



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
ESPECIALIZACIÓN EN ESTOMATOLOGÍA PEDIÁTRICA**

TÍTULO

**CANTIDAD DE BACTERIAS PRESENTES EN DENTINA INFECTADA Y
AFECTADA EN ÓRGANOS DENTARIOS PRIMARIOS EXTRAÍDOS POR
CARIES: ESTUDIO *IN VITRO***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN**

ESTOMATOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA:

C.D VALENZUELA SANCHEZ ALICIA

DIRECTOR DE TESIS

DR. GARCÍA PÉREZ ÁLVARO

TLALNEPANTLA ESTADO DE MÉXICO ENERO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

DR. ÁLVARO GARCÍA PÉREZ
DIRECTOR DE TESIS

DR. ALVARO EDGAR GONZÁLEZ-ARAGÓN PINEDA
CO - DIRECTOR DE TESIS

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado con el apoyo multidisciplinario de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala en la clínica de Estomatología Pediátrica, los laboratorios de UMF y sobre todo con el soporte incondicional de amigos y familia.

Por lo que me gustaría dedicar los siguientes agradecimientos:

A mis padres y hermana, por alentarme desde el inicio del posgrado y todos los días con sus palabras y abrazos.

A Mario, por darme fuerzas cuando más complicado era el camino.

A Karen, Óscar y Fer por ser excelentes amigos y compañeros de clínica.

Al Dr. Álvaro, por motivarme a mantener mi tema de investigación y por apoyarme incondicionalmente a la realización de un proyecto tan grande.

A la Dra. Cecilia, por enseñarme el área de investigación y por motivarme a ser la mejor versión profesional de mí.

A la Dra. Paty, por siempre dar soporte y palabras de aliento para la realización del tema de investigación.

Al Dr. Rodolfo, por abrir su laboratorio a mi investigación y dedicarme tiempo para explicar con paciencia procedimientos que nunca había realizado.

A la Dra. Beatriz, por acompañarme diario en los procedimientos de laboratorio, por enseñarme protocolos de tinción, corte y observación, por tener paciencia y cariño al explicar técnicas complicadas de realizar.

A Joel, por siempre tener palabras de motivación en las mañanas cuando más lo necesitaba.

A Kelly, por regalarme tu tiempo virtual para sesiones de observación y por darme un soporte académico y emocional cuando más complicado era el horizonte, por aclarar tantas dudas y por enseñarme el amor a la docencia.

INDICE

	PÁGINA
1. RESUMEN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	24
5. JUSTIFICACIÓN	25
6. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN	25
7. OBJETIVO GENERAL	26
8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
9. MATERIAL Y MÉTODOS	27
10. CRITERIOS DE SELECCIÓN	27
11. DEFINICIÓN DE LAS VARIABLES	28
12. TÉCNICAS UTILIZADAS	30
13. ASPECTOS ÉTICOS Y BIOSEGURIDAD	35
14. RESULTADOS	36
15. DISCUSIÓN	45
16. CONCLUSIONES	47
17. REFERENCIAS	48

1. RESUMEN

OBJETIVO GENERAL: Identificar la cantidad y profundidad de cúmulos bacterianos presentes en la dentina en órganos dentarios primarios extraídos por caries dental en la Clínica de Estomatología Pediátrica de la FES-I.

MATERIALES Y MÉTODOS: Estudio Experimental, Descriptivo in vitro, que incluyo órganos dentarios primarios extraídos con caries extensa Grupo experimental (n=11) y grupo Control (n=1) en la Clínica de Estomatología Pediátrica de la FES-I de Enero-Agosto del 2022. Se utilizaron las técnicas de Hematoxilina – Eosina y Gram con modificación de Taylor-Brown & Brenn.

RESULTADOS: 72.7% de los órganos dentarios presentó dentina infectada y el 100% dentina afectada. La mayor parte de los cúmulos bacterianos se encontraron en la dentina circumpulpar con un nivel severo. En segundo lugar, la pulpa cameral y radicular con un nivel moderado y por último la dentina terciaria.

CONCLUSIONES: Se observó que más de la mitad de los órganos dentarios presento dentina infectada, por lo tanto, la invasión bacteriana de la dentina se produce una vez que la dentina se expone al ambiente bucal, de igual modo la invasión bacteriana descontrolada produce una enfermedad pulpar inflamatoria hasta una infeccción radicular.

Palabras clave: dentina afectada, dentina infectada, caries, bacterias, infeccción

2. MARCO TEÓRICO

Complejo dentino-pulpar

El tejido pulpar y dentinario conforman estructural y funcionalmente una verdadera unidad biológica denominada complejo dentino-pulpar. La dentina y la pulpa constituyen una unidad estructural, por la inclusión de las prolongaciones de los odontoblastos en la dentina; conforman una unidad funcional, debido a que la pulpa mantiene la vitalidad de la dentina y ésta a su vez la protege. También comparten un origen embrionario común, ambas derivan del ectomesénquima que forma la papila del germen dentario.

Dentina

La dentina es la porción de tejido duro del complejo pulpo-dentinario y forma la masa principal del diente. La dentina madura está químicamente compuesta de alrededor de 70% de material inorgánico, 20% de material orgánico y 10% de agua en peso. Es un tejido vital y dinámico, circunstancias que le permiten modificar su microestructura y composición como respuesta a procesos fisiológicos (edad, atrición), o patológicos, tales como la erosión, la abrasión, o la caries.¹ El material inorgánico está compuesto principalmente por cristales de hidroxiapatita, similares químicamente a los del esmalte, cemento y hueso. Son más pequeños y delgados. Las dimensiones de los cristales son de 36nm de longitud, 25 nm de anchura y 10 nm de altura, además se orientan de forma paralela a las fibras de colágeno de la matriz de la dentina, disponiéndose entre las fibras y también dentro de las mismas, ya que ocupan los espacios entre las moléculas de colágeno que la forman. La matriz orgánica está formada por componentes entre los que se destaca el colágeno tipo I, que es sintetizado por el odontoblasto y representa el 90% de dicha matriz. Los colágenos tipo III, IV, V y VI se han descrito en pequeñas proporciones.²

El tipo III se segrega en casos de dentina opalescente y está ocasionalmente presente en la dentina peritubular; el tipo IV, en los momentos iniciales de la dentinogénesis. La fase mineral se encuentra dentro del colágeno. La fase inorgánica hace que la dentina sea más dura que el hueso y más blanda que el esmalte. La dentina posee un color amarillento y tiene una cualidad elástica que es muy importante para el adecuado funcionamiento del diente, dado que otorga flexibilidad para evitar fractura del esmalte.^{3 4}

Zonas topográficas

Dentina de manto

Es la primera dentina sintetizada por los odontoblastos recién diferenciados, constituye una delgada capa de 20 μm de espesor que queda ubicada por debajo del esmalte y el cemento. La matriz orgánica de este tipo de dentina está formada por fibras de colágeno muy gruesa que se disponen en forma ordenada y regular. La dentina del manto posee abundante sustancia fundamental. Además, presenta un número aumentado de túbulos, pues contiene las ramificaciones terminales de los mismos. Es la matriz menos mineralizada que el resto de la dentina. Es también llamada dentina primaria.⁵

Dentina Circumpulpar

Esta forma el mayor volumen de dentina de la pieza dentaria, y se extiende desde la zona del manto hasta la predentina; su nombre proviene del hecho de que rodea a la pulpa. Las fibras colágenas son considerablemente más delgadas que las del manto, y se disponen irregularmente, formando una malla densa. La calcificación de esta dentina es de tipo globular y no lineal como ocurre en la dentina del manto.⁵

Pre dentina

Es una capa sin mineralizar, de 20 μm a 30 μm de ancho, situada entre los odontoblastos y la dentina circumpulpar. Está constituida por prolongaciones citoplasmáticas, acompañadas por fibras nerviosas amielínicas y matriz orgánica dentinaria. La primera capa de matriz extracelular formada por los odontoblastos es pre dentina; a medida que esta se calcifica se forma nueva pre dentina. Así, dicha capa se mantiene durante toda vida del diente, como consecuencia de la actividad cada vez más lenta, pero continua, de los odontoblastos. La presencia de esta dentina es importante ya que constituye una fuente de producción continua de dentina. También es muy importante conocer que, si la pre dentina se calcifica completamente, esta podría comenzar a ser resorbida por los odontoclastos.⁵

Tipos de dentina

Dentina primaria

Forma la mayor parte del diente y delimita la cámara pulpar de los dientes ya formados, se considera dentina primaria la que se deposita desde que comienza las primeras etapas de la dentinogénesis hasta que el diente entra en oclusión.⁶

Dentina secundaria

Es la formada después de la formación completa de la raíz, se representa por la aposición continuada, pero más lenta de dentina, posee un patrón incremental y una estructura tubular que es bastante irregular es mayor en cantidad, y aunque hay menos túbulos por milímetro cuadrado en la dentina secundaria por la lejanía con pulpa dental. En los molares hay una deposición de dentina secundaria en techo y piso de la cámara pulpar y origina una reducción asimétrica del tamaño y la forma de la cámara pulpar, por lo que no se deposita regularmente.⁶

Dentina terciaria

Esta es llamada también de reparación o reactiva, y se produce como reacción a los estímulos nocivos tales como las caries o procesos defectuosos de reparación. Esta está formada específicamente por los odontoblastos directamente afectados por el estímulo. La calidad y cantidad se relaciona con la intensidad y duración del estímulo. Puede ser muy rápido depositando $3.5 \mu\text{m}$ diarios como característica es que el patrón será irregular y disperso con células incluidas. Y si el estímulo es muy ligero la deposición será menor cantidad y en forma más regular.⁶

Histología de la Dentina

Túbulos dentinarios

Son estructuras cilíndricas delgadas que se extienden por todo el espesor de la dentina desde la pulpa hasta la unión amelodentinaria o cementodentinaria. La pared del túbulo está formada por dentina peritubular la cual se encuentra constituida por una matriz mineralizada, que ofrece una estructura y una composición química característica. En su interior se encuentra el líquido tisular y las prolongaciones odontoblásticas. Siguen un trayecto en S desde la superficie externa de la dentina hasta su límite con la pulpa en la dentina coronaria. Esta curvatura en S es menos pronunciada en la dentina radicular y aún menos pronunciada en el tercio cervical de raíz. Dichas curvaturas se originan como resultado del apiñamiento de los odontoblastos a medida que se dirigen hacia el centro de la pulpa.

La cantidad de túbulos depende de la ubicación. En la dentina coronal varía de 8000 a 58000 mm^2 , estas diferencias son importantes en la evaluación de las reacciones a los procedimientos restauradores. Se encuentran aproximadamente 7000 túbulos por mm^2 en la dentina periférica y 60000 por mm^2 cerca de la pulpa. Los túbulos dentinarios también presentan extensiones laterales

que se ramifican a partir del túbulo principal y que pueden alojar o no prolongaciones odontoblásticas, dichas ramificaciones se denominan canalículos.

El diámetro de los túbulos dentinarios es muy variable, depende de la edad del diente. En un diente joven, en la dentina circumpulpar, el túbulo puede tener un diámetro de 2,5 a 4 μm ; avanzando hacia el esmalte el diámetro decrece, y al llegar al límite amelodentinario, el diámetro promedio oscila entre 0,8 y 1 μm , y a este nivel muchas veces el túbulo se bifurca. En 1995 se evaluó el diámetro de los túbulos dentinarios a una distancia de 1.5 mm de la pulpa, en aproximadamente $2,5 \pm 0,3 \mu\text{m}$. En ocasiones aparecen, en ciertas zonas de la dentina, megatúbulos con un mayor diámetro, que lógicamente aumentarán localmente la permeabilidad. Estos hechos morfológicos tendrán repercusiones en los cambios de gradientes de presión en el interior del túbulo. Los túbulos dentinarios hacen permeable a la dentina, ofreciendo una vía de entrada a los irritantes del tejido pulpar para la caries.

