

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Odontología

Departamento de Estomatología

Programa de Doctorado en Medicina Clínica y Salud Pública



TESIS DOCTORAL

Ciclaje de pH en simulación de caries y evaluación de agentes remineralizadores basados en péptidos de autoensamblaje

JUAN SEBASTIÁN ZULUAGA MORALES

Directores

Profa. MARÍA VICTORIA BOLAÑOS
CARMONA

Prof. PEDRO ÁLVAREZ LLORET

Granada, 2023

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Juan Sebastián Zuluaga Morales
ISBN: 978-84-1117-856-3
URI: <https://hdl.handle.net/10481/82072>

Tesis dirigida por:

Profa. María Victoria Bolaños Carmona
Universidad de Granada

Prof. Pedro Álvarez Lloret
Universidad de Oviedo

Índice

Agradecimientos	1
Lista de abreviaturas.....	2
Lista de figuras.....	4
Lista de tablas.....	6
Resumen	7
1 Introducción.....	9
1.1 Diente	9
1.2 Caries dental.....	12
1.3 Remineralización.....	15
1.4 Agentes remineralizadores	16
1.4.1 Flúor	16
1.4.1.1 Mecanismos de acción.....	17
1.4.1.2 Pastas de dientes fluoradas	19
1.4.1.3 Soluciones fluoradas.....	19
1.4.2 Fosfopéptido de caseína – Fosfato de calcio amorfo.....	20
1.4.2.1 Mecanismos de acción.....	21
1.4.3 Péptidos de autoensamblaje	23
1.5 Técnicas analíticas	25
1.5.1 Espectroscopía vibracional.....	25
1.5.1.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (Fourier transform infrared, FTIR).....	26
1.5.1.2 Espectroscopía Raman.....	29
1.5.2 Difracción de Rayos X (X-Ray diffraction, XRD)	32
1.5.3 Microscopía electrónica de barrido/energía dispersiva de Rayos X (MEB/EDX)	33
1.5.4 Tinción tricrómica de Masson (TTM).....	35
2 Justificación, hipótesis y objetivos	36
2.1 Justificación.....	36
2.2 Hipótesis.....	38
2.3 Objetivos	38
2.3.1 Fase de desmineralización.....	38

2.3.1.1	Objetivo general.....	38
2.3.1.2	Objetivos específicos	38
2.3.2	Fase de remineralización.....	39
2.3.2.1	Objetivo general.....	39
2.3.2.2	Objetivos específicos	39
3	Materiales y métodos	40
3.1	Preparación de las muestras.....	40
3.2	Fase de desmineralización.....	40
3.2.1	Diseño experimental.....	40
3.2.2	Inducción de caries artificial (ciclaje de pH)	42
3.2.3	Análisis con espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada (Fourier transform infrared – Attenuated total reflectance, ATR-FTIR) ...	43
3.2.4	Análisis con espectroscopía Raman	44
3.2.5	Análisis de difracción de Rayos X bidimensionales (bidimensional X-Ray diffraction, 2D-XRD).....	45
3.2.6	Análisis con microscopía electrónica de barrido/energía dispersiva de Rayos X (MEB/EDX)	46
3.2.7	Tinción tricrómica de Masson (TTM).....	47
3.3	Fase de remineralización	47
3.3.1	Diseño experimental.....	47
3.3.2	Tratamiento de la dentina.....	49
3.3.3	Análisis con espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR).....	49
3.3.4	Análisis con espectroscopía Raman	49
3.4	Análisis estadístico	50
4	Resultados.....	51
4.1	Fase desmineralización:	51
4.1.1	Análisis con espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier – Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR).....	51
4.1.2	Análisis con espectroscopía Raman	55
4.1.3	Análisis con difracción de Rayos X bidimensionales (2D-XRD)	56
4.1.4	Análisis con microscopía electrónica de barrido/energía dispersiva de Rayos X (MEB/EDX)	57
4.1.5	Análisis con tinción tricrómica de Masson (TTM)	59
4.2	Fase de remineralización	59

4.2.1	Análisis con espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier – Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR).....	59
4.2.2	Análisis con espectroscopía Raman.....	65
5	Discusión.....	67
5.1	Fase de desmineralización.....	67
5.2	Fase de remineralización	71
6	Conclusiones	78
7	Referencias	79
	Anexo I.....	93
	Anexo II.....	95

Agradecimientos

Me gustaría aprovechar este espacio para expresar mi profundo agradecimiento a todos aquellos que, de manera directa o indirecta, han hecho posible el desarrollo de esta tesis doctoral.

Agradezco a Dios, quien me ha brindado fortaleza y sabiduría para llevar a buen término esta tesis doctoral.

Al Prof. Santiago González López muchas gracias por abrirme la puerta y recibirme en su grupo de investigación, y brindarme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto.

Gracias a mis directores de tesis: a la Profa. María Victoria Bolaños Carmona y al Prof. Pedro Álvarez Lloret por su constante apoyo y acompañamiento, su confianza depositada en mí, permanente motivación; siendo ejemplo a seguir de excelencia docente. Sin duda, fueron los motores que impulsaron este trabajo. A ustedes, infinitas gracias.

A todos mis amigos y colegas de la Universidad de Granada, a Paqui y a Yudi, especialmente a Carolina, a Frank “papu” y a Hassan por su apoyo, por las risas en el laboratorio, por los desayunos compartidos, por los momentos de reflexión y por hacer de mi estancia en Granada un momento inolvidable.

Gracias a mi familia, especialmente mi primo Alexander Cardona Osorio por su confianza, porque siempre creyó en mí y en mis proyectos, siendo el desarrollo de esta tesis doctoral, producto de ello. A él, mi más profundo agradecimiento.

Esta tesis contó con el financiamiento del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) del gobierno de España, Junta de Andalucía y FEDER – Next Generation / UE. También ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (Minciencias) del gobierno de Colombia y por la Fundación para el Futuro de Colombia (Colfuturo).

Lista de abreviaturas

2D-XRD, en inglés	Difracción de Rayos x bidimensionales
3D	Tridimensional
Ace	Grupo /radical acetil
Arg	Arginina
ATR, en inglés	Reflectancia total atenuada
AVAD	Años de vida ajustados por discapacidad
CD	Curodont™ D'Senz
CpH	Ciclaje de pH
CpH 14	Ciclaje de pH a 14 días
CpH 28	Ciclaje de pH a 28 días
CR	Curodont™ Repair
DCA	Dispositivo de carga acoplado
DE	Desviación estándar
DS	Dentina sana
EDX	Energía dispersiva de Rayos X
FAP	Fluorapatito
FCA	Fosfato de calcio amorfo
FPC	Fosfopéptido de caseína
FTIR, en inglés	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
FWHM, en inglés	Anchura a media altura
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
HAP	Hidroxiapatito
IC	Índice de cristalinidad
ICCMS, en inglés	Sistema Internacional de Clasificación y Manejo de la Caries
ICDAS, en inglés	Sistema Internacional de Detección y Evaluación de Caries
IR	Infrarroja/o
KLK-4, en inglés	Peptidasa 4 relacionada con la calicreína
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MFFS	Monofluorofosfato de sodio
MMP	Matriz de metaloproteinasas
Nd:YAG, en inglés	Granate de itrio y aluminio dopado con neodimio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAE	Péptido de autoensamblaje
PBS, en inglés	Solución salina amortiguada por fosfatos

Phe	Fenilalanina
PNC	Proteínas no colágenas
ppm	Partes por millón
PR	Productos remineralizadores
pSer	Serinas fosforiladas
SLRP, En inglés	Pequeño proteoglicano rico en leucina
Trp	Triptófano
TTM	Tinción tricrómica de Masson
XRD, en inglés	Difracción de Rayos X

Lista de figuras

Figura 1. Anatomía del diente y sus tejidos de soporte	9
Figura 2. Estructura cristalina del HAp.....	11
Figura 3. Ciclo de desmineralización y remineralización de caries.....	13
Figura 4. Códigos visuales clínicos ICDAS, basados en la evidencia de la extensión histológica de las lesiones.....	14
Figura 5. Cristalización no clásica.....	16
Figura 6. Representación esquemática del efecto del F^- en la inhibición de la desmineralización.....	18
Figura 7. Aspecto de un nanocomplejo de fosfopéptidos de caseína y el fosfato de calcio amorfo.....	21
Figura 8. Representación esquemática de las etapas del proceso de autoensamblaje del péptido P_{11-4}	24
Figura 10. Representación esquemática de los componentes básicos de un espectrómetro IR.....	27
Figura 11. Modos principales de vibración.....	28
Figura 12. Representación esquemática de un cristal de ATR con cinco reflejos.....	29
Figura 13. Mecanismos de dispersión Raman	30
Figura 14. Representación esquemática de los componentes básicos de un espectrómetro Raman.....	31
Figura 15. Representación de un microscopio Raman.....	32
Figura 16. Diagrama esquemático de un difractómetro de Rayos X.....	33
Figura 17. Representación esquemática de los principales componentes de un microscopio electrónico de barrido.....	34
Figura 18. Representación esquemática del diseño experimental de la fase de desmineralización.....	41
Figura 19. Perforación del borde de una rodaja de dentina.....	42
Figura 20. Rodajas de dentina colgando dentro de un tubo de ensayo.....	41
Figura 21. Espectrómetro FTIR Jasco 6600 con accesorio ATR empleado para el análisis de las muestras.....	44
Figura 22. Espectrómetro Raman Jasco NRS-5100.....	45
Figura 23. Difractómetro de Rayos X Bruker D8 DISCOVER con detector 2D (DECTRIS PILATUS 3R 100K-A).....	46

Figura 24. Representación esquemática del diseño experimental de la fase de remineralización.....	49
Figura 25. Fase de desmineralización. Perfil de picos obtenidos por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier – Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) en la banda de absorción de carbonato.....	52
Figura 26. Fase de desmineralización. Perfil de picos obtenidos por ATR-FTIR en la banda de absorción del fosfato.....	54
Figura 27. Fase de desmineralización. Resultados de las variables de ATR-FTIR.....	55
Figura 28. Fase de desmineralización. Resultados de las variables de espectroscopía Raman.....	55
Figura 29. Fase de desmineralización. Patrones 2D-XRD y barrido 2Theta integrado.....	56
Figura 30. Fase de desmineralización. Resultados de las mediciones del tamaño del cristalito mediante la integración de patrones 2D-XRD.....	57
Figura 31. Fase de desmineralización. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB).....	58
Figura 32. Fase de desmineralización. Imágenes de la tinción tricrómica de Masson (TTM) ...	59
Figura 33. Fase de remineralización. Perfil de los picos de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier – Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) en la banda de absorción de carbonato.....	61
Figura 34. Fase de remineralización. Perfil de los picos de ATR-FTIR en la banda de absorción del fosfato.....	64
Figura 35. Fase de remineralización. Resultados de las variables de espectroscopía ATR-FTIR.....	65
Figura 36. Fase de remineralización. Resultados de las variables de espectroscopía Raman...	66

Lista de tablas

Tabla 1. Material orgánico en esmalte y dentina.....	12
Tabla 2. Composición de las soluciones empleadas para el ciclaje de pH.....	42
Tabla 3. Composición, fabricante y procedimientos de aplicación de los materiales y soluciones utilizados.....	48
Tabla 4. Fase de desmineralización. Media y desviación estándar (DE) de las áreas relativas de los picos de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier – Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) en las bandas de absorción de carbonato y fosfato.....	53
Tabla 5. Fase de desmineralización. Concentración relativa de calcio (Ca) y fósforo (P) en las superficies dentinarias expresada en % de peso para todos los grupos experimentales.....	58
Tabla 6. Fase de remineralización. Media y desviación estándar (DE) de las áreas relativas de los picos de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier – Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) en las bandas de absorción de carbonato y fosfato.....	62

Resumen

Introducción

La caries dental es una enfermedad dinámica, multifactorial y no transmisible que resulta en la pérdida mineral y la degradación del colágeno de los tejidos dentales afectados. La simulación *in vitro* de la caries natural resulta de gran importancia en la investigación odontológica para el desarrollo y optimización de tratamientos clínicos más eficaces. El método de ciclaje de pH (CpH) es un procedimiento dinámico para la simulación de caries que consta de periodos alternos de des-remineralización. Por otro lado, el desarrollo de procesos de remineralización biomimética se perfila como una vía para superar la remineralización incompleta de la dentina (extra e intrafibrilar) durante el manejo de la caries. Para ello, el fosfopéptido de caseína-fosfato de calcio amorfo (FPC-FCA) y el péptido de autoensamblaje (PAE) P₁₁₋₄ se han propuesto como alternativas biomiméticas al flúor (F⁻) para la remineralización en procesos cariosos. Esta tesis propone: *i*) evaluar la viabilidad del ciclaje de pH (CpH) en diferentes tiempos experimentales para la simulación de caries residual y *ii*) determinar el efecto en la composición química de la dentina desmineralizada de cuatro productos remineralizadores: solución de fluoruro de sodio al 0.2 % (NaF), FPC-FCA, PAE P₁₁₋₄ y PAE P₁₁₋₄ en combinación con monofluorofosfato de sodio (MFFS) sobre caries residual artificial obtenida mediante CpH.

Materiales y métodos

Para la primera fase -desmineralización-, se obtuvieron rodajas de dentina de terceros molares sanos. Estos especímenes se sometieron a periodos experimentales de CpH de 14 y 28 días. También se obtuvieron muestras de caries natural residual de molares cariados (ICDAS #5). La composición química y las propiedades microestructurales y morfológicas de las muestras de dentina se examinaron mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) y Raman, difracción de Rayos X (XRD) y microscopía electrónica de barrido/energía dispersiva de Rayos X (MEB/EDX). Además, la profundidad del frente de desmineralización se evaluó mediante la tinción tricrómica de Masson (TTM). Para la segunda fase -remineralización- también se obtuvieron rodajas de dentina de terceros molares sanos y se asignaron a seis grupos: dentina sana (DS), CpH por 28 días (CpH 28), CpH 28 + NaF, CpH 28 + GC Tooth Mousse® (FPC-FCA), CpH 28 + Curodont™ D'Senz (P₁₁₋₄ + MFFS-900 ppm F⁻) y CpH 28 +

Curodont™ Repair (P₁₁-4). Posteriormente, las muestras se sometieron a una solución remineralizadora durante 24 h con objeto de evaluar la remineralización en una fase temprana, en condiciones ideales. La composición química a nivel molecular de las muestras se analizó mediante técnicas espectroscópicas de ATR-FTIR y Raman.

Resultados

El procedimiento de CpH provocó cambios notables en la composición mineral y en las características cristalinas con respecto a la DS y, en cierta medida, similares a los identificados en la caries natural. Dentro de ellos, se observó la disolución de carbonatos inestables-lábiles, pérdida de fosfatos de la matriz orgánica y disminución de la cristalinidad. A nivel morfológico, las imágenes de MEB mostraron algunos túbulos dentinarios ocluidos y otros con apertura extensa. Los resultados obtenidos mediante TTM revelaron que el CpH 28 produce una lesión más profunda que el CpH 14, simulando la progresión potencial de la caries natural con el tiempo de experimentación. Por otro lado, los productos remineralizadores (PR) aplicados en caries residual artificial, produjeron características tales como la formación de fosfatos asociados a diferentes ambientes de cristalinidad, la deposición mineral en la matriz orgánica y la mejora de la cristalinidad del componente mineral de la dentina.

Conclusiones

El CpH es un método químico-dinámico adecuado para la simulación de caries en dentina. Los resultados experimentales de este estudio permiten comprender mejor los mecanismos de desmineralización que podrían producirse en un entorno *in vivo* y proporcionan un sustrato estandarizado similar a la caries residual natural. Los productos remineralizadores (PR) evaluados producen cambios composicionales significativos en la dentina previamente desmineralizada. Asimismo, la presente investigación permite ampliar la comprensión del comportamiento del PAE P₁₁-4 sobre la dentina, mostrando variaciones composicionales a nivel molecular similares al NaF y al FPC-FCA. El P₁₁-4 podría considerarse una alternativa adecuada para el tratamiento y la remineralización de las lesiones producidas por caries en la dentina.

1 Introducción

1.1 Diente

Los dientes son órganos que están unidos a los maxilares superior e inferior, constando de tejidos duros o mineralizados (esmalte, dentina y cemento) y blandos (pulpa) (Figura 1). La función principal de los dientes es la masticación, siendo también esenciales para mantener un habla correcta. Aunque los dientes difieren en tamaño y forma, histológicamente son similares (1). Los tipos de dientes y sus posiciones en los maxilares están determinados por lo que se llama un “patrón de la dentición” donde se ve involucrada la expresión de diferentes genes. La determinación del patrón de la corona es un proceso notablemente coherente, siendo los dientes de los mamíferos, heterodontos (de diferente forma): incisiformes, caniformes y molariformes (2). A continuación, se describirán los tejidos duros que conforman la corona del diente. Las dimensiones se refieren a la dentición permanente.

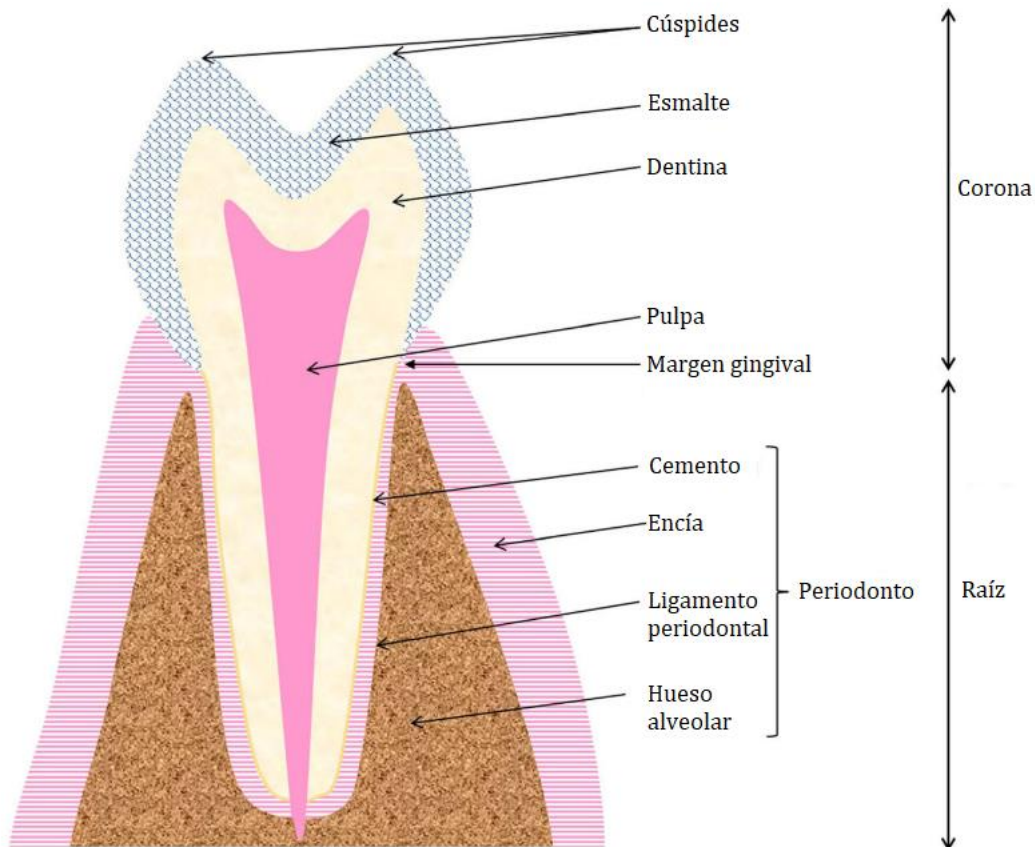


Figura 1. Anatomía del diente y sus tejidos de soporte. Tomado y modificado de de La Dure-Molla et al., (3)

- Esmalte: Es la capa más externa del diente cuyo grosor oscila entre 2.4 a 2.6 mm. Esta estructura es el tejido más mineralizado del diente, siendo también el de mayor dureza del cuerpo humano. Diariamente, el esmalte está sometido a una amplia gama de esfuerzos mecánicos como tensiones, esfuerzos, y cizallamientos derivados del contacto con los dientes adyacentes y los alimentos; así como a la exposición a los ácidos resultantes del metabolismo de las bacterias presentes en la biopelícula (1,4). El esmalte está compuesto por aproximadamente 96% de componente mineral (principalmente hidroxiapatito -HAp- carbonatado), 4% de material orgánico (proteínas y lípidos) y una pequeña cantidad de agua (Tabla 1) (1,5). La composición química del HAp corresponde a la fórmula estequiométrica $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ (6), cuya red cristalina es de simetría hexagonal conformada por tetraedros de PO_4^{3-} e iones de Ca^{2+} (7). Sin embargo, el HAp presente en los dientes está lejos de ser estequiométrico pues presenta frecuentemente sustituciones de otros iones como el F^- , CO_3^{2-} y Mg^{2+} que afectan su comportamiento, especialmente su solubilidad a pH ácidos (7,8). Las unidades fundamentales de organización en el esmalte son los prismas de HAp y la sustancia interprismática (9). Los cristales de HAp se disponen principalmente con sus ejes mayores (correspondientes a la dirección según eje *c*) paralelos a los ejes longitudinales de los prismas. Sin embargo, en la periferia de cada prisma, los cristales se desvían levemente de esta orientación, produciendo una interfase entre los prismas donde tiende a existir un mayor espacio intercristalino (10). Este espacio podría ofrecer vías de difusión dentro del tejido, una característica importante en relación con la caries y su posible desarrollo. Los cristales interprismáticos pueden existir como estructuras separadas, pero a menudo resulta difícil distinguirlos de los extremos de los prismas adyacentes (8). Toda la estructura cristalina puede entenderse como una serie de placas hexagonales de cristales de apatito apiladas unas sobre otras (11) (Figura 2). La densidad de los cristales/prismas en todo el esmalte, que determina el contenido mineral, no es uniforme. En general, esta densidad disminuye desde la superficie del tejido hacia la dentina, mientras que (presumiblemente) el fluido, la porosidad y el material orgánico aumentan en esta dirección (8).

