



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**Efecto de la Microdureza del Esmalte Dental en  
Condiciones de pH Cíclico con una Pasta  
Remineralizante**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**ESPECIALISTA EN ESTOMATOLOGÍA PEDIÁTRICA.**

P R E S E N T A

**C.D. CELINA LIZBETH CID MONDRAGÓN**

**TUTORA: Dra. CECILIA CARLOTA BARRERA ORTEGA**



Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## COMITÉ TUTORAL

---

DRA. CECILIA CARLOTA BARRERA ORTEGA  
DIRECTORA DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

---

DR. ALVARO GARCÍA PÉREZ  
CO - DIRECTOR DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>6</b>
2.2 FOSFOPÉPTIDO DE CASEÍNA Y FOSFATO DE CALCIO AMORFO .....	6
2.3 AGENTES REMINERALIZANTES DEL ESMALTE .....	7
2.4 INFLUENCIA DEL MEDIO AMBIENTE EN LA ESTRUCTURA DEL ESMALTE .....	9
2.5 REMINERALIZACIÓN BIOLÓGICA .....	11
2.6 FORMACIÓN Y MINERALIZACIÓN DEL ESMALTE DENTAL .....	13
2.7 PH CÍCLICO .....	16
2.8 MICRODUREZA .....	17
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>19</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>20</b>
<b>5. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>21</b>
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
2.10.1 Objetivo General .....	22
2.10.2 Objetivo Específico .....	22
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
7.2 OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA .....	23
7.3 LESIÓN INICIAL .....	25
7.4 PH CÍCLICO .....	26
7.5 VALORACIÓN DE LA LESIÓN .....	27
<b>8. RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
<b>9. DISCUSIÓN</b> .....	<b>36</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	<b>41</b>
<b>11. PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO</b> .....	<b>42</b>
<b>12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>43</b>

## Índice de Figuras

Figura 1 Mi Paste™ pasta de fosfopéptido de caseína y fosfato de calcio amorfo.	7
Figura 2 Disposición de los prismas del esmalte. Se identifican los ángulos que forman los prismas con la superficie externa (39).	14
Figura 3 Diagrama del cristal de hidroxiapatita. (39)	15
Figura 4 Proyección en una superficie plana de los iones que de forma tridimensional configuran la estructura cristalina de la hidroxiapatita. (39)	16
Figura 5 Esquema de la indentación Vickers.	18
Figura 6 Terceros molares sin defectos estructurales en el esmalte dental	24
Figura 7 Disposición de las superficies de trabajo	25
Figura 8 Inmersión de 96 horas de los grupos experimentales para realizarles la lesión inicial	26
Figura 9 Nanoindentador Nanovea CB500 <sup>R</sup> IIM, CU, UNAM.	28
Figura 10 Muestras fijadas sobre porta objetos, listas para ser indentadas, Fuente directa.	29
Figura 11 Indentación Vickers a los 5 días de tratamiento, Fuente directa.	30
Figura 12 Indentación Vickers a los 10 días de tratamiento, Fuente directa.	30
Figura 13 Indentación Vickers a los 15 días de tratamiento, Fuente directa.	31

## Índice de Gráficas

Gráfica 1 Comportamiento de los grupos experimentales después de 5 días de tratamiento. Fuente directa.....	32
Gráfica 2 Comportamiento de los grupos experimentales después de 10 días de tratamiento, Fuente directa.....	33
Gráfica 3 Comportamiento de los grupos experimentales después de 15 días de tratamiento, Fuente directa.....	34
Gráfica 4 Comportamiento de todos los grupos experimentales y sus diferentes tiempos con las diferencias significativas, Fuente directa. ....	35

## GLOSARIO

<b>Ca+</b>	Calcio
<b>CPP-ACP</b>	<i>Casein Phosphopeptide Amorphous Calcium Phosphate</i>
<b>CU</b>	Ciudad Universitaria
<b>p=</b>	Diferencias estadísticamente significativas
<b>Dr.</b>	Doctor
<b>Dra.</b>	Doctora
<b>EDS</b>	Espectrometría de Dispersión de Energía de Rayos X
<b>FESI</b>	Facultad de Estudios Superiores Iztacala
<b>Fig.</b>	Figura
<b>FHA</b>	Fluorhidroxiapatita
<b>F<sup>-</sup></b>	Fluoruro
<b>H<sup>+</sup></b>	Hidrogeno
<b>PO<sub>4</sub><sup>-3</sup></b>	Fosfato
<b>FCA</b>	Fosfato de calcio amorfo
<b>FPC</b>	Fosfopéptido de caseína
<b>FPC-FCA</b>	Fosfopéptido de caseína-fosfato de calcio amorfo
<b>f</b>	Fuerza
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>g</b>	Gramos
<b>GC</b>	Grupo control
<b>ES</b>	Grupo esmalte sano
<b>HVN</b>	<i>Hardness Vickers Number</i>
<b>HA</b>	Hidroxiapatita
<b>hrs</b>	Horas
<b>IIM</b>	Instituto de Investigaciones en Materiales
<b>kg</b>	Kilogramos
<b>KHN</b>	<i>Knoop hardness number</i>
<b>L</b>	Litros
<b>MD</b>	microdureza
<b>mg</b>	Miligramos
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mM</b>	milimolar
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>SEM</b>	<i>Scanning electron microscopy</i>
<b>ICDAS II</b>	Sistema Internacional de Detección y Valoración de Caries
<b>UAD</b>	Unión amelo-dentinaria
<b>UNAM</b>	Universidad Nacional Autónoma de México

## **Agradecimientos**

Este trabajo es el fruto de mucho esfuerzo y dedicación que sin el apoyo y la confianza de las personas mencionadas a continuación no sería posible.

A mi amada Universidad Nacional Autónoma de México y a mi casa máxima de estudios la Facultad de Estudios Superiores Iztacala las cuales me abrieron las puertas infinitas al conocimiento mostrándome que los límites sólo son mentales.

A la División de Posgrado e Investigación. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Al Dr. Stephen Muhl Sanders y a la Dra. Sandra Elizabeth Rodil Posada del Instituto de Investigación en Materiales, CU, UNAM, del Departamento de Materiales de Baja Dimensionalidad por dejarme trabajar en sus instalaciones para esta investigación.

A mi tutora, profesora y coordinadora de la Especialización en Estomatología Pediátrica. FES-Iztacala. UNAM. La Dra. Cecilia Carlota Barrera Ortega que con su profesionalismo, paciencia y excelente liderazgo me guio en todo este proceso eliminando los miedos y dudas que tenía sobre lo que yo era capaz de lograr motivándome y exigiéndome cada vez más, valores que llevare siempre en mi corazón y visión. De igual manera agradezco su amistad y apoyo personal.

Al Dr. Álvaro García Pérez por la paciencia y apoyo en las revisiones y pasos de este trabajo.

A mis compañeras y profesores de la Especialización los cuales ayudaron a formar mi carácter y una visión muy diferente en el ámbito profesional y personal.

Y especialmente agradezco a Dios por darme unos padres maravillosos que antes de que yo naciera ya estaban viendo que era lo mejor para mí y desde entonces me han brindado todo en esta vida, a ellos que siempre han creído en mí, dándome ejemplo de superación, humildad y sacrificio, enseñándome a valorar y agradecer todo en esta vida y a mi hermano quien es mi alegría y compañero de risas y sobre todo mi ejemplo a seguir. Sin ustedes no se hubiera podido realizar este proyecto ni ningún otro.

## **EL CAMINO CORRECTO**

Si tienes miedo a intentarlo  
es porque lo estás deseando.

El miedo te indica,  
claramente,  
que debes hacerlo.

## RESUMEN.

El Fosfopéptido de Caseína-Fosfato de calcio Amorfo (*FPC-FCA*) es utilizado para promover la remineralización dental en pacientes pediátricos con susceptibilidad a la caries dental. **Objetivo:** Evaluar el efecto de la pasta remineralizante midiendo la microdureza del esmalte dental en condiciones de pH cíclico. **Material y métodos:** En 35 terceros molares retenidos, obtenido por cirugía, antes o después del tratamiento ortodóncico, se realizó un corte mesiodistal y se obtuvieron 70 superficies de trabajo, de las cuales se dividieron en un grupo experimental (*FPC-FCA* n=30), un grupo control (*GC* n=30) y un grupo de esmalte sano (*ES* n=10) a los cuales se les realizó una lesión inicial mediante inmersión en solución desmineralizante durante 96 horas a pH 4.4. Los grupos experimentales fueron sometidos a pH cíclico alternando inmersión en soluciones desmineralizantes (pH 4.4 durante 3 horas) y soluciones remineralizantes (pH 7.2 durante 21 horas) durante 5, 10 y 15 días. La microdureza del esmalte dental superficial fue determinada a los 5, 10 y 15 días con un microdurómetro Vickers (*NANOVEA Nano/Micro Hardness&Scratch Tester* ®). **Resultados:** el promedio de la microdureza a los 5 días fue de 66.6 ( $\pm 23.0$ ) en el grupo de *ES*, 77.9 ( $\pm 7.6$ ) en el *GC* y 84.3 ( $\pm 26.3$ ) en el grupo *FPC-FCA*, no encontrando diferencias significativas ( $p=0.173$ ). Al comparar los promedios de microdureza a los 10 días por grupo la distribución fue: *ES* 79.0 ( $\pm 7.5$ ), *GC* 75.0 ( $\pm 8.0$ ) y grupo *FPC-FCA* 101.2 ( $\pm 22.5$ ) ( $p=0.002$ ). A los 15 días la distribución fue: *ES* 76.9 ( $\pm 11.1$ ), *GC* 70.4 ( $\pm 15.5$ ) y grupo *FPC-FCA* 93.8 ( $\pm 22.9$ ) ( $p=0.021$ ). Al aplicar las pruebas post-hoc se encontraron diferencias a los 10 días entre el grupo *ES* vs *FPC-FCA* ( $p=0.006$ ) y *GC* vs *FPC-FCA* ( $p=0.001$ ). A los 15 días *GC* vs grupo *FPC-FCA* ( $p=0.016$ ). **Conclusión:** El uso de la pasta con fosfopéptido de caseína y fosfato de calcio amorfo si remineraliza la superficie dental en condiciones de pH cíclico.

**Palabras clave:** *FPC-FCA*, fosfopéptido de caseína y fosfato de calcio amorfo, esmalte dental, desmineralización, remineralización, pH cíclico.

## ABSTRACT

The Casein Phosphopeptide-Amorphous calcium phosphate (CCP-ACP) is used to promote dental remineralization in pediatric patients with susceptibility to dental caries. **Objective:** To evaluate the effect of remineralizing paste by measuring the microhardness of dental enamel under cycling pH conditions. **Material and methods:** In 35 retained third molars, obtained by surgery, before or after the orthodontic treatment, a mesiodistal cut was made and 70 work surfaces were obtained, of which were divided into an experimental group (CCP-ACP), a control group (CG n = 30) and a group of healthy enamel (HE) to which an initial lesion was performed by immersion in demineralizing solution for 96 hours at pH 4.4. The experimental groups were subjected to cyclic pH alternating immersion in demineralizing solutions (pH 4.4 for 3 hours) and remineralizing solutions (pH 7.2 for 21 hours) for 5, 10 and 15 days. The microhardness of the superficial dental enamel was determined at 5, 10 and 15 days with a Vickers microdurometer. (NANOVEA Nano/Micro Hardness&Scratch Tester®). **Results:** the average microhardness at 5 days was 66.6 ( $\pm$  23.0) in the HE group, 77.9 ( $\pm$  7.6) in the CG and 84.3 ( $\pm$  26.3) in the CCP-ACP group, finding no significant differences ( $p = 0.173$ ). When comparing the microhardness averages at 10 days per group, the distribution was: HE 79.0 ( $\pm$  7.5), CG 75.0 ( $\pm$  8.0) and group CCP-ACP 101.2 ( $\pm$  22.5) ( $p = 0.002$ ). After 15 days the distribution was: HE 76.9 ( $\pm$  11.1), CG 70.4 ( $\pm$  15.5) and group CCP-ACP 93.8 ( $\pm$  22.9) ( $p = 0.021$ ). When applying the post-hoc tests, differences were found at 10 days between the HE group vs CCP-ACP ( $p = 0.006$ ) and CG vs CCP-ACP ( $p = 0.001$ ). At 15 days CG vs CCP-ACP group ( $p = 0.016$ ). **Conclusion:** The use of paste with casein phosphopeptide and amorphous calcium phosphate remineralizes the dental surface under conditions of cyclic pH

**Key words:** CCP-ACP, casein phosphopeptide and amorphous calcium phosphate, dental enamel, demineralization, remineralization, cycling pH.

