth with dental caries were selected to the present study. The decayed tissue were eliminated until reached the different areas of exploration, a total of 83 areas were obtained. Later, it has been made the meditation of clinic dentin hardness and laserfluorescence of all areas. Next, all areas with all the layers of dental caries were dyed with DNA markers and analyzed with the Olympus BX61 Epifluorescence Microscope in order to locate the carious dentine layers. Finally statistical analysis were carried out with SPSS program.

Results: LIF-C is able to distinguish between layers of dental caries. The Validity and Safety of the diagnostic tests show a greater Specificity than Sensitivity, except for the LIF-Quantitative and LIF-CL(vistaproof®) what are more sensitive than specific. Quantitative and Qualitative LIF show higher values for negative and positive predictive values than clinical hardness.

Conclusion: Laserfluorescence should be a complement of clinical hardness and this method should be applied to determine residual caries after dental preparation.

INDICE

1. INTRODUCCION	1
1.1 Caries dental	1
1.1.1 Concepto	1
1.1.2 Etiopatogenia	1
1.1.3 Microbiología	2
1.2 Caries Dentinaria	3
1.2.1 Histopatología	3
1.2.2 Límite cavitario	4
1.3 Métodos diagnósticos detección del límite cavitario	4
1.3.1 Términos estadísticos	5
1.3.2 Métodos diagnósticos empleados para detección del límite cavitario	6
1.4 Aparatos de Láserfluorescencia	8
1.4.1 Soprolife	8
1.4.2 Vistaproof	8
1.4.3 Siroinspect	9
1.4.4 Diagnodent	9
2. OBJETIVOS	10
2.1 Planteamiento del problema	10
2.2 Objetivos	11
2.3 Hipótesis nula	11
3. MATERIAL Y METODOS	12
3.1 Preparación de las muestras	12
3.2 Medición de la dureza clínica	13
3.3 Medición de la Láserfluorescencia cuantitativa	13
3.4 Medición de la Láserfluorescencia cualitativa	14
3.5 Validación con marcadores de ADN	15
3.6 Análisis estadístico	16

4. RESULTADOS	18
5. DISCUSION	23
6. CONCLUSIONES	27
7. BIBLIOGRAFIA	28

1. INTRODUCCION

1.1 CARIES DENTAL

1.1.1 Concepto

En 1859 J. Tomes(1) escribió; “Es mejor que una capa de dentina decolorada permanezca para proteger la pulpa, en lugar de correr el riesgo de sacrificar el diente”, lo cual nos sugiere, que la discusión para establecer el límite cavitario de nuestras restauraciones se remonta a épocas pasadas.

Hoy día la caries dental se considera una alteración de origen ecológico. La caries es una enfermedad crónica, provocada por un cambio ecológico en el medio ambiente del biofilm dental, el cual pasa a estar formado por una población microbiológica de alta cariogenicidad que produce un incremento en la producción de los ácidos orgánicos. Estos ácidos provocan la pérdida mineral del tejido dental duro, resultando una **lesión de caries**. (2)

1.1.2 Etiopatogenia de la lesión cariosa

La manifestación de la caries dental está mediada por complejos mecanismos que son iniciados por diversos factores, entre los que se incluyen; factores genéticos, conductuales, ambientales y microbianos. La presencia de bacterias es fundamental para el inicio y progresión de las lesiones de caries, sin bacterias, no hay lesión. (3)

La biopelícula microbiana oral que forma la placa dental tiene una gran diversidad de especies bacterianas y consiste en bacterias densamente incrustadas en una matriz de polímeros orgánicos de origen bacteriano y salival. Esta placa dental en presencia de azúcares fermentables, de la dieta y del tiempo, es el agente causal de la caries dental. La organización y la estructura de la placa dental varían considerablemente según los sitios donde se forma la placa. (4)

La dispersión de la lesión de caries en el esmalte está determinada por la distribución de la placa y la dirección de los prismas.(5) Cuando el frente de avance de una lesión de caries en el esmalte se aproxima a la unión esmalte-dentina, los ácidos, enzimas y otros estímulos alcanzan la periferia de la dentina produciendo como resultado, el aumento de permeabilidad del esmalte. En la zona dentinaria inmediata a la lesión del esmalte se produce una desmineralización, que la vuelve amarronada. La desmineralización se esparce

periféricamente a lo largo de la unión esmalte-dentina. En los túbulos dentinarios, que corresponden a las zonas desmineralizadas, se aprecia un proceso de esclerosis tubular. Los odontoblastos inician una respuesta alrededor de toda la zona de desmineralización, extendiéndose incluso a la periferia, a la unión esmalte-dentina. Mientras que en el centro de la lesión los procesos destructivos son tan intensos, que los procesos citoplásmicos tienen que retraerse hacia la pulpa para evitar que la lesión alcance la profundidad del tejido.

1.1.3 Microbiología

Al determinar la presencia de ciertas especies bacterianas en cada etapa de avance de la lesión, se ha podido evidenciar que algunas especies bacterianas predominan sólo en las etapas iniciales, y otras predominan exclusivamente en las etapas avanzadas de la lesión. Este hecho demuestra una sucesión microbiana a lo largo del progreso o avance de la lesión, que puede estar mediado por la dieta y otros factores. (3)

Entre las bacterias más frecuentemente asociadas con el inicio, progresión o avance de la lesión de caries dental citamos:

Streptococcus es la especie predominante en microbio cariogénico. Coloniza las superficies limpias de los dientes en una etapa temprana y también se relaciona con la caries radicular. Los cocos predominantes aislados de la dentina cariosa en la caries radicular son *S. mutans*, *S. sanguis* y *S. mitis*.(6) De todas ellas la especie más estudiada ha sido el *Streptococo mutans*, el cual se relaciona con el inicio y progresión de las lesiones de caries, aunque su presencia no es indispensable para el desarrollo de la enfermedad (3).

Actinomyces es un colonizador inicial de superficies radiculares humanas. *A. naeslundii* y *A. viscosus* pueden inducir caries en la superficie de la raíz. (7). Los actinomyces a menudo se aíslan de la microflora subgingival y de la placa asociada a la caries radicular (tienen apéndices de superficie larga denominados fibrillas o fimbrias).

Los **Lactobacilos** son bacterias gram positivas, anaerobias facultativas, acidúricas. Dentro de los lactobacillus aislados en caries dental se incluyen *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei* y *L. oris*. Se considera a esta especie bacteriana como un oportunista secundario, que está implicado en la progresión de la lesión de caries y que prevalece en las etapas avanzadas de la misma (3). Los lactobacilos son difíciles de cultivar y madurar como una biopelícula de una sola especie. Sin embargo, puede ser una especie predominante en un biofilm sustancial en presencia de *S. mutans*. (8)

Los **Bifidobacterium** son bacilos anaeróbicos gram positivos. Se asocian a lesiones de caries avanzadas lo que sugiere la asociación positiva de Bifidobacterium con la progresión de caries dental.(3)

1.2. CARIES DENTINARIA

El desarrollo de la caries en la dentina es diferente que en el esmalte en razón a los siguientes factores; la dentina contiene un mayor porcentaje de componente orgánico, mientras que en el esmalte el componente orgánico es una escleroproteína, en la dentina está integrado por colágeno. La dentina posee un elemento vivo, la prolongación intradentinaria del odontoblasto que le confiere capacidad reaccional. La disposición radial de los túbulos dentinarios favorece la penetración de los gérmenes en profundidad.(9)

1.2.1. Histopatología

En la estructura que adquiere la lesión de caries una vez que alcanza el límite amelodentinario hallaremos dos zonas; “dentina afectada” y “dentina infectada”. (10)

“Dentina infectada”

“Zona necrótica o zona de destrucción”

Dentina intensamente coloreada con pérdida estructural y abundantes gérmenes. La estructura tubular desaparece y se observa material granuloso sin estructurar que corresponde a restos necróticos (10). Clínicamente esta capa es blanda, se deforma fácilmente al ser presionada, de apariencia húmeda y constituye una masa amarillenta.