Dentina peritubular

La periferia del túbulo dentinario está compuesta por un anillo hipermineralizado de dentina, se forma dentro de la dentina mineralizada y posee una matriz orgánica en la cual hay muy pocas fibras colágenas. La formación de esta puede acelerarse por estímulos externos ambientales cerrando la luz del túbulo, obliterando el espacio tubular y se deposita de forma centrípeta y de manera lenta y gradual. En dientes recién erupcionados no se ha formado en la zona más pulpar por lo que se considera aún túbulos abiertos y en la restauración de estos dientes se debe tener más cuidado por la fácil llegada al tejido pulpar.⁷

La dentina peritubular puede ser diferenciada fácilmente de la dentina intertubular, debido a que presenta menos cantidad de fibrillas de colágeno y mayor proporción de proteoglicanos sulfatados, mientras que la dentina intertubular contiene gran cantidad de colágeno. Además, está más

mineralizada y por ello es más dura que la intertubular. La dureza de esta dentina puede proporcionar un soporte estructural adicional para la dentina intertubular y con ello fortalecer el diente. El crecimiento continuo de la dentina peritubular se produce como un cambio relacionado con la edad o por otras razones como procedimientos restauradores que llevan a la obliteración de los túbulos pudiendo producirse una esclerosis dentinaria. El término de esclerosis es usado para describir la deposición continua de dentina peritubular el cual puede ocasionar la obliteración del túbulo, denominándose dentina esclerótica fisiológica. La esclerosis de la dentina también aparece con la edad, se puede observar frecuentemente en el tercio apical de la raíz y en la corona. La esclerosis reduce la permeabilidad de la dentina y puede ayudar a prolongar la vitalidad de la pulpa.

Contenido de los túbulos dentinarios

El interior del túbulo dentinario se encuentra ocupado por la prolongación odontoblástica, aunque entre dicha prolongación y la pared del túbulo existe un espacio estrecho (espacio periprocesal) el cual se encuentra ocupado por el líquido tisular. Los procesos odontoblásticos son las prolongaciones citoplasmáticas que dejan los odontoblastos a medida que forman la dentina; ellos determinan la morfología de los túbulos. Estos procesos son más anchos en su base (cerca del cuerpo del odontoblasto) y terminan en punta afilada; sus ramas colaterales y terminales ocupan las ramificaciones de los túbulos dentinarios. Tomes fue quien describió hacia la mitad del siglo XIX la presencia de estructuras membranosas de origen epitelial en el interior de los túbulos, los estudios posteriores han sido controvertidos en lo concerniente a si el proceso odontoblástico ocupa todo el volumen disponible en el túbulo. Goracci *et al.*, mediante microscopio electrónico de alta resolución, determinaron el área exacta donde se extiende el proceso odontoblástico.⁸ Dicho estudio evidenció que las prolongaciones odontoblásticas son observadas solamente en el tercio interno de la dentina. En la actualidad se acepta por la mayoría de los autores que el proceso odontoblástico

termina en el tercio interno de la dentina y en los dos tercios externos, en los cuales los túbulos no poseen prolongaciones, y éstos estarán llenos de fluidos extracelulares. El fluido se dirige hacia fuera entre los odontoblastos y los túbulos dentinarios, escapa a través de los poros existentes en el esmalte. La exposición de los túbulos por fractura de un diente o por una preparación de una cavidad expone los túbulos, produciendo un movimiento de líquido no sólo hacia la superficie de la dentina expuesta en forma de gotitas muy pequeñas, sino también en profundidad, presionando las fibras nerviosas dentales las cuales inician el dolor. Se cree que el movimiento rápido del fluido a través de los túbulos dentinarios es una de las causas de que la dentina tenga sensibilidad.⁹

La existencia de los túbulos dentinarios determina que la dentina sea muy permeable; también constituyen una vía de ingreso rápido de microorganismos provenientes de una caries. En la dentina de dientes jóvenes, en donde, no se ha terminado de formar el ápice, los túbulos son más amplios y permeables, lo cual facilita aún más la filtración de bacterias o sus toxinas.¹⁰

Dentina intertubular

La dentina intertubular se distribuye entre las paredes de los túbulos dentinarios y su componente fundamental son las fibras de colágeno que constituyen una malla fibrilar entre la cual y sobre la cual se depositan los cristales de hidroxiapatita. Conforman el mayor componente de la dentina y representa el principal producto secretor de los odontoblastos, además está constituida por una red tejida de fibrillas colágenas que miden entre 50 y 200 nm de diámetro, en las cuales se deposita cristales de hidroxiapatita. La dentina intertubular se localiza entre los anillos de la dentina peritubular y constituye el grueso de la dentina circumpulpar. Su matriz orgánica está compuesta principalmente por fibrillas de colágeno con un diámetro de 500-1000 Å.^{5 11}

Dentina Interglobular

La dentina interglobular es el término utilizado para describir zonas de dentina no mineralizada o hipomineralizada que persisten dentro de la dentina madura. Esta se encuentra principalmente en la dentina circumpulpar, justo por debajo de la dentina del manto. Como resultado de algunas enfermedades como deficiencias hormonales o nutricionales, la mineralización de la dentina se ve afectada y se produce un aumento de las áreas de la dentina interglobular. Se forma durante la dentinogénesis y que representa islas no mineralizadas de tejido que puede ser producto de muchos factores locales y sistémicos. Como esta irregularidad de la dentina es un defecto de la mineralización y no de la formación de la matriz, el patrón arquitectónico normal de los túbulos permanece inalterado y corren sin interrupción a través del área interglobulares.¹²

Líneas incrementales

La dentina al igual que el hueso crece por aposición, este crecimiento es el que determina la formación de las líneas incrementales. Estas líneas corren en ángulo recto respecto a los túbulos dentinarios y marcan el patrón rítmico normal de la aposición de dentina en dirección interna y hacia la raíz. Las menores líneas incrementales que pueden ser distinguibles son las líneas incrementales de Von Ebner.¹³ Ellas representan el patrón diario de formación de dentina, se hallan separadas por una distancia regular, que es de unos 6 μm en la corona y de unos 3.5 μm en la raíz. Esta diferencia se debe a que la formación de la dentina en la corona es más rápida que en la raíz. Otro tipo de líneas incrementales son las de Owen. Estas líneas mayores son irregulares en grosor y espaciamiento. Owen las describió originalmente como una coincidencia de las curvaturas secundarias entre los túbulos dentinarios vecinos, pero actualmente se dice que son alteraciones en el proceso de calcificación de la dentina.¹⁴

Zona granulosa de Tomes

Se encuentra en toda la periferia de la dentina radicular. En cortes longitudinales se observa como una franja oscura, delgada de 50 μm aproximadamente, vecina a la unión cemento dentinaria y paralela a ella en toda su longitud. El aspecto granular se atribuyó a la existencia de numerosos espacios de dentina interglobular, que se originarían por la falta de mineralización de los haces de fibras colágenas de la zona más periférica de la dentina radicular.

Tejido pulpar

La pulpa es un tejido blando de origen mesenquimatoso, con células especializadas como son los odontoblastos, los cuales se encuentran dispuestos periféricamente en contacto directo con la matriz de la dentina. La relación que se establece entre los odontoblastos y la dentina es lo que se denomina complejo dentino-pulpar y es una de las razones por las cuales la pulpa y la dentina se deben considerar una unidad funcional. La pulpa dental es el tejido conectivo blando que mantiene a la dentina. En ella se pueden distinguir cuatro zonas diferentes: la zona odontoblástica, la zona subodontoblástica u oligocelular de Weil, la zona rica en células y la zona central de la pulpa o tejido pulpar propiamente dicho. Las células principales de la pulpa son: los odontoblastos, fibroblastos, células mesenquimatosas indiferenciadas y los macrófagos.¹⁵

Componentes Estructurales de la Pulpa

La pulpa dental consta básicamente de los mismos componentes que el tejido conjuntivo laxo de cualquier otra parte del cuerpo y se encuentra ricamente vascularizado e innervado. Está formada por un 75% de agua y por un 25% de materia orgánica. Esta última está constituida por células y matriz extracelular representada por fibras y sustancia fundamental.¹⁵

Elementos Celulares de la Pulpa Normal

Odontoblastos: Son las células más predominantes del órgano dentino-pulpar. Son células específicas o típicas del tejido pulpar, situadas en la periferia y adyacente a la predentina. Los odontoblastos conforman por su disposición en empalizada la capa odontoblástica, la cual es semejante a un epitelio cilíndrico pseudoestratificado en la región coronaria y un epitelio cilíndrico simple en la zona radicular. Los odontoblastos en la porción coronaria alcanzan la cifra de 45.000 m^2 , el cual va disminuyendo en la zona radicular. Los odontoblastos de la corona son también más grandes que en la zona radicular: esta célula adopta una forma cilíndrica alta de 40 μm , mientras que en la zona media las células son cúbicas y en la zona apical son de aspecto aplanado. Las variaciones morfológicas están directamente relacionadas con la actividad funcional.

Estas células poseen una matriz compuesta con fibras colágenas y proteoglucanos, capaz de mineralizarse. Las características ultraestructurales de estas células son similares, contienen un retículo endoplasmático rugoso muy extenso que ocupa gran parte del citoplasma, un aparato de Golgi bien desarrollado y localizado en el lado dentinario del núcleo, gránulos secretores y numerosas mitocondrias, además son ricas en ARN, y sus núcleos contienen uno o varios nucléolos prominentes.¹⁶

Las diferencias más significativas entre estas células quizás sean el aspecto morfológico y la relación anatómica que se establece entre las células y las estructuras que producen. Los odontoblastos por otra parte presentan prolongaciones celulares para formar los túbulos dentinarios. Con respecto a las variaciones de la longitud, de la prolongación celular o citoplasmática en el interior del túbulo dentinario, numerosas investigaciones demuestran que su extensión promedio oscila entre 0.2 a 0.7mm. Por otra parte, trabajos realizados con microscopia electrónica de barrido o mediante técnicas inmunohistoquímicas, demuestran que puede llegar hasta la unión amelodentinaria. Se ha sugerido que el proceso odontoblástico ocupa toda la longitud de los túbulos sólo en las primeras

fases del desarrollo, mientras que en un diente adulto las prolongaciones pueden presentar distintas longitudes, alcanzando en algunos casos la dentina periférica. La extensión de las prolongaciones odontoblásticas es un punto muy controversial. Investigaciones sugieren que los procesos o prolongaciones citoplasmáticos solo se extienden cerca de un tercio de la distancia, desde la preentina al esmalte en dientes normales de jóvenes adultos.¹⁵⁻¹⁷ En cuanto a la vida del odontoblasto no se conoce aún, pero es probable que sea la misma que el diente. Es importante hacer referencia, que el odontoblasto maduro es una célula altamente diferenciada que ha perdido la capacidad de dividirse. Los nuevos odontoblastos que se originan en los procesos reparativos de la dentina, es a expensas de las células mesenquimatosas indiferenciadas, aunque algunos autores opinan que podrían derivar de los fibroblastos pulpares.