## 1. INTRODUCCIÓN

Varios agentes de remineralización han sido introducidos para aumentar la resistencia del esmalte dental mostrando un gran potencial anticaries, ya que pueden remineralizar las lesiones incipientes en el esmalte, un agente remineralizante recientemente introducido son los nanocomplejos de fosfato de calcio amorfo (FPC-FCA) de caseína (1). El FPC-FCA proviene de una proteína de la leche llamada caseína y es un agente remineralizante que previene la desmineralización del esmalte dental (2). Su mecanismo de acción del FPC-FCA consiste en aumentar los niveles de iones de calcio y fosfato liberado a partir del fosfato de calcio amorfo en las superficies de esmalte, manteniendo la sobresaturación de estos iones en la cavidad bucal. El fosfato de calcio amorfo (FCA) favorece la proximidad entre los iones de calcio y fosfato, además que favorece el proceso de desmineralización y remineralización (3).

Dentro de las ventajas obtenidas con FPC-FCA se encuentran la capacidad de localización del calcio y fosfato en el *biofilm* cerca del diente. Cuando el pH de la cavidad bucal disminuye, las proteínas fosfopéptido de caseína liberan calcio y fosfato amorfos, creando un estado sobresaturado de calcio y fosfato alrededor del diente (4). Además, la presencia de FPC-FCA retrasa la formación del *biofilm* y favorece la cristalización de fosfatos de calcio (5).

Asimismo, se han realizado investigaciones para encontrar la asociación de FPC-FCA con la pasta dental con fluoruro, ya que existe poca información sobre si esta combinación mejora la remineralización (6; 7; 8). Sinfiteli PP *et al.*, en un estudio donde evaluó el efecto de las pastas FPC-FCA y FPC-FCAF asociadas con un dentífrico con fluoruro para prevenir la desmineralización del esmalte, encontró que la pasta fluorada en combinación con FPC-FCA inhibe la desmineralización del esmalte (9). Por otra parte, Meyer-Lueckel H *et al.*, comparó los efectos remineralizantes inducidos por la aplicación de complejos de fosfato de calcio amorfo (FPC-FCA) estabilizados con fosfopéptido de caseína (FPC-FCA containing

cream without fluoride) después del uso de la pasta dental con fluoruro en un estudio *in situ*, encontraron que el uso adicional de una pasta que contiene FPC-FCA (1) parece ser menos eficaz para la remineralización de las lesiones de caries que la aplicación prolongada de pasta dental con fluoruro (10).

Por otra parte, los modelos de pH cíclico son modelos químicos que sirven para evaluar los procesos de desmineralización y remineralización en intervalos constantes de tiempo para simular los ciclos de pH en el entorno bucal, proporcionando modelos *in vitro* que reproducen el proceso de caries (11; 12). Asimismo, la prueba de microdureza de la superficie del esmalte ha sido utilizada en varias investigaciones y ha demostrado ser muy útil en la detección de las etapas iniciales de la desmineralización que se producen en la superficie del esmalte (13; 14).

El concepto de remineralización se conoce desde hace más de 100 años, pero sólo en las recientes décadas se ha aceptado su rol terapéutico en el control de la caries dental. En cariología, la remineralización del esmalte es análoga a la curación de las heridas en los tejidos blandos del cuerpo. La remineralización constituye un proceso natural de reparación de las lesiones producidas por desequilibrio entre la pérdida de minerales y su posterior recuperación. Es el resultado de la detención o regresión de la lesión, al disminuir el ataque cariogénico, aumenta la resistencia de la superficie del diente o la combinación de ambos procesos (15).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la caries se define como un proceso patológico localizado que se inicia tras la erupción dental y puede producir reblandecimiento del tejido duro del diente evolucionando hasta la formación de una cavidad, de igual forma se produce por los subproductos ácidos resultantes de la fermentación bacteriana de los carbohidratos de la dieta; es multifactorial y se asocia con el consumo de carbohidratos y deficiente salud oral, existiendo la intervención de factores primarios tales como el huésped (saliva y dientes), la micro-flora (microorganismos) y el sustrato (dieta), así como también

factores moduladores como, edad, estrato socioeconómico, nivel educativo, cultura, hábitos alimenticios y percepción y conocimientos de higiene oral (16).

Si la caries dental es detectada en la fase previa a cavitación, puede ser posible la remineralización o inhibir la desmineralización aplicando las medidas preventivas apropiadas.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.2 Fosfopéptido de caseína y fosfato de calcio amorfo.

Es un nanocomplejo conocido como un agente anticariogénico eficaz capaz de prevenir la desmineralización del esmalte (17; 18). Su mecanismo de acción se basa en aumentar el nivel de iones de calcio y fosfato liberado a partir de FCA, en las superficies de esmalte, y por lo tanto hacerlos disponibles durante un desafío ácido mediante la creación de un estado sobresaturado de estos iones que mejoran la remineralización del esmalte. Basándose en estas propiedades, CPP-ACP (por sus siglas en inglés *Casein Phosphopeptide Amorphous Calcium Phosphate*) puede ser indicado para reducir la caries en pacientes de alto riesgo y para reducir la erosión dental en pacientes con reflujo gástrico u otros trastornos (Fig.1) (17).

Recientemente, aplicación de fosfopéptido de caseína pasta de fosfato de calcio amorfo (FPC-FCA) ha sido introducido para aumentar la resistencia del esmalte a la caries. FPC consiste en un agrupamiento de restos fosforilo que estabiliza nanopartículas de FCA en una solución metaestable. Es una proteína pegajosa que se adhiere a fosfato y los iones de calcio y los estabiliza en una forma amorfa. FPC-FCA se une fácilmente a la película, la placa de tejido blando e incluso la hidroxiapatita del esmalte (19).

En la literatura se han revisado varios estudios donde en un ensayo clínico que se incluyó en una revisión del 2009, se examinó el efecto de la pasta de FPC-FCA sobre la caries en zonas proximales en adolescentes. La medición en este estudio fue en los cambios que presentaron a los 24 meses en la densidad radiográfica de las superficies.

Sin embargo, los ensayos clínicos son limitados y teniendo en cuenta que los productos de FPC-FCA están contraindicados en niños con alergia a la leche y el uso de *Tooth Mousse Plus* no está recomendado en niños menores de seis años debido al contenido de fluoruro (20).



---

*Figura 1 Mi Paste™ pasta de fosfopéptido de caseína y fosfato de calcio amorfo.*

---

### **2.3 Agentes Remineralizantes del Esmalte**

Un agente remineralizante se puede definir como una sustancia capaz de promover la remineralización del tejido dental (21). La saliva es el agente remineralizante natural por excelencia (22) por su contenido de  $\text{PO}_4^{-3}$ , como se ha explicado. Bajo condiciones fisiológicas, logra de manera eficiente mantener el equilibrio entre la sustancia dental y la biopelícula, y en condiciones adversas, cuando por deficiente remoción de la biopelícula o ingesta de azúcares, entre otros, el pH tiende a disminuir, busca revertir el proceso de desmineralización. En este orden de ideas, también se considera la saliva un vehículo clave para fomentar la remineralización del esmalte a través de otros agentes remineralizantes (22). Después de un ataque ácido, el fluido salivar amortigua los  $\text{H}^+$  producidos por las bacterias. Cuando el pH es superior a 5.5, de manera natural se presenta la remineralización, porque la saliva está sobresaturada de  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $\text{F}^-$  con respecto al mineral dental (23). Para comprender la aplicabilidad de un agente remineralizante es necesario hacer referencia al entendimiento actual de caries dental, su clasificación diagnóstica y la toma de decisiones de manejo de caries dental (24). El sistema Internacional de Detección y Valoración de Caries (ICDAS II) categoriza las lesiones según hallazgos visuales con una alta correlación histológica, de acuerdo con la gravedad o profundidad de la lesión (25). Así, es claro

que aquellas lesiones que histológicamente afectan la dentina más allá del tercio externo (lesiones cavitadas: ICDAS 5 y 6), la mayoría de las sombras subyacentes de dentina (ICDAS 4) y un porcentaje variable de microcavidades (ICDAS 3) presentan infección de la dentina y requieren tratamiento operatorio (25). Decisiones de tratamiento para caries dental y riesgo de caries. El sistema de evaluación y diagnóstico ICDAS II propone hacer el tratamiento de las lesiones de caries según el estado de avance. Para el caso de los agentes remineralizantes, su uso se restringe a las lesiones que han perdido minerales, pero que aún no tienen contaminación microbiana. También se recomiendan como estrategia preventiva en pacientes que tienen alto riesgo de presentar caries. Por otro lado, las lesiones tempranas (no cavitadas) presentan desmineralización del esmalte y pueden presentar desmineralización de la dentina hasta el tercio externo, sin pérdida de tejido y sin invasión microbiana. Aquí se agrupan las opacidades visibles sin necesidad de secar (ICDAS 2, típica lesión de mancha blanca), con correlación histológica de desmineralización que puede llegar hasta el tercio externo de dentina, y las opacidades visibles después de secar o primer cambio detectable en esmalte (ICDAS 1), con desmineralización hasta la mitad externa del espesor del esmalte. En estas lesiones se recomienda tratamiento no operatorio. En las lesiones de mancha blanca y algunas microcavidades que se consideren sin dentina infectada, considerando que se ha dañado el eje de los prismas (25), se recomiendan los selladores de fosetas y fisuras o la aplicación tópica profesional periódica de fluoruro (10). Los agentes remineralizantes se indican en aquellas lesiones menos graves, que tienen mayor potencial de remineralización (21; 25). Dentro de estas se encuentran las opacidades visibles después de secar y aquellas lesiones subclínicas, que pueden detectarse con métodos diagnósticos de mayor sensibilidad, luz de fluorescencia cuantitativa o de sospecharse de su presencia en aquellos pacientes clasificados como de riesgo alto a caries (21). Entre los agentes remineralizantes del esmalte, la evidencia es amplia al mostrar la efectividad del fluoruro (26). Desde los años ochenta se reconoce que el fluoruro controla el desarrollo de la lesión de caries primordialmente por medio de su efecto tópico en los procesos de remineralización que ocurren en la interfaz entre la superficie dental

y los fluidos orales. Su mecanismo de acción consiste en que disminuye la tasa de desmineralización y promueve la remineralización del esmalte (26). Se ha encontrado que el fluoruro, así sea en muy baja concentración, sí está presente durante un proceso de desmineralización de la hidroxiapatita, por su condición de sobresaturación (alta concentración) con respecto al esmalte, lo cual favorecerá su flujo hacia los cristales de hidroxiapatita, reemplazando los hidroxilos por fluoruro, y acelerará el proceso de remineralización. El fluoruro se adsorberá en la superficie de los cristales parcialmente desmineralizados y atraerá iones de calcio para formar  $\text{Ca}_2\text{F}$ , que se disuelve liberando el fluoruro (27). Este último se estabilizará formando en la superficie fluorhidroxiapatita (FHA), a expensas de la hidroxiapatita (HA) original, creando cristales más estables y, por lo tanto, más resistente a futuros ataques ácidos (23). En este contexto, el cepillado dental diario con el uso de una crema dental con un contenido de al menos 1000 ppm  $\text{F}^-$  (26) se considera la mejor herramienta preventiva en caries dental, ya que, además de la desorganización mecánica de la biopelícula, la presencia de  $\text{F}^-$  favorecerá la formación de moléculas de  $\text{CaF}_2$  en el medio ambiente oral, que se convierte en un donador de  $\text{F}^-$  y  $\text{Ca}^{+2}$  para el esmalte en los momentos en los que se presenta pérdida de iones, al remineralizar tempranamente el esmalte. Este efecto preventivo es evidente en todos los grupos de edad y aumenta con el incremento de la concentración de flúor en la crema dental (26) y con el aumento en la frecuencia del cepillado (25). Adicionalmente, se ha reconocido la efectividad de los productos con fluoruro para aplicación tópica profesional periódica (cada 4-6 meses), en barniz ( $\geq 22.600$  ppm  $\text{F}^-$ ) o gel ( $> 10.000$  ppm  $\text{F}^-$ ), que se recomiendan para individuos con riesgo individual alto de caries (25). Dentro de las principales ventajas del fluoruro se debe reconocer la adherencia que existe a su uso (26). La mayoría de la población utiliza crema dental fluorada y la mayoría de la profesión odontológica utiliza barniz o gel de fluoruro. Aunque es claro que el fluoruro forma parte importante de los agentes remineralizantes.