“Zona de desmineralización superficial”

Ésta será la porción más profunda de la dentina infectada. Su estructura se halla distorsionada por la desmineralización masiva, pero generalmente la matriz orgánica permanece intacta. Contiene gérmenes especialmente proteolíticos, túbulos ensanchados y afectación de la dentina intertubular (9). Clínicamente se corresponde con dentina correa que no se deforma a la presión, pero puede ser excavada fácilmente.

“Dentina afectada”

“Zona de desmineralización profunda”

El componente microbiano disminuye gradualmente conforme se profundiza en esta capa. De esta forma, en el frente de la lesión hay escasas células bacterianas con viabilidad. La estructura tubular no está apenas alterada y la única diferencia sería la ausencia de

componentes minerales.(10) Clínicamente se caracteriza por un tejido de aspecto seco y de mayor dureza.

“Zona hipermineralizada, zona de dentina esclerótica o zona translúcida”.

Presenta aspecto hialino, que la destaca del resto de la dentina. Corresponde al mecanismo defensivo de la hipercalcificación tubular: retirada de la prolongación intradentinaria del odontoblasto con elaboración de dentina peritubular. (9) Constituye una capa en la que el lumen de los túbulos se ha visto obliterado por la actividad defensiva de los dentinoblastos ante el ataque cariígeno. Clínicamente se corresponde con dentina firme, no se deforma y es resistente a la excavación manual.

1.2.2 El límite cavitario

Histológicamente, debemos establecer el límite cavitario de las restauraciones en la zona de desmineralización o zona de desmineralización profunda, debido a la ausencia de gérmenes que presenta esta capa de la lesión. Sin embargo, la aplicación clínica de los estudios histológicos resulta complicada.

A lo largo de la historia la dureza y el color de la dentina, han sido los parámetros utilizados por los clínicos para diferenciar entre la dentina infectada y la no infectada por caries durante el proceso de excavación del tejido cariado (11,12). En 1996 Kidd *et al.* (13) demostraron la existencia de correlación entre los criterios clínicos (dentina dura o blanda/ seca o mojada) y los hallazgos microbiológicos. 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 (13), quedando el criterio clínico del color dentinario para establecer el límite cavitario en desuso.

Posteriormente se han desarrollado otros métodos diagnósticos para la detección del límite cavitario, aunque a pesar de ello, la dureza clínica, sigue siendo el criterio más empleado actualmente por los clínicos. (14)

1.3 METODOS DIAGNOSTICOS PARA LA DETECCION DEL LIMITE CAVITARIO

Los métodos diagnósticos clínicos convencionales empleados para la detección del límite cavitario son; la inspección táctil (sonda de caries) y el detector de caries, los cuales

han sido descritos ampliamente en la literatura y siguen siendo utilizados actualmente. Además, existe otro método al alcance del clínico; la Láser-fluorescencia, aunque su uso es menos común.

Antes de desarrollar los métodos empleados para la detección del límite cavitario, consideramos necesario recordar algunos conceptos estadísticos básicos.

1.3.1 Términos estadísticos

Validez, Seguridad, Exactitud, Precisión y Reproducibilidad de una Prueba Diagnóstica.

a) La **Validez** de una prueba diagnóstica es el grado en el que un test mide lo que necesitamos evaluar y se calcula por su “**Sensibilidad y Especificidad**” para un determinado punto de corte.

La **Sensibilidad** es la probabilidad de identificar correctamente a un individuo enfermo, la capacidad del test para detectar la enfermedad. La Sensibilidad se conoce también como “fracción de verdaderos positivos (FVP)”.

La **Especificidad** es la probabilidad de identificar correctamente a un individuo sano, la capacidad para detectar la ausencia de enfermedad. También se conoce como “fracción de verdaderos negativos (FVN)”.

b) La **Seguridad** de una prueba diagnóstica viene determinada por el valor predictivo de un resultado positivo o negativo (VPP o VPN).

El **valor predictivo positivo** es la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo en el test.

El **valor predictivo negativo** es la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo en la prueba esté realmente sano.

c) La **Exactitud** es la coincidencia con un valor aceptado como referencia. La **Precisión** se refiere a la capacidad de reproducir resultados al repetir mediciones.

La **Reproducibilidad** es la capacidad del test para ofrecer los mismos resultados cuando se repite su aplicación en circunstancias similares. Normalmente la reproducibilidad se mide intraoperador e interoperador.

1.3.2 Métodos diagnósticos empleados en la detección del límite cavitario

▪ 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 diferentes estados de la dentina (14);

- Dentina blanda

La dentina blanda se caracteriza por deformarse cuando se presiona con un instrumento duro sobre ella y poder ser excavada fácilmente. Histopatológicamente es dentina necrótica contaminada con biofilm.

- Dentina correosa

Es una dentina que 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

La dentina firme, además de no deformarse 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

También es físicamente resistente a la excavación manual, 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.

▪ Detector de caries

El detector de caries (ácido rojo al 1% propilenglicol), fue desarrollado en 1970 por Fusayama *et al.*(15) para ayudar al odontólogo a identificar la dentina infectada.

El detector de caries es un colorante que actúa fijándose en los radicales libres de las fibras de colágeno rotas de la dentina no recuperable. No obstante, no es específico de las proteínas colágenas de la fibra y puede fijarse en otras estructuras orgánicas. Fusayama *et al.*(15) indicaron que las zonas teñidas por la tinción coincidían con la invasión bacteriana de la dentina, sin embargo, no discrimina de manera precisa entre la zona infectada (zona superficial de dentina desmineralizada) y la zona afectada (zona profunda de dentina desmineralizada). Por ello, no se recomienda el uso del detector de caries, porque puede conducir a la sobreeliminación del tejido cariado. (11)

▪ **Láserfluorescencia**

La LF se basa en la excitación del tejido dental con una luz roja visible ($\lambda = 405$ y 450 nm) producida por un láser semiconductor. Al incidir la luz sobre la superficie del diente penetra unos milímetros en el tejido y genera una reflexión de la luz hacia la punta del dispositivo que medirá la fluorescencia por un sistema electrónico diferenciado.

Las bacterias implicadas en la caries dental generan productos metabólicos que presentan color y propiedades fluorescentes. Estos pigmentos pueden ser detectados por la fluorescencia inducida por láser. Se ha demostrado que la laser-fluorescencia es capaz de detectar los fluoróforos rojo-anaranjados (porfirinas del metabolismo bacteriano) en pequeñas concentraciones (16–18). En presencia de fluoróforos bacterianos la respuesta de los tejidos afectados es mayor, y el sistema LF detecta radiación fluorescente.