Fibroblastos: Son las células principales y más abundantes del tejido conectivo pulpar, especialmente en la corona, donde forman la capa rica en células. Los fibroblastos pulpares son células fusiformes con núcleos ovoides. Sintetizan y secretan la mayor parte de los componentes extracelulares, es decir, el colágeno y la sustancia fundamental. Los fibroblastos tienen por función formar, mantener y regular el recambio de la matriz extracelular fibrilar y amorfa: además son células multifuncionales, pues tienen también la capacidad de degradar el colágeno como respuesta ante distintos estímulos fisiológicos del medio interno. Se piensa también que estas células pueden tener el potencial de originar nuevos odontoblastos en la periferia de la pulpa cuando se amerita.¹⁷

Células Mesenquimáticas Indiferenciadas: Estas células derivan del ectodermo de las crestas neurales. Constituyen las células de reserva de la pulpa por su capacidad de diferenciarse en nuevos odontoblastos o fibroblastos, según el estímulo que actúe. Se encuentran bajo los odontoblastos en la zona rica en células. Estas células se hallan en toda el área celular y en la zona central de la pulpa y se relacionan a menudo con los vasos sanguíneos. Además, menciona que poseen abundante citoplasma y prolongaciones citoplasmáticas periféricas.

Al morirse o lesionarse los odontoblastos, a través de tales conexiones entre odontoblastos y estas células se pueden enviar señales a estas células menos diferenciadas y hacer que se dividan y se diferencien, formando odontoblastos o células similares a estas. El número de células mesenquimáticas disminuye con la edad, lo cual produce una reducción en la capacidad de autodefensa de la pulpa.

Macrófagos. Son monocitos que han abandonado el torrente sanguíneo, entran en los tejidos y se diferencian en varias subpoblaciones, una de esta subpoblación son los macrófagos, los cuales desempeñan funciones activas de endocitosis y fagocitosis, Debido a su movilidad y actividad fagocítica, estos elementos celulares son capaces de actuar como reservorios, que eliminan hematíes extravasados, células muertas y sustancias extrañas presentes en los tejidos, todo el material ingerido por los macrófagos es destruido por la acción de enzimas lisosomales. Además, otro grupo de macrófagos participan en reacciones inmunes mediante el procesamiento del antígeno y su presentación posterior a la célula T de memoria.

Células Dendríticas: Son elementos accesorios del sistema inmune. En la epidermis y en las membranas de las mucosas se encuentran células similares llamadas células de Langerhans. Las células dendríticas se hallan especialmente en los tejidos linfoides, pero también están ampliamente distribuidas por los tejidos conectivo, entre ellos el de la pulpa.

Linfocitos: Se ha demostrado que en la pulpa sana solamente posee linfocitos de tipo T, los linfocitos B normalmente están ausentes. Los linfocitos T participan en la respuesta inmunológica inicial; estas células se activan mediante mecanismos inmunológicos ante la presencia de antígenos provenientes de la caries, los cuales liberan linfoquinas que provocan vasodilatación pulpar, La interacción entre ambos tipos de linfocitos facilitaría la diferenciación de linfocitos B en células

plasmáticas, las cuales son la que elaboran anticuerpos específicos contra los antígenos que han propiciado la respuesta inflamatoria.

Mastocitos. Se encuentran ampliamente distribuidos por los tejidos conectivos. En pocas ocasiones se hallan en el tejido pulpar, mientras que se encuentran de forma sistémica en las pulpas con inflamación crónica, no se encuentran en las pulpas normales, pero se encuentran abundantemente en las pulpas inflamadas.

Fibras

Fibras Colágenas

Están constituidas por colágeno tipo I, el cual representa aproximadamente el 60% del colágeno pulpar. Su distribución y proporción difiere según la región. Son pocas y de forma irregular en la pulpa coronaria y en la zona radicular adquieren una disposición paralela y están en mayor concentración. Su densidad y diámetro aumenta con la edad.

Fibras Reticulares

Están formadas por delgadas fibrillas de colágeno tipo III asociadas a fibronectina. Ambos tipos de colágeno I y III son sintetizados por los fibroblastos. Las fibras reticulares son fibras muy finas que se distribuyen de forma abundante en el tejido mesenquimático de la papila dental. Estas fibras se disponen al azar en el tejido pulpar, excepto a nivel de la región odontoblástica donde se insinúan entre las células y constituyen el plexo de Von Korff. Además, puede aumentar el diámetro con la edad, pero en menor proporción que las colágenas.

Fibras Elásticas

Son muy escasas en el tejido pulpar y se encuentran localizadas exclusivamente en las delgadas paredes de los vasos sanguíneos y su principal componente es la elastina.

Sustancia Fundamental

La sustancia fundamental o matriz extracelular amorfa, está constituido principalmente por proteoglicanos y agua. Es de consistencia similar a un gel y constituye la mayor parte del órgano pulpar. La sustancia fundamental rodea y da apoyo a las estructuras. Se comporta como un verdadero medio interno, a través del cual las células reciben los nutrientes provenientes de la sangre arterial; igualmente los productos de desechos son eliminados en él para ser transportados hacia la circulación eferente.

Zonas Morfológicas de la Pulpa

Capa Odontoblástica

Es la capa más superficial de la pulpa, la cual se localiza debajo de la preentina. Está constituida por los odontoblastos dispuestos en empalizada. En consecuencia, esta capa se compone de los cuerpos celulares de los odontoblastos, además entre estos se pueden encontrar capilares, fibras nerviosas y células dendríticas.

La capa odontoblástica de la pulpa coronal contiene más células por unidad de área que la pulpa radicular. Mientras que los odontoblastos de la pulpa coronal maduran suelen ser cilíndricos, los de la porción media de la pulpa radicular son más cúbicos. Cerca del foramen apical aparecen como una capa de células planas. Entre los odontoblastos existen una serie de uniones intercelulares especializadas, es decir, complejos de unión, que incluyen desmosomas, uniones en hendiduras (nexos) y uniones estrechas (zónulas ocluyentes). Funcionalmente estas uniones son las que mantienen la integridad de la capa odontoblástica.

En la porción coronal de la pulpa joven, los odontoblastos presentan una forma cilíndrica alta, lo cual determina un aspecto de empalizada. Los odontoblastos de la porción media de la pulpa radicular son más cúbicos y cerca del foramen apical muestran un aspecto de capa celular aplanada. Entre los odontoblastos vecinos existen uniones celulares especializadas de tipo desmosomas. Las

uniones intercelulares proporcionan una vía de baja resistencia a través de la cual los estímulos eléctricos pueden pasar rápidamente de célula a célula. Estas uniones no rodean completamente a los odontoblastos, así el líquido, las proteínas plasmáticas, los capilares y las fibras nerviosas pueden pasar entre ellos. Las uniones de tipo desmosoma han sido observadas también entre odontoblastos y fibroblastos en el área sub-odontoblástica.

Zona pobre en Células O Zona Odontoblástica U Oligocelular De Weil

Esta capa se encuentra situada por debajo de la anterior, tiene aproximadamente 40 μm de ancho y se la identifica como una zona pobre en células. Está conformada por capilares sanguíneos, fibras nerviosas amielínicas y las finas prolongaciones citoplasmáticas de los fibroblastos. En ella existe el plexo nervioso de Raschkow, el plexo capilar subdentínoblástico y fibroblastos. Esta zona puede no ser aparente en las pulpas jóvenes, donde la dentina se forma con rapidez, o en las pulpas adultas, donde se genera dentina reparadora.

Zona rica en Células

Se caracteriza por su amplia densidad celular, donde se destacan las células mesenquimáticas y los fibroblastos que originan las fibras de Von Korff. Además, esta capa puede contener un número variable de macrófagos, células dendríticas y linfocitos. Esta capa es mucho más predominante en la pulpa coronal que la radicular. La división celular dentro la zona rica en células es rara en pulpas normales, la muerte de los odontoblastos causa un gran aumento en la mitosis. Puesto que los odontoblastos con lesiones irreversibles se sustituyen por células que emigran desde la zona rica en células hasta la superficie interna de la dentina.

Caries dental

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido la caries dental como un proceso localizado de origen multifactorial que se inicia después de la erupción dentaria, determinando el reblandecimiento del tejido duro del diente que puede evolucionar hasta la formación de una cavidad. La enfermedad es inicialmente reversible y puede ser detenida en cualquier estadio de su evolución, puede afectar la salud general y la calidad de vida de los individuos ya que afecta funciones básicas vitales como la alimentación y la nutrición y altera otras más complejas que influyen psicosocialmente en la vida de relación de las personas por ello la salud integral se ven comprometidas como consecuencia de la enfermedad caries.¹⁸

Definición de caries como enfermedad

La caries dental es una enfermedad dinámica, no transmisible, multifactorial, mediada por biopelículas, modulada por la dieta, que produce una pérdida neta de minerales de los tejidos dentales duros. Está determinada por factores biológicos, conductuales, psicosociales y ambientales. Como consecuencia de este proceso, se desarrolla una lesión de caries.¹⁹

La caries dental es una alteración de los tejidos mineralizados del diente donde se ha producido un desequilibrio de minerales con una consecuente disolución de los cristales de hidroxiapatita por los ácidos orgánicos, pudiendo provocar la ruptura de la superficie del esmalte produciendo una cavitación, la cual dejará expuesta a la dentina, en donde las fibras de colágeno sufrirán una degradación enzimática a causa de las bacterias. El proceso puede causar dolor, pérdida temprana de órganos dentarios, ausentismo escolar, y requerir tratamientos costosos.

Dependiendo de diversos factores, incluyendo el tiempo, la composición bacteriana, flujo salival, y la dieta, la acumulación de biopelículas puede conducir al establecimiento de un ambiente ácido que provoca la desmineralización del esmalte.

Caries de dentina

La caries dentinaria está formada por dos capas:

Dentina infectada: Una capa superficial que está severamente descalcificada y no se puede remineralizar fisiológicamente.

Dentina afectada: Y una capa profunda en la que la descalcificación es moderada.

Capa superficial o capa de dentina infectada

Se caracteriza porque la estructura histológica está completamente perdida. Los túbulos dentinarios están desorganizados y su interior está ocupado por bacterias que proliferan en su interior. Debido a la desmineralización que acompaña al proceso carioso la dentina peritubular desaparece y el diámetro tubular aumenta. Las bacterias van invadiendo la dentina intertubular, facilitado este hecho por la pérdida de la dentina peritubular, y los túbulos van coalesciendo unos con otros, dando lugar a la formación de áreas de necrosis. Otra vía de difusión bacteriana son las ramificaciones laterales de los túbulos dentarios. En la dentina intertubular se aprecia una desmineralización severa, las fibras de colágeno quedan expuestas total o parcialmente y están desnaturalizadas.