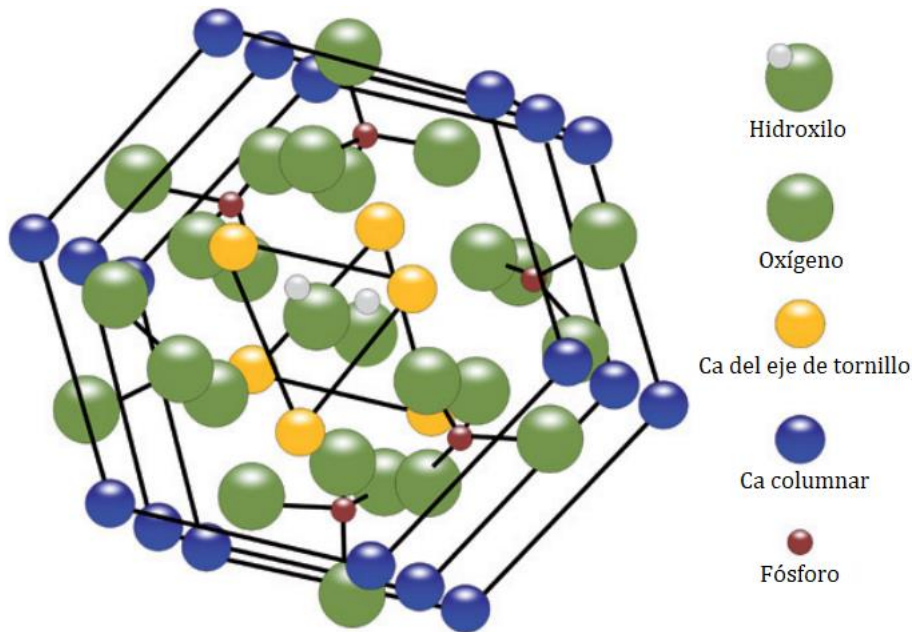


Figura 2. Estructura cristalina del HAp. Proyección hexagonal general de la disposición de los iones de calcio y fosfato alrededor de la columna central de hidroxilo a lo largo del eje c. Tomado y modificado de Kay et al., (6) Elliot (12), y Brunton et al., (13).

- Dentina: La dentina es un tejido mineralizado, elástico, blanco-amarillento, avascular que encierra la cámara pulpar. Por otra parte, la dentina, al ser un tejido más resistente que el esmalte (frágil, debido a su alto contenido mineral), brinda apoyo a este último, evitando su posible fractura a causa de las fuerzas debidas a la masticación (1). La dentina está compuesta por 70–75% mineral, 18–21% matriz orgánica y 4–12% agua (14). El componente inorgánico también está formado por HAp, mientras que el componente orgánico se compone principalmente por proteína fibrilar colágena (tipo I) junto con diversas proteínas no colágenas que actúan como moduladores durante mineralización del tejido (Tabla 1). Asimismo, la dentina contiene las prolongaciones citoplasmáticas de los odontoblastos (células implicadas en la formación de la dentina) que pueden ser estimulados por diversos procesos para depositar dentina según lo exija la ocasión (1).

La microestructura de la dentina está dominada por la presencia de túbulos dentinarios. Estos túbulos están rodeados por una región peritubular hipermineralizada (dentina peritubular), y que a su vez se haya embebida en una matriz intertubular (dentina intertubular) formada principalmente por colágeno tipo I que engloba cristales de HAp

y fluido dentinario, todo ello configurando un complejo entramado. Los túbulos se extienden desde la cámara pulpar hasta la unión amelodentinaria. Estos canales varían en número y pueden representar desde el 1% (0.8 mm de diámetro) del área total de la superficie de la dentina cerca de la unión amelodentinaria y aumentar en dirección a la pulpa hasta un 22% (2.5 mm de diámetro) (15,16).

Tabla 1. Componentes orgánicos presentes en esmalte y dentina.

Componente orgánico	Esmalte	Dentina
Principales proteínas de la matriz	Amelogenina	Colágeno tipo I, tipo III y trazas de colágeno V y VI
Otras proteínas de la matriz	No amelogeninas: Ameloblastina Enamelina	No colágenas: Sialofosfoproteína Glicoproteína Fosfoproteína
Proteoglicano	<i>En discusión</i>	SLRP
Proteinasas de la matriz	MMP-20 (enamelisina) KLK-4	Enzimas implicadas en el procesamiento del colágeno y otras necesarias para degradar la matriz

SLRP en inglés, pequeño proteoglicano rico en leucina; MMP, matriz de metaloproteinasas; KLK-4 en inglés, peptidasa 4 relacionada con la calicreína.

1.2 Caries dental

La caries dental se define como una enfermedad dinámica, no transmisible y multifactorial (factores biológicos, comportamentales, psicosociales y ambientales); mediada por la biopelícula -comunidad de microorganismos integrados en una matriz polimérica extracelular que se adhieren a la superficie del diente- y modulada por la dieta, que resulta en la pérdida mineral y degradación del colágeno de los tejidos duros del diente (17–19).

El proceso dinámico de la caries dental consiste en periodos de desmineralización y remineralización dental que se alternan rápidamente y que, si se produce una desmineralización neta durante el tiempo suficiente, dan lugar al inicio de lesiones de caries en determinados lugares anatómicos de los dientes (Figura 3). El desequilibrio entre factores protectores -aquellos que promueven la remineralización y detienen la lesión- y factores de riesgo -aquellos que modifican el balance en dirección hacia la aparición y progresión de la caries dental- influirán de manera determinante en el inicio y desarrollo de esta enfermedad (17,20).

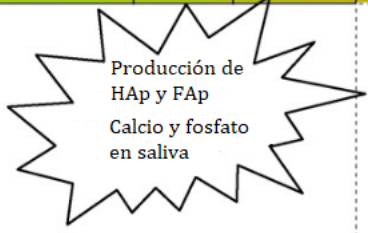
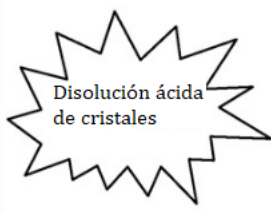
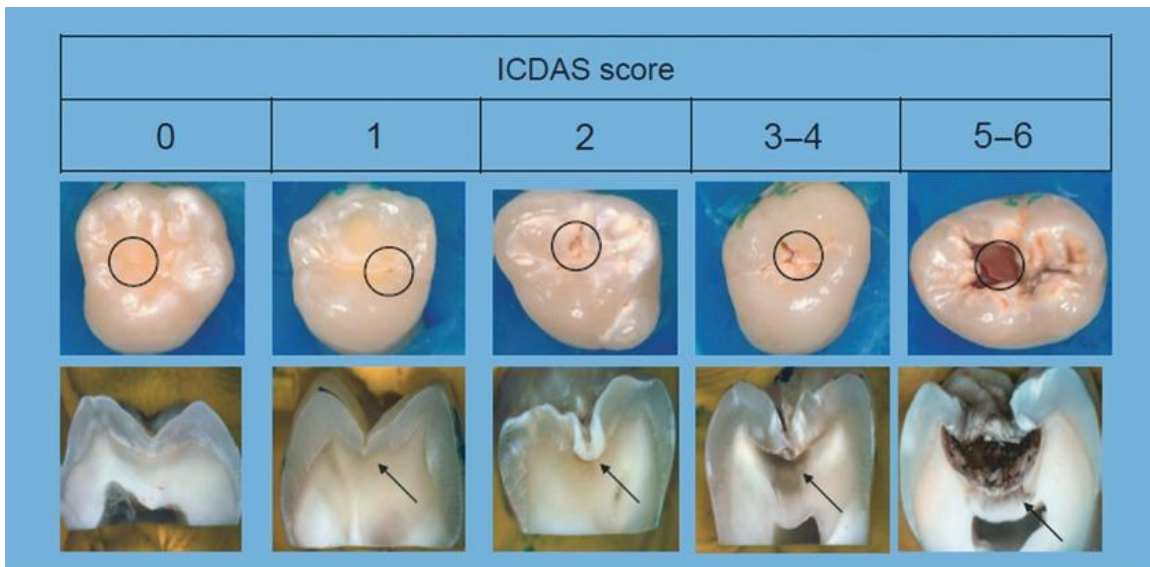
			pH crítico del HAp		pH crítico del FAp			
pH	6.8	6.0	5.5	5.0	4.5	4.0	3.5	3.0
								
8.0	6.8	6.0	5.5	5.0	4.5	4.0	3.5	3.0
Formación de cálculos		Remineralización Desmineralización		Caries			Erosión	

Figura 3. Ciclo de desmineralización y remineralización de caries. Tomado y modificado de Mount y Hume (21), y de Pretty (20).

La caries dental coronal inicia en la superficie del esmalte, afectando posteriormente a la capa subsuperficial. Bajo la observación al microscopio, la lesión producida por la caries sigue la dirección divergente hacia oclusal de los prismas del esmalte. Esta morfología durante la evolución de la caries es debida a que la desmineralización avanza a lo largo y lateralmente de los prismas del esmalte (4).

Los microorganismos presentes en la biopelícula (siendo los estreptococos del grupo *mutans* los que desempeñan un papel importante en el inicio de la desmineralización) generan compuestos ácidos (predominantemente, ácido láctico) como producto final del metabolismo de carbohidratos fermentables, principalmente azúcares (17,22,23). Estos ácidos hacen que el pH descienda hacia valores en los que la interfaz biopelícula-esmalte se subsatura y desmineraliza parcialmente la capa superficial del diente (17). La pérdida mineral incrementa la porosidad del esmalte, permitiendo que los ácidos se difundan a mayor profundidad y continúen desmineralizando la subsuperficie. Si la pérdida mineral es suficiente, aparece la lesión de mancha blanca, la cual es clínicamente importante, pues hasta esta etapa, esta lesión puede ser detenida o revertida (24). El ambiente ácido, es responsable de la desmineralización del esmalte y posteriormente, del componente inorgánico de la dentina, pero no es capaz de progresar en la matriz orgánica de esta última, ya que la degradación de colágeno es un proceso de carácter enzimático. El ácido láctico en la dentina, producido por bacterias acidogénicas es responsable de la activación de la matriz de metaloproteinasas (MMP), especialmente MMP del huésped, las cuales podrían descomponer la matriz orgánica (25).

- Diagnóstico: Aunque existen sistemas de diagnóstico novedosos que se basan en la medición de señales o respuestas físicas del proceso de caries (*e.g.*, Rayos X, luz láser, transmisión de corriente eléctrica, etc.) (20), el Sistema Internacional de Clasificación y Manejo de la Caries (en inglés, ICCMS), realiza la detección y evaluación de la caries dental a través del Sistema Internacional de Detección y Evaluación de Caries (en inglés, ICDAS). Este sistema de detección y evaluación visual y táctil clasifica las fases del proceso de caries en función de la extensión histológica y la actividad. Se ha diseñado para su uso en la práctica clínica, la educación, la investigación y la salud pública; proporcionando un lenguaje común para la estadificación de la caries que se utiliza cada vez en más países (Figura 4) (26).



ICDAS codes, based on the histological extent of lesions, stage the caries continuum
 Images provided courtesy of Dr Andrea Ferreira Zandoná, University of Indiana



Figura 4. Códigos visuales clínicos ICDAS, basados en la evidencia de la extensión histológica de las lesiones. Tomado de Pitts et al., (26).

De acuerdo al Estudio de Carga Global de la Enfermedad (27), la caries no tratada en dientes permanentes es la afección más frecuente entre todas las condiciones médicas evaluadas, con una prevalencia mundial del 35% para todas las edades combinadas, con 2.4 billones de personas afectadas; mientras que la caries no tratada en los dientes primarios ocupa el décimo lugar en cuanto a prevalencia, afectando a 621 millones de niños en todo el mundo. Un trabajo de revisión concluye que, aunque la prevalencia de caries dental ha disminuido, sigue siendo prevalente en todos los grupos etarios (28). En las últimas cuatro décadas, la prevalencia y la

gravedad de las lesiones de caries de dentina en niños de entre 5 a 12 años ha disminuido, con la prevalencia más baja entre los niños de 12 años y en personas entre los 35 a 44 años en los países de mayor renta per cápita (28). Entre los niños, la caries se asocia a repercusiones negativas en una serie de actividades de la vida diaria (29). Del mismo modo, el dolor de dientes y la caries son las afecciones más comúnmente asociadas a una peor calidad de vida relacionada con la salud bucodental en adultos (30). De hecho, la caries es la principal causa de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) en el ámbito de la salud bucodental entre las personas ≤ 35 años de edad (27).

1.3 Remineralización

La remineralización es el proceso de restauración mineral, a través de la transferencia de aniones y cationes, a sitios de nucleación donde se forman y desarrollan estructuras mineralizadas (31). La remineralización de la dentina cariada puede ocurrir de forma espontánea, mediante la incorporación de iones provenientes de la saliva sobre los cristalitos remanentes; o mediante tratamientos (fuentes externas) que incorporan dichos iones (32). El proceso de remineralización de la dentina puede ocurrir a través de dos vías (33):

- Vía clásica: Unidades primarias como iones, átomos o moléculas se agregan para formar grupos de núcleos (clústeres), cuyo crecimiento o separación está determinado por energías de la red cristalina y por fenómenos de interacción en superficie (34). Esta vía no proporciona necesariamente una interacción óptima con los componentes orgánicos de la matriz de dentina (32). Además ha demostrado ser poco efectiva debido a la falta de disponibilidad de cristalitos semilla para lograr la nucleación homogénea de cristalitos de apatito (34,35).
- Vía no clásica: consiste en la remineralización intrafibrilar del colágeno a través de análogos biomiméticos de proteínas no colágenas (PNC) que estabilizan partículas nano precursoras de fosfato de calcio amorfo (FCA) similares a líquidos (Figura 5) (34,36).

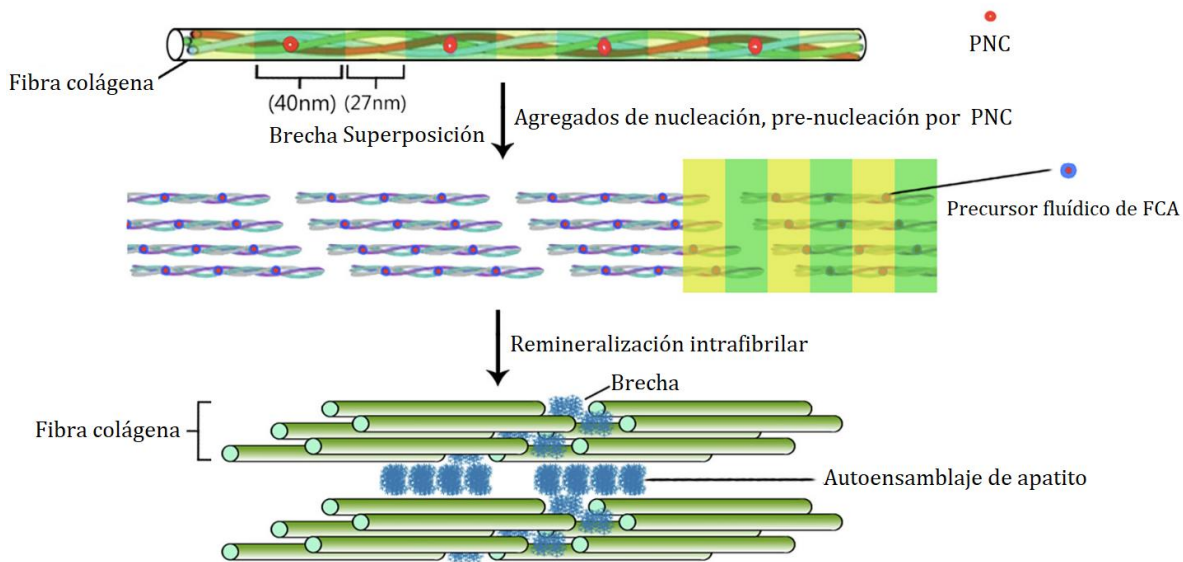


Figura 5. Cristalización no clásica. Agregados de nucleación y pre-nucleación por PNC se agregan aún más en nanopartículas de FCA similares a líquidos. Posteriormente, este último penetraría en los compartimentos de agua intrafibrilares de la matriz de colágeno y sometería a un autoensamblaje para formar una fase cristalina metaestable. Tomado y adaptado de He et al., (37).

1.4 Agentes remineralizadores

Un agente remineralizador puede definirse de forma sencilla como aquel compuesto que promueve la remineralización del tejido dental. A grandes rasgos, estos agentes proporcionan iones o moléculas (como calcio y fosfato) desde el medio exterior a la lesión de caries, promoviendo la deposición o precipitación mineral en los tejidos duros dentales desmineralizados (38).