#### **2.4 Influencia del medio ambiente en la estructura del esmalte.**

La caries dental es una enfermedad infecciosa, que causa la destrucción local de los tejidos duros del diente, y se asocia a la dieta, la acumulación de

microorganismos y las condiciones de la saliva. El desarrollo de una lesión de caries clínicamente visible es una consecuencia de la interacción de varios factores de la cavidad oral y los tejidos dentales (28). Fermentación de carbohidratos por las bacterias de la placa dental que conduce a la formación de diversos ácidos inorgánicos, causando una disminución en el pH. Cuando el pH de la cavidad oral alcanza un valor crítico de 5.5, sucede una subsaturación de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{PO}_4^{-3}$  y se producen iones. La tendencia es, por lo tanto, la pérdida de los iones de los dientes con el medio ambiente, lo que se denomina desmineralización; ésta puede dar lugar a lesiones de caries. Cuando el pH se vuelve superior a 5.5 a través de la acción amortiguadora de la saliva, sucede una sobresaturación de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{PO}_4^{-3}$  en el medio. En esta situación, la tendencia es incorporar los iones al diente, este fenómeno se conoce como remineralización (29).

Existe un constante intercambio iónico entre los tejidos dentales y el medio ambiente, buscando siempre el equilibrio. Los estudios han demostrado que el uso de fluoruros provoca una disminución de la caries. Una serie de investigaciones han demostrado la importancia de los fluoruros en la desmineralización y la remineralización, en el control de la aparición de caries, cuando el fluoruro está presente constantemente en el medio bucal (30).

Cabe mencionar que la saliva y sus componentes mucosos mantienen los dientes húmedos y recubiertos para ayudar a su preservación por virtud de la presencia de iones de calcio y de fósforo, protegiendo así al esmalte de disolución por ácidos; la saliva tiene constituyentes orgánicos e inorgánicos. Un litro de saliva humana consta de 994g de agua, 1g de sólidos en suspensión y 5g de sustancias disueltas de las cuales 2g son de materia orgánica y 3g de materia inorgánica. Los iones de sodio y potasio son los constituyentes inorgánicos más abundantes en saliva. Las concentraciones del ión Sodio y de ión Cloruro aumentan con la velocidad del flujo salival. Dentro de los constituyentes inorgánicos de la saliva se encuentran los siguientes: (31)

- Sodio 14.8 mg/L
- Calcio 3.1 mg/L
- Cloruro 10.0 mg/L
- Potasio 22.1 mg/L
- Magnesio 0.6 mg/L
- Fósforo 193.0 mg/L

- Azufre 149.0 mg/L
- Dentro de los componentes orgánicos de la saliva se encuentran la Glucosa (200 mg/L), Colesterol (80 mg/L), Creatina (10 mg/L), Urea, (200 mg/L), Ácido Úrico (15 mg/L), y otros componentes de la glándula parótida (31).

La remineralización es el proceso natural de reparación de las lesiones cariosas. Se sabe de la remineralización por lo menos hace cien años. Sin embargo, es sólo en las últimas décadas que la importancia terapéutica de la remineralización ha sido en general aceptada. Administrar de forma tópica el fluoruro en varios vehículos ha producido importantes reducciones en la prevalencia y la incidencia de caries dental. Cuando el desafío bacteriano es alto o los componentes de la saliva faltan, la remineralización es insuficiente para detener o revertir el proceso de caries. Hay una necesidad de encontrar formas para mejorar el proceso de remineralización y la transferencia de tales conocimientos es la terapéutica clínica (31).

La desmineralización y la remineralización son procesos de la caries dental que a menudo se describen como un evento fisicoquímico. Aunque esto permite una comprensión más fácil, descripción y mecanismo de este proceso de la enfermedad, la caries dental es mucho más compleja. La caries dental es una enfermedad multifactorial que incluye la participación de bacterias cariogénicas y otros componentes salivales (proteínas, enzimas, calcio, fósforo, flúor) y las fuentes alimentarias de fermentación, hidratos de carbono (sacarosa, glucosa). La integridad del esmalte se altera después de la formación de una biopelícula dental (película adquirida y placa dental), y el proceso de la caries se produce a lo largo de la interfaz entre la biopelícula dental y la superficie del esmalte (32).

### **2.5 Remineralización biológica**

La mineralización biológica, también llamada calcificación es el proceso durante el cual ciertos tejidos acumulan grandes cantidades de minerales y forman cristales complejos haciendo que dichos tejidos adquieran rigidez (33).

Las sales de los dientes están compuestas de HA con carbonatos absorbidos y diversos cationes unidos en una estructura cristalina dura. También se están

depositando continuamente nuevas sales mientras se reabsorben sales antiguas. Este depósito y reabsorción mineral apenas se produce en el esmalte. La mayor parte de lo que ocurre en el esmalte obedece a un intercambio de minerales con la saliva por difusión (34).

Para entender los diversos eventos que ocurren en el diente, es necesario conocer su estructura mineral, formada sobre todo por HA, cuya fórmula es  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Todo proceso de cambio entre este mineral y el medio bucal, ocurrirá de acuerdo con el equilibrio de la disolución del mineral en ambiente acuoso. La formación y disolución de cada sólido cristalino depende del equilibrio de dos fuerzas. En el caso de la hidroxiapatita, tal equilibrio es función de la concentración de iones de calcio, fosfato e hidroxilo en el líquido circundante. La actividad iónica en equilibrio, es decir, cuando no se forma ni se disuelve apatita, está en constante cambio. Cuando la concentración iónica de los líquidos circundantes está en equilibrio, el intercambio de iones entre el sólido y la solución es igual en ambas direcciones, con cambio neto nulo. En la cara interna entre el sólido y la solución, los iones del primero exhiben el movimiento térmico, cruzando constantemente el plano interfacial, con algunos iones que migran a la solución, mientras que un número igual los reemplazan, incorporándose al sólido. Este equilibrio dinámico entre los cristales y su ambiente líquido está afectado por varios factores, incluyendo el pH, la quelación y la concentración de todos los tipos de iones de la solución (34).

Cada ciclo de mineralización comprende un período de sobresaturación de líquido cuando la fuerza conductora se aplica a la deposición de mineral. Un período de subsaturación ocasionará disolución mineral si la superficie del diente en ese punto es soluble en la solución a tal grado de subsaturación. Los minerales más solubles en el esmalte (calcio y carbonato de magnesio) son los primeros en disolverse durante el período de subsaturación, mientras que los más insolubles (fluorapatita) del líquido de la placa se depositarán preferencialmente durante el período de sobresaturación. Cada ciclo puede aumentar la resistencia de la superficie del diente en episodios sucesivos de disolución mineral. Cuando la

resistencia del diente alcanza un nivel suficiente para resistir el potencial de disolución de los períodos de subsaturación, la superficie se hará inmune a la caries (15). Un estado de sobresaturación intenso, prolongado y frecuente producirá una lesión cariosa. Períodos menos intensos breves e infrecuentes de saturación, interrumpidos por otros de sobresaturación, no solo mantendrán intacta la superficie dental, sino que también pueden mejorar la resistencia de ésta a posteriores ataques cariosos, siempre que la composición del líquido generado sea favorable durante la fase de remineralización. Con una serie de ciclos de desmineralización-remineralización se puede producir un cambio en la composición del diente en las capas profundas del esmalte, algunas veces hasta la unión amelodentinaria (34).

## **2.6 Formación y mineralización del esmalte dental.**

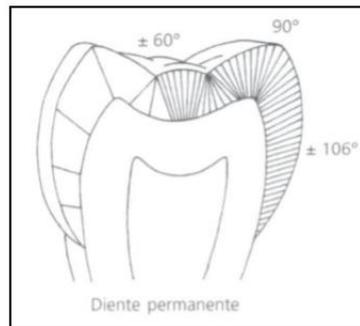
El esmalte dental es el tejido más duro del organismo debido a que estructuralmente está constituido por millones de prismas altamente mineralizados que lo recorren en todo su espesor, desde la unión amelo-dentinaria (UAD) a la superficie externa o libre en contacto con el medio bucal. (35)

El esmalte dental está constituido por una matriz inorgánica (95%) de cristales de hidroxiapatita (HA)  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , una matriz orgánica (3%) y agua (2%). Por su composición y características es semejante a otros tejidos mineralizados del cuerpo, como el hueso, la dentina y el cemento. (36; 37)

A continuación, se mencionan las características que hacen al esmalte un tejido único (38).

- Embriológicamente deriva del ectodermo, órgano del esmalte.
- No participa el colágeno en su composición química.
- Los cristales de HA son susceptibles a la acción de los ácidos.
- Los ameloblastos involucran por apoptosis durante la erupción dental.
- El esmalte maduro no contiene células por eso se considera como sustancia extracelular altamente mineralizada.
- Es incapaz de repararse, aunque existe el fenómeno de remineralización.

El esmalte por su superficie externa está en relación directa con el medio bucal, en el cuello dentario, el esmalte se relaciona con la encía por medio de la unión dentogingival. El espesor del esmalte no es constante y varía en las distintas piezas dentarias y aun en las distintas zonas de un mismo diente. En general, el espesor decrece desde el borde incisal o de las cúspides hacia la región cervical. El espesor máximo es de 2 a 3 mm (Fig. 2) con una orientación de los prismas que depende de la zona del diente.



---

*Figura 2 Disposición de los prismas del esmalte. Se identifican los ángulos que forman los prismas con la superficie externa (39).*

---

Algunas propiedades físicas del esmalte son:

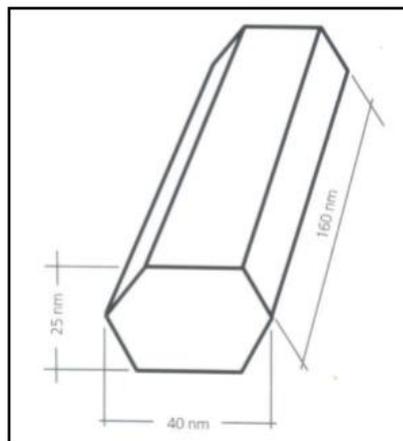
- a) Dureza. - Está relacionada directamente con el grado de mineralización.
- b) Elasticidad. - Es muy escasa y depende de la cantidad de agua y de sustancia orgánica que posee. Es un tejido frágil y la mayor elasticidad se presenta en el cuello del diente por tener mayor contenido de sustancia orgánica.
- c) Color y Transparencia. - Es translúcido dependiendo de las estructuras subyacentes, en especial de la dentina, en zonas de mayor espesor el tono es grisáceo y en zonas más delgadas es blanco amarillento. La transparencia se atribuye a variaciones en el grado de calcificación y homogeneidad del esmalte.
- d) Permeabilidad. - Es extremadamente escasa y solo algunos iones presentes en el medio permiten una difusión, pero es sólo hasta 30  $\mu\text{m}$  en la subsuperficie.

e) Radiopacidad. - Es muy alta por su alto grado de mineralización.