Estudios bioquímicos revelaron que los precursores del colágeno y los enlaces intermoleculares están disminuidos.²⁰ Además, los cristales liberados son granulares y no guardan relación con la estructura orgánica. Dado que no hay procesos odontoblásticos vivos y las fibras colágenas están irreversiblemente dañadas, esta dentina no se puede remineralizar fisiológicamente, por lo que debe ser eliminada clínicamente.²⁰

Capa profunda o de dentina afectada

Esta capa se puede dividir a su vez en tres áreas, teniendo todas en común que la estructura dentinaria está conservada:

- Capa túrbida
- Zona transparente o translúcida
- Zona subtransparente

En la **capa túrbida** los procesos odontoblásticos están presentes y vivos. La dentina peritubular ya es evidente y, aunque la dentina intertubular está desmineralizada, las fibras colágenas no están desnaturalizadas y presentan sus bandas características. Estudios bioquímicos han puesto de manifiesto que los enlaces intermoleculares están reducidos, pero hay más precursores del colágeno. Otra característica es que los cristales de hidroxiapatita son más cortos, puesto que la desmineralización afecta en primer lugar a sus extremos. Aunque se considera una capa libre de bacterias, hay autores que han demostrado su presencia.²⁰

En la **zona transparente o translúcida**, la dentina intertubular está también desmineralizada parcialmente. Hay una característica importante y es que los túbulos dentinarios están llenos de cristales de whitloquita (Mineral de fosfato que a menudo se representa como un tipo de apatita). Estos cristales son de gran tamaño y más resistentes al ataque ácido. Esta esclerosis tubular es la responsable de su aspecto transparente o translúcido.²⁰

Los depósitos intratubulares no se sabe con certeza si son un mecanismo de defensa activo o el resultado de un fenómeno cíclico de disolución y precipitación de los cristales. Lo que sí se ha demostrado es que su presencia disminuye la permeabilidad dentinaria y, por tanto, el paso de ácidos, bacterias y productos bacterianos, sirviendo de protección para el tejido pulpar. Por estos motivos es una dentina que debemos respetar durante la eliminación de caries.²⁰

Por último, la *dentina subtransparente* no es más que una zona de transición entre la zona transparente y la dentina sana subyacente, por lo que encontramos menos calcificaciones intratubulares y más áreas de dentina no afectada.²⁰

Características de la dentina afectada por caries

Fase mineral

La fase mineral de la dentina se compone principalmente de hidroxiapatita rica en carbonato. El proceso de caries dentinaria consiste en episodios dinámicos y cíclicos de desmineralización y remineralización. Un estudio de imágenes infrarrojas a través de microscopía transformada de Fourier (FTIR) ha demostrado que la fase mineral de la dentina afectada por caries es menos cristalina y tiene un contenido mineral más bajo que la dentina normal. El microanálisis con sonda de electrones (EPMA) reveló que la dentina afectada por caries, así como la dentina infectada por caries, mostraban un contenido de magnesio (Mg) mucho más bajo en comparación con la dentina intacta, aunque las densidades de calcio (Ca) y fósforo (P) en la dentina afectada por caries eran relativamente similares a la dentina intacta. La reducción del contenido de Mg en la dentina comienza antes del comienzo de la disminución del contenido de Ca y P en la caries dentinaria.

Los cambios en el contenido de Mg podrían ser el primer signo de desmineralización por caries y pueden indicar una pérdida de matriz de dentina peritubular. Además, los cristales de apatita más grandes están presentes en la dentina remineralizada después de una desmineralización por caries, en comparación con los cristales de apatita en la dentina intacta.²¹

Fase orgánica

La matriz orgánica dentinaria contiene diferentes proteínas extracelulares, como colágeno tipo I, proteoglicanos, fosfoproteínas dentinarias y sialoproteínas. Se han informado cambios en la matriz orgánica de la dentina asociados con la caries. En la capa interna (dentina afectada por caries), el patrón general de composición de aminoácidos no muestra diferencias significativas con respecto a la dentina intacta. Además, los enlaces cruzados covalentes intermoleculares reducibles del colágeno se desplazan parcialmente a la forma precursora, lo que conduce a una disminución de los enlaces cruzados, pero este cambio es reversible. Estos resultados apoyan la idea de que la dentina afectada por caries es remineralizable.²¹

Respuesta defensiva ante la caries

Existen controversias en la literatura sobre el papel y el impacto de las reacciones dentinarias y pulpares que ocurren durante el ataque de caries. Investigaciones han considerado la caries como un proceso progresivamente destructivo.¹⁸⁻²²

La caries dental se desarrolla donde las acumulaciones bacterianas en la superficie del diente permiten organizarse en estructuras de biopelículas, recibiendo nutrientes de la dieta y permaneciendo relativamente imperturbable por las fuerzas mecánicas.¹⁸

Se debe esencialmente a la proliferación o sobrecrecimiento de bacterias cariogénicas como los estreptococos del grupo mutans, que metabolizan los azúcares de la dieta, y conducen a un nicho ecológico de un pH bajo creando así el inicio de la desmineralización de la estructura dental. Por el contrario, algunas bacterias del biofilm a través de su sistema de arginina-desiminasa pueden producir un pH alcalino que da como resultado un micro-nicho neutralizante y un pH elevado que conduce a remineralización.²²

Cuando no existe la capacidad de remineralización de la zona mineral del diente o no se logra controlar a tiempo con una restauración el avance del proceso carioso, la lesión pasa a la dentina peritubular para finalmente alcanzar la dentina intertubular; igualmente se produce la desmineralización de la dentina, luego la disolución de la matriz y finalmente la propagación de las bacterias, las cuales fagocitan la matriz diluida y conforman la cavidad cariosa en la zona dentinaria. Para que exista una respuesta pulpar no es necesario que las bacterias alcancen físicamente la pulpa. Las toxinas o los subproductos metabólicos se pueden difundir a través de los túbulos dentinarios y provocar respuestas inmunes en la pulpa dental.

La endotoxina bacteriana es capaz de difundir a través de 0,5 mm de dentina. Las bacterias pueden penetrar hasta 0,75 mm de la pulpa sin producir lesión pulpar, pero a partir de esa distancia, a medida que avanzan las reacciones pulpares, se va volviendo más intensa. Para este punto se activa la respuesta inmune natural frente a la caries y dependiendo de la cantidad de dentina sana se intentará resolver el problema de la invasión bacteriana.

Como primera respuesta existe un aumento de los espacios intercelulares entre los odontoblastos. La dentina desmineralizada libera moléculas estimuladoras como glicoproteínas, fibronectina y factores de crecimiento tipo beta que interactúan con los receptores de membrana de los odontoblastos. Éstos aumentan la actividad de la fosfatasa alcalina y de la ATPasa, la cual permite la captación de calcio y fósforo y la síntesis de colágeno, depositándose dentina esclerótica. De esta forma disminuye la permeabilidad dentinaria. Es decir, aumentan el depósito de dentina peritubular para formar dentina esclerótica.

Parece que mientras existan al menos 2 mm de dentina sana se activa la respuesta inmune innata de la pulpa frente a las bacterias y se inicia cuando las células efectoras (monocito-macrófagos, células dendríticas inmaduras, células T y, en la pulpa, también los odontoblastos) reconocen, a través de los receptores, los patrones moleculares inespecíficos presentes en las bacterias (ácido lipoteicoico,

LPS, ARN bacteriano). Y activan la inflamación neurogénica creando así citoquinas innatas para lograr eliminar precozmente la mayoría de los antígenos bacterianos que llegan al tejido pulpar, por lo que sería suficiente para proteger la pulpa y facilitar su reparación creando así la pulpitis reversible.²³

La respuesta inflamatoria específica de la pulpa dental se caracteriza por el acúmulo focal de células inflamatorias crónicas. Este proceso está probablemente mediado, en un estadio inicial, por los odontoblastos y, posteriormente, por las células dendríticas; estas últimas son responsables de la presentación del antígeno y de la estimulación de los linfocitos T. Los anticuerpos se acumulan en la capa odontoblástica; con el avance de la lesión, pueden verse en los túbulos dentinarios. Los mediadores neurogénicos están implicados en la respuesta pulpar a los irritantes y, al igual que los componentes del sistema inmune, pueden mediar en el proceso patológico. La estimulación externa de la dentina provoca la liberación de neuropéptidos los cuales producen respuestas vasculares tales como la vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, lo que provoca un proceso inflamatorio con edema, calor y dolor.²⁴

El acúmulo de células inflamatorias comienza a ser marcado cuando la lesión cariosa se aproxima a la pulpa y la infección alcanza la dentina terciaria. La exposición pulpar en los dientes deciduos e inmaduros puede provocar una respuesta proliferativa o hiperplásica.²⁴ Si la infección persiste termina activándose la respuesta inmune adaptativa específica, que incrementa la inflamación y aumenta el edema y la presión intrapulpar, lo que en una cavidad inextensible como lo es la cavidad pulpar, acaba por producir un daño irreversible a la pulpa (pulpitis irreversible, necrosis pulpar).²⁵

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los métodos de identificación de la dentina se basan en la observación del color y la dureza del tejido, es decir son métodos físicos. Actualmente estos métodos son cuestionados, por la falta de objetividad ya que el color y dureza no son datos confiables en cuanto a la penetración bacteriana del tejido dentinario. Existen resultados contradictorios que muestran bacterias invasoras en el esmalte y dentina y otros no encuentran, algunas investigaciones afirman que debajo de una lesión temprana que se encuentra bajo el esmalte y la dentina está libre de bacterias, sin embargo, otros mostraron bacterias dentro de lesiones no cavitadas, y en algunos casos las bacterias se encuentran presentes en la dentina. Por lo tanto, es necesario identificar la cantidad de dentina afectada e infectada, ya que estudios previos solo reportan las características de cada una, y no la profundidad a la que puedan llegar.

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál será la cantidad y la profundidad de las bacterias presentes en la dentina afectada en órganos dentarios primarios extraídos por caries dental en la Clínica de Estomatología Pediátrica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-I)?

5. JUSTIFICACIÓN

La Odontología Mínimamente Invasiva (OMI) es un enfoque basado en evidencia que tiene como objetivo detener la caries y preservar la mayor cantidad de estructura dental posible, logrando su objetivo de un enfoque menos invasivo mediante la eliminación de la dentina infectada. La dentina infectada y afectada por caries son sustratos distintos que tienen diferente composición química y estructuras morfológicas. Aunque se ha reportado reducciones en los recuentos bacterianos y una actividad reducida en la dentina afectada restante, la actividad bacteriana continua sigue siendo una preocupación en la práctica clínica diaria.

Por lo tanto, persisten los esfuerzos para eliminar o reducir las bacterias residuales en la dentina afectada con el objetivo de disminuir el riesgo de progresión de la caries, mediante el uso de agentes antibacterianos al acondicionador de dentina, la aplicación de fluoruros antes de la restauración y el empleo de revestimientos/bases antibacterianos. Investigaciones han reportado que la dentina afectada por caries puede ser remineralizada, haciendo una adhesión más confiable a este tejido.

De ahí el interés en conocer la cantidad de bacterias en la dentina infectada, afectada y sana, con el propósito de comprender la dificultad que presenta realizar un procedimiento estable, duradero y la reparación del tejido dental afectado.

6. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

La cantidad de cúmulos bacterianos en la dentina afectada tubular será mayor en comparación con la cantidad de cúmulos bacterianos en dentina infectada.

7. OBJETIVO GENERAL

- Identificar la cantidad y profundidad de cúmulos bacterianos presentes en la dentina en órganos dentarios primarios extraídos por caries dental en la Clínica de Estomatología Pediátrica de la FES-I.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Describir las características la dentina afectada e infectada en los órganos dentales
- Describir las características del tejido neurovascular afectado por caries (necrosis, fibrosis, tejido inflamatorio).

9. MATERIAL Y MÉTODOS

- **Tipo de estudio:** Experimental, Descriptivo *in vitro*.
- **Población de estudio:** Órganos dentarios primarios extraídos con caries extensa en la Clínica de Estomatología Pediátrica de la FES-I.
- **Periodo de estudio:** De Enero a Agosto del 2022.
- **Tamaño de la muestra:** Diez órganos dentarios primarios extraídos con caries extensa y dos dientes sanos extraídos.
- **Tipo de muestreo:** Muestreo no probabilístico por conveniencia.

10. CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión

- Órganos dentarios con caries extensa y sin posibilidad de rehabilitar.
- Órganos dentarios con diagnóstico de extracción indicada.
- Órganos dentales sanos (Mesiodens) o con necesidad de ser extraído por tratamientos de ortopedia dental.

Criterios de exclusión

- Órganos dentarios con destrucción extensa y que no cuente con dentina clínica visible.

11. DEFINICIÓN DE VARIABLES DEL ESTUDIO

VARIABLES INDEPENDIENTES	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	NIVEL DE MEDICIÓN
Caries dental	Enfermedad dinámica, no transmisible, multifactorial, mediada por biopelículas, modulada por la dieta, que produce una pérdida neta de minerales de los tejidos dentales duros.	Cualitativa ordinal	ICDAS 4-5
Edad	Número de años cumplidos al momento de la examinación bucal	Cuantitativa discreta	Años
VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	NIVEL DE MEDICIÓN
Cantidad de bacterias presentes	Numero de bacterias presentes en la dentina infectada y afectada	Cuantitativa discreta	
Dentina	Capa sensible de tejido y túbulos dentinarios que tienen una comunicación constante con el nervio de los OD debajo del esmalte.	Cualitativa nominal dicotómica	Dentina infectada: Una capa superficial que está severamente descalcificada y no se puede remineralizar fisiológicamente. Dentina afectada: Y una capa profunda en la que la descalcificación es moderada.
Tejido pulpar afectado	Tejido afectado por microorganismos, los cuales llegan a la pulpa a través de los túbulos dentinarios expuestos,	Cualitativa ordinal	Necrosis Pulpar, Hiperemia, Fibrosis, Inflamatorio Mixto.

	ya sea por caries, o factores irritantes (productos bacterianos, bacterias, endotoxinas, etc.), que, al penetrar a través de los túbulos dentinarios, destruyen el odontoblasto y las células subyacentes.		
--	--	--	--

12. TECNICAS UTILIZADAS

El presente estudio se encargó de evaluar 11 órganos dentales de dentición primaria con caries severa y 1 órgano dental sano. Al final se obtuvieron dos grupos: Grupo experimental (n=11) y grupo Control (n=1).

PROCEDIMIENTO

El procedimiento fue colocar el OD en formol al 10% después de la extracción, fueron almacenados por aproximadamente 20 meses. Cabe mencionar que los OD fueron recolectados en el año 2020 pero debido a la pandemia se pudieron procesar hasta el año 2022. Todos los dientes fueron sometidos a la descalcificación en ácido fórmico al 5% en formol amortiguado y agitación continua de 1,100 rpm a temperatura de 28.5 (Incubator shaker orbital). Los incisivos estuvieron en este proceso por 12 semanas, y se inició el protocolo de lavado y deshidratación. Los molares estuvieron a partir de la semana 15 en ácido fórmico al 20% y se inició el protocolo de lavado hasta la semana 17. El protocolo de lavado consistió en 4 inmersiones en agua destilada cada 30 minutos y el protocolo de deshidratación consistió en cambios de alcohol etílico de manera ascendente del 70% al 100% haciendo dos infiltraciones del diente de 1 hora cada cambio de alcohol, al finalizar se hacía un cambio a alcohol al 50% y aceite de cedro al 50% (Alcohol-Aceite de cedro) se dejó en este infiltrado por 24 horas. Posterior a este tiempo, se colocó en aceite de cedro al 100% por 3 días. Después del protocolo de deshidratación se llevó a las muestras a parafina I y II por 2 horas respectivamente y parafina III 1 hora, al finalizar se colocó la muestra en cubos de inclusión. Las muestras se llevaron al microtomo para realizar cortes entre 7 y 5µm, con el fin de obtener 4 laminillas por bloque, con cortes seriados de cinco cortes longitudinales al eje mayor del órgano dental. Se separaron las laminillas en dos bloques para someterlos a la tinción de rutina con hematoxilina y eosina y Gram con modificación de Taylor-Brown & Brenn.



Fig. 1 Protocolo de descalcificación, deshidratación e inclusión.

- (A) Órganos dentales dentro de Incubador shaker orbital, en proceso de descalcificación en ácido fórmico al 5% en formol amortiguado y agitación continua de 1,100rpm a temperatura de 28.5.
- (B) Protocolo de deshidratación con cambios de alcohol etílico de manera ascendente del 70% al 100% haciendo dos infiltraciones del diente de 1 hora cada cambio de alcohol.
- (C) Aspecto de órgano dental 7 posterior a deshidratación con alcohol etílico.
- (D) Ingreso de órganos dentales al alcohol-cedro al 50% permaneciendo así por 24 horas.
- (E) Aspecto de órgano dental 13B posterior al ingreso de cedro al 100% por 3 días.
- (F) Colocación de órganos dentales dentro de los cubos de parafina con respectivo marcaje.

Técnica de Hematoxilina – Eosina

1. Desparafinar los tejidos una hora antes de procesamiento
2. Sumergir laminillas en Xilol I y II 5min respectivamente.
3. Alcohol de manera descendente de 100%, 96% y 70% dos cambios respectivamente de 2 minutos.
4. Lavar con agua destilada 5 minutos
5. Sumergir laminillas en Hematoxilina de Harris 5 minutos.
6. Lavar con agua destilada rápidamente para quitar excesos.
7. Lavar con alcohol ácido para decolorar rápidamente.
8. Lavar 2 minutos con agua destilada
9. Sacar y meter en agua amoniacal
10. Lavar con agua destilada 2 minutos
11. Sumergir laminillas en Eosina por 2 minutos
12. Rehidratar en alcohol a manera ascendente de 70%, 96% y 100% dos cambios respectivamente con 2 minutos cada cambio.
13. Sumergir en Xilol II y II 5 minutos respectivamente.
14. Colocar resina Entellan sobre laminillas para realizar el fijado de porta-laminilla.
15. Dejar secar al aire para observación posterior en microscopio.

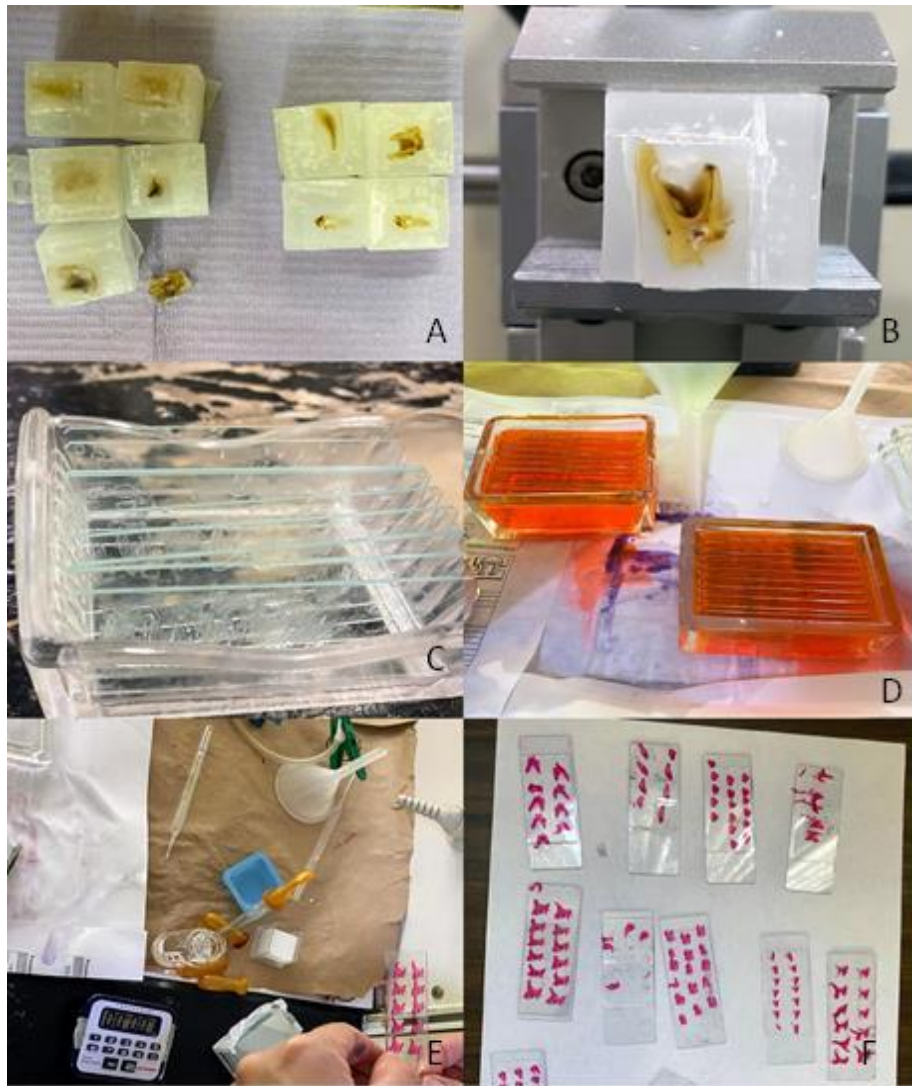


Fig. 2 Protocolo de corte y tinción

- (A) Órganos dentales dentro de cubos de inclusión y corte para el microtomo.
- (B) Órgano dental 5 (OD5) en microtomo para realizar cortes entre 7 y 5 μm , con el fin de obtener 4 laminillas por bloque, con cortes seriados de cinco cortes longitudinales al eje mayor del órgano dental.
- (C) Organización de cortes en cubetas de tinción en dos bloques.
- (D) Realización de tinción de rutina, Hematoxilina – Eosina.
- (E) Fijación de cubreobjetos con resina.
- (F) Organización e identificación de cortes realizados.

Técnica Gram con modificación de Taylor-Brown & Brenn

1. Sumergir en Xilol I y II 5 minutos respectivamente.
2. Deshidratar en alcohol descendente de 100%, 96% y 70% dos cambios respectivamente de 2 minutos.
3. Lavar en agua destilada 5 minutos.
4. Sumergir en colorante violeta 5 minutos
5. Lavar en agua destilada
6. Sumergir en Yodo/Lugol 1 minuto.
7. Lavar en agua destilada.
8. Decolorar acetona-alcohol por 30 segundos.
9. Lavar en agua destilada.
10. Sumergir en Fucsina hasta 3 minutos.
11. Lavar en agua destilada.
12. Sumergir en solución de ácido pícrico por 10 segundos.
13. Rehidratar con 2 cambios de alcohol de 70%, 96% y 100% 2 minutos respectivamente.
14. Lavar en Xilol I y II 5 minutos respectivamente.
15. Colocar resina Entellan sobre laminillas para realizar el fijado de porta-laminilla.
16. Dejar secar al aire para observación posterior en microscopio.

13. ASPECTOS ÉTICOS Y BIOSEGURIDAD

El protocolo fue sometido al Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala para su aprobación en apego al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, título segundo de los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos (Capítulo I Reforma 2014).

Este protocolo de investigación se apega al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud en los artículos 13, 14, 16, 17 ya que es información perteneciente a seres humanos y se protegerá la privacidad del individuo sujeto de investigación. Asimismo, de acuerdo con el artículo 17 esta es: **I.- Investigación con riesgo mínimo.**

14. RESULTADOS

Tabla 1. Profundidad y presencia de cúmulos bacterianos en diferentes zonas de dentina de los órganos dentarios extraídos por caries dental de niños de la Clínica de Estomatología Pediátrica de FES Iztacala.