1.4.1 Flúor

El flúor (F^-) es el más electronegativo de todos los elementos químicos y por lo tanto, raramente se encuentra en la tierra en forma elemental. Combinado químicamente en forma de fluoruros, el F^- ocupa el decimoséptimo lugar en el orden de frecuencia de aparición de los elementos, y representa alrededor del 0.06-0.09% de la corteza terrestre. Este elemento se ha utilizado comúnmente como medida de salud pública para el control de la caries, mediante la fluorización del agua, la sal y la leche (39). Existe una diversidad de compuestos de F^- usados en agentes remineralizadores que están disponibles tanto para el público como para los profesionales de la salud (especialmente, odontólogos) (40). Estos compuestos de F^- se pueden utilizar en combinación de diferentes vehículos, como lo pueden ser las pastas dentales o los enjuagues bucales que se detallaran más adelante (40,41).

1.4.1.1 Mecanismos de acción

- Inhibición de la desmineralización: El F^- presente en la placa bacteriana penetra la subsuperficie junto con los ácidos producidos por el metabolismo de las bacterias y protege los cristales de HAp de su disolución (42,43). La superficie dental que está completamente cubierta por F^- no se disuelve ante una caída de pH, ya que este tipo de recubrimiento hace que las características del cristal sean similares a las de la fluorapatito (FAp). Por el contrario, si la superficie está cubierta de forma parcial, las partes del diente sin cubrir sufrirán un proceso selectivo de disolución (Figura 6) (43,44).

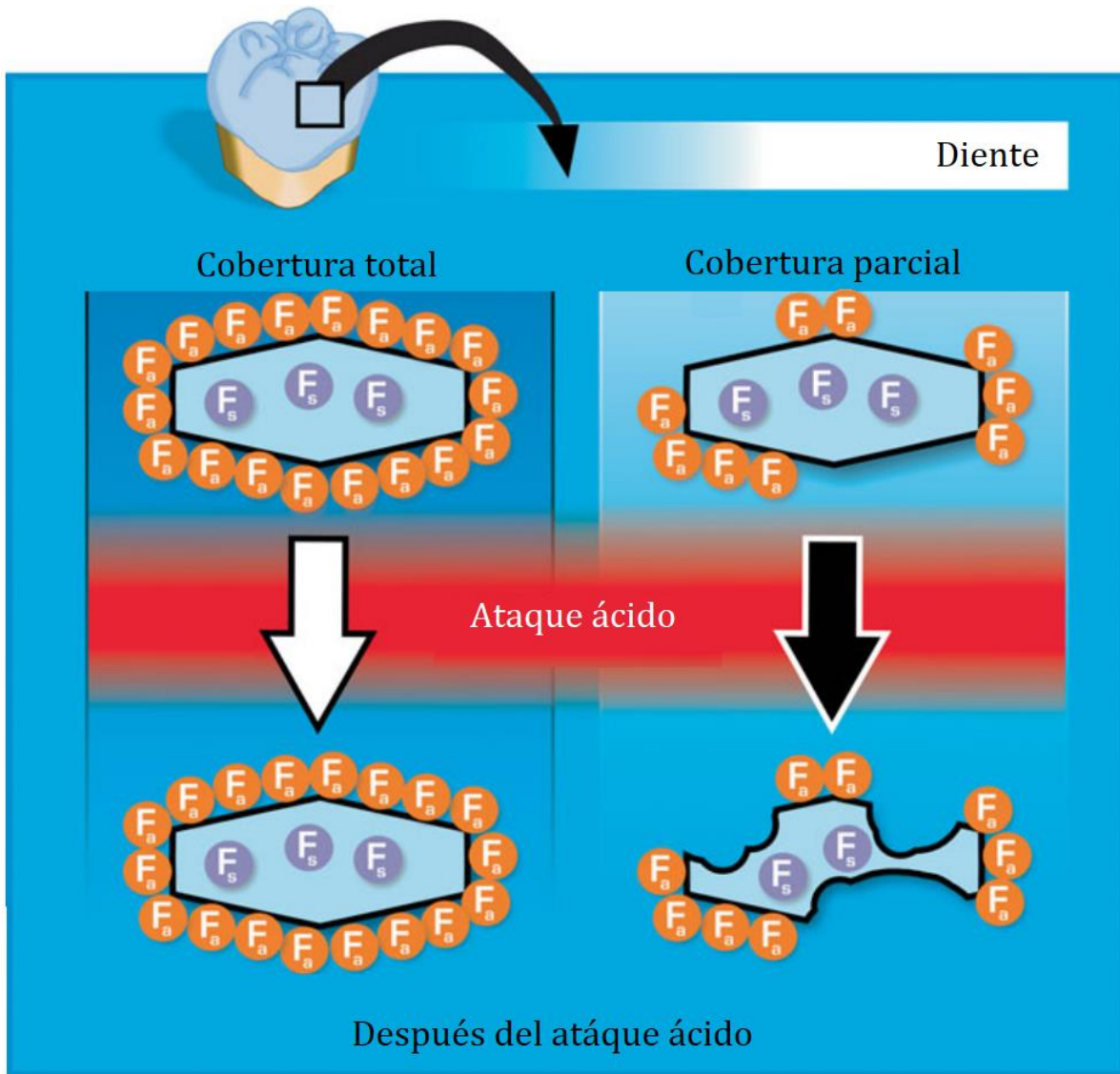


Figura 6. Representación esquemática del efecto del F- en la inhibición de la desmineralización. Cuando la cobertura es total, el F protege los cristales de la disolución. Mientras que, si la cobertura es parcial, las porciones no cubiertas del cristal se disolverán. F_a, fluoruro adsorbido en la superficie del cristal; F_s, fluoruro presente en la fase sólida, incorporado en la estructura de los cristales, también conocido como FHA. Tomado y modificado de Buzalaf et al., (43) y Arends y Christoffersen (44).

- Mejora de la remineralización: En este mecanismo las trazas de fluoruro presentes durante la disolución del HAp hacen que la solución esté altamente sobresaturada con respecto a la FHA, lo cual acelera el proceso de remineralización. Además, el fluoruro se absorbe en los cristales parcialmente desmineralizados para atraer iones de calcio. Este nuevo revestimiento hace que el tejido dental sea más resistente a futuros ataques

ácidos debido a la expulsión de carbonatos y a la incorporación de fluoruro en este reemplazamiento aniónico (42,43).

- Interferencia en el metabolismo y desarrollo de las bacterias orales: En general, existen dos maneras por las cuales el fluoruro afecta las células microbianas: 1) mediante la inhibición directa de una variedad de enzimas en células intactas, ya sea directamente o en forma de complejos metálicos a nivel submilimolar; y 2) mejorando la permeabilidad de protones de las membranas celulares al actuar en forma de HF como transportador de protones transmembrana (45,46).

El HF se forma más fácilmente en condiciones ácidas y entra en la célula siendo 10^7 veces más permeable que el F^- (45,46). Una vez en el citoplasma, el HF se disocia en iones H^+ y F^- debido a que este es más alcalino que el medio exterior (46). El F^- intracelular inhibe las enzimas glicolíticas, disminuyendo la producción de ácidos, resultado de la glicólisis (43,46). También reduce el pH, lo cual compromete el equilibrio electrolítico de la célula. Esto se debe a que al aumentar la entrada de protones a través de la membrana celular, simultáneamente aumenta la demanda de ATP para la regulación ácido-base, haciendo que la célula sufra un proceso de acidificación o estrés por inanición (46,47).

1.4.1.2 Pastas de dientes fluoradas

Las pastas de dientes fluoradas son el medio más usado para mantener un nivel bajo y constante de F^- en el entorno oral (39,48), cuya efectividad ha sido demostrada en varias revisiones y meta-análisis (39,49,50). Su amplio uso ha jugado un papel importante en la disminución de la caries dental en países desarrollados en las últimas décadas, mejorando la salud bucal de la población (39,51). Los principales componentes de las pastas con F^- actuales son el fluoruro de sodio (NaF) y el monofluorofosfato de sodio (MFFS), siendo también el fluoruro de estaño (SnF_2) y el fluoruro de aminas comúnmente usados (39,40). Aunque en 1977 la Comisión Europea sugirió que se establezca un límite superior de 1500 ppm de fluoruro en las pastas dentales que se venden sin receta, actualmente se acepta que la concentración de fluoruro de la pasta de dientes "estándar" esté entre 1000 a 1500 ppm por recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (39).

1.4.1.3 Soluciones fluoradas

Las soluciones fluoradas fueron los primeros vehículos de aplicación profesional con el propósito de reducir los niveles de caries (40,52). Dentro de estas preparaciones

encontramos soluciones neutras de NaF, así como también SnF₂ y fluoruro fosfato acidulado (compuesto por NaF, HF y H₃PO₄) entre otras (40). Los enjuagues bucales (o colutorios) que contienen F⁻ se recomiendan como parte de una estrategia preventiva para personas con alto riesgo de caries, que incluyen pacientes que se someten a tratamiento de ortodóntico o pacientes con hiposalivación. Dichos enjuagues suelen contener entre 100 a 500 ppm de F⁻ empleándose una o dos veces al día. Por otro lado, el enjuague bucal conteniendo 900 ppm F⁻ se ha utilizado tradicionalmente de forma semanal o quincenal en programas escolares en niños con alta prevalencia de caries (39,53).

1.4.2 Fosfopéptido de caseína – Fosfato de calcio amorfo

La idea del empleo de la caseína como agente remineralizador surge después de que los productos lácteos, tales como la leche y el queso, mostraran un efecto anticariogénico en modelos *in situ* en animales y humanos (54). La leche es un alimento que proporciona aminoácidos esenciales y nitrógeno orgánico como parte de la dieta tanto para animales como para humanos de todas las edades. Además de caseína, la leche contiene otros factores con propiedades anticariogénicas tales como Ca²⁺, PO₄³⁻ y lípidos. Por lo tanto, la eficacia de los alimentos lácteos en prevenir la caries dental ha sido reconocida en varios estudios (55,56). Las caseínas son fosfoproteínas predominantes en la leche bovina, que a través de digestión trípica, se obtienen fosfopéptidos de caseína (FPC) (54). Las moléculas de fosfopéptido de caseína contienen un conglomerado de dos serinas fosforiladas (pSer) y dos ácidos glutámicos (pSer-pSer-Glu-Glu) los cuales tienen la capacidad de asociarse con cristales de fosfato de calcio, estabilizándolos en forma de fosfato de calcio amorfo (Ca₃(PO₄)₂-nH₂O) bajo condiciones alcalinas y neutras (Figura 7) (57-60).

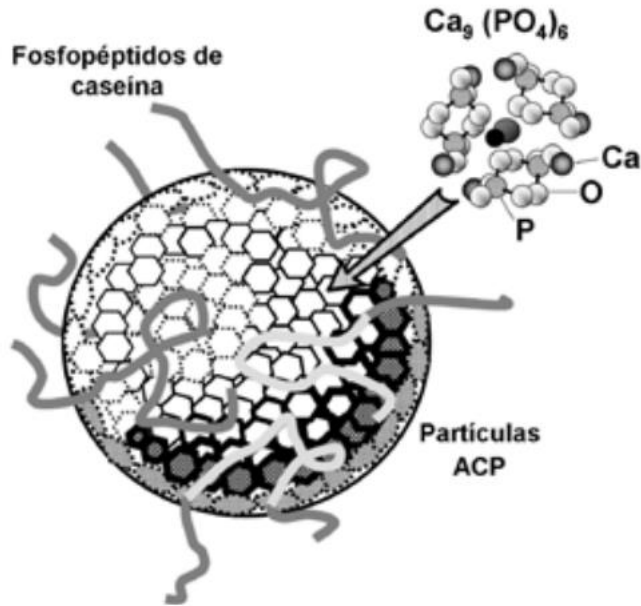


Figura 7. Aspecto de un nanocomplejo de fosfopéptidos de caseína y el fosfato de calcio amorfo. Tomado de Castellanos et al., (59)

1.4.2.1 Mecanismos de acción

- Reservorio de fosfato de calcio: El FPC se asocia al fosfato de calcio amorfo (FCA) en la superficie del diente formando nanocomplejos de FPC-FCA, incorporándose en la placa e incrementando los niveles de fosfato de calcio en este entorno. El FPC-FCA al actuar como reservorio de PO_4^{3-} y Ca^{2+} , amortigua la actividad de los iones libres de Ca^{2+} y PO_4^{3-} ayudando a mantener un estado de sobresaturación con respecto al mineral del diente (58,59,61).
- Efectos microbiológicos:
 - Inhibición de la adhesión bacteriana: Varios estudios han mostrado que mediante una saturación rápida de la superficie dental recubierta de saliva por parte de complejos de caseína, se inhibe la adherencia de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* (62–64). Además, se ha revelado que el FPC-FCA se une tanto a la placa dental (con fuerte afinidad por el *S. mutans*) como a macromoléculas absorbidas en la superficie dental (64–66). Aunque los mecanismos de anti-adhesión del FPC-FCA no están claramente dilucidados, se ha demostrado que este compite con el Ca^{2+} libre por los sitios de unión al Ca^{2+} de la placa. Este mecanismo hace que se reduzca el grado de formación de puentes de Ca^{2+} entre la biopelícula y las células que se adhieren, y entre las propias células bacterianas (64,65). Además, las moléculas de FPC tienen

regiones hidrofílicas e hidrofóbicas que impiden la adhesión inicial bacteriana a las superficies dentales recubiertas por la biopelícula. Este fenómeno se debe a que estas regiones pueden llegar a enmascarar las proteínas hidrofóbicas de la superficie celular bacteriana. Todos estos mecanismos de interferencia con la unión microbiana pueden evitar cambios ecológicos nocivos en la placa dental, inhibiendo el desarrollo de caries dental (64).

- Efectos amortiguadores: Aunque el FPC-FCA no impide la producción de ácidos bacterianos, al actuar como reservorio de péptidos e iones de PO_4^{3-} y Ca^{2+} , compensa cualquier caída de pH (57,64). Las fosfatasas y las peptidasas de la placa descomponen enzimáticamente el FPC, disminuyendo su capacidad de estabilizar iones de PO_4^{3-} y Ca^{2+} . La hidrólisis resultante de esta degradación hace que el pH de la placa aumente, lo cual resulta ser beneficioso para el equilibrio entre de-remineralización (64,67).
- Disrupción de la biopelícula: El FPC-FCA tiene la capacidad de prevenir la adhesión celular, lo cual es esencial para el desarrollo de biopelículas. Esta capacidad la logra, posiblemente, enmascarando la biopelícula y las macromoléculas de la superficie celular bacteriana. Además, el FPC-FCA, mediante la interrupción de la arquitectura estructural de la biopelícula, permitiría la difusión de iones de F^- , PO_4^{3-} y Ca^{2+} , que favorece la remineralización y haría la placa dental menos capaz de mantener un pH ácido en la superficie donde se adhieren (64).
- Efectos bacteriostáticos/bactericidas: Se sugiere que el FPC-FCA mantiene altas concentraciones de Ca^{2+} libre en la placa dental lo que puede tener efectos bacteriostáticos o bactericidas (64,65). Esto induce a la permeabilidad y a una lisis parcial en la membrana estreptocócica (64,68).
- Promoción de la remineralización: El FPC, al estabilizar el fosfato de calcio en una solución metaestable, facilita la presencia de altas concentraciones de iones de PO_4^{3-} y Ca^{2+} , incluido CaHPO_4 . También, el FPC-FCA bajo condiciones ácidas, amortigua el pH de la placa y se disocia en iones de PO_4^{3-} y Ca^{2+} , incluyendo igualmente CaHPO_4 (55,57). Estos iones, durante el proceso de remineralización, se difunden a través de los poros ocupados por proteínas y agua de las lesiones cariosas. Una vez en el cuerpo de la lesión, la actividad de los iones de PO_4^{3-} y Ca^{2+} incrementa, y a su vez, aumenta el grado de saturación con respecto al HAp. Al formarse HAp dentro de la lesión, se generan ácidos

y fosfatos, incluyendo ácido fosfórico neutral, que se difunden fuera de la lesión siguiendo un gradiente de concentración (55,57).

1.4.3 Péptidos de autoensamblaje

Los péptidos de autoensamblaje (PAEs) fueron descubiertos en 1989 en una investigación impulsada por la casualidad. Desde ese momento, los péptidos de autoensamblaje han sido objeto de diversas aplicaciones que van desde ciencia de materiales hasta medicina regenerativa (69,70).

El péptido de autoensamblaje P₁₁₋₄ está disponible comercialmente como Curodont™ Repair (Credentis AG, Dorfstrasse, Windisch, Suiza) cuya estructura química (Ace-Gln-Gln-Arg-Phe-Glu-Trp-Glu-Phe-Glu-Gln-Gln-NH₂) consta de cinco aminoácidos: arginina, triptófano, fenilalanina, glutamina y ácido glutámico (70,71). Por otro lado, el Curodont™ D'Senz (Credentis AG, Dorfstrasse, Windisch, Suiza) es otro producto basado en PAEs cuya composición difiere principalmente en la presencia de monofluorofosfato de sodio (MFFS) con el PAE en su estado autoensamblado. Siguiendo la norma ISO 10993, se han desarrollado estudios que han demostrado que el P₁₁₋₄ no es citotóxico ni desencadena respuestas inmunológicas (72,73). Además, hasta el momento, no se han reportado efectos adversos severos en estudios clínicos ni en estudios *in vitro* (72,74).

El P₁₁₋₄ es una molécula pequeña (peso molecular: 1598 g/mol; liofilizado) diseñada para que, bajo diferentes desencadenantes ambientales y condiciones fisicoquímicas específicas, cambie de un estado monomérico y se ensamble en un hidrogel fibrilar (71,75,76). Desencadenantes ambientales, tales como un pH < 7 y una variación en la fuerza iónica (71,75,77), hacen que el P₁₁₋₄ se someta espontáneamente a un autoensamblaje jerárquico formando "nanocintas" de aproximadamente un micrómetro de longitud. Posteriormente se induce un ensamblaje adicional, de modo que las nanocintas se apilen en pares para formar cintas, que a su vez pueden ensamblarse aún más para formar fibrillas, y esos pares de fibrillas se entrelazan de borde a borde para formar fibras de mayor dimensión (76,78) (Figura 8).

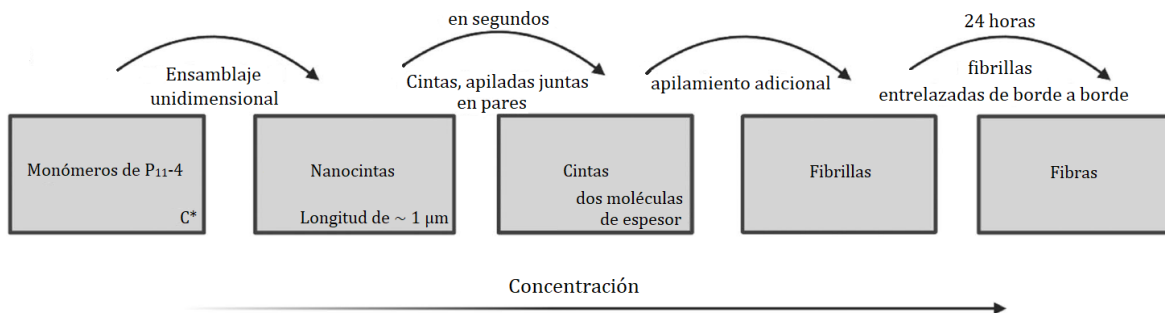


Figura 8. Representación esquemática de las etapas del proceso de autoensamblaje del péptido P_{11-4} . Cuando la concentración de monómero del péptido llega a la concentración crítica (C^*), el péptido P_{11-4} experimenta un autoensamblaje unidimensional y jerárquico. Este proceso incluye la formación de nanocintas de hoja β de un micrómetro de largo, cintas en cuestión de segundos y un ensamblaje adicional para formar fibrillas y fibras de borde a borde dentro de las siguientes 24 horas. Tomado y modificado de Bonchev et al., (79).