A continuación, se mencionan las fases de la composición del esmalte:

a) **Matriz orgánica**- Es de naturaleza proteica, y en ésta se encuentran las amelogeninas, enamelinas, ameloblastinas y tuftelinas.

b) **Matriz inorgánica**. - Está constituida por sales minerales cálcicas básicamente fosfatos y carbonatos. Los cristales alcanzan una longitud de 100-1000 nm, un ancho de 30-70  $\mu\text{m}$  y una altura de 10-40  $\mu\text{m}$  (Fig.3).

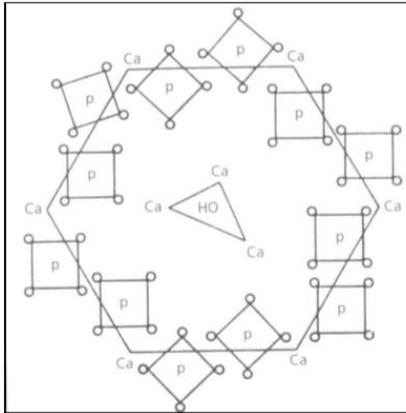


---

*Figura 3 Diagrama del cristal de hidroxiapatita. (39)*

---

Los cristales de hidroxiapatita están constituidos por celdas unitarias con una configuración cristalográfica de tipo hexagonal, en cuyos vértices existen iones calcio y en el centro se localiza el grupo hidroxilo (Fig. 4).




---

*Figura 4 Proyección en una superficie plana de los iones que de forma tridimensional configuran la estructura cristalina de la hidroxiapatita. (39)*

---

c) **Agua-** Es el tercer componente de la composición química del esmalte. Se localiza en la periferia del cristal constituyendo la denominada esfera de hidratación. Por debajo y hacia el interior en el cristal, se ubica la denominada esfera de iones y compuestos absorbidos, en la que el catión<sub>2+</sub> puede ser sustituido por Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, e H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> y el anión OH<sup>-</sup> por F<sup>-</sup> Cl etc. El porcentaje de agua disminuye progresivamente con la edad.

### 2.7pH cíclico

El propósito del método de pH cíclico es la reproducción de las condiciones de desmineralización y remineralización que se presentan en la cavidad bucal (40) modelo Ten Cate. La importancia clínica de la remineralización ha sido demostrada convincentemente por Becker Dirks (41; 42) en 1966, quien demostró que el 50% de las manchas blancas observadas en los jóvenes, desaparecen posteriormente como probable resultado del potencial de remineralización de la saliva. Ten Cate diseñó un modelo de pH cíclico para estudiar la pérdida y ganancia de minerales en lesiones artificiales del esmalte dental, este sistema de pH cíclico es la mejor reproducción de la situación *in vivo*. (43) Las muestras fueron sujetas a una secuencia de soluciones desmineralizantes de 2.2 mM Ca, 2.2 mM P, 50 mM de

CH<sub>3</sub>COOH a un pH 5.0 a 37°C y una solución remineralizante de 1.5 mM Ca, 0.9 mM P, 130 mM KCl a un pH 7.0 a 37°C. Se realizaron 3 ciclos diferentes de cambio de soluciones. (44; 45)

- a) 21 hrs de remineralización por 3 hrs de desmineralización.
- b) 24 hrs de remineralización por 0 hrs de desmineralización.
- c) 16 hrs de remineralización por 8 hrs de desmineralización.

## **2.8 Microdureza**

La dureza es una propiedad mecánica de los materiales, consistente en la dificultad que existe para rayar o crear marcas en la superficie mediante la penetración de una punta. La dureza se mide utilizando un durómetro para el ensayo de penetración.

El término microdureza (MD) se refiere a indentaciones hechas con una carga no superior a 1 kg de fuerza (f). Existen métodos de prueba estándar comunes para expresar la microdureza de un material. Cada uno de ellos se divide en un rango de escalas, definidas por una combinación de las cargas aplicadas y la geometría del indentador. (46; 19)

El método de prueba de dureza Vickers (HVN por sus siglas en inglés (Hardness Vickers Number) que usaremos consiste en marcar el material de prueba con un indentador de diamante, que tiene forma de una pirámide recta con una base cuadrada y un ángulo de 136° entre caras opuestas, sometidas a una carga de 1 a 100 kg/f (Fig. 5). La carga normalmente aplicada en el esmalte dental es de 10, 25 y 50 gramos por 10, 20 y 30 segundos, utilizando el indentador Vickers. Las dos diagonales de la indentación en la superficie del material después de la remoción de la carga se miden usando un objetivo del microscopio incorporado al microdurómetro. Se calcula el área de la superficie de la muesca que forma una pendiente. Es adecuado para aplicarse con el fin de determinar la microdureza de áreas pequeñas y para materiales muy duros. (46)

La fórmula de microdureza (MD) es la siguiente:

$$HV_N = \frac{(1.845)F}{d^2}$$

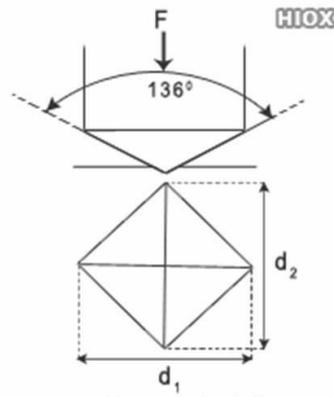
donde:

**HVN**; es el número de microdureza Vickers

**1.845**; es la constante de microdureza.

**F**; es la carga aplicada en gramos.

**d<sup>2</sup>**; es la distancia media de las diagonales (horizontal y vertical).



*Figura 5 Esquema de la indentación Vickers.*

Las pruebas de microdureza se usan mucho y tienen una aplicación importante en odontología. La prueba de microdureza puede evaluar el grado de mineralización de un sustrato dental. Una fuerza específica aplicada durante un tiempo y una distancia específicas proporcionan datos importantes (47).

Se utiliza un aparato que tiene como aditamento diferentes puntas de diamante., al aplicar una carga definida, la punta de diamante se hace incidir sobre una superficie, luego se retira la punta y se mide, localizando el indentador con ayuda de los objetivos de microscopio (40X, 10X), luego se determina la diagonal de la muesca que se dejó sobre la superficie, este aparato es conocido como Microdurómetro. Se utiliza en estudios que evalúan la capacidad de remineralización del esmalte y la dentina después de diferentes tratamientos como ocurre en situaciones no equilibradas de desmineralización y remineralización (46).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Cuál es el efecto de la pasta fluorada MI Paste™ utilizada en la Clínica de Estomatología Pediátrica en la superficie del esmalte dental que ha sido desmineralizado y sometido a condiciones de pH cíclico?

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Existen informes en la literatura sobre el efecto de la pasta fluorada MI Paste™ en la Clínica de Estomatología Pediátrica. La mayoría de éstos, se relacionan con el efecto de dichos compuestos en la superficie del esmalte. Sin embargo, existe poca evidencia de los cambios que se presentan hacia dentro del esmalte, es decir por debajo de la superficie, y si es que se presenta, ¿cuál es el impacto en la estructura del esmalte?

## **5. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN**

- La pasta remineralizante (FPC-FCA) sí causa un efecto en la microdureza de la superficie del esmalte dental en condiciones de pH cíclico.

## **6. OBJETIVOS**

### **2.10.1 Objetivo General**

- Determinar el efecto remineralizante de MI Paste <sup>TM</sup> (FPC-FCA) que se utiliza en la clínica de Estomatología Pediátrica sobre la superficie del esmalte dental en condiciones de pH cíclico.

### **2.10.2 Objetivo Específico**

- Determinar la microdureza del esmalte dental superficial después de 5, 10 y 15 días de aplicación de la pasta remineralizante en condiciones de pH cíclico.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.2 Obtención y preparación de la muestra

Se realizó un estudio experimental, longitudinal *in vitro* con una muestra de 35 terceros molares retenidos, con coronas anatómicas intactas, de reciente extracción indicados antes o después del tratamiento ortodóncico, sin defectos estructurales del esmalte. Durante la recolección de los terceros molares, los cuales fueron recolectados con la ayuda de la clínica de cirugía Oral y Maxilofacial de la Facultad de Odontología en CU. Donde fueron almacenados en agua desionizada en recipientes plásticos, (Culture Dishes Z358762-20EA Sigma-Aldrich™). Una vez obtenida toda la muestra, se acondicionaron las superficies: se les retiró el tejido blando con diferentes curetas Gracey (Hu-Friedy™), posteriormente se les realizó un corte longitudinal en dirección mesio-distal para obtener dos superficies de trabajo una bucal y otra lingual, con un disco de diamante (Brasseler™ diamond 910<20,000 rpm, California, U.S.) con irrigación constante, obteniendo 70 superficies de trabajo en total (caras bucales y linguales). La zona del espacio pulpar fue bloqueada con cera toda estación (Fileness™, México) para obtener una superficie lisa. A las superficies de trabajo se les realizó profilaxis con una pasta libre de fluoruro (QOM™), en la corona anatómica de las superficies de trabajo, se delimitó una ventana de 3x6 mm para la aplicación del tratamiento, el resto de la corona y raíz se cubrió con barniz ácido resistente (Revlon™) de diferentes colores para distinguir los grupos, cada grupo fue colocado en un contenedor plástico transparente.



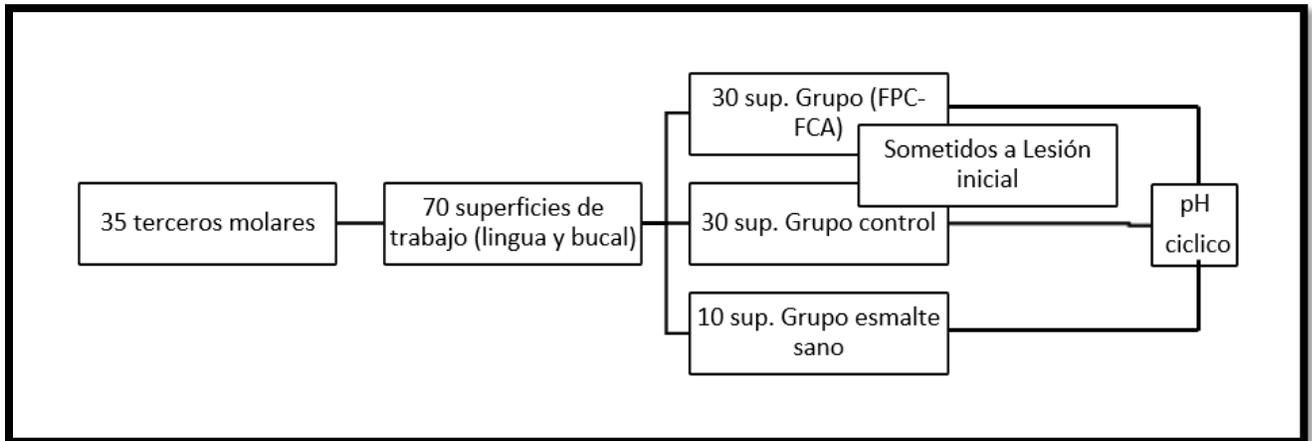
---

*Figura 6 Terceros molares sin defectos estructurales en el esmalte dental*

---

### 7.3 Lesión Inicial

A 60 superficies de trabajo previamente acondicionadas se les realizó una lesión inicial (inmersión en solución desmineralizante) que consistió en tener las superficies inmersas en una solución desmineralizante utilizando 2.2 mM Ca y 2.2 mM P, 50 mM de CH<sub>3</sub>COOH con un pH ajustado a 4.4 por la adición de KOH corroborándolo mediante el pH-metro (JENWAY 3540 pH Conductivity Meter™) a 1M, durante 96 horas a una temperatura constante de 37° C. Después de las 96 horas se dividieron en grupos experimentales (Fig. 7)



*Figura 7 Disposición de las superficies de trabajo*

- ✓ grupo FPC-FCA (n=30) donde se aplicó la pasta según las instrucciones del fabricante.
- ✓ GC (n=30) con lesión inicial y sin tratamiento (Fig. 8).