MUESTRA	EDAD	DIENTE	DENTINA CIRCUMPULPAR	DENTINA TERCIARIA	PULPA CAMERAL	PULPA RADICULAR
OD1	6	Control (SANO)	—	—	—	—
OD3	7	85	***	*	—	—
OD5	7	74	**	—	*	*
OD6	8	51	N/A	—	**	**
OD7	6	55	**	—	—	—
OD13B	5	61	***	—	—	—
OD13C	5	52	***	—	—	—
OD13D	5	62	***	—	*	*
OD16	8	75	—	—	**	—
OD18	8	54	***	*	**	***
OD19A	5	52	—	*	**	**
OD21	8	84	*	—	—	—

Presencia de cúmulos:

Sin Presencia: _

Leve: *

Moderado: **

Severo: ***

Interpretación: En la Tabla 1 podemos observar que la mayor parte de los cúmulos bacterianos se encontraron en la dentina circumpulpar con un nivel severo. En segundo lugar, la pulpa cameral y radicular con un nivel moderado y por último la dentina terciaria.

Tabla 2. Características del tejido pulpar órganos dentarios extraídos por caries dental de niños de la Clínica de Estomatología Pediátrica de FES Iztacala.

MUESTRA	EDAD	NECROSIS PULPAR	HIPEREMIA	FIBROSIS	INFLAMATORIO MIXTO	PREDENTINA	DENTINA TERCIARIA
OD1	6	NO	NO	NO	NO	NO	NO
OD3	7	SI	NO	NO	NO	NO	SI
OD5	7	NO	NO	NO	SI	NO	SI
OD6	8	SI	NO	NO	NO	NO	NO
OD7	6	SI (CORONAL)	NO	SI (RADICULAR)	NO	NO	NO
OD13B	5	NO	SI	SI	SI	SI	SI*
OD13C	5	NO	SI	NO	NO	SI	SI
OD13D	5	SI	SI	SI	NO	NO	NO
OD16	8	NO	SI	SI	SI	NO	SI
OD18	8	SI	NO	NO	NO	NO	SI
OD19A	5	SI	NO	NO	NO	NO	SI
OD21	8	NO	NO	NO	SI*	SI	SI

Interpretación: En la Tabla 2 se puede observar el porcentaje del tejido pulpar de los órganos extraídos por caries, al 50% se pudo observar las características en la necrosis pulpar, 33.3% en hiperemia, 33.3% en fibrosis, 33.3% inflamatorio mixto, 25.0% predentina y 66.7% en dentina terciaria.

Tabla 3. Presencia de dentina afectada e infectada de órganos dentarios extraídos por caries dental de niños de la Clínica de Estomatología Pediátrica de FES Iztacala.

ID	MUESTRA	EDAD	DIENTE	INFECTADA	AFECTADA
1	OD1	6	Supernumerario (sano)	N/A	N/A
2	OD3	7	85	SI	SI
3	OD5	7	74	NO	SI
4	OD6	8	51	NO	SI
5	OD7	6	55	NO	SI
6	OD13B	5	61	SI	SI
7	OD13C	5	52	SI	SI
8	OD13D	5	62	SI	SI
9	OD16	8	75	SI	SI
10	OD18	8	54	SI	SI
11	OD19A	5	52	SI	SI
12	OD21	8	84	SI	SI

Interpretación: En la Tabla 3 se presenta la distribución de los órganos dentarios extraídos y si existe la presencia de dentina afectada o infectada, 72.7% de los órganos dentarios presentó dentina infectada y el 100% dentina afectada.

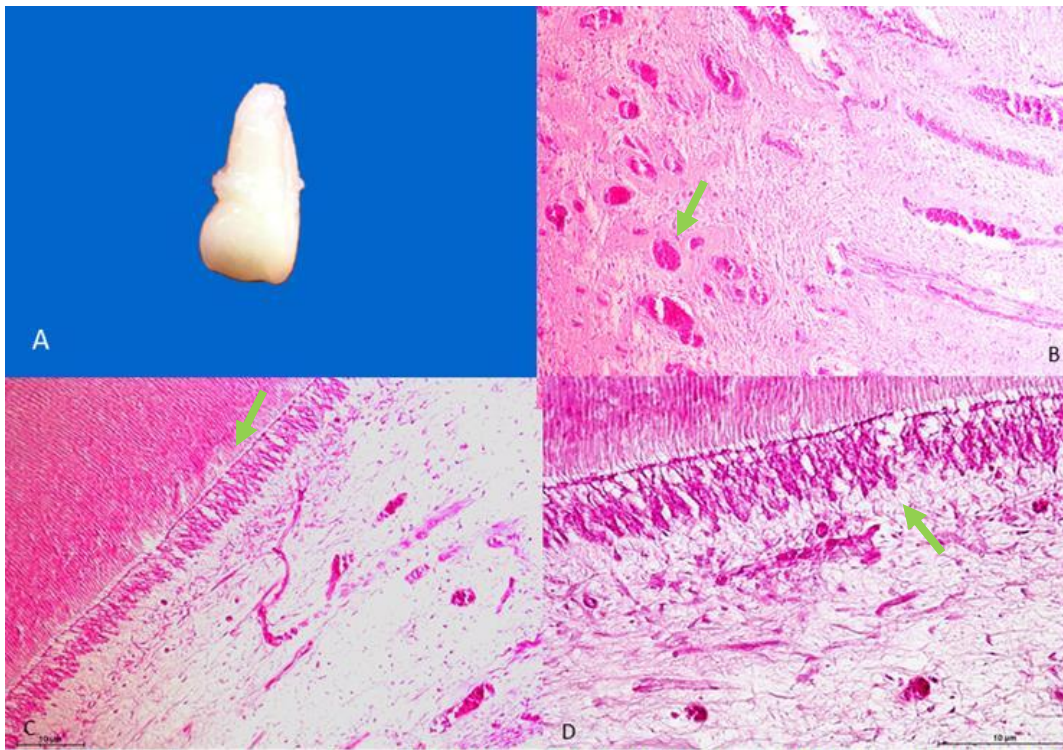


Fig. 3 Órgano dental 1; Macroscopía y microscopía

- (A) Macroscopía de OD1 sano.
- (B) Fotomicrografía H&E 20x cámara pulpar características normales de pulpa dental con presencia de capilares continuos sobre un tejido conjuntivo laxo sin infiltrado inflamatorio (*flecha verde*).
- (C) H&E 20x Presencia de túbulos dentinarios con forma regular, zona de predentina y capa de odontoblastos sin alteraciones tisulares (*flecha verde*).
- (D) H&E 40x Zona de odontoblastos aplanados y matriz laxa correspondiente a pulpa acelular. (*flecha verde*).

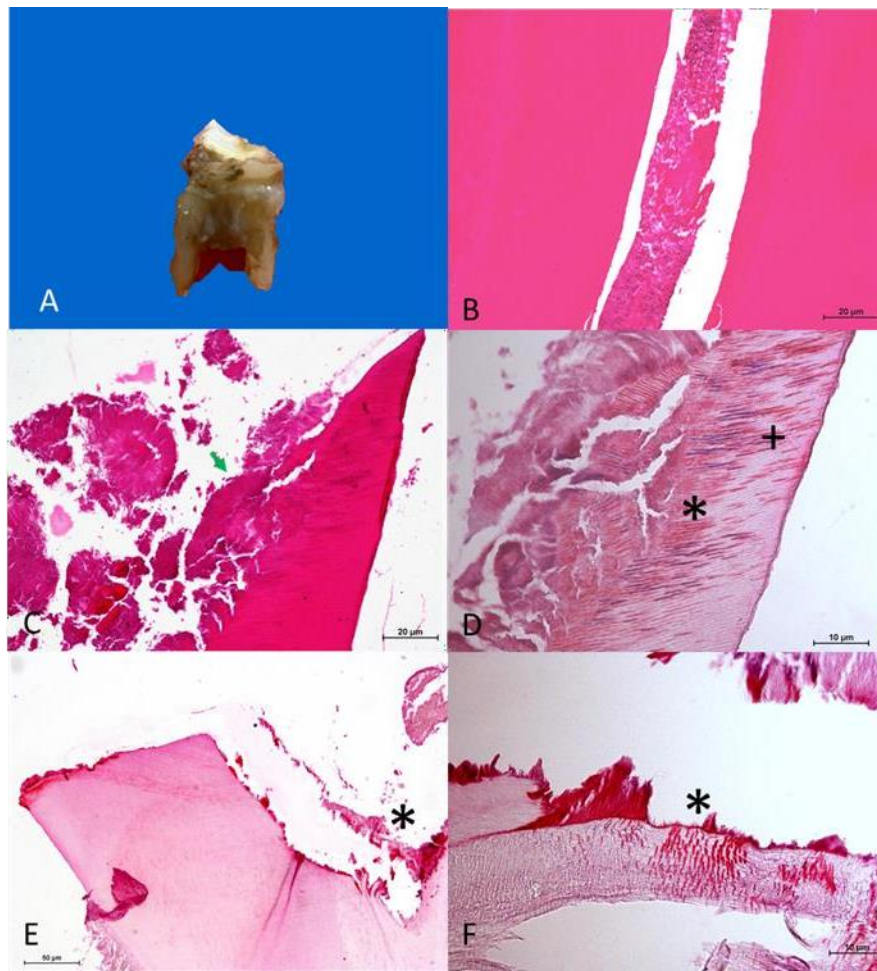


Fig. 4 Órgano dental OD 3; Macroscopía y microscopia

(A) *Macroscopía de OD3, destrucción coronaria y lesión en furca.*

(B) *Fotomicrografía H&E 20x centro de la zona radicular, se observa la pulpa necrótica con zonas de cúmulos.*

(C) *H&E 10x Porción coronaria distal, zona de pulpa necrótica y cúmulos bacterianos en dentina (flecha verde).*

(D) *Fotomicrografía Gram modificada 20x Penetración de bacterias en los túbulos dentinarios siendo así la dentina afectada, se muestran en colores diferentes bacterias gram positivas (azules) (+) y negativas (rojas)(*).*

(E) *Gram modificada 4x Porción coronaria mesial, penetración de bacterias (*) a lo largo de los túbulos dentinarios*

(F) *Gram modificada 20x Zona de furca, se observa la diferencia de la dentina infectada siendo la zona pigmentada en rojo intenso (*) y la dentina afectada siendo colonizada por las bacterias a lo largo del túbulo dentinario.*

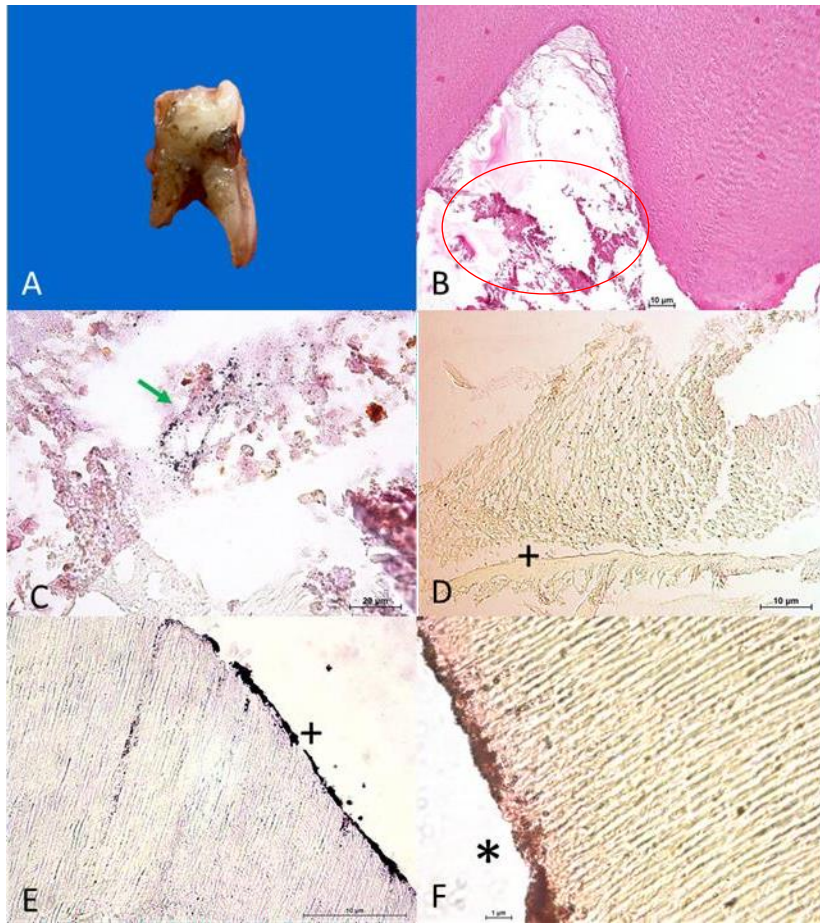


Fig. 5 Órgano dental 5; Macroscopía y microscopia.