El péptido P_{11-4} se autoensambla como resultado de la interacción iónica entre el ácido glutámico cargado negativamente y la arginina cargada positivamente (70,80). El P_{11-4} , una vez ensamblado, presenta agregados de cargas negativas, constituidos por cuatro residuos asociados al ácido glutámico con capacidad de actuar como sitios de unión de Ca^{2+} . La distancia entre estos sitios es de 9,4 Å, que está cerca de la posición de los iones Ca^{2+} columnares en la red cristalina del HAp (76).

El mecanismo de acción del péptido P_{11-4} yace en la formación de un andamio como resultado del autoensamblaje jerárquico al difundirse por la lesión de caries (70,81). La construcción de este andamio ocurre bajo circunstancias apropiadas que caracterizan una lesión cariosa, como la presencia de cationes y un $pH < 7.4$ (70,77). El P_{11-4} forma una matriz 3D dentro de la lesión inicial de caries que mimetiza la matriz de proteínas del esmalte (Figura 9).

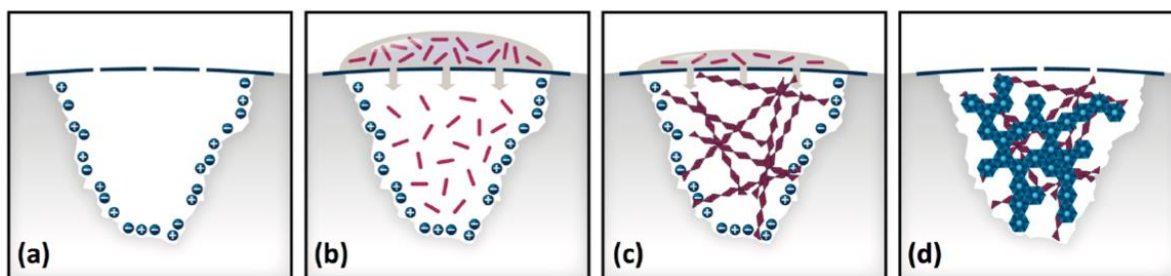


Figura 9. Representación del tratamiento de una lesión cariosa y la regeneración del esmalte con el péptido de autoensamblaje P_{11-4} . (a) Lesión cariosa. La línea discontinua representa la capa superficial mineralizada y los poros que conectan el cuerpo de la lesión con la cavidad oral; el espacio en blanco debajo refleja la lesión cariosa subsuperficial con las cargas negativas y positivas que representan los iones libres dentro de la lesión. (b) Aplicación y difusión de una gota de péptido P_{11-4} monomérico sobre la superficie de la lesión. (c) Autoensamblaje del P_{11-4} dentro de la lesión cariosa formando un andamio 3D. Esto debido a la mayor fuerza iónica y al pH ácido de la lesión cariosa. (d) Se forman cristales de HAp de novo (hexágonos azules) alrededor del andamio de péptido autoensamblado. Tomado de Alkilzy et al., (82)

Esta matriz tiene una alta afinidad por los iones de Ca^{2+} y actúa como factor nucleante para la formación de HAp *de novo* (76,81,82). Además, las fibras de P₁₁₋₄ se unen a los iones de Ca^{2+} ya existentes de la red de HAp del esmalte dental, permitiendo la unión estable del nuevo esmalte regenerado al tejido duro o mineralizado del diente (13,73).

Numerosos estudios, tanto clínicos como *in vitro*, han demostrado la eficacia del péptido P₁₁₋₄ en el esmalte dental. Por ejemplo, un estudio *ex vivo* concluyó que lesiones erosivas en esmalte bovino creadas artificialmente, pueden ser remineralizadas con P₁₁₋₄, siendo evaluadas mediante mediciones con pulsos de velocidad ultrasónica y microscopía electrónica de barrido (MEB) (83). También, en esmalte bovino, el P₁₁₋₄ redujo la fluorescencia y el área de lesiones de mancha blanca artificiales en diferentes puntos de tiempo, siendo cuantificadas con QLF-D Biluminator™ (84).

Con respecto a los estudios *in vivo*, el ensayo de eficacia y seguridad no controlado de Brunton et al., (13) examinó por primera vez la seguridad y efectos clínicos del P₁₁₋₄ en la detención de lesiones cariosas en 19 superficies vestibulares en adultos (lesiones de mancha blanca clase V). Este estudio reportó 11 eventos adversos de los cuales dos pudieron estar relacionados con la aplicación del péptido (uno fue hipersensibilidad dental; el otro, sensibilidad a un enjuague bucal). Los resultados mostraron una mejoría significativa de las lesiones a juzgar por el color, el tamaño y la progresión de la lesión, lo que permitió el posterior desarrollo de más estudios clínicos. También se ha demostrado la regresión de lesiones interproximales a través de evaluación radiográfica clínica, lo cual ha sido considerado imposible de lograr incluso para agentes remineralizadores como el F⁻ (85). El P₁₁₋₄ además de ser aplicado como tratamiento mínimamente o no invasivo para caries interproximales, su eficacia se extiende al manejo de caries oclusales y bucales, además de prevenir y tratar lesiones de caries inducidas por el tratamiento ortodóntico (70).

1.5 Técnicas analíticas

A continuación, se detalla el fundamento teórico y manejo instrumental de las técnicas analíticas empleadas para la caracterización de la composición química, morfología y propiedades estructurales de las muestras de dentina analizadas en esta tesis doctoral.

1.5.1 Espectroscopía vibracional

La espectroscopía se define como el estudio de la interacción de la luz con la materia (86). Para determinar la composición química de los tejidos dentales se emplean comúnmente técnicas espectroscópicas vibracionales como la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

(FTIR, por sus siglas en inglés) y la espectroscopía Raman. Ambas técnicas involucran el estudio de la interacción de radiación con vibraciones moleculares, aunque difieren en la manera en la cual la energía es transferida a la molécula mediante el cambio de su estado vibracional (87).

1.5.1.1 Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (Fourier transform infrared, FTIR)

La FTIR es una técnica espectroscópica vibracional que ha sido ampliamente empleada para caracterizar la composición molecular de materiales. En el campo de la odontología sus aplicaciones abarcan en gran parte, la caracterización de tejidos mineralizados como el esmalte, la dentina y el hueso cuyos parámetros más comúnmente evaluados son: la proporción mineral con respecto a la matriz orgánica, la proporción carbonato a fosfato, la cristalinidad/madurez mineral y el grado de entrecruzamiento de los enlaces cruzados de colágeno (88).

La espectroscopía FTIR está basada en el fenómeno de interferencia entre dos haces para producir un interferograma. Este último consiste en una señal producida como una función del cambio de longitud de trayectoria entre dos haces (89). Un instrumento FTIR básico funciona según el principio de transmisión, pero difiere de los instrumentos dispersivos en la forma en que se registra el espectro de la muestra. La parte central de un espectrómetro FTIR está formada por un interferómetro que consta de una fuente de emisión infrarroja (IR), un divisor de haz, dos espejos y un detector de señal. La radiación IR proveniente de la fuente incide en el divisor de haz y se dirige en parte hacia los dos espejos de reflexión. Uno de ellos está fijo mientras que el otro espejo se mueve a una velocidad constante durante la adquisición del espectro-señal. Los rayos IR son reflejados por los espejos y recombinados en el haz divisor. Luego, estos haces pasan a través de la muestra y llegan al detector que registra todas las longitudes de onda en el IR al mismo tiempo. Cuando los dos haces reflejados por los espejos se recombinan, han recorrido diferentes distancias y por lo tanto la recombinación conduce a la interferencia constructiva y destructiva. El patrón resultante se denomina interferograma. La transformada de Fourier del espectro IR de la muestra, es lo que registra el detector después de que el haz recombinado ha pasado a través de la muestra. Los datos registrados por el instrumento se procesan por una computadora que realiza una transformada de Fourier adicional para convertir de nuevo el interferograma en un espectro IR (86,90). Los componentes básicos de un espectrómetro IR se muestran en la Figura 10.

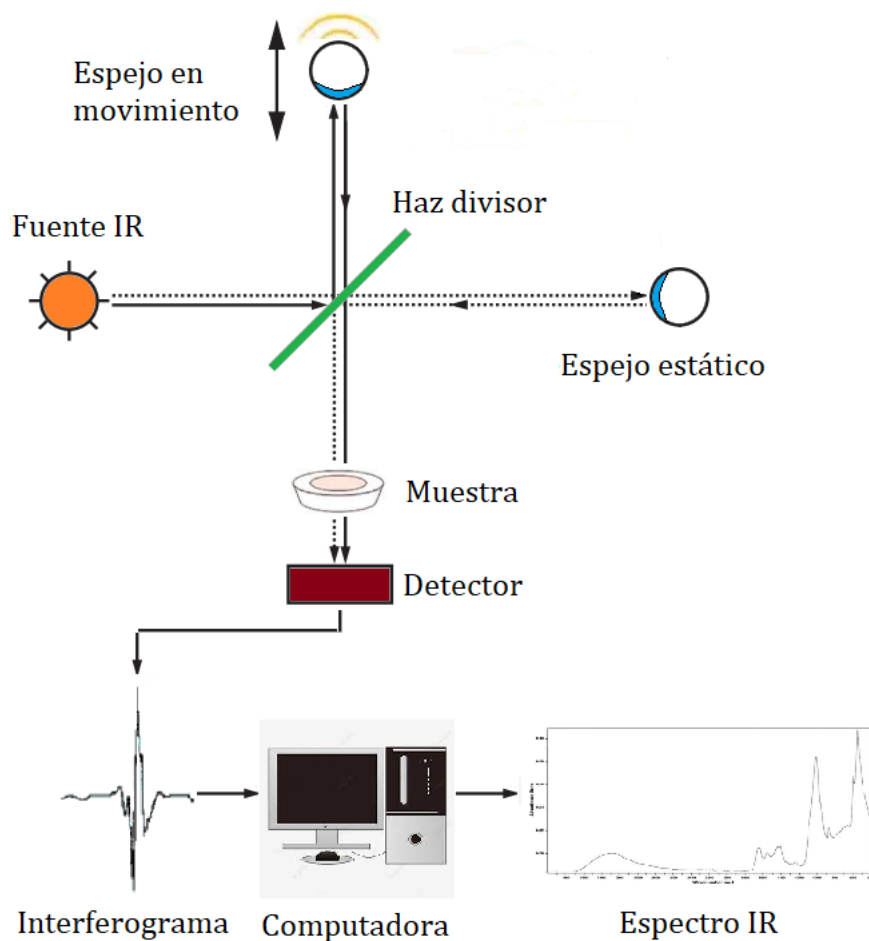
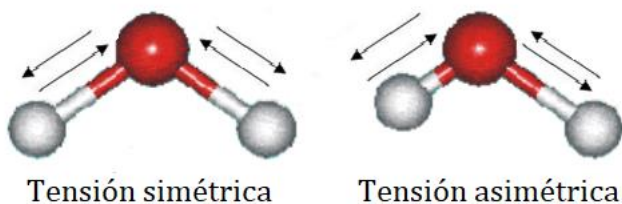


Figura 10. Representación esquemática de los componentes básicos de un espectrómetro IR. Tomado y modificado de Blum y John (90)

La mayoría de los componentes orgánicos e inorgánicos son activos para la radiación IR ya que tienen momentos dipolares (88,91). Debido a que la mayoría de moléculas exhiben absorción en la mitad de la región IR entre 4000 y 400 cm^{-1} , esta es la región espectral más observada (90). Cuando una molécula es irradiada por luz IR, absorbe cierta cantidad de radiación incidente a una frecuencia / energía específica y sufre una excitación vibracional desde el estado fundamental a un estado de energía vibracional más alto (92). Las moléculas tienen diferentes modos vibracionales, dentro de los cuales se encuentran las vibraciones de tensión (simétrica y asimétrica) que constan de un cambio en la longitud del enlace entre los átomos; y las vibraciones de flexión, donde cambian los ángulos de enlace. Estas vibraciones de flexión vienen en modo de tijera, balanceo, cabeceo y torsión (90). El modo tijera es un cambio en el ángulo entre un grupo de átomos y el resto de la molécula cuando los átomos se doblan en direcciones opuestas, mientras que en el balanceo (similar al modo tijera) los átomos se doblan en la misma dirección. El cabeceo y la torsión son conocidos como vibraciones fuera del plano.

En el cabeceo hay un cambio en el ángulo entre el plano de un grupo de átomos y el plano del resto de la molécula, mientras que en la torsión hay un cambio en el ángulo entre los planos de dos átomos o dos grupos de átomos dentro de la molécula (Figura 11) (87). La longitud de onda de cada pico de absorbancia IR es determinada por las propiedades físicoquímicas de la molécula correspondiente. Por lo tanto, se diagnostican como una huella dactilar de ese grupo funcional en particular (88,93).

a) Vibración de tensión



b) Vibración de flexión

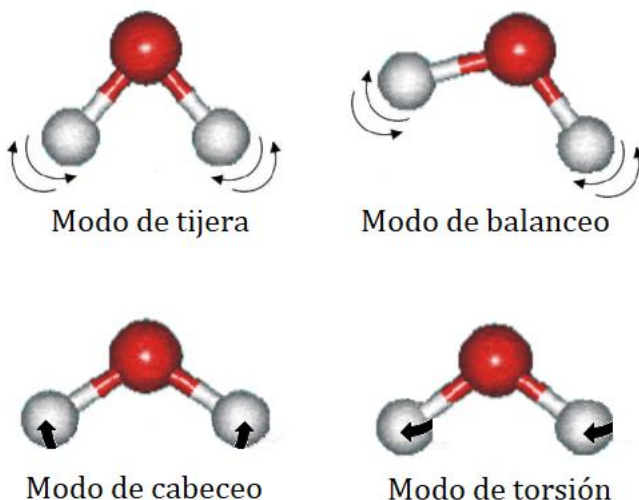


Figura 11. Modos principales de vibración. a) Vibraciones de tensión: simétrica y asimétrica. b) Vibraciones de flexión: tijera, balanceo, cabeceo y torsión. Tomado y modificado de Liceo UGB (94).

- Reflectancia total atenuada (Attenuated total reflectance, ATR)

Los espectros de FTIR se pueden adquirir por medio de diferentes técnicas: transmisión, reflectancia especular, reflectancia difusa, fotoacústica y a través de reflectancia total atenuada (ATR, en sus siglas en inglés) (88,95). De las técnicas anteriormente nombradas, las dos principales son la transmisión y la reflectancia. La reflectancia se usa ampliamente para adquirir espectros de forma no destructiva, sin necesidad o con una mínima preparación de la

muestra (92). Particularmente, la ATR utiliza el fenómeno de reflectancia interna en la cual el haz IR pasa a través de un elemento de reflexión interna que posee un alto índice refractivo y con baja solubilidad en agua, como lo puede ser un cristal de seleniuro de zinc, germanio o yoduro de talio (89,92). En la interfaz muestra-elemento ocurre una reflexión interna completa, donde la onda se extiende más allá de la superficie del cristal y penetra una pequeña distancia (0.5 – 2 μm) en la muestra, en la forma de una onda evanescente, antes de regresar al cristal (88,92). Esta onda evanescente se atenuará debido a la absorción IR de la muestra (92). Después de uno o más reflejos en el cristal, el haz IR abandona el cristal y la radiación atenuada resultante llega al detector para ser medida y graficada para, posteriormente, generar un espectro FTIR, tal y como se representa en la Figura 12 (89,90,92). Debido a la poca profundidad de penetración, se hace necesario una pequeña presión de contacto en las muestras que no se adhieren por sí mismas al cristal de ATR para obtener un espectro de calidad (88).

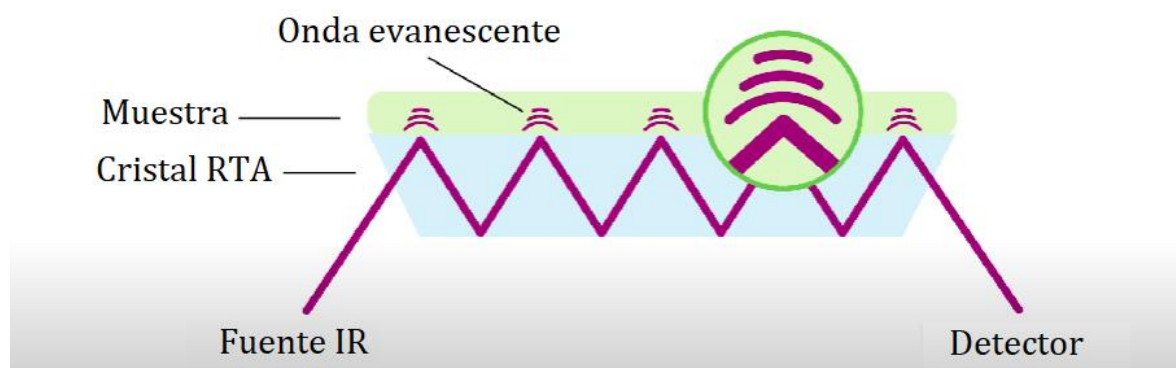


Figura 12. Representación esquemática de un cristal de ATR con cinco reflejos. Tomado y modificado de METTLER TOLEDO AutoChem (96).

1.5.1.2 Espectroscopía Raman

El uso de la espectroscopía Raman para aplicaciones biomédicas, incluyendo la odontología, se ha visto incrementado significativamente debido a los avances en la instrumentación y al desarrollo de sondas de fibra óptica. Sus aplicaciones se expanden a biomateriales, química estructural y análisis superficial (97,98). También, entre sus aplicaciones analíticas se incluyen el estudio de patologías de los tejidos duros dentales, la identificación de la microflora oral y el estudio de tejidos blandos orales (98).

La dispersión Raman fue descubierta por el físico Sir Chandrasekhra Venkata Raman en 1928, quien usó la luz solar como fuente, un telescopio como colector, y su propia visión como

detector. Gradualmente, tuvieron lugar mejoras en los diversos componentes de la instrumentación Raman hasta hoy en día (99).

Su principio básico consiste en que una luz monocromática irradia una molécula y resultan dos tipos de dispersión de luz: elástica e inelástica. En la dispersión elástica no se produce ningún cambio en la frecuencia de los fotones o ningún cambio en su longitud de onda y energía. Por el contrario, en la dispersión inelástica, hay cambios en la frecuencia del fotón debido a la excitación o desactivación de las vibraciones moleculares en las que el fotón puede perder cierta cantidad de energía o ganarla (100,101). Como se resultado, puede ocurrir cualquiera de los fenómenos representados en la Figura 13 (102,103):

-Dispersión Rayleigh: Cuando el mayor componente de la luz dispersada por el medio de prueba proviene de la misma frecuencia que el haz de la luz incidente, dependiendo del tipo de láser empleado ($E = E_0$).

-Dispersión Raman anti-Stokes: Cuando la luz dispersada saliente puede ser de una frecuencia más alta que la luz incidente ($E = E_0 + E_v$).

-Dispersión Raman Stokes: Cuando la luz dispersada saliente puede ser de una frecuencia más baja que la luz incidente ($E = E_0 - E_v$).