Debemos tener en cuenta ciertas **limitaciones** de la LIF; los restos de placa o de contenido orgánico, las manchas, el grado de deshidratación en el diente, obturaciones de composite o restos de pasta de pulido pueden afectar las lecturas de LF, por ser fuentes de fluorescencia y por tanto causar falsos positivos (16,17). Además, 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 (18,19). 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. Consecuentemente es necesario calibrar el sistema de LF 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 (20) 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.

1.4 APARATOS DE LASERFLUORESCENCIA

Como aparatología de LIF cualitativa disponemos de la cámara Soprolife, el Vistaproof, y el Siroinspect, como aparatología cuantitativa disponemos del sistema KavoDiagnodent.

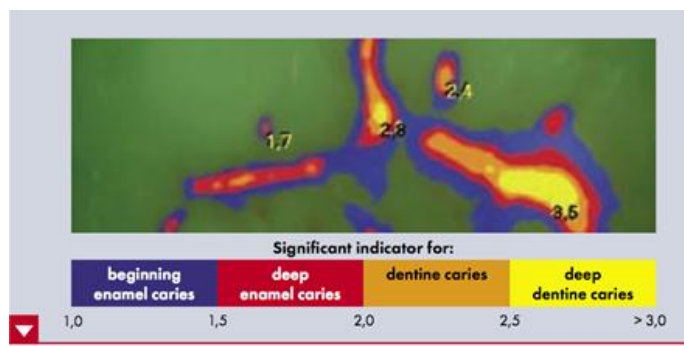
1.4.1 Soprolife

El software Sopro Imaging es la interfaz del usuario del sistema Sopix PSPIX, SOPROLIFE y de las cámaras Sopro©. 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). La cámara nos da una imagen anatómica (luz diurna) superpuesta con una imagen auto fluorescente (luz azul) de la muestra. La cámara está equipada con un sensor de imagen (sensor CCD de 0.25-in) que consiste en un mosaico de pixeles cubiertos con filtros de los colores complementarios. Los datos obtenidos, relacionados con la energía recibida por cada pixel, nos permite obtener una imagen que puede ser almacenada en el ordenador.

1.4.2 VistaProof

VistaProof es un programa de gestión de imágenes en el que se analizan las imágenes obtenidas a través de una cámara intraoral 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, corresponde con un haz de luz de una longitud de onda de 405 nm producida por seis LEDs que estimula a las porfirinas, 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. El software diferencia hasta los distintos estadios de la caries dándole un valor numérico que va desde 0 a 5. En la (Fig.1), se puede observar las diferentes tonalidades que se obtienen de la lesión cariosa.

Figura 1. Código de colores del sistema Vistaproof.



1.4.3 Siroinspect

El sistema de LIF SIROINSPECT, emite y recibe haces de luz de diferentes longitudes de onda. Éste haz de luz, corresponde con un haz de luz de 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. Estas señales luminosas son recogidas directamente por el observador mediante unas gafas diseñadas para ver las diferencias cromáticas.

1.4.4 Diagnodent

El DIAGNOdent pen® (DIAGNOdent, KaVo, Biberach, Germany) es un instrumento basado en un láser que emite una luz roja de una longitud de onda de 655 nm desde un haz de fibra óptica. A la vez que la luz láser se propaga por el área de la superficie dental, la óptica bidireccional de la pieza de mano permite cuantificar simultáneamente la energía de la luz láser reflejada en una escala del 0 al 99.

A la longitud de onda específica en la que trabaja el DIAGNOdent, el tejido sano de las estructuras dentaria no exhibe poca o ninguna fluorescencia, que da como resultado una medición baja en la pantalla del aparato. Sin embargo, la estructura cariada del diente emite fluorescencia que por consiguiente marcará una cifra elevada en la pantalla.

2. OBJETIVOS

2.1 Planteamiento del problema

Durante la eliminación del tejido cariado, 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.

En estudios previos, dentro de esta línea de investigación (21), se ha comprobado que mediante una prueba objetiva de microdureza sí existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la dureza de las distintas capas de la caries dentinaria. Sin embargo, la agudeza perceptiva del clínico es de 40 vickers (HV) y no es lo suficientemente discriminativa para diferenciar entre las capas en las que se establece el límite cavitario (LC) dentinario (15HV).

Además, los conceptos actuales de la dentina *que hay que eliminar y la que hay que mantener*(14,22,23) están cambiando las decisiones clínicas en cuanto al grado de dureza y textura de la dentina recuperable. Tradicionalmente, una dentina dura: “*grito dentinario de Frey*” era la dentina sana, pero ¿La dentina correosa lo es? ¿Hasta qué punto y con la subjetividad clínica existente podemos recomendar dejar o no la dentina correosa? ¿Qué cantidad de bacterias estamos dejando? Por ello, consideramos pertinente abordar estos puntos desde el punto de vista de la investigación, pues está aceptado universalmente el uso de la dureza para la determinación del límite cavitario, pero no se ha profundizado en sus indicaciones y limitaciones. Con estos antecedentes nos planteamos los objetivos para la Prueba de la Dureza Clínica (Objetivo 1°).

Por otra parte, existen métodos objetivos para la determinación del LC basados en fluorescencia de la dentina inducida por láser (LIF), que no dependen estrictamente del operador y son reproducibles y monitorizables, sin embargo, también presentan limitaciones que inducen a falsos positivos. En este sentido han sido mayormente estudiados los métodos LIF cuantitativos pero muy escasamente los métodos LIF cualitativos. Por ello, es necesario realizar estudios con estos métodos diagnósticos que nos aporten más información.

Además, según estudios previos dentro de la línea de investigación (24), las recomendaciones del fabricante para la interpretación de la LIF-Cualitativa no se corresponde con el Código de colores (Verde-Naranja-Rojo) y varía entre aparatos y longitudes de onda.

Por ello, se ha establecido una nueva escala con la que se puede determinar la Validez y Seguridad de la LIF cualitativa para la determinación del LC dentinario. Con lo anteriormente expuesto, nos planteamos los objetivos para LIF-Cualitativa (Objetivo 2º).

2.2 Objetivos específicos

Objetivo primero:

- a) Determinar la correlación entre las distintas durezas clínicas (dura, correosa y blanda) con las distintas capas de la caries dentinaria y el Límite Cavitario.
- b) Determinar la Validez y Seguridad de la Dureza Clínica para determinar el Límite Cavitario.

Objetivo segundo:

- a) Conocer, si existe, correlación entre las distintas categorías de la LIF-Cualitativa y LIF-Cuantitativa con las distintas capas de la caries dentinaria y el Límite Cavitario.
- b) Determinar la Validez y Seguridad de la LIF-Cualitativa a distintas longitudes de onda y aparatología frente a la LIF-Cuantitativa y Dureza Clínica en la determinación de LC.