---

*Figura 8 Inmersión de 96 horas de los grupos experimentales para realizarles la lesión inicial*

---

### **7.4pH cíclico.**

El pH cíclico consistió en la inmersión de toda la muestra en una secuencia de soluciones desmineralizantes y remineralizantes:

- **durante 3 horas:** inmersión en una solución con un pH 4.4 (desmineralizante) a 37°C (2.2 mM Ca, 2.2 mM P, 50 mM de CH<sub>3</sub>COOH).
- **durante 21 horas:** inmersos en una solución con un pH 7.0 (remineralizante) a 37°C (1.5 mM Ca, 0.9 mM P, 130 mM KCl) (44; 45).

Entre estas soluciones al grupo FPC-FCA se le aplicó el tratamiento (cada 24 horas) siguiendo las instrucciones del fabricante (se le colocó la pasta con un hisopo dejando actuar por 3 min, pasado este tiempo se retiraron los excedentes con agua desionizada), al término del tratamiento el grupo FPC-FCA y los grupos ES y GC siguieron con el pH cíclico durante 5, 10 y 15 días.

- a)** Grupo Esmalte Sano (ES; n=10) no tiene lesión inicial, sin tratamiento.

- b)** Grupo FPC-FCA (n=30) tiene lesión inicial y se le aplicó tratamiento cada 24 horas.
- c)** Grupo Control (GC; n=30) tiene lesión inicial, sin tratamiento.

### **7.5 Valoración de la Lesión**

Una vez comenzado el experimento y al término de 5, 10 y 15 días se seleccionaron aleatoriamente 10 superficies del grupo FPC-PCA, 10 superficies del GC y 10 del grupo ES, se almacenaron en agua desionizada, en la cámara de temperatura controlada a 37°C, mientras se realizaba la prueba de microdureza y así sucesivamente hasta concluir el periodo de tiempo (15 días) con cambio de soluciones cada tercer día, estas soluciones fueron almacenadas en botellas de vidrio color ámbar.

Se tomaron las primeras superficies de trabajo a los 5 días de tratamiento y se realizaron las microindentaciones para determinar la microdureza y así sucesivamente. Se utilizó el Nanoindentador Nanovea CB500 ubicado en el Instituto de Investigaciones en Materiales, Ciudad Universitaria de la UNAM, México (Fig.8).

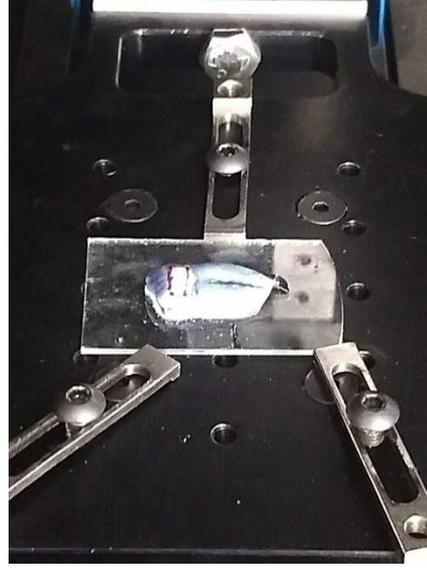
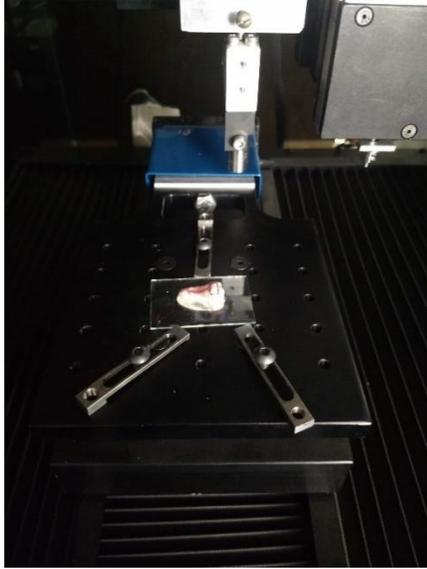


---

*Figura 9 Nanoindentador Nanovea CB500<sup>R</sup> IIM, CU, UNAM.*

---

Las muestras fueron colocadas en porta objetos utilizando resina epóxica para su fijación evitando movimientos indeseados y poder así realizar la microindentación. Posteriormente se seleccionó la superficie de trabajo, ubicando las zonas con menor convexidad para así poder realizar una indentación nítida y confiable (Fig. 9).



---

*Figura 10 Muestras fijadas sobre porta objetos, listas para ser indentadas,  
Fuente directa.*

---

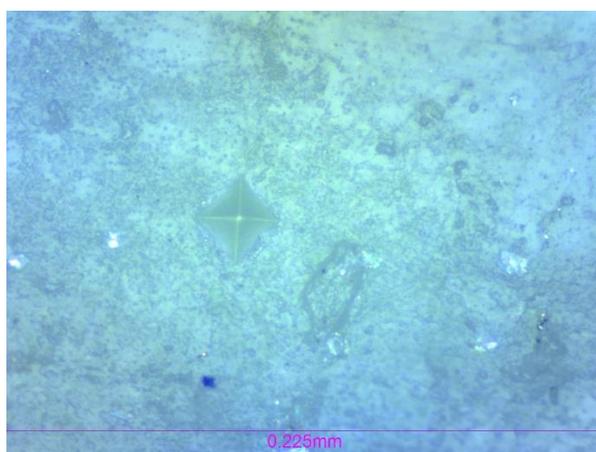
Se realizaron 12 indentaciones por superficie de trabajo, de los valores obtenidos se eliminaron 2, es decir, el valor más alto y el valor más bajo por lo tanto se registraron los datos de 10 indentaciones por superficie de trabajo dando un gran total de 700 indentaciones. Dichas indentaciones se realizaron a los 5 (Fig. 10), 10 (Fig. 11) y 15 días (Fig. 12).



---

*Figura 11 Indentación Vickers a los 5 días de tratamiento, Fuente directa.*

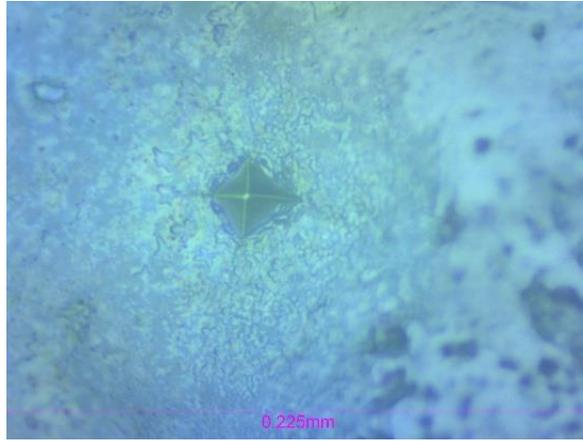
---



---

*Figura 12 Indentación Vickers a los 10 días de tratamiento, Fuente directa.*

---



---

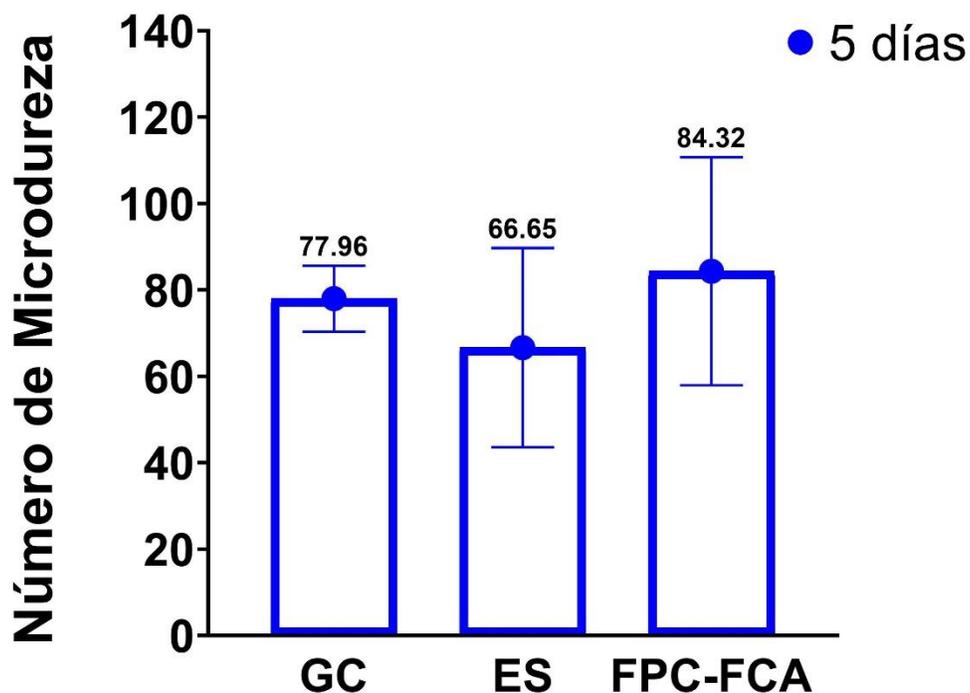
*Figura 13 Indentación Vickers a los 15 días de tratamiento, Fuente directa.*