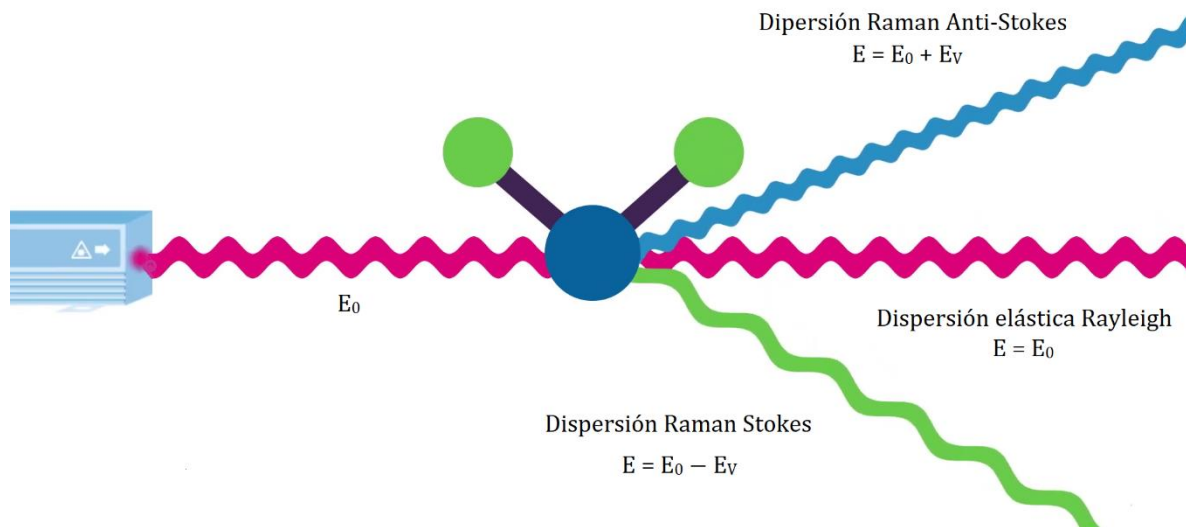


Figura 13. Mecanismos de dispersión Raman. E_0 : energía del fotón incidente; E : energía del fotón dispersada; E_v : energía vibracional. Tomado y modificado de METTLER TOLEDO AutoChem (104).

Debido a que las bandas Stokes tienen una intensidad más alta que las bandas anti-Stokes, generalmente la parte Stokes es considerada para la medida en la espectroscopía Raman, la cual se presenta en el rango de 0 a 4000 cm^{-1} (desplazamiento Raman) (102,103).

Un espectrómetro Raman consiste de una fuente láser que genera una corriente de fotones. Existen varios tipos de láser que pueden usarse como fuente de excitación: estos incluyen ion argón (488.0 y 514.5 nm), ion criptón (530.9 y 647.1 nm), He:Ne (632.8 nm), Nd:YAG (1064 nm y 532 nm) y láser de diodo (630 y 785 nm). La luz producida por el láser es dirigida a través de un divisor de haz y enfocada a través de una lente en la muestra. Este mecanismo lleva a la dispersión de la luz, que generalmente se recolecta utilizando la misma óptica y se dirige al espectrómetro. Los fotones dispersados elásticamente son separados por filtros antes de ingresar al espectrómetro. Después, los fotones dispersados inelásticamente (fotones Raman) se seleccionan mediante rejillas del espectrómetro de acuerdo a sus energías y son capturados por el dispositivo de carga acoplado (DCA) (105). La Figura 14 muestra un diagrama de un espectrómetro Raman.

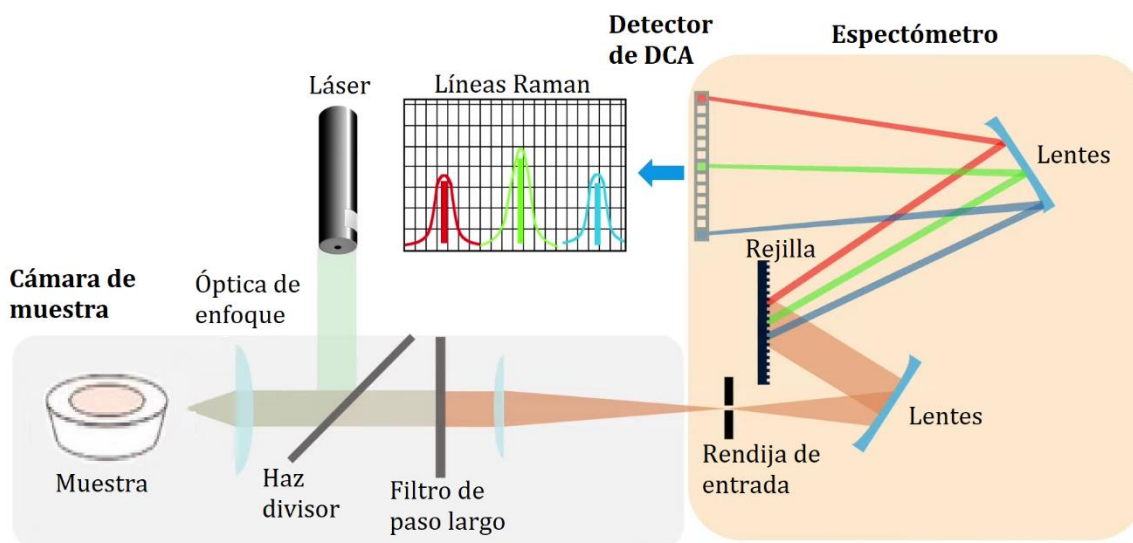


Figura 14. Representación esquemática de los componentes básicos de un espectrómetro Raman. Tomado y modificado de Bruker Corporation (106).

La microscopía Raman o confocal es una técnica no destructiva que requiere mínima o ninguna preparación de la muestra. La microscopía Raman consta de un instrumento Raman convencional, además de una óptica para enfocar la muestra (microscopio) y dispositivo para mover la muestra hacia el rayo láser (plataforma XYZ motorizada), tal y como se representa en la Figura 15 (107).

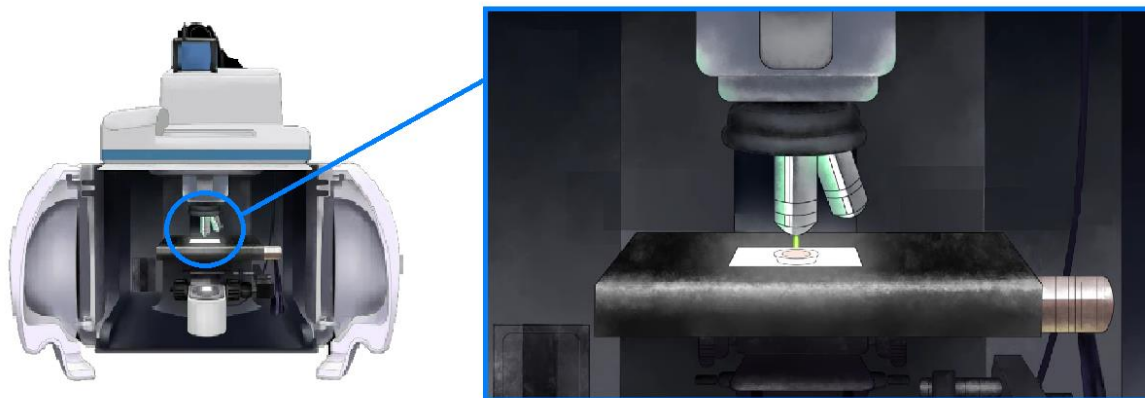


Figura 15. Representación de un microscopio Raman. Tomado y modificado de Aaron Celestian (108).

1.5.2 Difracción de Rayos X (X-Ray diffraction, XRD)

La XRD es una técnica analítica comúnmente empleada para el estudio de propiedades estructurales y características cristalinas de un amplio rango de materiales, dentro de ellos metales, minerales, plásticos, cerámicas, etc. (109). Además, esta técnica ha sido usada para investigar la composición cualitativa y cuantitativa de fases cristalinas y amorfas, el tamaño de cristalitas (dominios cristalinos) de las fases, así como el grado de cristalinidad de materiales biocompuestos (110,111) y de tejidos dentales (112).

Los difractómetros de Rayos X constan fundamentalmente de tres elementos básicos: un tubo de Rayos X, un porta muestras y un detector de Rayos X (Figura 16) (109,113). La XRD se basa en la interferencia constructiva de un haz de Rayos X monocromático y una muestra cristalina. La radiación emitida por el tubo de Rayos X presenta un espectro que consta de diferentes longitudes de onda siendo las más comunes K_{α} (compuesta de $K_{\alpha 1}$ y $K_{\alpha 2}$) y K_{β} . Estas longitudes de onda específicas son características del material empleado en la generación del haz para la difracción (*e.g.*, Cu K_{α} =1.5418 Å). El filtrado del haz mediante láminas o monocromadores es fundamental para producir los Rayos X monocromáticos para la selección en una determinada longitud de onda. Posteriormente, a la salida de la óptica primaria, estos Rayos X se coliman y se dirigen hacia la muestra situada en el porta muestras.

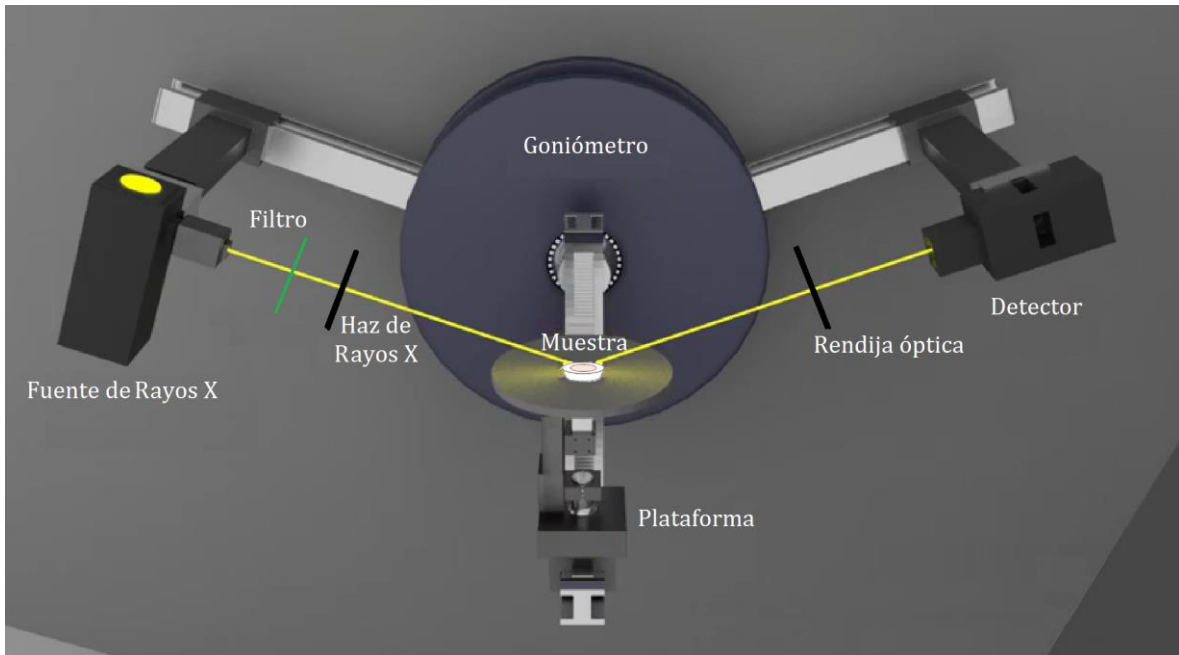


Figura 16. Diagrama esquemático de un difractor de Rayos X. Tomado y modificado de piofile (114).

A medida que giran la fuente y el detector (barrido angular a través de goniómetros), se registra la intensidad de los Rayos X reflejados por la muestra. De esta manera, un detector registra y procesa esta señal de Rayos X y la convierte en una tasa de conteo, que posteriormente se procesa y visualiza en la computadora. En el fenómeno de la difracción se produce una interferencia constructiva en el que la geometría de los Rayos X que inciden sobre la muestra satisfacen la ley de Bragg, definida como (109):

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

donde n es un número entero, λ es la longitud de onda de los Rayos X incidentes, d es el espacio interplanar atómico que genera la difracción y θ es el ángulo de difracción, registrado durante el barrido (109). Esta ley se puede utilizar para determinar e interpretar el tipo y parámetros de la red cristalina de un determinado material (111).

1.5.3 Microscopía electrónica de barrido/energía dispersiva de Rayos X (MEB/EDX)

Esta técnica constituye una herramienta avanzada que ha sido usada para observar las superficies de especímenes desde el desarrollo del primer prototipo en 1935 y que ha logrado un progreso notable desde el inicio de su comercialización instrumental en 1965 (115). La combinación de alto aumento o magnificaciones durante la observación, mayor profundidad de enfoque, mayor resolución y facilidad de observación de la muestra, hace que la MEB sea uno

de los instrumentos más utilizados y de mayor versatilidad en la investigación actual. La MEB proporciona magnificaciones que pueden llegar a alcanzar hasta 300000X y una resolución espacial de menos de 2 nm (116). Los principales componentes del MEB se muestran en la Figura 17.

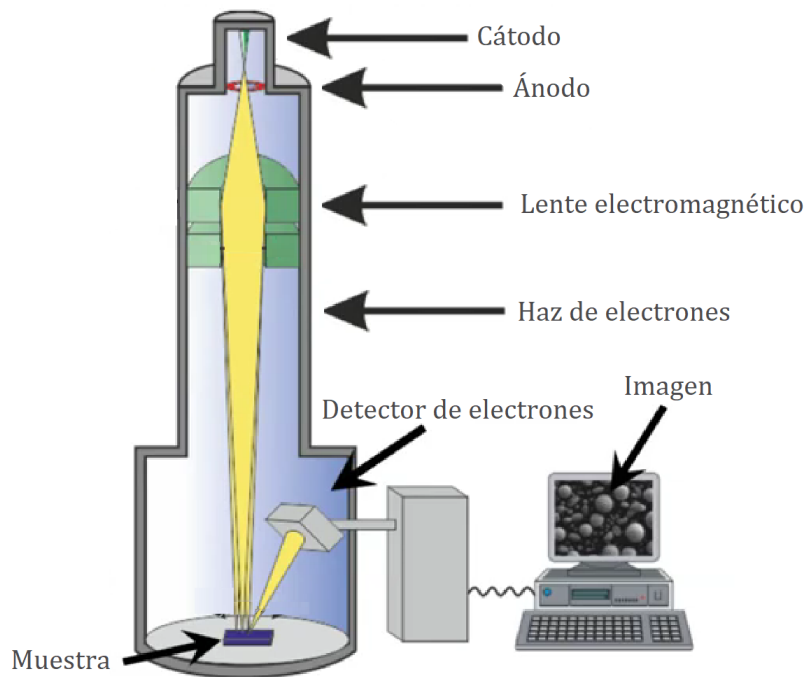


Figura 17. Representación esquemática de los principales componentes de un microscopio electrónico de barrido. Tomado y modificado de Rolf Grieseler (117).

En esta técnica, un haz de electrones se produce en la fuente de emisión a partir de la excitación de un filamento metálico (cátodo) y que es atraído por la diferencia de potencial generada por el ánodo. El haz de electrones viaja por una columna de vacío a través de campos y lentes electromagnéticas, las cuales enfocan el haz hacia la muestra. Posteriormente, un mecanismo de bobinas deflectoras permite guiar o dirigir el haz para escanear la superficie de la muestra siguiendo un patrón de trama o barrido. Cuando el haz incidente entra en contacto con la superficie de la muestra se produce diferentes tipos de señal, que pueden provenir de electrones secundarios, electrones Auger, electrones retrodispersados, Rayos X característicos y catodoluminiscencia. Una vez que estas señales emitidas por la muestra son captadas por los distintos detectores, son convertidas en imágenes digitales o mostradas como espectro de emisión proporcionando diversa información analítica (118). En particular, destacamos las características de la emisión de:

- Electrones secundarios: Son electrones de baja energía empleados principalmente para revelar las características topográficas de un espécimen. Estas imágenes tienen un poder de resolución de <10 nm (118).
- La espectroscopía de energía de Rayos X (EDX) es un método de análisis de superficie que proporciona un análisis químico semicuantitativo de la muestra. El principio de este método yace en la radiación de las muestras con electrones de alta energía y en la observación de los Rayos X emitidos como resultado de la desexcitación de los huecos electrónicos del núcleo (111). Un detector mide y cuenta los Rayos X emitidos los cuales son diferentes de un elemento a otro considerando que cada elemento tiene una estructura atómica única (115,119). En los espectros obtenidos puede existir alguna superposición de picos de diferentes elementos, pero otros picos o un conocimiento de la naturaleza de la muestra permiten la detección complementaria de elementos, al menos teóricamente (111).

1.5.4 Tinción tricrómica de Masson (TTM)

El nombre "tricrómico" designa a las técnicas de tinción en las que se utilizan dos o más colorantes aniónicos junto con un heteropoliácido: ácido fosfomolibdico o fosfotúngstico. Estos ácidos son compuestos solubles en agua y alcohol que pueden incluirse en las soluciones colorantes o aplicarse a las secciones secuencialmente. Considerando la técnica empleada, el resultado es una coloración selectiva del colágeno por uno de los colorantes utilizados. El cartílago y algunas secreciones mucosas adquieren el mismo color que el colágeno, pero su intensidad de tinción suele ser menor. Las técnicas tricrómicas revelan fibras colágenas y reticulares, membranas basales y gránulos secretores, normalmente con un color más intenso y mayor claridad (120).

La TTM se trata del procedimiento de tinción más sencillo, ya que sólo se utiliza dos colorantes aniónicos, tras teñir los núcleos con hematoxilina de hierro. Existen muchas variantes de este método, que utilizan diferentes colorantes o una solución de heteropoliácido diferente. Los resultados obtenidos son: núcleos negros; citoplasma en tonos rosa, rojo y marrón; eritrocitos, queratina y mielina de color escarlata; fibras de colágeno de color verde azulado fuerte; y el moco y cartílago de color verde más claro (120).

2 Justificación, hipótesis y objetivos

2.1 Justificación

En la actualidad existen diversos protocolos para la inducción de caries artificial en la investigación cariológica *in vitro*. Estos protocolos comprenden modelos estáticos que usan soluciones/geles ácidos (*e.g.*, ácido láctico o acético), modelos microbiológicos (empleando bacterias relacionadas con el proceso de caries, como *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* spp.) y otros modelos dinámicos, como el ciclaje de pH (CpH) (4). Todos estos procedimientos intentan simular las transformaciones, tanto de tipo inorgánico como orgánico, que ocurren durante el proceso natural en el desarrollo de caries. En particular, el CpH consiste en alternar períodos de desmineralización y remineralización, simulando el mecanismo de pérdida y restauración mineral que tiene lugar durante el proceso de caries en la cavidad oral (4).

La simulación de caries resulta de gran importancia para la investigación de diferentes problemas clínicos odontológicos (*e.g.*, aplicación de adhesivos, empleo de materiales biocompatibles, etc.) ya que la composición y estructura de la caries de la dentina pueden influir en las propiedades mecánicas de los dientes (121,122) así como en el comportamiento de los sistemas adhesivos (123,124).

La caries residual es aquella que queda bajo las restauraciones después de la eliminación selectiva (incompleta) de la caries con el objeto de reducir el riesgo de exposición pulpar y otros síntomas pulpares postoperatorios (125). Estudios previos han propuesto evaluar la inducción de dentina artificial afectada por caries mediante el uso de CpH (126,127). Sin embargo, hasta la fecha, únicamente una investigación de Schwendicke et al., (128) ha evaluado la idoneidad de la inducción de caries residual mediante este protocolo comparando diferentes modelos estáticos y microbiológicos mediante análisis microrradiográficos y nanodureza. En este contexto, resulta necesario evaluar con precisión las alteraciones fisicoquímicas que ocurren en la dentina durante el proceso de desmineralización mediante el procedimiento de CpH considerando diferentes tiempos de ciclaje.