2.3 Hipótesis nulas

1. *“No existen diferencias entre las distintas categorías de la Dureza Clínica, LIF-Cualitativa y LIF-Cuantitativa en relación con los distintos estratos de la caries dentinaria”*
2. *“La Validez y Seguridad de la Dureza Clínica, LIF-Cualitativa y LIF-Cuantitativa es similar en el diagnóstico del Límite Cavitario dentinario.*

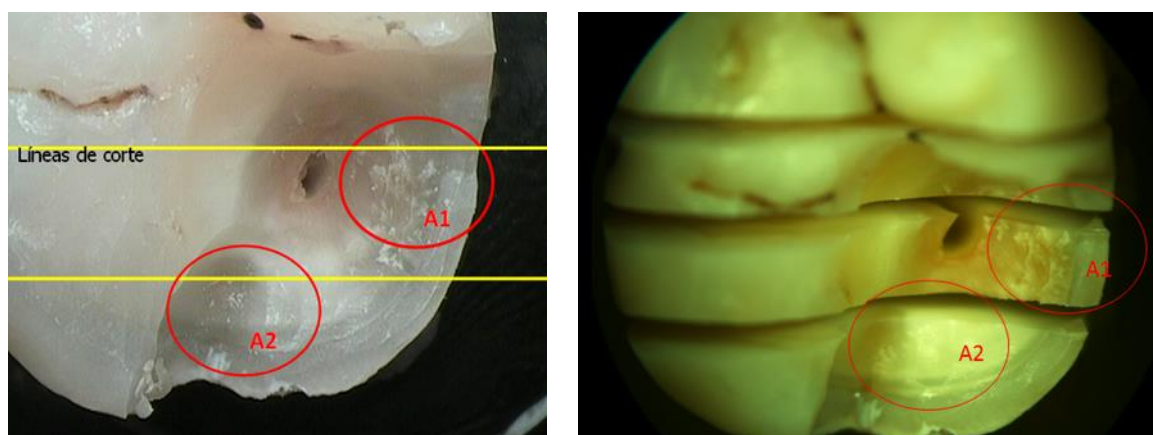
3. MATERIAL Y METODO

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 de 45 dientes ex-vivo, premolares y molares de diferentes pacientes, que presentaban en 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 7 días postextracción para evitar la pérdida de fluorescencia del tejido dental.

3.1 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. 2). El tejido cariado se eliminó con los medios habituales, cucharilla de caries y fresas de carburo de tungsteno. Se prepararon, normalmente, dos áreas por cada diente 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 el corte del diente en cada área, una vez realizadas las mediciones experimentales.

Figura 2. Áreas de estudio seleccionadas y planificación de líneas de corte para la validación histológica.



3.2 Medición de la dureza clínica

La medición de la dureza clínica fue realizada por un operador experimentado con una sonda doble Hu-Friedy extu 17/23 (Mfo.Co.ILL,USA) por su extremo #23, y se determinaron tres categorías de dureza:

1ª. **Dentina blanda:** se caracteriza por deformarse cuando se presiona con un instrumento duro sobre ella y puede ser excavada fácilmente.

2ª. **Dentina correosa:** recuerda al tacto del cuero; no se deforma a la presión, pero puede ser excavada sin precisar mucha fuerza.

3ª. **Dentina dura:** físicamente resistente a la excavación manual, sólo puede ser eliminada usando fresas o instrumentos de corte bien afilados. Al arrastrar la punta de la sonda exploradora se oye un sonido estridente, denominado “chirrido o grito dentinario”.

3.3 Medición de la Láserfluorescencia cuantitativa (LIF-C)

En las áreas de estudio se midió la fluorescencia mediante el dispositivo KaVo DIAGNOdent pen® (Type 2190, SN 06- 1002105) a $\lambda = 655$ nm. Las mediciones (0-99) se tomaron por un operador (OP1), previamente calibrado con un operador experimentado en el uso clínico de la LIF-C (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. 3) fue del 0,88, acuerdo casi perfecto, según la escala de escala de Ladis y Koch. (25)

Figura 3. Fórmula del análisis de concordancia de Kappa

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

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

El dispositivo de LIF-C fue calibrado con un estándar de cerámica proporcionado por el fabricante y siguiendo sus instrucciones. 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, calculando el valor medio que se tomó como resultado.

3.4 Medición de la Láserfluorescencia cualitativa (LIF-CL)

En las áreas de estudio, se midió la fluorescencia mediante tres sistemas de LIF-CL: 1) Soprolife® (Acteon, La Ciotat, France) a $\lambda = 450$ nm. (Fig.4); el aparato Siroinspect® (Sirona Dental Systems Fabrikstrasse 31. 64625 Bensheim. Alemania) a $\lambda = 405$ nm (Fig. 4); y con el Sistema Vistaproof® (Dür Dental SE, 74321, Bietigheim-Bissingen, Alemania) a $\lambda = 405$ nm.

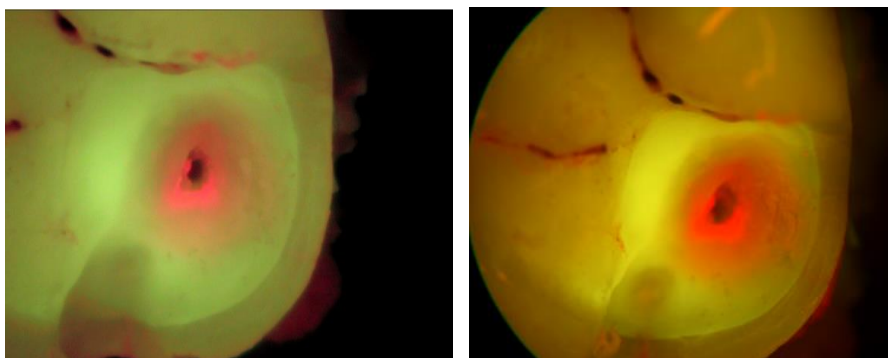
La valoración de las imágenes, producidas por sus softwares, se realizó por dos operadores, que no habían intervenido en la preparación de las muestras, y que las analizaron independientemente en la pantalla de un PC (Toshiba, mod. Satellite Pro) y en una habitación con el mismo grado de iluminación. Sólo hubo discrepancias en dos muestras que fueron eliminadas del estudio (n=88).

Figura 4. Medición con fluorescencia cualitativa a $\lambda=450$ 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 los que se añadieron rosa y rojo vivo, por presentarse fundamentalmente con los aparatos a $\lambda=405$ nm, a diferencia de los que hemos denominado rosa y rojo apagado (Fig.5).

Figura 5. Colores rosa vivo (Vistaproof®) y rojo vivo (Siroinspect®)



Por otra parte, en un estudio previo (24) se ha determinado que los colores que el fabricante recomienda para la interpretación del límite cavitario no corresponden con la mejor validez de la prueba, lo que ha conllevado a una recodificación de la escala de colores relacionada con la dentina recuperable/no recuperable y es la que hemos seguido en esta investigación (Tabla 1).

Tabla 1. Recodificación de colores en la Láserfluorescencia Cualitativa para la dentina recuperable/no recuperable.