- (A) Macroscopía de OD5, con cavidad por caries en zona mesial de corona clínica.
- (B) Fotomicrografía H&E 10x centro de la cámara pulpar, se observa la pulpa necrótica.
- (C) H&E 20x Porción central de cámara pulpar con cúmulos bacterianos (flecha verde) y zona necrótica.
- (D) Fotomicrografía Gram modificada 20x; Zona de cúmulos bacterianos (+) en porción central de cámara pulpar.
- (E) Gram M 20x Penetración de bacterias (+) en los túbulos dentinarios en capa de dentina tubular, siendo así la dentina afectada.
- (F) Gram M 40x Penetración de bacterias (*) en túbulos dentinarios en porción circumpulpar.

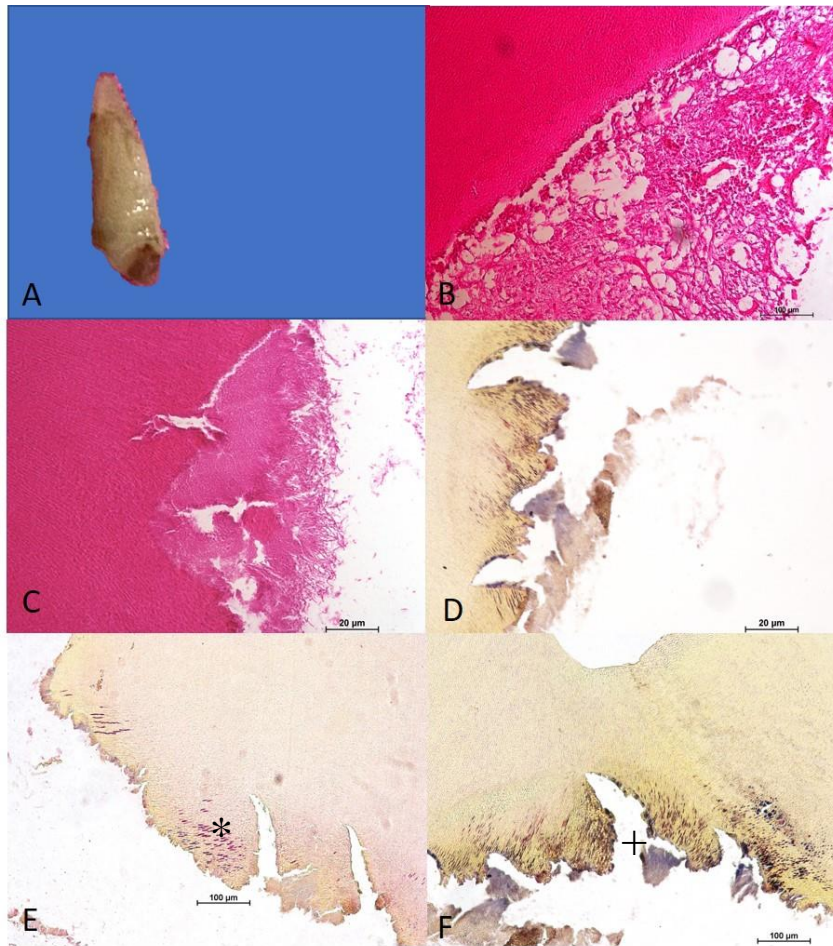


Fig. 6 Órgano dental 13B; Macroscopía y microscopía

(A) *Macroscopía de OD13B, destrucción coronaria.*

(B) *Fotomicrografía H&E 10x* centro de la cámara pulpar, se observa la pulpa con fibrosis e hiperemia por abundantes vasos y tejido inflamatorio mixto, en tejido dentinario se observa zona de predentina y una capa de odontoblastos desorganizados.

(C) *H&E 10x* Porción distal de la parte coronal, zona de dentina infectada por la desorganización de los túbulos dentinarios.

(D) *Fotomicrografía Gram modificada 20x* Zona de penetración bacteriana en túbulos dentinarios en porción distal de la zona dentinaria circumpulpar(dentina afectada) y bacterias gram positivas (+) se observa la dentina infectada

(E) *Gram M 20x* Penetración de bacterias gram negativas (*) en los túbulos dentinarios en capa de dentina tubular.

(F) *Gram M 20x* Zona de dentina afectada e infectada (+) coalesciendo en parte central de la porción coronaria.

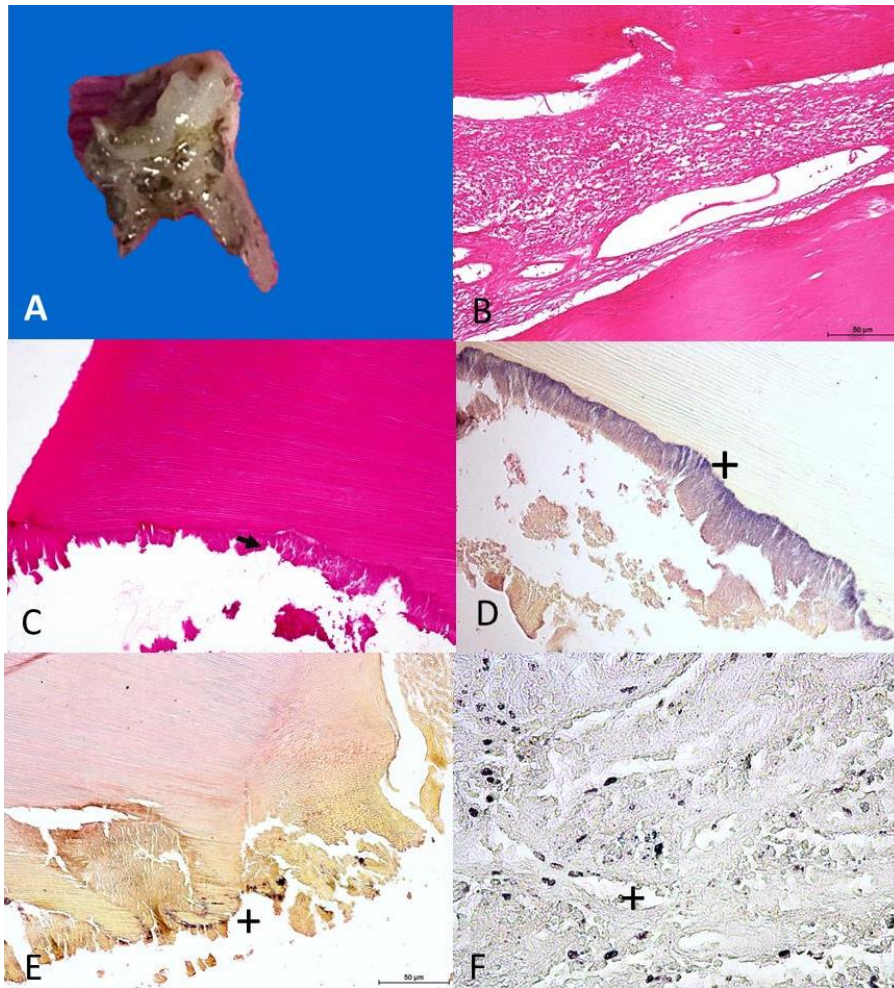


Fig. 7 Órgano dental 16; Macroscopía y microscopia

(A) Macroscopia de OD16, destrucción coronaria parcial.

(B) *Fotomicrografía H&E 10x* centro de la porción radicular, tejido inflamatorio mixto y ligera hiperemia, tejido dentinario se observa resorción interna

(C) *H&E 10x* Porción mesial de la parte coronal, zona de dentina infectada (*flecha negra*) por la desorganización de los túbulos dentinarios

(D) *Fotomicrografía Técnica Gram modificada 10x* Dentina infectada presencia de colonias bacterianas gran negativas (+)

(E) *Gram M 20x* Penetración de bacterias (+) en los túbulos dentinarios en capa de dentina tubular.

(F) *Gram M 20x* Invasión bacteriana (+) en tejido pulpar porción cortada centro de la cámara pulpar.