---

## 8. RESULTADOS

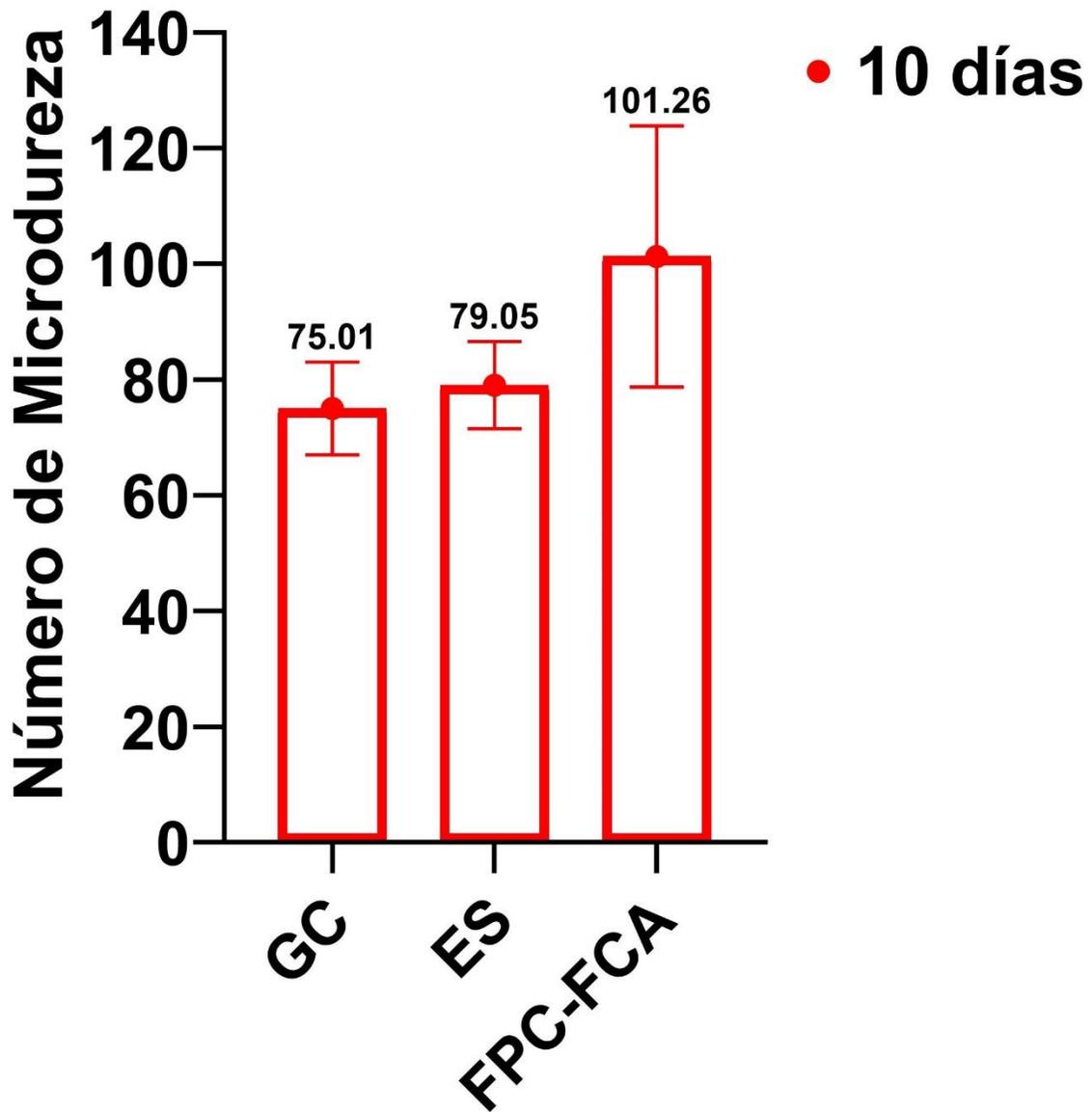
Se realizaron 12 indentaciones por cada superficies grupo dando un total de 840 indentaciones, sin embargo, se eliminaron de cada uno de las superficies de trabajo el número Vickers mayor y menor, de tal manera que únicamente 700 datos se utilizaron para realizar el análisis estadístico; se obtuvo una distribución normal, por lo tanto, se realizó un Análisis de Varianza (*ANOVA* por sus siglas en inglés) utilizando la media y la desviación estándar, y un análisis *post-hoc* para determinar diferencias entre los grupos experimentales.

El promedio de la microdureza a los 5 días fue de 66.6 ( $\pm 23.0$ ); en el grupo ES, 77.9 ( $\pm 7.6$ ) GC y 84.3 ( $\pm 26.3$ ) en el grupo FPC-FCA, no encontrando diferencias significativas ( $p=0.173$ ) como se observa en la figura 13.



*Gráfica 1 Comportamiento de los grupos experimentales después de 5 días de tratamiento. Fuente directa.*

En la figura 14 se observan los promedios de microdureza a los 10 días por grupo la distribución fue: grupo ES 79.0 ( $\pm 7.5$ ), GC 75.0 ( $\pm 8.0$ ) y grupo FPC-FCA 101.2 ( $\pm 22.5$ ) ( $p=0.002$ ).

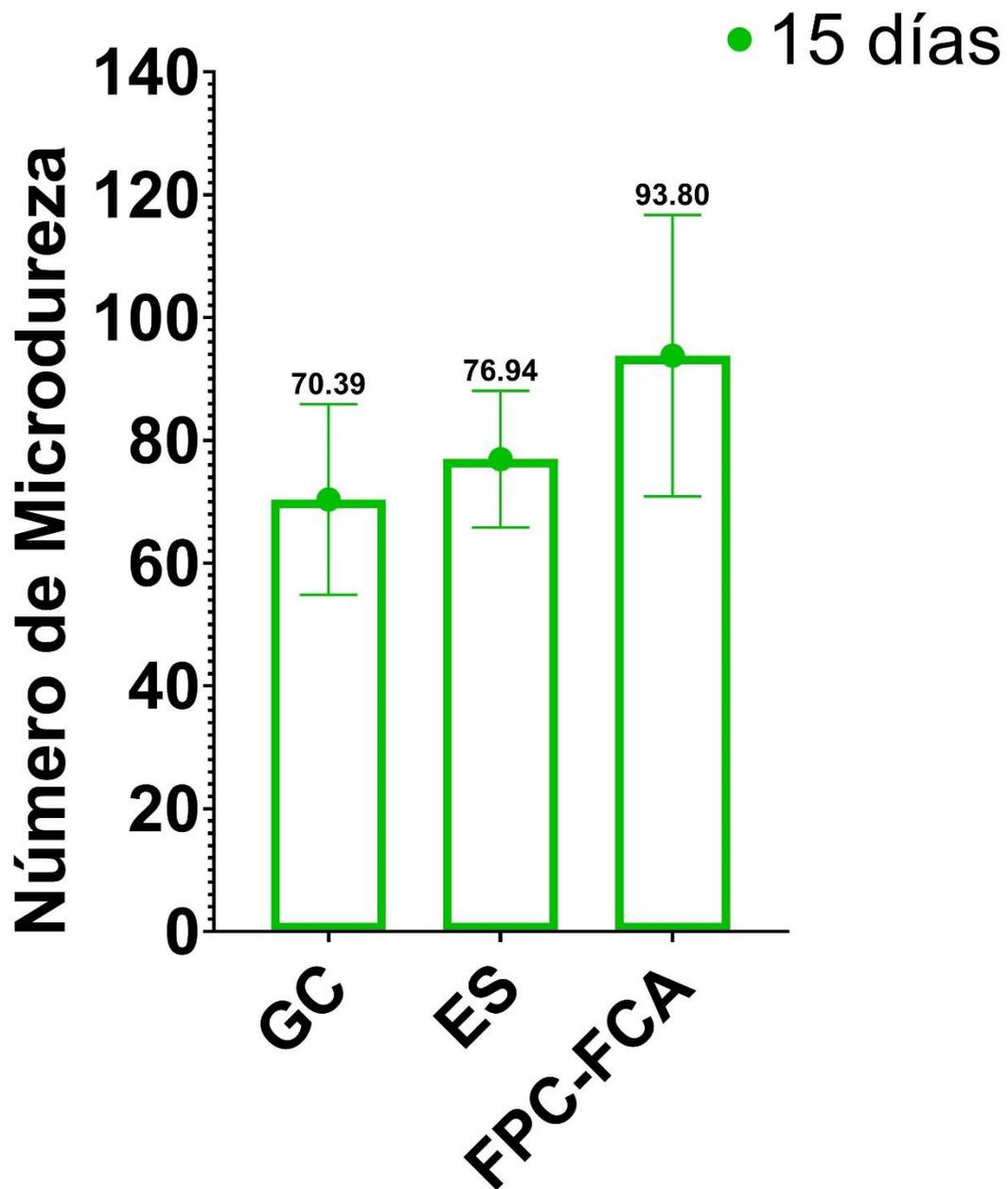


---

*Gráfica 2 Comportamiento de los grupos experimentales después de 10 días de tratamiento, Fuente directa.*

---

A los 15 días (figura 15), la distribución fue: grupo ES 76.9 ( $\pm 11.1$ ), GC 70.4 ( $\pm 15.5$ ) y grupo FPC-FCA 93.8 ( $\pm 22.9$ ) ( $p=0.021$ )



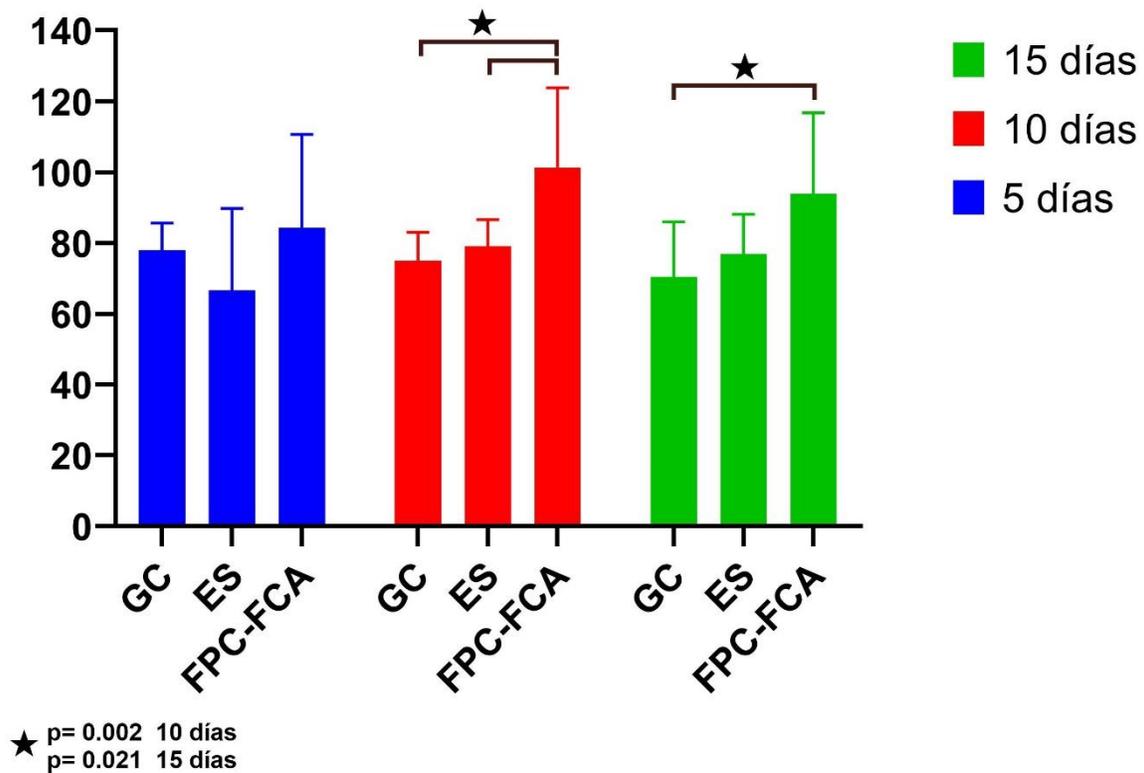
---

*Gráfica 3 Comportamiento de los grupos experimentales después de 15 días de tratamiento, Fuente directa.*

---

En la figura 16 se comparan los valores de microdureza por grupos experimentales, donde se observa la tendencia del grupo FPC-FCA a tener los valores de microdureza por encima de los demás grupos.

Al aplicar las pruebas *post-hoc* se encontraron diferencias a los 10 días entre el grupo sano vs FPC-FCA ( $p=0.006$ ) y GC vs FPC-FCA ( $p=0.001$ ). A los 15 días GC vs grupo FPC-FCA ( $p=0.016$ ).



*Gráfica 4 Comportamiento de todos los grupos experimentales y sus diferentes tiempos con las diferencias significativas, Fuente directa.*

## 9. DISCUSIÓN

En esta investigación *in vitro*, la desmineralización y la remineralización del esmalte dental se evaluó mediante la microdureza Vickers. En el presente estudio se valoró el efecto de la pasta compuesta con Fosfopéptido de Caseína y el Fosfato de Calcio Amorfo (FPC-FCA) sobre la microdureza superficial del esmalte dental sano sometido a condiciones de pH cíclico.

El uso de pastas dentales como recurso para la buena higiene bucal está ampliamente documentado, y a partir de los estudios del fluoruro como agente preventivo (48), las pastas dentales desempeñan un rol importante como vehículo de agentes utilizados en la prevención de lesiones cariosas (49), mediante la adición de diversos agentes terapéuticos. En el caso del FPC-FCA, fue propuesto en la década de los noventa como medio remineralizante (50; 51) y se ha comprobado su eficacia y su eficiencia al colocarlo sobre el esmalte dental.