Por otro lado, se han desarrollado varios productos para promover la remineralización de la dentina y el manejo de la caries. Entre ellos, el uso del flúor (F^-) [*e.g.*, NaF y monofluorofosfato de sodio (MFFS)] sigue siendo la terapia estándar para la remineralización de las lesiones cariosas. No obstante, se necesitan concentraciones elevadas de F^- en los fluoruros tópicos (*e.g.*, soluciones, pastas dentales, geles, etc.) para proporcionar un efecto protector y anticaries local

sobre las estructuras dentales mineralizadas (40). Aunque el uso del F⁻ ha demostrado ser altamente efectivo en la prevención de la caries (82,129) y en la disminución global de los índices de caries (39,51,82), recientemente se ha considerado que este elemento puede llegar a presentar toxicidad, generando preocupación entre el público en general con respecto al uso de productos con altas concentraciones de este compuesto (130,131). Por otra parte, la ingestión inadvertida de fluoruros tópicos en niños aumenta el riesgo de fluorosis. Aunque las formas leves de fluorosis dental no representan un problema de salud pública, los casos más severos constituyen un problema estético, especialmente cuando los dientes anteriores superiores están involucrados (132,133). Por lo tanto, es importante lograr un equilibrio adecuado entre los efectos beneficiosos y perjudiciales de las terapias con fluoruro tópico (132,133). Además, el mecanismo de acción del F⁻ se basa en el concepto clásico de cristalización basada en iones, el cual puede no ser aplicable para remineralizar completamente la dentina desmineralizada, haciendo que la mineralización o regeneración mineral dentro de la lesión sea difícil de lograr.

Esta circunstancia ha llevado al desarrollo de nuevas tecnologías de remineralización diseñadas con concentraciones bajas o libres de F⁻ y con la capacidad de complementar su acción mediante otras vías. Esto a su vez ha hecho que el concepto de remineralización biomimética se plantee como un enfoque diferente y novedoso, desarrollándose materiales más activos y acoplados al colágeno de la dentina desmineralizada mediante nanoprecusores de fosfato de calcio amorfo (FCA) estabilizados por análogos biomiméticos de proteínas no colágenas (PNC) (34,36). Dentro de estas alternativas remineralizadoras se encuentra el compuesto fosfopéptido de caseína-fosfato de calcio amorfo (FPC-FCA), el cual ha demostrado ser eficaz en la prevención de la desmineralización y en la mejora de la remineralización de las lesiones del esmalte y la dentina (75,134,135).

Recientemente, también ha llamado la atención otra alternativa remineralizadora para el abordaje clínico de lesiones iniciales de caries: el uso de péptidos de autoensamblaje (PAEs). Los PAEs son una terapia prometedora para la regeneración del esmalte, respaldada por estudios *ex vivo* (81,84) y clínicos (13,74). Hasta la fecha, los PAEs también han demostrado mejorar las propiedades mecánicas en dentina desmineralizada artificialmente, lo que conduce a un aumento de la fuerza de adhesión de ciertos adhesivos (75,136,137). Entre estos compuestos, el P₁₁₋₄ puede formar una matriz 3D en la subsuperficie de la lesión inicial de caries, mimetizar las proteínas de la matriz del esmalte y captar iones de Ca²⁺ para formar hidroxiapatito (HAp) *de novo* (76,81,82). Asimismo, el péptido P₁₁₋₄ también ha mostrado

incrementar la resistencia de las fibras colágenas, compensando la actividad de degradación de la colagenasa en procesos de caries (138). Sin embargo, los efectos del péptido autoensamblaje P₁₁-4 sobre las propiedades físico-químicas del componente mineral de la dentina han sido poco estudiados, resultando necesario dilucidar su comportamiento sobre este sustrato para su posterior utilización en diversos procedimientos clínicos.

2.2 Hipótesis

La primera hipótesis que plantea esta tesis doctoral es que el ciclaje de pH (CpH) es idóneo para la simulación de caries residual.

La segunda hipótesis es que los agentes remineralizadores (fluoruro de sodio, fosfopéptido de caseína-fosfato de calcio amorfo y el péptido de autoensamblaje P₁₁-4) influyen en las características composicionales de la dentina previamente desmineralizada artificialmente con CpH.

2.3 Objetivos

2.3.1 Fase de desmineralización

2.3.1.1 Objetivo general

Evaluar la viabilidad del ciclaje de pH (CpH) en diferentes tiempos experimentales para la simulación *in vitro* de caries residual.

2.3.1.2 Objetivos específicos

- Analizar las características composicionales de la dentina desmineralizada mediante CpH a 14 y 28 días con respecto a la dentina sana y a la caries residual natural.
- Estudiar las características microestructurales de la dentina sana, de la caries residual natural y de la dentina desmineralizada con CpH a 14 y 28 días.
- Determinar las características morfológicas de la dentina desmineralizada con CpH a 14 y 28 días con respecto a la dentina sana y a la caries residual natural.
- Evaluar las características histológicas de la dentina desmineralizada con CpH a 14 y 28 días, de la dentina sana y de la caries residual natural.

- Comparar la composición química, las características microestructurales, morfológicas e histológicas de la dentina sana, de la caries residual natural y de la dentina desmineralizada con CpH a 14 y 28 días.

2.3.2 Fase de remineralización

2.3.2.1 Objetivo general

Determinar el efecto de diversos agentes remineralizadores basados en diferentes tipos de péptidos sobre caries residual artificial obtenida mediante CpH.

2.3.2.2 Objetivos específicos

- Analizar la composición química de la caries residual artificial (dentina previamente desmineralizada con CpH) y remineralizada con un producto fluorado estándar (fluoruro de sodio).
- Examinar la composición química de la caries residual artificial (dentina previamente desmineralizada con CpH) y remineralizada con fosfopéptido de caseína-fosfato de calcio amorfo.
- Evaluar la composición química de la caries residual artificial (dentina previamente desmineralizada con CpH) y remineralizada con el péptido de autoensamblaje P₁₁₋₄ + monofluorofosfato de sodio.
- Analizar la composición química de la caries residual artificial (dentina previamente desmineralizada con CpH) y remineralizada con el péptido de autoensamblaje P₁₁₋₄.
- Comparar las características composicionales de la dentina previamente desmineralizada con CpH (caries residual artificial) y remineralizada con fluoruro de sodio y productos remineralizadores basados en péptidos (fosfopéptido de caseína-fosfato de calcio amorfo, péptido de autoensamblaje P₁₁₋₄ y, péptido de autoensamblaje P₁₁₋₄ + monofluorofosfato de sodio).

3 Materiales y métodos

3.1 Preparación de las muestras

El uso y estudio de las muestras empleadas en esta tesis fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Granada (España) con número 942/CEIH/2019 (ver Anexo I).

De un conjunto de dientes almacenados en solución de timol (0.05%), se seleccionaron al azar 149 terceros molares sanos (sin caries y sin defectos estructurales) y 23 molares permanentes cariados. Los dientes con caries oclusal se incluyeron siguiendo el criterio ICDAS # 5 (cavidad distintiva con dentina visible) (139,140). Dado que las lesiones de caries alcanzaban la dentina profunda, la profundidad de las lesiones se fijó por encima de la cámara pulpar.

La corona de los dientes sanos se seccionó mesodistalmente utilizando una máquina de corte de baja velocidad (IsoMet, Buehler, IL, EE.UU.) con un disco de diamante (Benetec Limited, Beaconsfield, Reino Unido) bajo refrigeración constante por agua para obtener rodajas de dentina coronal de 1 mm de grosor. El esmalte de las rodajas obtenidas se removió de la dentina y se pulieron secuencialmente con papeles de carburo de silicio (carborundo) de grano 600, 1200, 2500 y 4000. Los molares cariados se excavaron parcialmente hasta alcanzar la dentina cariada ligeramente húmeda y correosa que quedaba en la proximidad de la pulpa (*i.e.*, caries residual). Durante la preparación se retiraron las raíces de los dientes cariados. Posteriormente, se obtuvieron rodajas de caries residual y se pulieron según el procedimiento descrito anteriormente desde la superficie oclusal hasta 1 mm de grosor, medido con un micrómetro digital (Mitutoyo, Kawasaki, Japón).

3.2 Fase de desmineralización

3.2.1 Diseño experimental

Las rodajas de dientes sanos ($n = 69$) se asignaron aleatoriamente a tres grupos ($n = 23$) según el factor-sustrato: 1) control negativo/dentina sana: inmersión en agua destilada a temperatura ambiente durante el tiempo de experimentación, 2) inducción artificial de caries con un modelo de ciclaje de pH (CpH) durante 14 días (CpH 14), y 3) inducción artificial de caries con un modelo de CpH durante 28 días (CpH 28). Los dientes cariados naturales se consideraron como control positivo. La Figura 18 muestra el diseño experimental de esta fase que se detallará en los siguientes apartados.

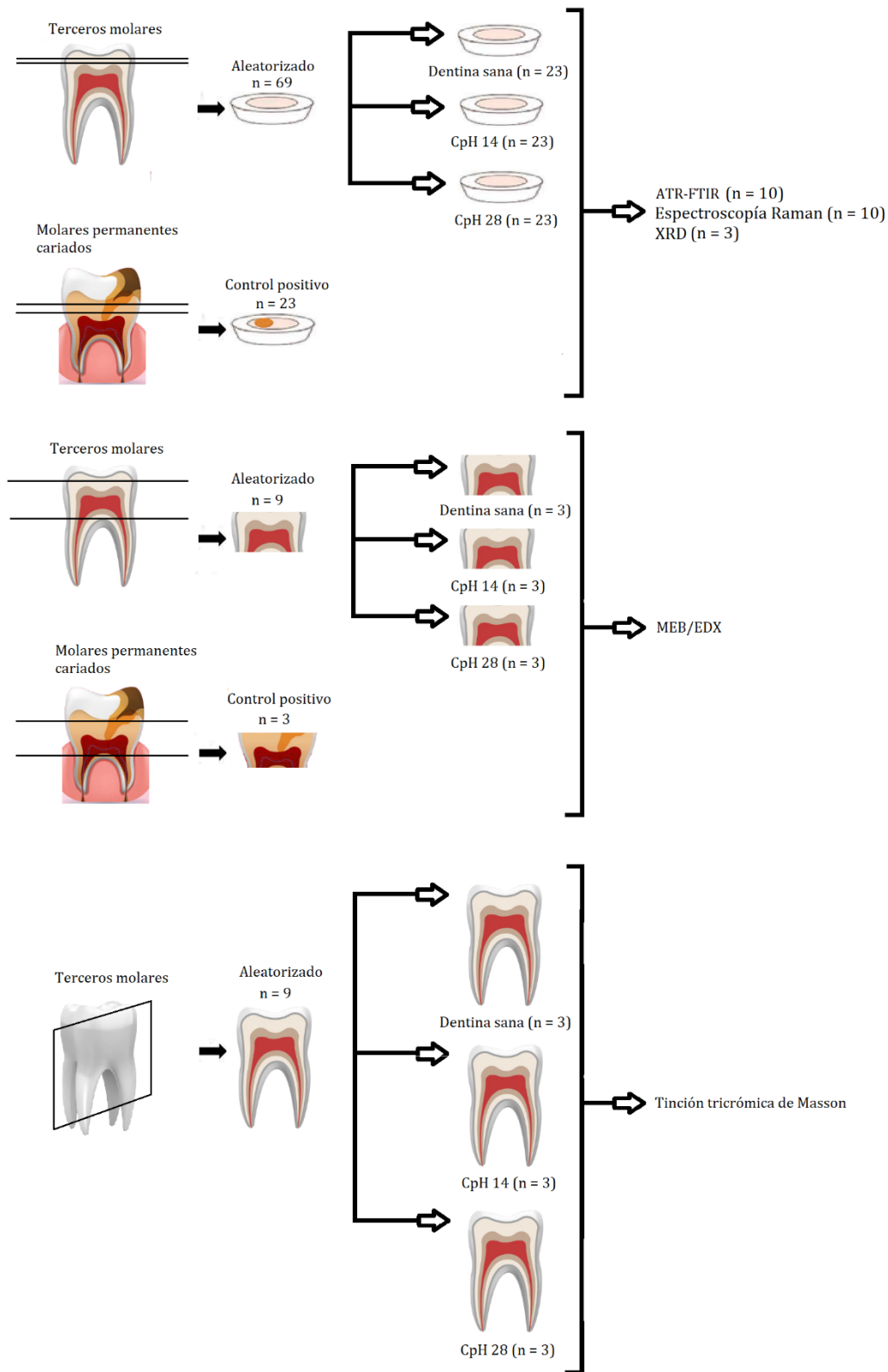


Figura 18. Representación esquemática del diseño experimental de la fase de desmineralización. CpH 14, ciclaje de pH a 14 días; CpH 28, ciclaje de pH a 28 días; ATR-FTIR, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada; XRD, difracción de Rayos X; MEB/EDX, microscopía electrónica de barrido/energía dispersiva de Rayos X.

3.2.2 Inducción de caries artificial (ciclaje de pH)

Las rodajas de dentina se perforaron cerca del borde con una fresa redonda de diamante (Komet #802-314-010, Komet-Brasseler, Lemgo, Alemania) en una pieza de mano de alta velocidad (Kavo Supertorque Lux 660B, Kaltenbach & Voigt GmbH, Biberach, Alemania) bajo refrigeración constante por agua (Figura 19) para permitir la inmersión a través de un hilo de nylon en los tubos de ensayo (Figura 20). Para la inducción artificial de la caries (CpH), se realizó una inmersión cíclica de las muestras utilizando 20 mL de una solución desmineralizadora durante 8 h y 20 mL de una solución remineralizadora durante 16 h, tal como proponen Marquezan et al. (127). La Tabla 2 muestra la composición química y las concentraciones de las soluciones (desmineralizadora y remineralizadora) empleadas para el CpH. Todos los reactivos usados para la preparación de las soluciones fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.) (>99.0% de pureza). Las soluciones se renovaron diariamente y las rodajas se enjuagaron con agua desionizada después de cada inmersión. Este procedimiento de CpH se llevó a cabo en dos tiempos experimentales durante 14 y 28 días a temperatura ambiente y sin agitación de las soluciones.



Figura 19. Perforación del borde de una rodaja de dentina.



Figura 20. Rodajas de dentina colgando dentro de un tubo de ensayo.

Tabla 2. Composición de las soluciones empleadas para el ciclaje de pH.

Solución	pH	Composición
Desmineralizadora	4.8	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM, NaH ₂ PO ₄ y 50 mM de ácido acético
Remineralizadora	7.0	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ y 0.15 M KCl

3.2.3 Análisis con espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada (Fourier transform infrared – Attenuated total reflectance, ATR-FTIR)

Las muestras seleccionadas aleatoriamente ($n = 10$ por grupo) se analizaron utilizando un espectrómetro FTIR JASCO 6600 (Jasco Inc., Easton, MD, EE.UU.) equipado con un accesorio ATR con punta de diamante (ATR Pro ONE, JASCO Inc., Easton, MD, EE.UU.) (Figura 21). Este equipo se encuentra en los laboratorios del Departamento de Mineralogía y Petrología de la Universidad de Granada. Los espectros ATR-FTIR se registraron en modo de absorbancia con una resolución de 1 cm^{-1} en 124 acumulaciones de barrido utilizando un rango espectral de $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$. Los picos superpuestos se resolvieron mediante el método de segunda derivada dentro de cada banda seccionada utilizando el software de ajuste de curvas PeakFit v4.12 (Systat Software, San Jose, CA, EE.UU.). El grado de suavizado se aplicó en un rango del 10-25% y el ajuste del área del pico se realizó mediante la función mixta Gaussiana-Lorentziana. El ajuste de la curva se aceptó cuando el r^2 alcanzó valores superiores a 0.95. Este procedimiento se utilizó para calcular las áreas de pico relativas dentro de las bandas de carbonato ($855\text{-}890 \text{ cm}^{-1}$; $\nu_2 \text{ CO}_3^{2-}$) y fosfato ($890\text{-}1150 \text{ cm}^{-1}$; $\nu_1, \nu_3 \text{ PO}_4^{3-}$). Además, se calcularon los siguientes parámetros a partir de las razones de áreas:

- MinCO_3 (razón de áreas entre las bandas: $\nu_2 \text{ CO}_3^{2-}/\nu_1, \nu_3 \text{ PO}_4^{3-}$): cantidad relativa de carbonato respecto al fosfato en el mineral (141,142).
- Grado de mineralización (razón de áreas entre las bandas: $\nu_1, \nu_3 \text{ PO}_4^{3-}/\text{Amida I}$): cantidad relativa de mineral de fosfato respecto a la matriz orgánica (banda 1640 cm^{-1}) (142).
- Índice de cristalinidad (IC): calculado como la razón entre las áreas de sub-bandas a 1030 cm^{-1} (fosfatos de apatito de ambientes altamente cristalinos) a 1020 cm^{-1} (fosfatos de apatito de ambientes pobremente cristalinos) dentro de la región $\nu_1, \nu_3 \text{ PO}_4^{3-}$ (142,143).



Figura 21. Espectrómetro FTIR Jasco 6600 con accesorio ATR empleado para el análisis de las muestras.

3.2.4 Análisis con espectroscopía Raman

Las muestras seleccionadas aleatoriamente ($n = 10$ por grupo) se analizaron con un espectrómetro Raman JASCO NRS-5100 (Jasco Inc., Easton, MD, EE.UU.) equipado con un microscopio óptico Olympus (Figura 22). Este equipo se encuentra disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Los espectros se adquirieron utilizando un láser de diodo rojo de 785 nm en un rango espectral de $300\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ con una resolución de 1 cm^{-1} y un tiempo de exposición de 10 s con 5 acumulaciones. Las mediciones de los espectros Raman se realizaron siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para los análisis ATR-FTIR. Se calcularon los siguientes parámetros:

- Carbonato a fosfato (razón de amplitud: $1070\text{ cm}^{-1}/959\text{ cm}^{-1}$): grado de sustitución de carbonato tipo B en la estructura reticular del apatito (144).
- Fosfato a CH_2 (razón de amplitud: $959\text{ cm}^{-1}/1450\text{ cm}^{-1}$), como la razón mineral con respecto a la matriz orgánica: banda de estiramiento simétrico del fosfato, al modo de cabeceo del CH_2 de las cadenas laterales de las moléculas de colágeno (144,145).

- Índice de cristalinidad: calculado como la anchura a media altura (en inglés, FWHM) a 959 cm^{-1} , banda principal de absorción de la $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ (146).



Figura 22. Espectrómetro Raman Jasco NRS-5100.

3.2.5 Análisis de difracción de Rayos X bidimensionales (bidimensional X-Ray diffraction, 2D-XRD)

Para estos análisis se obtuvieron patrones de 2D-XRD ($n = 3$ por grupo, seleccionadas de forma aleatoria) utilizando un difractómetro de Rayos X (Bruker D8 DISCOVER, Billerica, MA, EE.UU.) equipado con un detector 2D (DECTRIS PILATUS 3R 100K-A, Baden-Dätwill, Suiza) con radiación $\text{Cu K}\alpha$ a 50 kV y 30 mA (Figura 23). Este equipo se encuentra disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Para la obtención de las medidas, el rango angular de barrido 2θ considerado fue de 20° a 60° , considerando 19 pasos y 40 s/paso, con un tamaño de haz colimado de 0.5 mm de diámetro. Los puntos analizados en las superficies de la dentina (tres puntos por muestra) se seleccionaron empleando un microscopio óptico equipado con una referencia láser para el correcto enfoque del haz de Rayos X, así como la determinación de la posición en foco de la superficie. Las intensidades de difracción concentradas en arcos (correspondientes al espaciado d específico de la red cristalina) se integraron en un barrido unidimensional 2θ . El tamaño de cristalito de los cristales de HAP se determinó midiendo la anchura a media altura (en inglés, FWHM) de los picos de difracción

(002) que aparecen aproximadamente a 25.9° en el patrón 2θ . El tamaño del cristalito (d) se relaciona con la medida promediada del volumen de los dominios cristalinos (XRD-Índice de cristalinidad). Para ello, se empleó el método de Debye-Scherrer para estimar las medidas del tamaño del cristalito (147):

$$d = K\lambda/\beta \cos \theta$$

donde d corresponde al tamaño del cristalito (expresado en nm), λ es la longitud de onda de la fuente de Rayos X ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), K es la constante de Scherrer, asumida como un factor $K = 0.89$, y β es el ensanchamiento de la línea (FWHM) para la reflexión de difracción (002). Estas medidas se realizaron con el uso del programa X'Pert HighScore Plus (PANalytical, Lelyweg, Almelo, Países Bajos).