	$\lambda=450nm$ (Soprolife®)			D	$\lambda=405nm$ (Siroinspect®)			D	$\lambda=405nm$ VistaProof®			
	H1 – H2 /	H3			H1 – H2 /	H3			H1 – H2 /	H3		
Blanco	4	1	2	E				E			E	
Gris	1		1	E	1			E	1		E	
Negro	1			E				E			E	
Verde	23	18	7	R	24	11	4	R	26	12	3	R
Amarillo	2	1	2	R		1		R				R
Naranja	4	2		R	9	9	5	R	4	5	1	R
Rosa				NR				R	3	6	5	E
Rojo		2	5		2	1		R	3		4	E
Rosa vivo								NR			2	NR
Rojo vivo			1	1	2	13				1	7	NR

Dentina; H1:Hiperm mineralizada; H2:Desmineralizada Profunda; H3: Desmineralizada Superficial E:Color excluido; R:Color dentina Recuperable; NR: Color dentina No Recuperable

3.5 Validación con marcadores de ADN

Cada diente fue cortado por las líneas de corte seleccionadas en espesores de $\geq 3mm$ usando la recortadora Struers Accutom-2 (Roper Technologies, Inc. Florida, USA), obteniendo 88 muestras dobles (mesial y distal del corte) de la que se eligió la más representativa del área explorada mediante las pruebas de dureza y Láserfluorescencia. 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%),

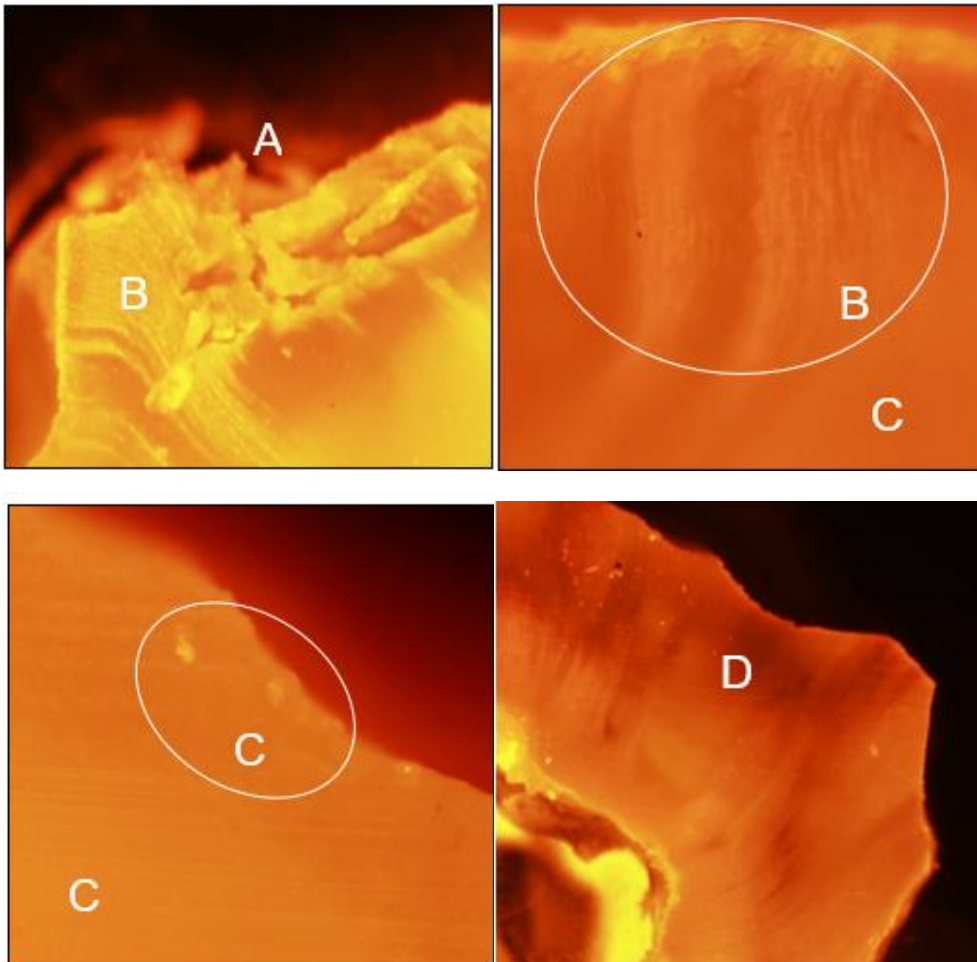
enjuagadas repetidamente con solución salina de fosfato tamponada, pH 7,2 (PBS), y teñidas con un marcador de ADN- Ioduro de Propidio 10 mg/ml [1:500], lavadas con PBS, introducidas en solución de Timol 1% y mantenidas en oscuridad. Las muestras marcadas fueron analizadas usando un microscopio de epifluorescencia OLYMPUS BX61, x10 en aire. Con el software del microscopio se obtuvieron las imágenes con distinto grado de fluorescencia. (Fig. 6). Un observador experimentado selecciono en cada muestra las áreas correspondientes a las cuatro capas de la caries, 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.
- Zona hipermineralizada:** zona contigua a la anterior, más profunda, con total ausencia de fluorescencia y de coloración oscura.

3.6 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron introducidos en el programa SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se calcularon las medias y las desviaciones estándar para los valores de la Láserfluorescencia Cuantitativa ($\lambda=655\text{nm}$) para cada capa de la caries dentinaria, previa comprobación de la distribución no normal de la muestra. Para conocer si existían diferencias estadísticamente significativas se aplicaron pruebas paramétricas (T de student) fijando la significación en $\alpha \leq 0,05$.

Figura 6. 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).



Para los datos cualitativos, prueba de dureza clínica y Láserfluorescencia cualitativa ($\lambda=450\text{nm}$ y $\lambda=405\text{nm}$), asociados a cada capa de caries dentinaria se aplicaron test no paramétricos (U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis) y para conocer si existían diferencias estadísticas se fijó la significación en $\alpha \leq 0,05$.

Para conocer la seguridad y validez de la dureza clínica y de la Láserfluorescencia cuantitativa y cualitativa como medio diagnóstico del límite cavitario, se calculó la Sensibilidad (S), Especificidad (SP), Valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, considerando la prueba segura cuando la suma de la Sensibilidad más la Especificidad fue $\geq 1,60$. Previamente para los valores numéricos de la LIF-C se estableció como mejor punto de corte 30, se consideró por mostrar el valor más alto en la suma de S+Sp.

4. RESULTADOS

Los resultados de la prueba de la **Dureza Clínica** muestran capacidad para diferenciar entre las capas de la caries dentinaria y entre la dentina recuperable y la no recuperable (Tabla 3). Aunque, no diferencian entre las capas cercanas al límite cavitario (Tabla 3). La categoría “dentina correosa” se reparte entre los estratos histológicos de la caries (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de la Dureza Clínica entre las capas de la caries dentinaria.

DUREZA CLINICA	(H1) Hipermineralizada		(H2) Desmineralizada Profunda		(H3) Desmineralizada Superficial	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Duro	32	86,5	15	62,5	9	40,9
Correoso	5	13,5	6	25,0	7	31,8
Blando	0	0,0	3	12,5	6	27,3
n=83	37	100	24	100	22	100

Tabla 3. Estadísticos de contraste de la Dureza para los estratos de la caries dentinaria.