En este trabajo se obtuvieron terceros molares impactados, con corona anatómica intacta y sin defectos estructurales de la misma, donde los valores de microdureza del grupo Esmalte Sano es real, ya que no estuvo expuesto al medio bucal, además de causar una lesión inicial al Grupo Control y al grupo tratado con FPC-FCA y registrar estos valores como día cero en el pH cíclico. Manoharan (52) utilizó premolares extraídos mencionando únicamente que no tenían caries, sin embargo no establece el tiempo de permanencia de su muestra en cavidad oral, lo que hace que su metodología no sea repetible y sus resultados fiables al igual que Lata (53).

En este trabajo se usó como prueba física la microdureza Vickers para determinar el aumento en la remineralización al colocar la pasta con FPC-FCA. Manoharan (52) utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) junto con el análisis semicuantitativo (EDS) donde determinó la diferencia en la relación CA/P en las muestras remineralizadas.

En este trabajo se determinó que tanto en esmalte sano, como en esmalte con lesión inicial sometido a condiciones de pH cíclico fue, considerablemente más alto los valores de microdureza al cabo del tiempo por la aplicación de la pasta y esta

pasta no tiene fluoruros. Lata (53) menciona en su trabajo que la combinación de fluoruro y FPC-FCA no proporciona ningún potencial de remineralización aditiva en comparación con el fluoruro solo y que su combinación no es eficaz en la remineralización de la caries de esmalte dental.

En este trabajo se determinó el valor de la microdureza Vickers del esmalte dental sano, así como también dos grupos con lesión inicial, una con tratamiento y otra sin tratamiento, en condiciones de pH cíclico al cabo de 5, 10 y 15 días realizando 12 indentaciones por superficie, eliminando el valor mayor y el valor menor para obtener un gran total de 900 indentaciones para el análisis estadístico. Carvalho (17) utilizó microdureza Knoop que ha sido la menos reportada para trabajos *in vitro*, y únicamente realizó 5 indentaciones por superficie.

Investigaciones *in vitro* han demostrado que el efecto del FPC-FCA sobre el esmalte dental es la modificación del proceso de remineralización y desmineralización, ya que actúa como un reservorio de iones de calcio y fosfato en la saliva, y en un ambiente ácido se incorporan al esmalte. (54; 49; 55; 50)

El modelo más utilizado para valorar el efecto del FPC-FCA en el proceso de remineralización, ha sido sobre superficies en las que se ha creado una lesión inicial en el esmalte dental (53); por esta razón no hay reportes que describan el efecto del FPC-FCA en el esmalte sano; ya que todas las investigaciones preparan la superficie con soluciones ácidas para simular la existencia de lesiones desmineralizadas en el esmalte dental antes de someterlo a las prueba de remineralización en condiciones de pH cíclico. En este estudio se consideró determinar el efecto tanto en esmalte sano como en esmalte desmineralizado, creando las mismas condiciones de soluciones alternadas de pH cíclico descritas en el modelo de Ten Cate (56): En términos generales, las muestras fueron sometidos durante 15 días a pH cíclico, y se encontró que durante los primeros 5 días no hubo diferencias significativas, sin embargo, con el paso del tiempo y las aplicaciones de la pasta FPC-FCA a los días 10 y 15 si hubo una franca remineralización.

En cuanto al tiempo de exposición a las condiciones de pH cíclico, los reportes varían, ya que se informa de valores obtenidos a los 5 días (53), 12 días (49) y hasta 28 días (57), y los valores reportados en esos trabajos no son homogéneos ya sea por el método utilizado para causar la lesión inicial o la forma como se determinó el efecto del FPC-FCA.

El tamaño de la muestra es un aspecto importante a considerar, ya que se han reportado trabajos en los que la población total de 15 (53; 50), 40 (49), 22 (58) especímenes en total. En este trabajo se utilizó una muestra de 35 terceros molares retenidos, distribuidos de manera homogénea y aleatoria, en grupos de 30 superficies de trabajo (previo corte mesio-distal).

En cuanto a los valores basales del esmalte dental, en la literatura se encuentran valores distintos, dependiendo de las condiciones de carga empleados. De tal manera que hay autores, como Jardim, (55) que determinaron valores de MDS de 265.32 a 324.28 (Knoop hardness number) KHN para el esmalte sin lesión utilizando condiciones de carga de 50g/f durante 10s; aunque su escala de dureza fue Knoop. Por otro lado, Lata (53) utilizó 25g<sub>f</sub> durante 5s obteniendo 306.75 VHN; mientras que, Al Jobair (49) uso 300g/f fuerza por 15s obteniendo 346.2 VHN; Srinivasan (59) con 70g/f por 15s obteniendo 324VHN, Panich (54) utilizó 100g/f por 15s obteniendo 338VHN. Todos estos valores son significativamente mayores que los encontrados en nuestro trabajo, ya que la microdureza en el esmalte sano se determinó en 150.47HVN, con 25g/f durante 20s. La diferencia con los reportados en la literatura puede ser explicada por las características de las muestras empleadas, ya que en algunos casos utilizaron premolares, (53) otros son de origen bovino, (6; 55) y en la mayoría de los casos, son dientes que ya han estado expuestos al medio oral; a diferencia de los empleados en nuestro estudio que eran dientes humanos no erupcionados con esmalte intacto.

Para crear las condiciones de una lesión inicial, en nuestro estudio se realizó mediante inmersión en solución ácida (pH 4.4) durante 96 horas, tal como lo realizó Kumar (6); Mientras que Jardim (55) la provocó con acetato de sodio durante 16 horas (pH 5), Lata (53) en solución desmineralizante durante 72 horas; Al Jobair

(49) por inmersión en refresco de cola (pH 2.6) 2 minutos 3 veces al día por 3 días; al igual que Srinivasan (59) durante 8 minutos en soda (pH 2.3); Karlinsey (60) utilizó carbapol más ácido láctico durante 36 horas (pH 5) y Panich (54) introdujo los especímenes 10 ciclos de 5 segundos en refresco de cola, 5 segundos en saliva repitiéndolo 2 veces en intervalos de 6 horas (pH 2.7).

Un factor importante a considerar en la valoración de los resultados son las condiciones del pH cíclico, ya que se encuentra variabilidad en cuanto al tiempo y soluciones utilizadas para crear las condiciones de pH cíclico. En nuestro trabajo fue 21 horas en solución remineralizante y 3 horas en solución desmineralizante Ten Cate (56; 61) hasta ahora el más reportado. En el experimento de Kumar (6) el tiempo total fue de 10 días, con 3 horas en desmineralización, 2 veces al día y con 2 horas de remineralización entre cada cambio de solución, durante 60 segundos se colocó tratamiento después de la primera desmineralización y antes de la segunda (6). El modelo de Lata (53) fue de 3 horas de desmineralización y 21 horas de remineralización aplicando la pasta mínimo 3 minutos durante 5 días; Al Jobair (49) realizó un proceso de desmineralización en soda 2 minutos 3 veces al día en intervalos de 8 horas por 3 días y remineralización durante 3 minutos de tratamiento colocándolos 6 horas en saliva y a las 18 horas en saliva se repite cada tercer día durante 12 días dando como resultado 27 exposiciones a soda y 3 aplicaciones de tratamiento, Karlinsey (60) colocó durante 2 minutos el tratamiento seguido de 4 horas de desmineralización seguido de 2 minutos de tratamiento durante 20 días, Panich (54) realizó 10 ciclos de 5 segundos en soda repitiendo 2 veces en intervalos de 6 horas y aplicando el tratamiento durante 3 minutos.

En este trabajo se utilizó la microdureza como prueba determinante para establecer el efecto de la remineralización colocando la pasta. En diferentes estudios de los compuestos fluorados, se ha buscado determinar el efecto mediante distintas técnicas instrumentales (62), entre ellas la microdureza. Esta es una prueba que permite asociar los cambios en la estructura con el comportamiento mecánico del sustrato. (6) En años recientes se ha calculado la pérdida y ganancia de dureza como un efecto del medio ambiente o modificación del mismo por productos. Los

valores reportados por Jardim (55) y Lata (53) permiten corroborar el efecto de compuestos fluorados sobre el esmalte.

Una de las limitaciones de esta investigación fue que únicamente se usó la pasta con FPC-FCA, por lo tanto, se sugiere en futuros trabajos utilizar otras pastas que tengan fluoruro, como la pasta Mi Paste Plus GC® de la misma casa comercial, pero adicionada con 900ppm de fluoruro de sodio y utilizar la misma metodología y comparar estos resultados.

## **10. CONCLUSIONES**

El uso de la pasta con fosfopéptido de caseína y fosfato de calcio amorfo si remineraliza la superficie dental en condiciones de pH cíclico.

Es determinante que usar esta pasta en pacientes con riesgo a caries disminuiría considerablemente la desmineralización, pérdida de la continuidad del esmalte dental y por consecuencia disminuiría la posibilidad de que el paciente desarrolle la caries dental.

## **11. PERSPECTIVAS DEL ESTUDIO**

En este estudio se realizó la medición de la microdureza del esmalte dental superficial sano, con lesión inicial o desmineralizante y sólo un grupo experimental o tratado con una pasta con fosfopéptido de caseína y fosfato de calcio amorfo Mi Paste®.

Esto hace necesario pensar en investigaciones adicionales con esta misma marca, pero que además contiene fluoruro de sodio 0.2% (900ppm) como ingrediente adicional y someterlo a las mismas condiciones para después comparar los resultados.

En la estomatología pediátrica atendemos a pacientes con alto riesgo a caries y el tener los resultados de estos estudios, ayudará a las futuras generaciones de especialistas a tener mayores posibilidades de tratamientos dentales y por consecuencia la disminución de caries en una de las poblaciones más vulnerables como lo son los niños en este país.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Reynolds EC., Cai F., Cochrane NJ., Shen P., Walker GD., Morgan MV, et al.** Fluoride and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *J Dent Res.* 87, 2008, Vol. 4, 344-8.
2. **De Souza CC., Cury JL., Coutinho TC., Da Silva EM., Tostes MA.** Effect of different application frequencies of CPP-ACP and fluoride dentrifice on demineralized enamel: a Laboratory study. *Am J Dent.* 27, 2014, Vol. 4, 215-9.
3. **Cochrane NJ., Cai F., Huq NL., Burrow MF., Reynolds EC.** New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res.* 89, 2010, 1187-97.
4. **Oliveira PRA., Coutinho TCL., Portela MB, Paula VCA, Tostes MA.** Influence of biofilm formation on the mechanical properties of enamel after treatment with CPP-ACP creme. *Braz Oral Res.* 31e, 2017, 84.
5. **Rathiotis C., Vougiouklakis G., Eliades G.** Characterization of oral films formed in the precense of a CPP-ACP agent an in situ study. *J Dent.* 36, 2008, Vol. 4, 272-80.
6. **Kumar VLN, Ittagarun, King NM.** The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate on remineralization of artificial caries-like lesion:an in vitro study. *Australian Dental Journal.* 2008, Vol. 53, págs. 34-40.
7. **Al-Mullahi Am., Toumba KJ.** Effect of slow release fluoride devices and casein phosphopeptide/amorphous calcium phosphate nanocomplexes on enamel remineralization in vitro. *Caries Res.* 44, 2010, Vol. 4, 364-71.
8. **Shen P., Manton DJ., Cochrane NJ., Walker GD., Yuan Y., Reynolds C., Reynolds EC.** Effect of added calcium phosphate on enamel remineralization by fluoride in a randomized controlled in situ trial. *J Dent.* 39, 2011, Vol. 7, 518-25.
9. **Sinfiteli PP. Coutinho TCL., Oliveira PRA., Vasques WF., Azevedo LM., Pereira AMB., Tostes MA.** Effect of fluoride dentrifice and casein-phosphopeptide-amorphous calcium phosphate cream with and without fluoride in preventing enamel demineralization in a pH cyclic study. *J Appl Oral Sci.* 25, 2017, Vol. 6, 604-611.
10. **Meyer-Lueckel H., Wierichs RJ., Schellwein T., Paris S.** Remineralizing efficacy of a CPP-ACP cream on enamel caries lesions in situ. *Caries Res.* 49, 2015, Vol. 1, 56-62.
11. **Yo OY., Mei ML., Zhao IS., Li QL., Lo EC., Chu CH.** Remineralisation of enamel with silver diamine fluoride and sodium fluoride. *Dent Mater.* 34, 2018, Vol. 12, e344-e352.
12. **Wierichs RJ., Zelck H., Doerfer CE., Appel P., Paris S., Estevez-Oliveira M., Meyer-Lueckel H.** Effects of dentrifices differing in fluoride compound on artificial enamel caries lesions in vitro. *Odontology.* 105, 2017, Vol. 1, 36-45.
13. **Sivapriya E., Sridevi K., Periasamy., Lakshminarayanan L., Pradeepkumar AR.** Remineralization ability of sodium fluoride on the microhardness of enamel, dentine and dentinoenamel junction. An in vitro study. *J Conserv Dent.* 20, 2017, Vol. 2, 100-104.