Figura 23. Difractómetro de Rayos X Bruker D8 DISCOVER con detector 2D (DECTRIS PILATUS 3R 100K-A).

3.2.6 Análisis con microscopía electrónica de barrido/energía dispersiva de Rayos X (MEB/EDX)

Tres especímenes adicionales por grupo se fijaron en glutaraldehído al 2.5% a pH 7.4 durante 12 h a 4°C de temperatura. Después de la fijación, las muestras se sumergieron inmediatamente en una solución búfer de fosfato (en inglés, PBS) a pH 7.4 durante 1 h (aplicando ciclos de 20 min) y se enjuagaron en agua destilada durante 1 min. Posteriormente, las muestras se deshidrataron en grados ascendentes de etanol (50%, 70%, 90% y 96%) durante 20 min en

cada paso. Por último, las muestras se sumergieron en etanol al 100% durante dos ciclos de una hora. Las muestras preparadas se montaron en soportes de aluminio y se recubrieron de carbono con un equipo de pulverización iónica. Las imágenes de microscopía electrónica se obtuvieron con un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5600, Peabody, MA, EE.UU.) operado a un voltaje de 20 kV y a una corriente de 10 mA. Para los análisis químicos semicuantitativos, se empleó espectroscopía de EDX para determinar las concentraciones relativas de fósforo (P) y calcio (Ca) en las superficies de la dentina. Este equipo se encuentra en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

3.2.7 Tinción tricrómica de Masson (TTM)

Tres especímenes adicionales por grupo se seccionaron longitudinalmente en rodajas para realizar análisis histológicos (tinción tricrómica de Masson). Las rodajas se fijaron en un soporte de vidrio con un adhesivo fotopolimerizable (Technovit 7210 VLC; Heraeus Kulzer GmbH Co., Werheim, Alemania) y se pulieron secuencialmente con papeles de carburo de silicio de grano 1200 a 4000 hasta un grosor de aproximadamente 10 μm . Las rodajas se tiñeron con el protocolo tricrómico de Masson y se examinaron en un microscopio óptico (BH-2; Olympus, Tokio, Japón) a 50X de magnificación. En cada sección se midió la anchura de la banda de color rojo, correspondiente a la dentina desmineralizada con colágeno expuesto. Para ello, un único examinador ciego realizó tres mediciones diferentes de la anchura utilizando el software ImageJ 1.50 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE.UU.). No fue posible realizar el análisis de TTM para el control positivo (caries natural) debido a la pérdida del tejido cariado durante el pulido de las secciones. Estos ensayos se realizaron en los laboratorios de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada.

3.3 Fase de remineralización

3.3.1 Diseño experimental

Las rodajas de dentina sana ($n = 80$) se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos ($n = 20$) según el factor-sustrato: 1) CpH 28 + solución de NaF al 0.2%, 2) CpH 28 + fosfopéptido de caseína-fosfato de calcio amorfo (GC Tooth Mousse®), 3) CpH 28 + péptido de autoensamblaje P₁₁₋₄ con monofluorofosfato de sodio-900 ppm de F⁻ (Curodont™ D'Senz) y 4) CpH 28 + péptido de autoensamblaje P₁₁₋₄ (Curodont™ Repair). Para este ensayo se tuvieron en cuenta las mismas muestras de la fase de desmineralización para los grupos de dentina sana y CpH 28. Todas las muestras de dentina tratadas con productos remineralizadores se sumergieron

posteriormente en solución remineralizadora durante 24 h. En la Tabla 3 se describen los fabricantes, la composición de los materiales y las instrucciones de aplicación. La Figura 24 muestra el diseño experimental que se detallará en los siguientes apartados.

Tabla 3. Composición, fabricante y procedimientos de aplicación de los materiales y soluciones utilizados.

Materiales	Composición	Modo de aplicación
Solución de NaF al 0.2%	1 g de NaF en 500 mL de agua desionizada	Aplicar 1.0 mL por 1 min
GC Tooth Mousse® - GC Corporation, Tokio, Japón	Agua pura, glicerol, FPC-FCA, D-sorbitol, CMC-Na, propilenglicol, dióxido de silicio, dióxido de titanio, xilitol, ácido fosfórico, saborizante, óxido de zinc, sacarina sódica, p-hidroxibenzoato de etilo, óxido de magnesio, goma guar, p-hidroxibenzoato de propilo, p-hidroxibenzoato de butilo.	Aplicar con un microcepillo por 3 min
Curodont™ D'Senz, Credentis AG, Dorfstrasse, Windisch, Switzerland	Hidrolizado de almidón hidrogenado, agua, sílice hidratada, PEG-8, goma de celulosa, monofluorofosfato sódico, aroma, sacarina sódica, ácido cítrico, hidroxido sódico, fosfato dicálcico, oligopéptido-104, glicerofosfato cálcico, limoneno, cinamal.	Aplicar con un microcepillo por 2 min
Curodont™ Repair, Credentis AG, Dorfstrasse, Windisch, Switzerland	Péptido P ₁₁₋₄ - secuencia de aminoácidos - (Ace-Gln-Gln-Arg-Phe-Glu-Trp-Glu- Phe-Glu-Gln-Gln-NH ₂)	Usar con aplicador por 5 min
Solución remineralizadora	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ y 0.15 M KCl ajustado (pH 7.0)	Sumergir las muestras en 20 mL por 24 h

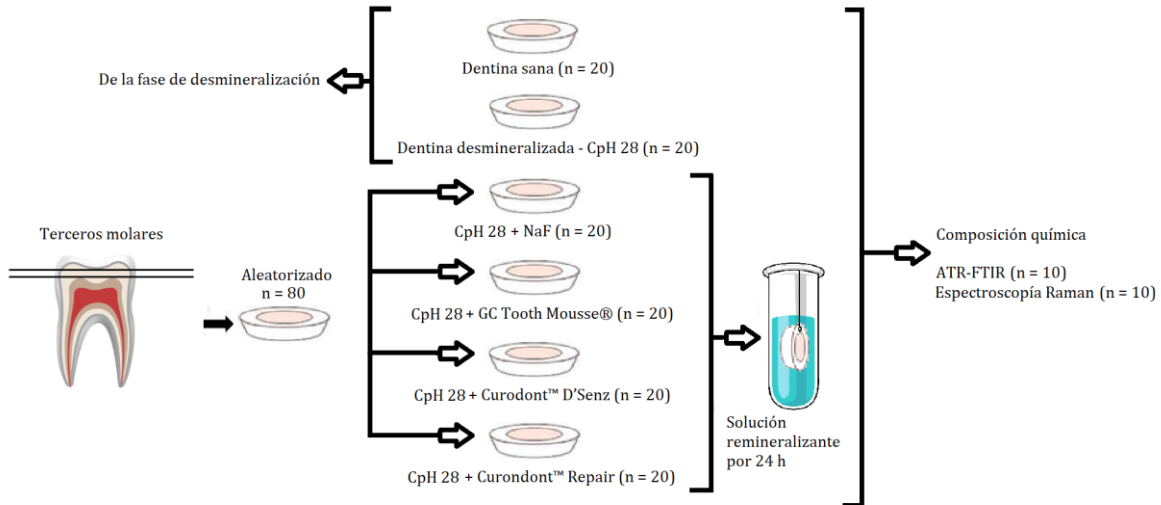


Figura 24. Representación esquemática del diseño experimental de la fase de remineralización. CpH 28, ciclaje de pH a 28 días; ATR-FTIR, espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada.

3.3.2 Tratamiento de la dentina

La inducción de caries artificial se realizó de igual forma al CpH descrito en el apartado 3.2.2. Las rodajas de dentina se asignaron aleatoriamente a los tratamientos: dentina sana (inmersión en agua destilada a temperatura ambiente durante el tiempo del ensayo); CpH 28; CpH 28 + tratamiento con 1.0 mL de solución de NaF al 0.2% (1 min); CpH 28 + GC Tooth Mousse® (3 min); CpH 28 + tratamiento con Curodont™ D'Senz (2 min); y CpH 28 + Repair (5 min). Los excesos de material después de su aplicación se eliminaron con papel absorbente. Posteriormente, las rodajas de dentina con tratamientos remineralizadores se sumergieron por 24 h en solución remineralizadora.

3.3.3 Análisis con espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Se analizaron 10 muestras por grupo seleccionadas de forma aleatoria mediante ATR-FTIR de la manera descrita en el apartado 3.2.3. Particularmente, para los grupos de productos remineralizadores, se calcularon las áreas de picos relativas dentro de la banda del fosfato considerando el rango $985-1145\text{ cm}^{-1}$; ν_1 , $\nu_3\text{ PO}_4^{3-}$.

3.3.4 Análisis con espectroscopía Raman

Para estos análisis se seleccionaron aleatoriamente 10 muestras por grupo y se llevaron a cabo los análisis con espectroscopía Raman de la manera descrita en el apartado 3.2.4

3.4 Análisis estadístico

Para todas las variables estudiadas se calcularon los promedios y las desviaciones estándar. La distribución normal de los datos se comprobó mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para la comparación entre grupos se aplicaron pruebas paramétricas (ANOVA unidireccional con Tukey y Games-Howell post hoc) y no paramétricas (Kruskal-Wallis y Mann-Whitney), de acuerdo a la normalidad de la distribución. El nivel de significación se estableció en $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EE.UU.).

4 Resultados

4.1 Fase desmineralización:

4.1.1 Análisis con espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier – Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

La Figura 25 muestra los perfiles y las asignaciones de los picos dentro de la banda de absorción del carbonato (ν_2 CO_3^{2-} ; $855\text{-}890\text{ cm}^{-1}$) en los grupos de dentina sana (DS), caries natural y ciclaje de pH (CpH). En estas secciones del espectro de ATR-FTIR se observa un estiramiento y una ligera disminución de la amplitud relativa del perfil del pico a 866 cm^{-1} (carbonato inestable-lábil); así como un estiramiento y un ligero aumento de la amplitud relativa del perfil del pico a 878 cm^{-1} (sustitución de carbonato tipo A-OH \cdot) en los grupos de caries natural y CpH en comparación con el grupo de DS. La Tabla 4 presenta los valores de área relativos y las diferencias estadísticas para los picos medidos en la banda de carbonato ν_2 CO_3^{2-} . Para el P1_ CO_3 _a 866 cm^{-1} (carbonato inestable-lábil) y el P2_ CO_3 _a 871 cm^{-1} (sustitución de carbonato tipo B- PO_4^{3-}), se observa una disminución de los valores para los grupos de caries natural y CpH en comparación con el grupo de DS, aunque para este último, no alcanza valores estadísticamente significativos. Por otro lado, el P3_ CO_3 _a 878 cm^{-1} (sustitución de carbonato tipo A-OH \cdot) muestra diferencias significativas, presentando valores más elevados en los grupos de caries, CpH 14 y CpH 28 en comparación con el grupo de DS.

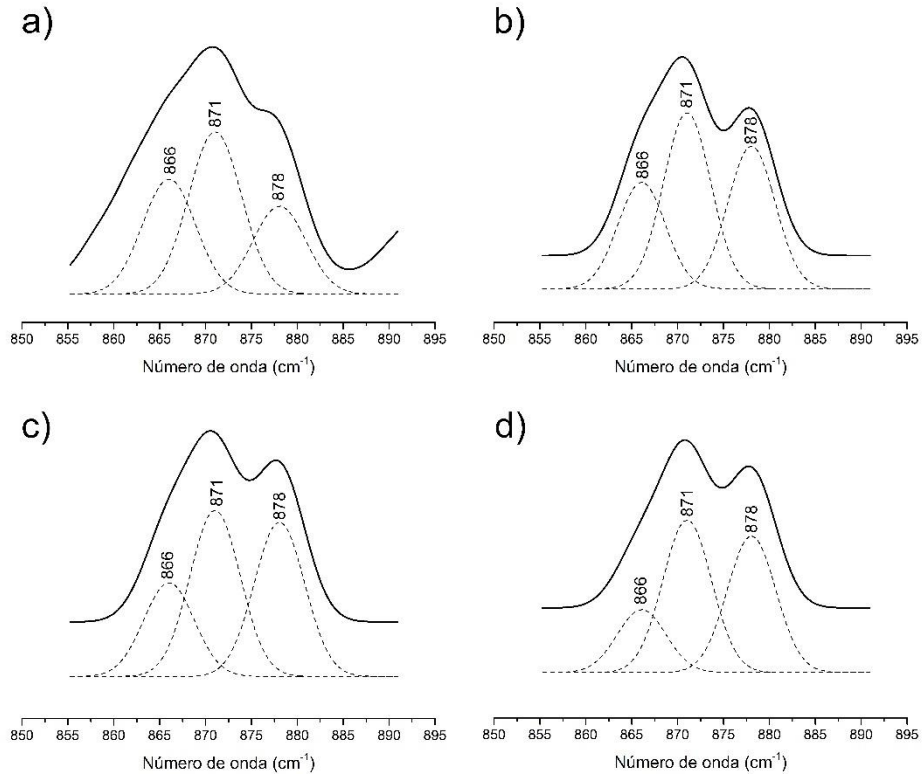


Figura 25. Fase de desmineralización. Perfil de picos obtenidos por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier – Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) en la banda de absorción de carbonato (ν_2 CO_3^{2-}): a) dentina sana, b) dentina cariada, c) ciclaje de pH (CpH) durante 14 días, y d) CpH durante 28 días. La asignación de los tres picos corresponde a carbonato inestable-lábil (~ 866 cm^{-1}), carbonato tipo B (~ 871 cm^{-1}), y carbonato tipo A (~ 878 cm^{-1})(141,148).

Tabla 4. Fase de desmineralización. Media y desviación estándar (DE) de las áreas relativas de los picos de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier – Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) en las bandas de absorción de carbonato (ν_2 CO_3^{2-}) y fosfato (ν_1 , ν_3 PO_4^{3-}). Diferentes letras mayúsculas en superíndice muestran diferencias estadísticas entre grupos ($p < 0.05$).

Número de onda (cm^{-1})	Dentina sana (n=10)	Caries (n=10)	CpH 14 (n=10)	CpH 28 (n=10)
P1_CO ₃ _a866	0.386 ± (0.073) ^A	0.248 ± (0.072) ^B	0.227 ± (0.047) ^B	0.197 ± (0.075) ^B
P2_CO ₃ _a871	0.474 ± (0.068) ^A	0.458 ± (0.115) ^A	0.457 ± (0.039) ^A	0.449 ± (0.051) ^A
P3_CO ₃ _a878	0.140 ± (0.029) ^A	0.294 ± (0.083) ^B	0.316 ± (0.052) ^B	0.353 ± (0.068) ^B
P1_PO ₄ _a940	0.080 ± (0.019) ^A	0.006 ± (0.007) ^B	0.012 ± (0.004) ^B	0.009 ± (0.005) ^B
P2_PO ₄ _a960	0.129 ± (0.014) ^A	0.031 ± (0.019) ^B	0.037 ± (0.008) ^B	0.030 ± (0.009) ^B
P3_PO ₄ _a996	0.205 ± (0.021) ^A	0.056 ± (0.036) ^B	0.062 ± (0.014) ^B	0.050 ± (0.018) ^B
P4_PO ₄ _a1005	0.192 ± (0.037) ^A	0.146 ± (0.037) ^{A,B}	0.144 ± (0.013) ^B	0.134 ± (0.015) ^B
P5_PO ₄ _a1020	0.131 ± (0.016) ^A	0.223 ± (0.027) ^B	0.227 ± (0.028) ^B	0.231 ± (0.020) ^B
P6_PO ₄ _a1030	0.085 ± (0.008) ^A	0.186 ± (0.030) ^B	0.176 ± (0.012) ^B	0.183 ± (0.012) ^B
P7_PO ₄ _a1044	0.047 ± (0.011) ^A	0.099 ± (0.020) ^B	0.094 ± (0.007) ^B	0.100 ± (0.008) ^B
P8_PO ₄ _a1056	0.031 ± (0.009) ^A	0.060 ± (0.013) ^B	0.059 ± (0.007) ^B	0.060 ± (0.008) ^B
P9_PO ₄ _a1060	0.028 ± (0.009) ^A	0.052 ± (0.012) ^B	0.054 ± (0.008) ^B	0.056 ± (0.007) ^B
P10_PO ₄ _a1078	0.032 ± (0.007) ^A	0.052 ± (0.010) ^B	0.058 ± (0.010) ^B	0.061 ± (0.008) ^B
P11_PO ₄ _a1096	0.026 ± (0.004) ^A	0.053 ± (0.010) ^B	0.047 ± (0.004) ^B	0.050 ± (0.006) ^B
P12_PO ₄ _a1109	0.017 ± (0.005) ^A	0.037 ± (0.009) ^B	0.031 ± (0.009) ^B	0.036 ± (0.006) ^B

La Figura 26 muestra los perfiles y las asignaciones de los picos dentro de la banda de absorción del fosfato (ν_1 , ν_3 PO_4^{3-} ; 890-1150 cm^{-1}) en los grupos de DS, caries y CpH. En estas secciones del espectro se observan varios cambios en los grupos de caries natural y CpH con respecto al grupo de DS: disminución relativa de la amplitud de los picos en la región de 940 cm^{-1} a 1005 cm^{-1} y un aumento de la amplitud de los picos de 1020 cm^{-1} a 1109 cm^{-1} . En la Tabla 4 se muestran los resultados estadísticos y las diferencias de las áreas relativas de los picos medidos dentro de la banda del fosfato. Particularmente, los picos P1 a P4 (PO_4 _a940 cm^{-1} a PO_4 _a1005 cm^{-1}) muestran una disminución significativa de los valores del área relativa para los grupos caries, CpH 14 y CpH 28 con respecto al grupo de DS. Por el contrario, existe un aumento de los valores de P5 a P12 (PO_4 _a1020 cm^{-1} a PO_4 _a1109 cm^{-1}) en la misma correspondencia entre grupos. Estas diferencias entre la caries natural y los grupos de CpH (14 y 28 días) en comparación con el grupo de DS son estadísticamente significativas, excepto para el P4_PO₄_a1005 cm^{-1} . Por otro lado, no existen diferencias significativas al comparar las variables descritas anteriormente entre el grupo de caries natural con los grupos CpH, así como al comparar entre sí los grupos CpH (14 y 28 días).