ESTRATOS COMPARADOS	ESTADISTICOS DE CONTRASTE	
	U de Mann-Whitney	Prueba de Kruskal-Wallis
H1 - H2 - H3	---	0,001
H1 - H2	0,022	---
H1 - H3	0,000	---
H2 - H3	0,119	---
[H1+H2] – H3	0,001	---

Los resultados de la **Láserfluorescencia Cuantitativa ($\lambda=655\text{nm}$)** diferencian entre la dentina recuperable/no recuperable y entre los estratos que delimitan el límite cavitario (Tabla 5). Existen diferencias significativas entre las medias, aunque las desviaciones standard son amplias (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución de la Láserfluorescencia (LIF) Cuantitativa en las capas de la caries dentinaria.

LIF $\lambda=655\text{nm}$	H1 Hipermineralizada		H2 Desmineralizada Profunda		H3 Desmineralizada Superficial	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
		21,92	26,29	30,7	26,95	73,77
n=83	37		24		22	

SD:desviación estándar

Tabla 5. Estadísticos de contraste de la Láserfluorescencia Cuantitativa para la caries dentinaria.

ESTRATOS COMPARADOS	ESTADISTICO DE CONTRASTE/ Láserfluorescencia $\lambda=655\text{nm}$
	T de Student ($\alpha \leq 0,05$)
H1 – H2	0,125
H1 – H3	0,000
H2 - H3	0,000
[H1+H2] – H3	0,000

Los resultados para la **Láserfluorescencia Cualitativa ($\lambda=450\text{nm}$ Soprolife)** diferencian entre la dentina recuperable/no recuperable y no entre los estratos que delimitan el límite cavitario (Tabla 7). La categoría “Verde-Naranja” es más frecuente para los estratos de dentina recuperable y la categoría “Rojo” para la capa desmineralizada superficial (Tabla 6).

Tabla 6. Distribución de la Láserfluorescencia (LIF) $\lambda=405\text{nm}$ entre las capas de caries dentinaria.

Soprolife $\lambda=450\text{nm}$	(H1) Hipermineralizada		(H2) Desmineralizada Profunda		(H3) Desmineralizada Superficial	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Verde	23	62,2	18	75,0	7	31,8
Naranja	6	16,2	3	12,5	2	9,1
Rojo	0	0,0	2	8,3	6	27,3
Otros	8	21,6	1	4,2	7	31,8
n=83	37	100	24	100	22	100

Tabla 7. Estadísticos de contraste de la Láserfluorescencia $\lambda=450\text{nm}$ para la caries dentinaria.

ESTRATOS COMPARADOS	ESTADISTICOS DE CONTRASTE / Láserfluorescencia $\lambda=405\text{nm}$	
	U de Mann-Whitney	Prueba de Kruskal-Wallis
H1 - H2 - H3	---	0,121
[H1+H2] – H3	0,041	---

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

Los resultados para la **Láserfluorescencia Cualitativa ($\lambda=405\text{nm}$ -Siroinspect®)** diferencian entre la dentina recuperable/no recuperable y entre los estratos que delimitan el límite cavitario (Tabla 9). Las categorías “Verde-Naranja-Rojo” son más frecuente para los estratos de dentina recuperable y la categoría “Rojo Vivo” para la capa Desmineralizada Superficial (Tabla 8).

Tabla 8. Distribución de la Láserfluorescencia (LIF) $\lambda=405\text{nm}$ en las capas de la caries dentinaria.

LIF (Siroinspect®) $\lambda=405\text{nm}$	(H1) Hipermineralizada		(H2) Desmineralizada Profunda		(H3) Desmineralizada Superficial	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Verde	24	64,9	11	45,8	4	18,2
Naranja-Rojo	11	29,7	11	45,8	5	22,2
Rojo Vivo	2	5,4	2	8,3	13	59,1
n=83	37	100	24	100	22	100

Tabla 9. Estadísticos de contraste de la Láserfluorescencia (Siroinspect®) en la caries dentinaria.

ESTRATOS COMPARADOS	ESTADISTICOS DE CONTRASTE / Láserfluorescencia $\lambda=405\text{nm}$	
	U de Mann-Whitney	Prueba de Kruskal-Wallis
H1 - H2 - H3	---	0,000
H1 - H2	0,154	---
H1 - H3	0,000	---
H2 - H3	0,000	---
[H1+H2] – H3	0,000	---

Los resultados para la **Láserfluorescencia Cualitativa ($\lambda=405\text{nm}$ -Vistaproof®)** diferencian entre la dentina recuperable/no recuperable y entre los estratos que delimitan el límite cavitario (Tabla 11). Las categorías “Verde-Naranja” son más frecuentes para los estratos de dentina recuperable y la categoría “Rojo Vivo” para la capa de dentina desmineralizada (Tabla 10).

Tabla 10. Distribución de la Láserfluorescencia (LIF) $\lambda=405\text{nm}$ entre las capas dentinarias.

LIF (Vistaproof®) $\lambda=405\text{nm}$	(H1) Hipermineralizada		(H2) Desmineralizada Profunda		(H3) Desmineralizada Superficial	
	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia	Porcentaje
Verde/Naranja	30	81,1	17	70,8	4	18,2
Rojo Vivo	0	0,0	1	4,2	9	40,9
Otros*	7	18,9	6	25,0	9	40,9
n=83	37	100	24	100	22	100

(*) Corresponden a la categoría Rosa-Rojo Apagado (n=21) y a gris (n=1)

Tabla 11. Estadísticos de contraste de la Láserfluorescencia (Vistaproof®) para las capas de caries.

ESTRATOS COMPARADOS	ESTADÍSTICOS DE CONTRASTE/ Láserfluorescencia $\lambda=405\text{nm}$	
	U de Mann-Whitney	Prueba de Kruskal-Wallis
H1 - H2 - H3	---	0,000
H1 - H2	0,364	---
H1 - H3	0,000	---
H2 - H3	0,000	---
[H1+H2] – H3	0,000	---

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

La **Validez y Seguridad** de las pruebas diagnósticas muestran una mayor Especificidad que Sensibilidad, excepto para la LIF-Cuantitativa y la LIF-CL (Vistaproof®) que son más sensibles que específicas (Tabla 12). La LIF Cuantitativa y Cualitativa, muestran valores más altos para los Valores Predictivos negativos y positivos que la Dureza Clínica (Tabla 12).

Tabla 12. Validez y Seguridad para la Dureza y Láserfluorescencia (LIF) en el Diagnóstico del Límite Cavitario.

VALIDEZ Y SEGURIDAD	S	Sp	S+Sp	VPP	VPN
DUREZA CLINICA	0,27	0,95	1,22	0,67	0,78
LIF* $\lambda=655$ nm	0,82	0,73	1,55	0,68	0,86
LIF1 $\lambda=450$ nm	0,40	0,96	1,36	0,75	0,85
LIF2 $\lambda=405$ nm	0,59	0,95	1,54	0,81	0,86
LIF3 $\lambda=405$ nm	0,98	0,69	1,67	0,9	0,92

(*) Punto de corte para la LIF Cuantitativa = 23; LIF1: Soprolife; LIF2: Siroinspect®; LF 3: Vitaproof® S: Sensibilidad; Sp: Especificidad; VPP: Valor Predictivo positivo; VPN: Valor Predictivo Negativo.