14. **Shetty KP., Satish SV., Gouda V., Badade AR., Gouda B., Patil S.** Comparative evaluation and effect of organic and inorganic fluoride dentifrices on enamel microhardness: An in vitro study. *J Int Soc Prev Community Dent.* 6, 2016, Vol. 2, 130-31.
15. **J, Castellanos.** Enamel Remineralization under the Current Caries Understanding. *DOSSIER CRIES DENTAL: INVESTIGACIÓN Y CONOCIMIENTO BÁSICO.* 32, 2013, Vol. 62, págs. 49-59.
16. **Bastidas, Ximena Andrea Cerón.** The ICDAS system as a complementary method for the diagnosis of dental caries. *Revista CES Odontología.* 2, 2015, Vol. 28, págs. 100-109.
17. **Carvalho de Souza C, Leoni J.** Effect of different application frequencies of CPP-ACP and fluoride dentifrice on demineralized enamel: A laboratory study. *American Journal of Dentistry.* 4, 2014, Vol. 27, págs. 215-219.
18. **Khamverdi Z, Kordestani M.** Effect of Proanthocyanidin, Fluoride and Casein Phosphopeptide. *J Dent (Tehran).* 2, 2017, Vol. 14, págs. 73-83.
19. **Khamverdi Z, Kordestani M, Panahandeh N, Naderi F, Kasraei S.** Influence of CO2 laser irradiation and. *Journal of Lasers in Medical Sciences.* 2018, Vol. 9, págs. 144-148.
20. **A., Blinkhorn.** Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate products in caries prevention. *BMC Oral Health.* 2, 2016, Vol. 17, págs. 46-47.
21. **Lynch RJM, Smith SR.** Remineralization agents: New and Effective or just marketing hype? *Adv Dent Res.* 24, 2012, págs. 63-70.
22. **Bardow A, Lagerlöf F, Nauntofte B, Tenovouo J.** The role of saliva. Oxford : s.n., 2008.
23. **Buzalaf M, Pessan, J, Honório H, ten Cate J.** Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci.* 2011, Vol. 22, págs. 97-114.
24. **NB, Pitts.** How the detection assessment diagnosis and monitoring of caries integrate with personalized caries management. *Monogr Oral Sci.* 2009, Vol. 21, págs. 1-14.
25. **Ismail A, Sohn W and Tellez M.** The international caries detection and assessment system (ICDAS) an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent-Oral-Epidemiol.* 3, 2007, Vol. 35, págs. 170-8.
26. **Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Appelbe P, Marinho VC, Shi X.** Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst.* 2010.
27. **POGGIO C, LOMBARDINI M, VIGORELLI P, CECI M.** Analysis of Dentin/Enamel Remineralization by a CPP-ACP Paste: AFM and SEM Study. *Wiley Periodicals, Inc.* 2013, Vol. 35, págs. 366–374 .
28. **Wu, C.** Grape products and Oral Health. *J Nutrition.* 2009, Vol. 139, págs. 1818-1823.
29. **Samuel S, Rubinstein C.** Microhardness of Enamel Restored with Fluoride and Non-Fluoride Releasing Dental Materials. *Braz Dent J.* 1, 2001, Vol. 12, págs. 35-38.
30. **Tantbirojn D, Huang A, Ericson M, Poolthong S.** Change in surface hardness of enamel by a cola drink and CPP-ACP paste. *J Dentistry.* 2008, Vol. 36, págs. 74-79.

31. **Lazzari, Eugene.** Bioquímica Dental. México : Nueva Editorial Interamericana, 1970.
32. **Garcia F, Hicks M.** Maintaining the integrity of the enamel surface: The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *JADA*. 2008, Vol. 139, págs. 25S-34S.
33. **C, Sanchez.** Desmineralización y remineralización, el proceso en balance y la caries dental. *Revista ADM*. 1, 2010, Vol. 69, págs. 30-32.
34. **Saldaña M.** Ionómeros y fluoruros que intervienen en la remineralización del esmalte. 2011.
35. **Low D, Duraman N, Fulton J, Tezuka N.** A comparative study of the microstructure-property relationship in human adult and baby teeth. *Ceram Eng Sci Proc*. 6, 2005, Vol. 26, págs. 145-152.
36. **Veiderma M, Tonsuaadu K, Knubovets R, Peld M.** Impact of anionic substitutions on apatite structure and properties. *J Organometallic Chemistry*. 2005, Vol. 690, págs. 2638-2643.
37. **Rosas, Prado S.** Eficacia in vitro de compuestos fluorados en la remineralización de lesiones cariosas del esmalte bajo condiciones de pH cíclico. *Revista Odontológica Mexicana*. 2, 2014, Vol. 18.
38. **Gómez M, Campos A.** Histología y Embriología Bucodental. *España : Medica Panamericana*. 2, 2004, págs. 273 - 315.
39. **Gómez de Farias M, Campos Muñoz A.** *Histología y embriología bucodontal*. 2. s.l. : panamericana, 2002.
40. **M, Araiza Téllez.** Efficiency of fluoride-containing compounds on remineralization of carious enamel lesions under cyclic pH conditions. *Revista Odontológica Mexicana*. 2, 2014, Vol. 18, págs. 96-104.
41. **Cate, Ten.** In vitro studies on the effects of fluoride on enamel remineralization. *J Dent Res*. 1990, Vol. 69, págs. 614-619.
42. **Jingyang ZHANG 1 \*, Xuelian HUANG 1,2 \* Shengbin HUANG.** Changes in composition and enamel demineralization inhibition activities of gallic acid at different pH values. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2015, Vol. 73, págs. 595–601.
43. **JM, ten Cate.** pH-cycling of enamel and dentin lesions in the presence of low concentrations of fluoride. *EUROPEAN JOURNAL OF ORAL SCIENCES*. 1995, Vol. 103, págs. 362-367 .
44. **Ten Cate, Timmer k.** Effect of Timing of Fluoride Treatment on Enamel De- and Remineralization in vitro: A pH-Cycling Study. *Caries Res*. 1988, Vol. 22, págs. 20-26.
45. **Y. Mukaia, M.D. Lagerweija.** Effect of a Solution with High Fluoride Concentration on Remineralization of Shallow and Deep Root Surface Caries in vitro. *Caries Res*. 2001, Vol. 35, págs. 317–324 .
46. **Punathil Sameer, Pulayath Civy V.** Assessment of enamel surface microhardness with different fluoride varnishes-an in vitro study. *The journal of contemporary dental practice*. 19, 2018, Vol. 11, págs. 1317-1321.

47. **Téllez., A. Contreras Sánchez. F. Takiguchi Álvarez. M. A. Araiza.** Microdureza del esmalte desmineralizado tratado con resina infiltrante y barniz fluorado en condiciones de pH cíclico. *Dentista y paciente.* 2018, Vol. 120, págs. 54-59.
48. **Buzalaf MAR, Hannas AR, Magalhaes AC, Riows D, Honório HD, Delbem ACB.** pH cycling models for in vitro evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations. *J Appl Oral Sci.* 2010, Vols. 18, 4, págs. 316-334.
49. **Al Jobair, A.** The effect of repeated applications of enamel hardness after multiplex exposures to cola drink. *Pakistan Oral & Dental Journal.* 2010, Vol. 30, 1, págs. 154-158.
50. **Elsayad I, Sakr A, Badr Y.** Combining CPP-ACP with fluoride: a synergistic remineralization Potential of artificially demineralized enamel or not? *Journal of biomedical optics.* 2009, Vol. 14, 4, págs. 1-6.
51. **Reynolds, EC.** Remineralization of enamel subsurface lesions by casein Phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J. Dent Res.* 1997, Vol. 66, págs. 1587-1595.
52. **Vidya Manoharan, R. Krishna Kumar, Arun Kumar Sivanraj, and Selva Balaji Arumugam.** Comparative Evaluation of Remineralization Potential of Casein Phosphopeptide- Amorphous Calcium Fluoride Phosphate and Novamin on Artificially Demineralized Human Enamel: An In vitro Study. *Contemp Clin Dent.* 2018, 9, págs. S58-S63.
53. **Lata S, Varghese ON, Varughese JM.** Remineralization potential of fluoride and amorphous calcium phosphate-casein phospho peptide on enamel lesions: An in vitro comparative evaluation. *J Conserv Dent.* 2010, Vol. 13, 1, págs. 42-46.
54. **Panich Murathe, Poolthong Suchit.** The effect of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate and a cola soft drink on in vitro enamel hardness. *JADA.* 2009, Vol. 140, 4, págs. 455-460.
55. **Jardim JJ, Pagot MA, Maltz M.** Artificial enamel dental caries treated with different topical fluoride regimes: An in situ study. *J. of Dentistry.* 2008, Vol. 36, págs. 396-401.
56. **Ten Cate JM, Duijsters PPE.** Alternating Demineralization and Remineralization of Artificial Enamel Lesions. *Caries Res.* 1982, Vol. 16, págs. 201-210.
57. **Yamaguchi K, Miyazaki Mi, Takamizawa T.** Effect of CPP-ACP paste on mechanical properties of bovine enamel as determined by an ultrasonic device. *Journal of Dentistry.* 2006, 34, págs. 230-236.
58. **Cai F, Shen P, Morgan MV, Reynolds EC.** Remineralization of enamel subsurface lesions in situ by sugar-free lozenges containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Australian Dental Journal.* 2003, Vol. 48, 4, págs. 240-243.
59. **Srinivasan N, Kavitha M, Loganathan SC.** Comparison of the remineralization potential of CPP-ACP and CPP-ACP with 900ppm fluoride on eroded human enamel: an in situ study. *Archives of oral Biology.* 2010, Vol. 55, págs. 541-544.

60. **Karlinsey Robert L, Mackey Allen C, Stocket George K, Pfarrer Aaron M.** in vitro assessments of experimental NaF dentifrices containing a prospective calcium Phosphate technology. *American Journal of Dentistry*. June de 2009, Vol. 22, 3, págs. 180-184.
61. **Ten Cate Jacob M.** Models and Role Models. *Caries research*. 2015, Vol. 49, págs. 3-10.
62. **Buzlaf, MAR.** Fluoride Exposures and dental fluorosis: A literature review. *Rev. FOB*. 2001, Vol. 9, 1/2, págs. 1-10.
64. **Featherstone, J.** Remineralization the Natural Caries Repair Process the Need for New Approaches. *Adv Dent Res*. 2009, Vol. 21, 4, págs. 74-79.