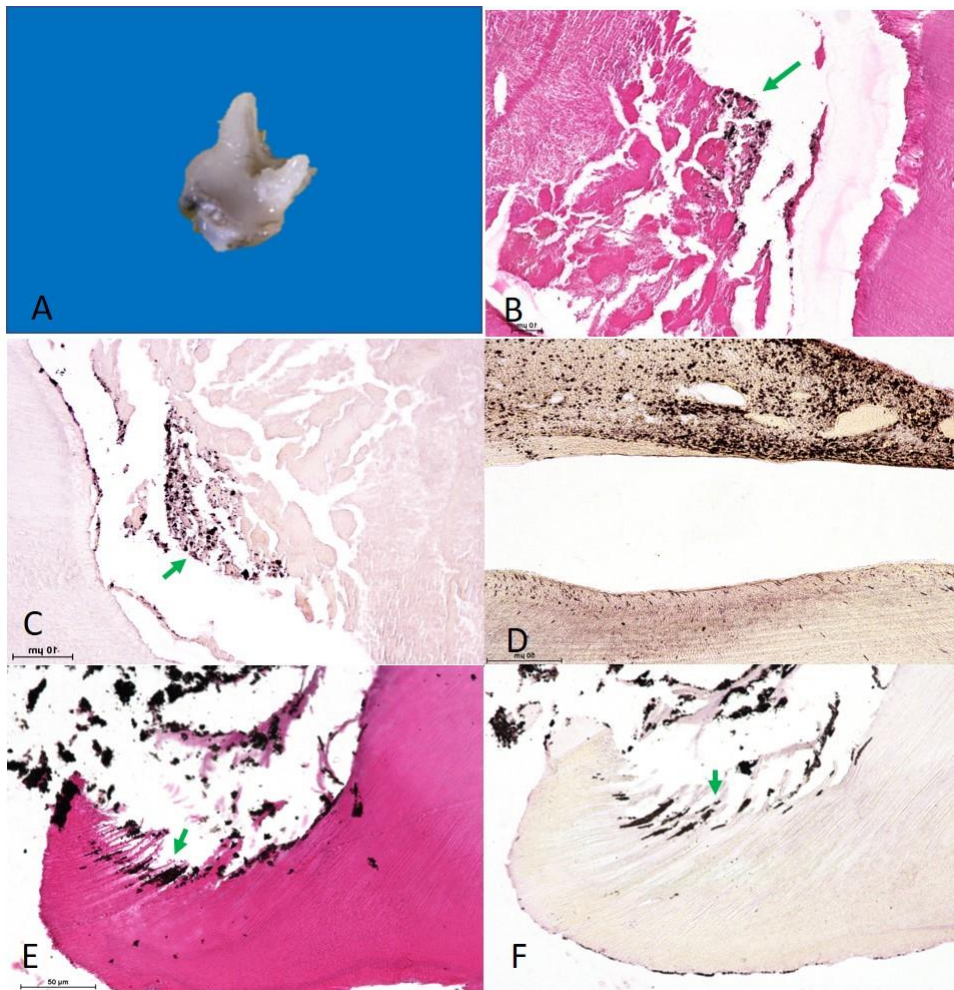


Fig.8 Órgano dental OD18; Macroscopía y microscopia

- (A) Macroscopia de OD18, cavidad por caries extensa, con material restaurador en corona clínica.
- (B) *Fotomicrografía H&E 10x* Centro de la cámara pulpar, pulpa con necrosis e invasión bacteriana (*flecha verde*) en cuerno pulpar distal, en zona de dentina se observa dentina terciaria.
- (C) *Fotomicrografía Técnica Gram modificada 10x* Porción mesial de tejido pulpar, se observan múltiples cúmulos bacterianos invadiendo (*flecha verde*).
- (D) *Gram Modificada 20x* Porción radicular totalmente invadida en cúmulos bacterianos y penetración de dentina tubular radicular.
- (E) *H&E 10x* Penetración de bacterias en los túbulos dentinarios en capa de dentina circumpulpar en porción (*flecha verde*).
- (F) *Gram Modificada 20x* Penetración de bacterias (*flecha verde*) en los túbulos dentinarios en capa de dentina circumpulpar en porción coronaria distal.

15. DISCUSIÓN

En el presente estudio se encontró que en el total de la muestra el 72% presentó dentina infectada y el 100% dentina afectada. La dentina es un tejido mineralizado formado por una red de colágeno, donde el odontoblasto responde a cualquier irritación con una deposición mineral en los túbulos dentinarios. Cuando los ácidos bacterianos atacan, el mineral se disuelve gradualmente, exponiendo la red colágena.

La desmineralización de la dentina es causada principalmente por la exposición a soluciones ácidas con pH por debajo del crítico cuando el mineral tiende a disolverse hasta saturar la solución. La dentina cariada se describe en términos de dos capas alteradas, una capa exterior cariada (dentina infectada) y una capa interior cariada (dentina afectada). Cada capa se divide a su vez en diferentes zonas.²⁶ La capa exterior cariada, que está contaminada con bacterias, las fibras de colágeno están degradadas y no se pueden remineralizar, y por otra parte la capa interior cariada, que está libre de bacterias con una desnaturalización limitada del colágeno y se puede remineralizar. La capa exterior cariada debe eliminarse durante la preparación de la cavidad (dentina infectada) y la capa interior cariada interna debe conservarse (dentina afectada).²⁷

Asimismo, la odontología de mínima invasión recomienda solo la eliminación de la zona superficial, altamente contaminada con bacterias e irreparable, y menciona que la dentina restante afectada por caries más profunda puede curarse y repararse con el complejo dentino-pulpar y, por lo tanto, puede retenerse y sellarse utilizando materiales de restauración biointeractivos. Este protocolo de extracción de tejido selectivo de mínima invasión conserva más tejido dental y se ha demostrado que mejora la supervivencia a largo plazo del complejo dentino-pulpar.²⁸

Por otra parte, investigaciones microbiológicas y clínicas han demostrado que la cantidad de bacterias disminuye durante los procedimientos de excavación gradual y que las lesiones se detienen clínicamente. Bjørndal & Larsen en un estudio donde examinaron la microflora antes y después de

los procedimientos de excavación por etapas en lesiones cariosas profundas en nueve dientes permanentes encontraron una disminución en la flora detectada después del intervalo de tratamiento asimismo la distribución de especies bacterianas no representaba una microbiota cariogénica típica de lesiones profundas, lo que confirmaba los hallazgos clínicos de progresión de caries detenida.²⁹ Por otra parte, en el presente estudio se encontró que la mayor parte de los cúmulos bacterianos se encontraron en la dentina circumpulpar, pulpa cameral y radicular y por último la dentina terciaria en niveles moderados y severos. Una limitante del presente estudio es que no fueron identificados que tipo de bacterias estaban presentes en la dentina infectada o afectada, pero existen investigaciones donde reportan que tipo de bacterias se encuentran presentes.

La invasión bacteriana de los túbulos dentinarios ocurre cuando la dentina queda expuesta luego de una ruptura en la integridad del esmalte o cemento. Los productos bacterianos se difunden a través del túbulo dentinario hacia la pulpa y provocan cambios inflamatorios en el complejo pulpo-dentinario. Los organismos grampositivos dominan la microflora de los túbulos tanto en la dentina cariada como en la no cariada. El número relativamente alto de anaerobios obligados presentes, como *Eubacterium spp.*, *Propionibacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Peptostreptococcus micros* y *Veillonella spp.*, sugiere que el ambiente favorece el crecimiento de estas bacterias. Por otra parte, los estreptococos se encuentran entre las bacterias más comúnmente identificadas que invaden la dentina. Las interacciones específicas de otras bacterias bucales con los estreptococos invasores pueden facilitar la invasión de la dentina por grupos bacterianos seleccionados.³⁰

Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos involucrados en la invasión de los túbulos dentinarios por bacterias debería permitir el desarrollo de nuevas estrategias de control, como compuestos inhibidores incorporados en productos para el cuidado de la salud bucal o materiales dentales, que ayudarían en la práctica de la Odontopediatría.

16. CONCLUSIONES

- 72.7% de los órganos dentarios presentó dentina infectada y el 100% dentina afectada.
- La mayor parte de los cúmulos bacterianos se encontraron en la dentina circumpulpar con un nivel severo.
- 50% de los órganos dentarios presentó características de necrosis pulpar, 33.3% hiperemia, 33.3% fibrosis, 33.3% inflamatorio mixto, 25.0% predentina y 66.7% en dentina terciaria.
- Por lo tanto, de acuerdo a la literatura la invasión bacteriana de la dentina se produce rápidamente una vez que la dentina se expone al entorno bucal y, en las primeras etapas de la infección, las bacterias Grampositivas de la placa dominan la microflora. De igual modo, la invasión bacteriana descontrolada conduce a enfermedad pulpar inflamatoria, infección del conducto radicular y enfermedad periapical.
- Las aplicaciones de estos resultados pueden aplicarse en el desarrollo de nuevas estrategias de control como incluir compuestos que se agregan a pastas o enjuagues bucales, o que podrían incorporarse a materiales dentales, para inhibir la invasión bacteriana de los túbulos dentinarios.

17. REFERENCIAS

- [1] He L, Hao Y, Zhen L, Liu H, Shao M, Xu X, Liang K, Gao Y, Yuan H, Li J, Li J, Cheng L, van Loveren C. Biomineralization of dentin. *J Struct Biol.* 2019;207(2):115-122.
- [2] Arola DD, Gao S, Zhang H, Masri R. The Tooth: Its Structure and Properties. *Dent Clin North Am.* 2017;61(4):651-668.
- [3] Marshall GW, Jr, Marshall SJ, Kinney JH, et al. The dentin substrate: structure and properties related to bonding. *J Dent.* 1997;25(6):441–58.
- [4] Kinney JH, Marshall SJ, Marshall GW. The mechanical properties of human dentin: a critical review and re-evaluation of the dental literature. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(1):13–29.
- [5] Goldberg M, Kulkarni AB, Young M, Boskey A. Dentin: structure, composition and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed).* 2011;3(2):711-35.
- [6] Nanci A. Ten Cate's Oral Histology. Development, Structure, and Function. 9th Edition 2016.
- [7] Goldberg M, Septier D. A comparative study of the transition between predentin and dentin using various preparative procedures in the rat. *Europ J Oral Sciences.* 1996;104:269–277.
- [8] Goracci G, Mori G, Baldi M. Terminal end of the human odontoblast process: a study using SEM and confocal microscopy. *Clin Oral Investig.* 1999;3(3):126-32.
- [9] West N, Seong J, Davies M. Dentine hypersensitivity. *Monogr Oral Sci.* 2014;25:108-22.
- [10] Farges JC, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, Cooper PR. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:230251.
- [11] Gotliv B-A, Veis A. Peritubular Dentin, a Vertebrate Apatitic Mineralized Tissue without Collagen: Role of a Phospholipid-Proteolipid Complex. *Calcif Tissue Int.* 2007;81:191–205.

-
- [12] D'Ortenzio L, Kahlon B, Peacock T, Salahuddin H, Brickley M. The rachitic tooth: Refining the use of interglobular dentine in diagnosing vitamin D deficiency. *Int J Paleopathol.* 2018;22:101-108.
- [13] Erickson GM. Incremental lines of von Ebner in dinosaurs and the assessment of tooth replacement rates using growth line counts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(25):14623-7.
- [14] Kumar GS. Dentin in: *Orban's Oral Histology and Embryology.* 14 Ed. 2015
- [15] Cohenca N, Paranjpe A, Berg J. Vital pulp therapy. *Dent Clin North Am.* 2013;57(1):59-73.
- [16] Bleicher F. Odontoblast physiology. *Exp Cell Res.* 2014;325(2):65-71.
- [17] Lynch MD, Watt FM. Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *J Clin Invest.* 2018;128(1):26-35.
- [18] Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet.* 2007;369(9555):51-9.
- [19] Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, Maltz M, Manton DJ, Martignon S, Martinez-Mier EA, Pitts NB, Schulte AG, Splieth CH, Tenuta LMA, Ferreira Zandona A, Nyvad B. Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Res.* 2020;54(1):7-14.
- [20] Ceballos García L. Adhesión a dentina afectada por caries y dentina esclerótica. *Av Odontoestomatol.* 2004; 20(2):71-78.
- [21] Nakajima M, Kunawarote S, Prasansuttiporn T, Tagami J. Bonding to caries-affected dentin. *Japanese Dental Science Review.* 2011;47(2):102-114.
- [22] Ricucci D, Siqueira JF Jr. Bacteriologic status of non-cavitated proximal enamel caries lesions. A histologic and histobacteriologic study. *J Dent.* 2020;100:103422.

-
- [23] Hahn CL, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod.* 2007;33(6):643-51.
- [24] Hahn CL, Liewehr FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. *J Endod.* 2007;33(7):773-81.
- [25] Hahn CL, Liewehr FR. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. *J Endod.* 2007;33(3):213-9.
- [26] Zavgorodniy AV, Rohanizadeh R, Swain MV. Ultrastructure of dentine carious lesions. *Arch Oral Biol.* 2008;53(2):124-32.
- [27] Sakoolnamarka R, Burrow MF, Kubo S, Tyas MJ. Morphological study of demineralized dentine after caries removal using two different methods. *Aust Dent J.* 2002;47(2):116-22.
- [28] Alturki M, Koller G, Warburton F, Almhöjd U, Banerjee A. Biochemical characterisation of carious dentine zones using Raman spectroscopy. *J Dent.* 2021;105:103558.
- [29] Bjørndal L, Larsen T. Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. *Caries Res.* 2000;34(6):502-8.
- [30] Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):171-83.