5. DISCUSION

Este estudio de investigación tiene como objetivo poner de manifiesto el papel de la Láserfluorescencia (LIF) frente a la dureza clínica como medio para determinar el límite cavitario entre dentina recuperable y no recuperable en la caries de dentina. La capacidad de la LIF para diferenciar entre tejido sano y enfermo ha sido demostrada por diversos autores con diferentes aplicaciones; en el diagnóstico de la caries oculta de dentina (26,27) y en las exposiciones pulpares (28), etc. Actualmente, la Dureza Clínica de la dentina es el signo de mayor relevancia para establecer el Límite Cavitario (13). Sin embargo, esta prueba depende del operador, del instrumento y de la técnica empleada. Por ello, muchos de los resultados son producto de pruebas en manos de operadores experimentados y dedicados a la investigación y con criterios basados en la dicotomía blando-duro. Con los nuevos conceptos sobre la dureza clínica (14), la escasa agudeza perceptiva del Clínico respecto a la dureza (21) y las lagunas que existen en la investigación de la LIF (escasos estudios de la LIF Cualitativa) resaltamos la pertinencia de este estudio.

La Dureza Clínica (DC) es capaz de diferenciar entre dentina recuperable y no recuperable, pero a costa de unir las categorías “dura-correosa” donde la dura si se alinea claramente con la dentina hipermineralizada (HM) y también con la Desmineralizada Profunda (DP), pero no lo hace la correosa que se reparte entre los estratos HM, DP y Desmineralizada Superficial (DS). Así como la dentina dura y blanda son claramente identificadas por el clínico y con su correspondiente estrato; la correosa constituye un reto pues difícilmente la podemos asociar con el límite cavitario. No obstante, la capa hipermineralizada es siempre interpretada como sana y ello es una garantía para delimitar el límite cavitario. Aunque, conlleva a preparaciones sobreextendidas que no reflejan el verdadero límite cavitario histológico (LC), 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.

La Láserfluorescencia Cuantitativa (LIF-C) a $\lambda=655\text{nm}$, diferencia entre la dentina recuperable de la no recuperable, también puede diferenciar entre las capas DP y DS, con lo que puede ser una buena prueba para la determinación del verdadero LC. Los valores de la LIF-C obtenidos en este estudio son superiores a los encontrados por otros autores (29) para

la dentina sana y aunque existe una gran diferencia entre los valores medios entre DP y DS, la alta desviación estándar implica que existen valores de LIF-C no muy específicos en las distintas capas del LC, lo que analizaremos en el apartado de Validez y Seguridad.

Por otra parte, uno de los inconvenientes de la LIF son las fuentes de fluorescencia no cariogénicas como las tinciones que pueden inducir a falsos negativos (16) y la cercanía a la pulpa que tiene su propia fluorescencia (20). Sin embargo, en dentinas no teñidas, esta prueba debe ser muy tenida en cuenta, pues puede ser un elemento que, junto con la dureza clínica, puede mejorar el rendimiento diagnóstico durante la eliminación del tejido cariado. También conviene citar la gran reproductibilidad de la prueba, tanto intraoperador como interoperador.

Las LIF-Cualitativas (LIF-CL), como ya se ha comentado, han sido muy poco estudiadas. A diferencia de la Dureza Clínica, la LIF-CL es un medio que explora en tiempo real la totalidad de la dentina, compartiendo con la LIF-C la reproductibilidad, objetividad de la prueba y la capacidad de monitorización. Sin embargo, muestra resultados diferentes, según la longitud de onda empleada y el aparato, incluso a una misma longitud de onda.

La LIF-CL a $\lambda=450$ nm, tiene capacidad para diferenciar entre dentina recuperable y no recuperable, aunque no diferencia a nivel del Límite Cavitario (DP-DS). A diferencia de lo que indica el fabricante el color anaranjado de la dentina no debe ser eliminado. Así, las coloraciones en rojo con la LIF deben ser eliminadas y no las comprendidas entre el espectro verde-naranja. No hemos encontrados estudios respecto a la eliminación del tejido cariado con esta LIF-CL a $\lambda=450$ nm, con lo que no podemos establecer comparación entre nuestros resultados y los de otros autores.

La LIF-CL a $\lambda=405$ nm, hemos utilizado dos sistemas: Siroinspect® (LIF-CL1) y Vistaproof® (LIF-CL2). Cada uno de ellos tiene una escala diferente para la interpretación de los resultados. La LIF-CL1 y LIF-CL2, tienen en común que para la dentina de la capa DS dan colores rosa-rojo pero muy luminosos (vivos). Sin embargo, para la dentina *Recuperable* el Siroinspect® muestra colores entre el espectro Verde-Rojo y el Vistaproof® solo entre el espectro Verde-Naranja. Para este último, los colores Rosa-Rojo poco luminosos (apagados) no son concluyentes entre el binomio *Recuperable/No Recuperable*, por lo que no deben ser tenidos en cuenta esta categoría (rojo-rosa apagado) en este aparato, en nuestra opinión y según los resultados obtenidos.

Con estas recodificaciones la LIF-CL a 405nm tiene la capacidad diferenciar entre las capas del LC (DP-DS), al igual que la LIF-C. Por ello, puede determinar el límite cavitario histológico (DP-DS) y la dentina *Recuperable/No Recuperable*. No debemos olvidar las limitaciones expresadas: fluorescencia no cariogena, colores no representativos (blanco-gris-negro), etc.

No obstante, también debemos aprovechar las características que nos proporciona la Dureza Clínica, por ello abogamos por la utilización conjunta de ambas pruebas LIF+Dureza Clínica. Es un planteamiento que no hace más que fundamentarse en las características descritas para las capas de las caries dentinarias, compuestas por grados de desmineralización (Dureza) y, por otra, la contaminación bacteriana (Láserfluorescencia). Nos faltaría para un estudio clínico completo del límite cavitario, testar la integridad de las fibras de colágeno durante la eliminación del tejido cariado. Esto lo podríamos hacer con el ácido rojo 1 % en propileno glicol (Kuraray Noritake Dental), que se ha descrito que se puede fijar a las proteínas de las fibras de colágeno una vez rotas o desestructuradas. 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 mediante 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.(15)

Hasta ahora hemos reflejado la utilidad de las pruebas en cuanto a la capacidad de identificar las capas de la caries dentinaria, pero ¿con que Validez y Seguridad? Para contestar a esta pregunta, hemos realizado para cada una de las pruebas la Sensibilidad (S) y Especificidad (Sp). La suma de S+Sp debe ser $\geq 1,60$ para considerar la prueba efectiva.

En general, la Sp es superior a la S en la mayoría de las pruebas. El combinar una prueba Sensible con una Específica aumenta la capacidad diagnóstica por lo que sería interesante combinar la Dureza Clínica con la LIF a 655nm y sobre todo observando la baja Sensibilidad (0,27) de la Dureza. La LIF-C (S=1,55) no supera el valor 1,60, sin embargo, la S es de 0,82, que precisamente es de lo que adolece la Dureza, principalmente debido a la difícil interpretación de la dentina “correosa”. No obstante, este es un tema controvertido y hay estudios en los que se demuestra que incluso una dentina desestructurada e infectada se puede recuperar (30), aunque solo lo recomendaríamos en cavidades cercanas a pulpa, donde no podemos eliminar la dentina correosa.

La LIF-CL presenta sus mejores resultados en la LIF a 405nm y en la versión Vistaproof® (S+Sp=1,67). Además, muestra una sensibilidad de (0,98), si bien no hay que olvidar que para alcanzar estos resultados no se pueden tener en cuenta la categoría rojo apagado y gris (25% de las medidas). Por otra parte, la versión Siroinspect®, muestra una Validez del 1,54, inferior a la anterior, pero donde se pueden tener en cuenta todas las categorías de la escala de colores. Entendiendo el significado de la Sensibilidad y Especificidad, se puede valorar la validez de cada prueba (Tabla 12), pero de una forma general la LIF debe ser un complemento a la dureza 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 (VP) completaremos esta información.

En ciencias de la salud para considerar una prueba aceptable debe tener un valor $\geq 0,8$, lo que es aplicable a los VP positivos y negativos. Los VP+ son muy altos para las LIF a 405nm y también superiores a 0,8 para los VP-. Los inconvenientes son para la LIF-CL2, en las que tenemos eliminar categorías de color por no ser discriminativos. Los VP- son aceptables para la LIF a 655nm y 450nm y para la Dureza de 0,78, por ello cuando tenemos un resultado de dentina recuperable posiblemente lo es, pero no podemos afirmar lo mismo ante un caso positivo y considerarlo como no recuperable.

A la falta de estudios confirmatorios, dada la escasez de publicaciones en este ámbito y sobre todo para la LIF-Cualitativa estos resultados deben ser tomados con precaución. También la extrapolación de estudios in vitro a in vivo tienen sus limitaciones. No obstante, ante pruebas objetivas que dependen poco del operador, de la técnica y del instrumento; con la capacidad de explorar toda la dentina y las limitaciones de la Dureza, las pruebas basadas en la Láserfluorescencia deberían ser aplicadas con mayor frecuencia en este campo.

6. CONCLUSIONES

1. No podemos asociar la dentina correosa con el límite cavitario, pues se reparte entre los estratos hipermineralizado, desmineralizado profundo y desmineralizado superficial. Sin embargo, la dentina dura (recuperable) y la blanda (no recuperable) son identificadas claramente por el clínico con sus correspondientes estratos en la caries dentinaria.
2. La dureza clínica no constituye un buen método para determinar el límite cavitario, pues puede conllevar a realizar preparaciones dentarias sobreextendidas que no reflejan el verdadero límite cavitario histológico.
3. La Láserfluorescencia Cuantitativa a $\lambda=655\text{nm}$ es capaz de diferenciar la dentina recuperable de la no recuperable y las capas del límite cavitario. Por lo que constituye una buena prueba complementaria para la dureza clínica.
4. Entre los aparatos de Láserfluorescencia cualitativa existen diferencias entre su capacidad diagnóstica dependiendo de su longitud de onda. Todos diferencian entre dentina Recuperable/ No Recuperable, pero son los de $\lambda=405$ los que diferencian el Límite Cavitario. La validez de los LIF $\lambda=405$ es superior, pero para el Sistema Vistaproof®, la categoría rosa-rojo no es diagnóstica de la capa dentinaria.
5. La Láserfluorescencia debe ser un complemento de la dureza clínica en la exploración del límite cavitario de las restauraciones dentales.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Tomes J. A System of dental Surgery. 1 ed. London: John Churchill; 1859.
2. Fejerskov O, Larsen M. Demineralization and remineralisation: the key to understanding clinical manifestations of dental caries. Fejerskov O, Nyvad B, Kidd EA. Dental caries. Oxford:Wiley Blackwell; 2015. p.160-169
3. 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).
4. Marsh P, Martin M. Marsh and Martin's Oral Microbiology. 6nd.ed. New York: Elviesier; 2016. Cap 5 p.81-111.
5. Thylstrup A, Fejerskov O. Caries. Barcelona: Doyma; 1988.
6. Sumney DL, Jordan H V. Characterization of Bacteria Isolated from Human Root Surface Carious Lesions. J Dent Res. 1974; 53(2):343–51.
7. 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.
8. Filoche SK, Anderson SA, Sissons CH. Biofilm growth of Lactobacillus species is promoted by Actinomyces species and Streptococcus mutans. Oral Microbiol Immunol. 2004;19(5):322–6.
9. Nadal-Valldaura A. Patología dentaria. Barcelona: Rondas; 1987.
10. García Barbero J. Patología y terapéutica dental : operatoria dental y endodoncia. Barcelona: Elsevier; 2014.
11. 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.
12. Banerjee A, Watson TF, Kidd EA. Dentine caries excavation: a review of current clinical techniques. Br Dent J. 2000;188(9):476–82.
13. Kidd EA, Ricketts DN, Beighton D. Criteria for caries removal at the enamel-dentine

- junction: a clinical and microbiological study. *Br Dent J.* 1996;180(8):287–91.
14. Herrera M, Bonilla V, Segura Egea JJ. Caries enfermedad versus caries lesión: implicaciones diagnósticas y terapéuticas según el International Caries Consensus Collaboration Group. *Endodoncia.* 2016;34(4):204–219.
 15. Sato Y, Fusayama T. Removal of dentin by fuchsin staining. *J Dent Res.* 1976;55(4):678–83.
 16. Lussi A, Hibst R, Paulus R. DIAGNOdent: an optical method for caries detection. *J Dent Res.* 2004;83.
 17. Anttonen V, Seppä L, Hausen H. A follow-up study of the use of DIAGNOdent for monitoring fissure caries in children. *Dent Oral Epidemiol.* 2004;32(4):312–8.
 18. Reis A, Mendes FM, Angnes V, Angnes G, Grande RHM, Loguercio AD. Performance of methods of occlusal caries detection in permanent teeth under clinical and laboratory conditions. *J Dent.* 2006;34(2):89–96.
 19. Braun A, Krause F, Jepsen S. The influence of the calibration mode of a laser fluorescence device on caries detection. *Caries Res.* 2005;39(2):144–9.
 20. Neves AA, Coutinho E, De Munck J, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Does DIAGNOdent provide a reliable caries-removal endpoint? *J Dent.* 2011;39(5):351–60.
 21. Ramirez B. 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. [Trabajo fin de grado]. Sevilla:departamento de estomatología. Universidad de Sevilla; 2018.
 22. Schwendicke F, Frencken JE, Bjørndal L, Maltz M, Manton DJ, Ricketts D, et al. Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Carious Tissue Removal. *Adv Dent Res.* 2016;28(2):58–67.
 23. Innes NPT, Frencken JE, Bjørndal L, Maltz M, Manton DJ, Ricketts D, et al. Managing Carious Lesions: Consensus Recommendations on Terminology. *Adv Dent Res.* 2016;28(2):49–57.
 24. Laverde D. 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

- fin de máster]. Sevilla: departamento de estomatología. Universidad de Sevilla; 2018.
25. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159–74.
 26. 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.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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(1):14–9.
 30. Chibinski ACR, Reis A, Kreich EM, Tanaka JLO, Wambier DS. Evaluation of primary carious dentin after cavity sealing in deep lesions: a 10- to 13-month follow-up. *Pediatr Dent*. 2013;35(3):107-12.