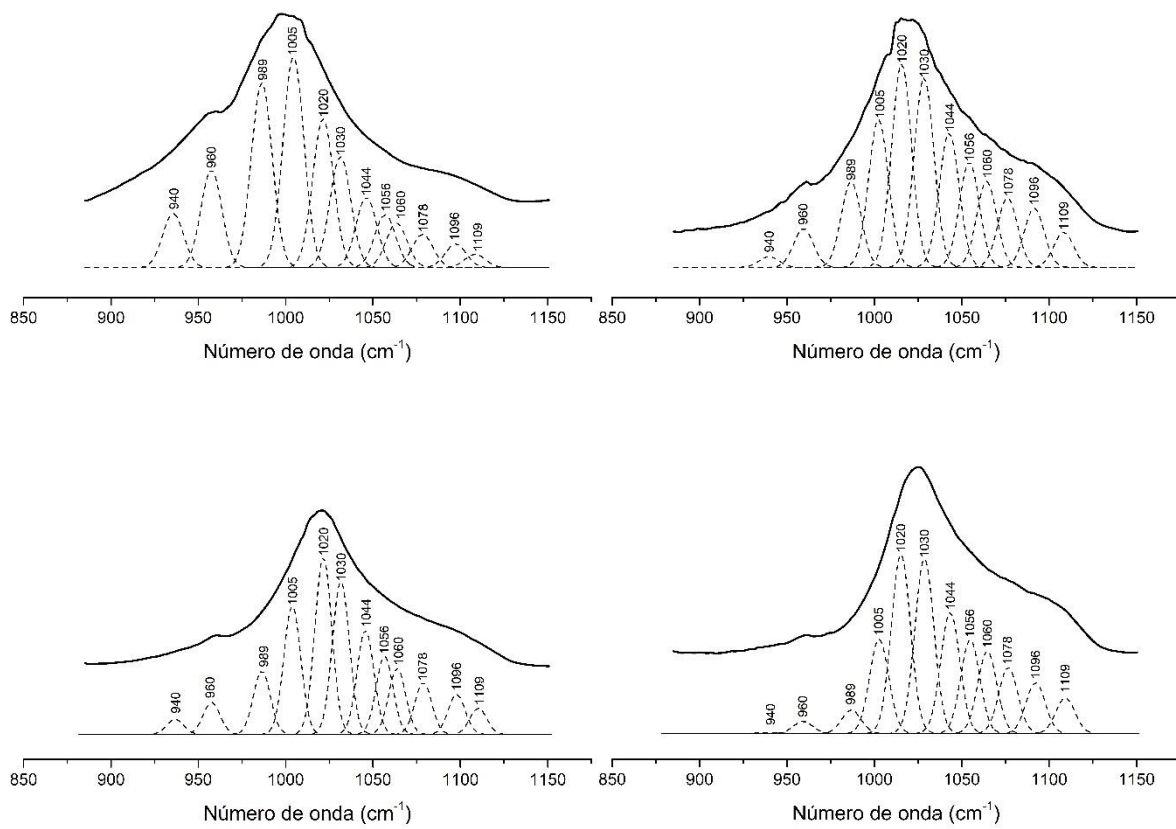


Figura 26. Fase de desmineralización. Perfil de picos obtenidos por ATR-FTIR en la banda de absorción del fosfato (v_1 , v_3 PO_4^{3-}): a) dentina sana, b) dentina cariada, c) CpH durante 14 días, y d) CpH durante 28 días. Asignación de picos: ~ 940 cm^{-1} (modo de estiramiento de simetría v_1 P-O), ~ 960 cm^{-1} (v_1 PO_4^{3-}), ~ 996 cm^{-1} (PO_4^{3-} en ambiente de apatito), ~ 1005 cm^{-1} (v_3 PO_4^{3-}), ~ 1020 cm^{-1} (v_3 PO_4^{3-} en apatitos pobremente cristalinos), ~ 1030 cm^{-1} (v_3 PO_4^{3-} en apatitos estequiométricos), ~ 1044 cm^{-1} (apatitos con HPO_4^{2-} y sustitución carbonatada de tipo B), ~ 1056 cm^{-1} (modos vibracionales T_2 de los apatitos), ~ 1060 cm^{-1} (v_3 PO_4^{3-} en apatitos pobremente cristalinos), ~ 1075 cm^{-1} (v_3 PO_4^{3-} en apatitos pobremente cristalinos), ~ 1100 cm^{-1} (v_3 PO_4^{3-} en apatitos pobremente cristalinos), y ~ 1109 cm^{-1} (apatitos pobremente cristalinos) (141,149–153).

En cuanto a las variables de ATR-FTIR representadas en la Figura 27, los valores de carbonato a fosfato en mineral (Figura 27a: MinCO₃) y el grado de mineralización (Figura 27b) muestran una disminución en los grupos de caries y CpH con respecto al grupo de DS. Por el contrario, el índice de cristalinidad (Figura 27c: IC) muestra valores más elevados en comparación con la relación anterior (es decir, grupo de DS vs. los grupos de caries y CpH). Por otra parte, los análisis estadísticos revelan diferencias significativas para todos los parámetros entre el grupo de DS frente a los grupos de caries natural y ambos grupos de CpH. Además, no existen diferencias para estas variables entre el grupo de caries natural y los grupos de CpH, así como entre los grupos de CpH (14 frente a 28 días).

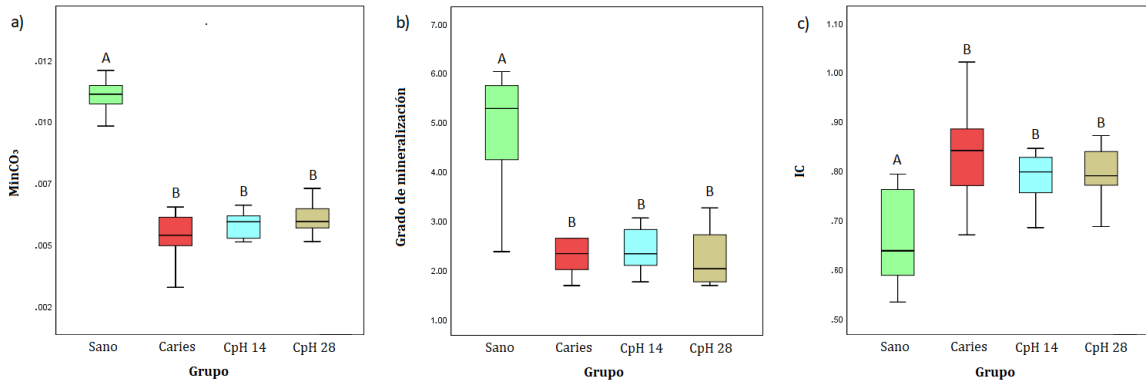


Figura 27. Fase de desmineralización. Resultados de las variables de ATR-FTIR. a) MinCO₃ (razón carbonato a fosfato), b) Grado de mineralización (razón mineral a orgánico), y c) Índice de cristalinidad (IC). Letras mayúsculas diferentes muestran diferencias estadísticas entre grupos ($p < 0.05$).

4.1.2 Análisis con espectroscopía Raman

La Figura 28 muestra los resultados para las variables obtenidas a partir del análisis de los espectros Raman. Los valores de la razón carbonato a fosfato (Figura 28a) revelan una disminución en el grupo de caries, con diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo de control negativo (DS). La razón fosfato a CH₂ (Figura 28b) indica una disminución en ambos grupos de CpH (14 y 28 días) en comparación con los grupos de DS y caries. El índice de cristalinidad (Figura 28c) obtenido por espectroscopia Raman (FWHM de la banda de fosfato ~959 cm⁻¹) muestra valores más elevados en el grupo de DS en comparación con los grupos de caries y CpH.

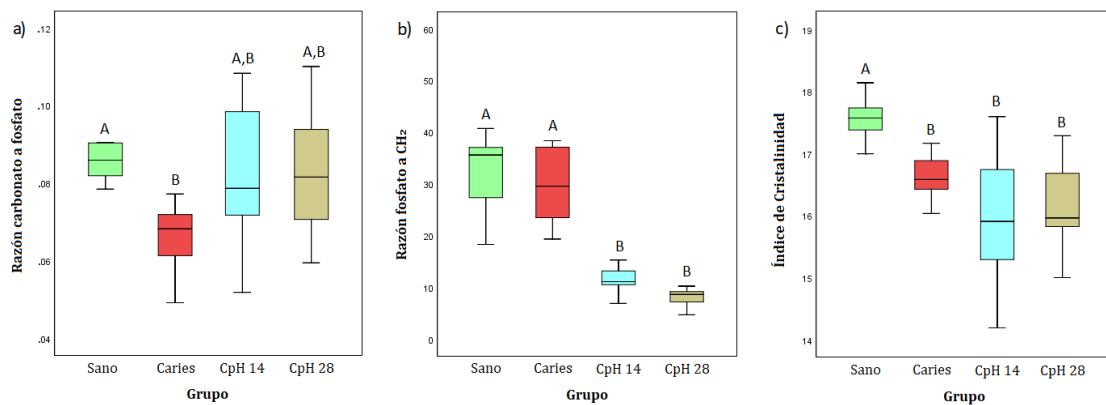


Figura 28. Fase de desmineralización. Resultados de las variables de espectroscopía Raman. a) Razón carbonato a fosfato, b) Razón carbonato a CH₂, y c) Índice de cristalinidad. Letras mayúsculas diferentes muestran diferencias estadísticas entre grupos ($p < 0.05$).

4.1.3 Análisis con difracción de Rayos X bidimensionales (2D-XRD)

Las propiedades cristalinas del componente mineral de la dentina se estudiaron mediante el análisis de los patrones de 2D-XRD. La Figura 29 muestra los patrones de 2D-XRD y el 2Theta integrado (*i.e.*, el barrido unidimensional) para los grupos de DS, caries y CpH a 14 y 28 días. Los perfiles de los picos de XRD relacionados con la difracción del cristal de HAp observados en el grupo de DS, fueron más definidos (menor ensanchamiento) que los correspondientes a las muestras de los grupos de CpH y caries. Las mediciones del tamaño de los cristalitas (*i.e.*, estimación del tamaño promedio de los dominios cristalinos) para la dentina mineral se muestran en la Figura 30. Los resultados indican que el tamaño del cristallito para los cristales de HAp (considerando la dirección del eje c - reflexión 002) es mayor en el grupo de DS con respecto al grupo de dentina cariada y los grupos de CpH, con valores cristalinos más pequeños en las muestras de dentina cariada.

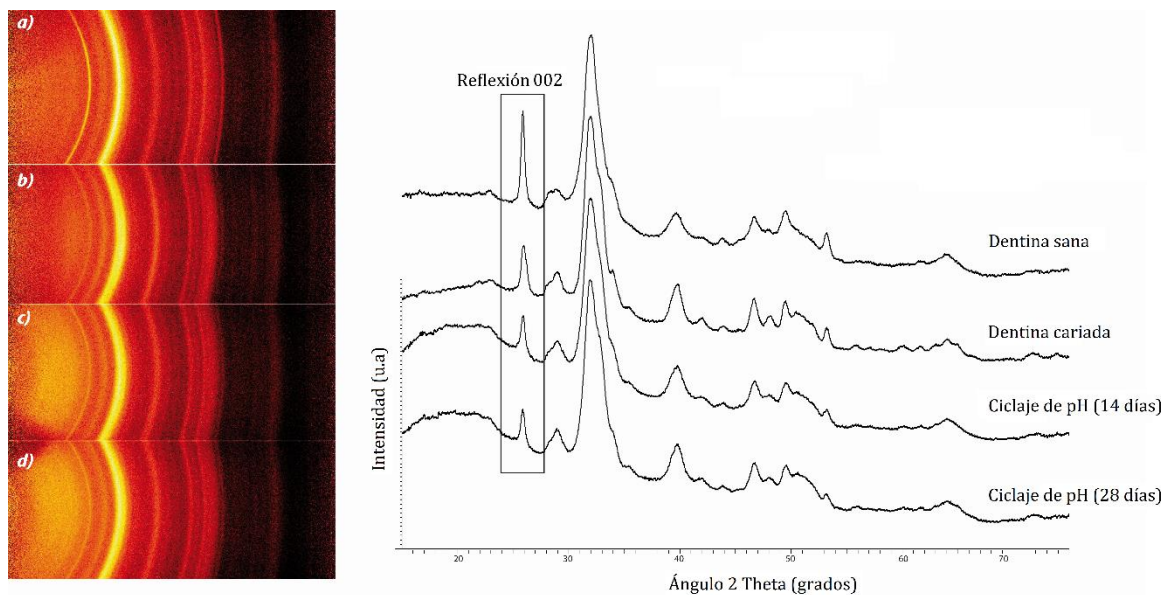


Figura 29. Fase de desmineralización. Patrones difracción de Rayos X bidimensionales (2D-XRD) y barrido 2Theta integrado. A) dentina sana, b) dentina cariada, c) CpH 14, y d) CpH 28 días. El pico de difracción (002) considerado para las mediciones del tamaño de los cristalitas se indica en los patrones unidimensionales.

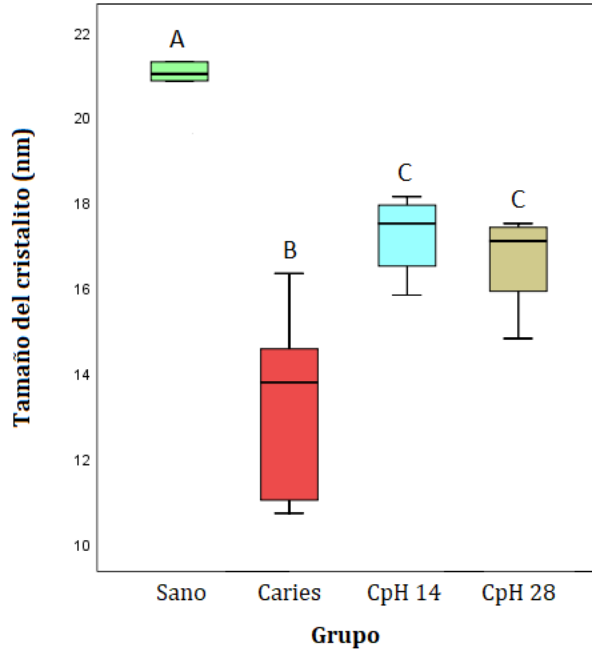


Figura 30. Fase de desmineralización. Resultados de las mediciones del tamaño del cristalito mediante la integración de patrones 2D-XRD. Letras mayúsculas diferentes muestran diferencias estadísticas entre grupos ($p < 0.05$). Los valores se expresan en nanómetros (nm).

4.1.4 Análisis con microscopía electrónica de barrido/energía dispersiva de Rayos X (MEB/EDX)

En la Figura 31 se muestran imágenes de MEB representativas de las superficies dentinarias de todos los grupos experimentales. Los análisis morfológicos indican una superficie lisa y regular en los grupos de DS, CpH 14 y CpH 28. La dentina desmineralizada mediante procedimientos de CpH (14 y 28 días) presenta oclusión y apertura extensa de algunos túbulos dentinarios. Por otro lado, las imágenes MEB del grupo de caries natural muestran una superficie irregular y rugosa con túbulos dentinarios abiertos y áreas de colágeno colapsadas. Además, la EDX revela valores inferiores de Ca y P % para el grupo de caries natural y ambos grupos de CpH con respecto al grupo de DS (Tabla 5).

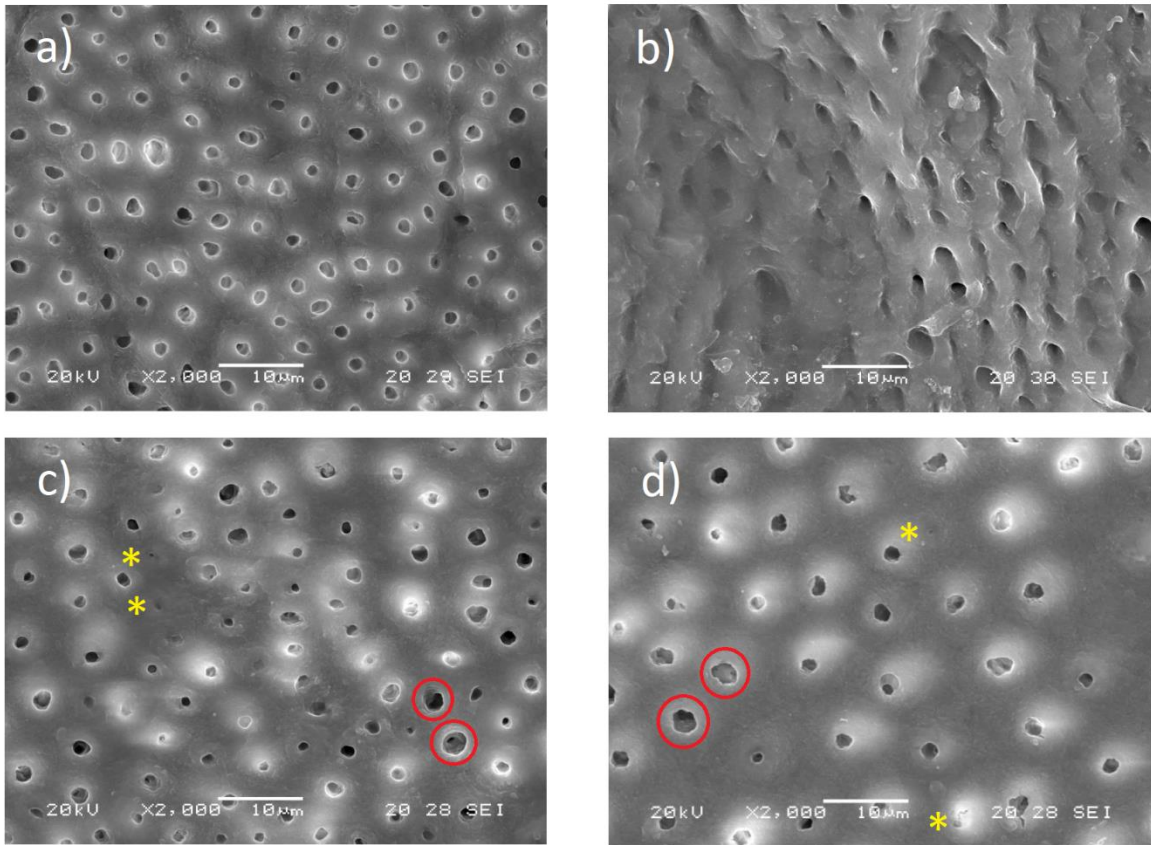


Figura 31. Fase de desmineralización. Imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB). A) dentina sana, b) dentina cariada, c) CpH 14, y d) CpH 28. Los círculos rojos indican algunos túbulos con apertura extensa en ambos grupos de CpH. Los asteriscos amarillos señalan algunos túbulos dentinarios ocluidos en los grupos de CpH 14 y de CpH 28. Barra de escala: 10 µm.

Tabla 5. Fase de desmineralización. Concentración relativa de calcio (Ca) y fósforo (P) en las superficies dentinarias expresada en % de peso para todos los grupos experimentales.

Grupo	Elemento	Peso (%)
Dentina sana	Ca	27.82
	P	14.10
Dentina cariada	Ca	17.40
	P	8.87
CpH 14	Ca	23.08
	P	11.68
CpH 28	Ca	22.78
	P	11.36

4.1.5 Análisis con tinción tricrómica de Masson (TTM)

La profundidad de la desmineralización de la dentina por CpH en 14 y 28 días se evaluó mediante el protocolo de TTM. Esta técnica permite identificar el colágeno mineralizado de tipo I tiñendo de verde el colágeno intacto y de rojo el colágeno desmineralizado (Figura 32). La extensión de la desmineralización (banda roja) mostró una mayor profundidad en el grupo CpH 28 (media \pm DE: $86.71 \pm 10.9 \mu\text{m}$) en comparación con el grupo CpH 14 (media \pm DE: $42.07 \pm 3.74 \mu\text{m}$).

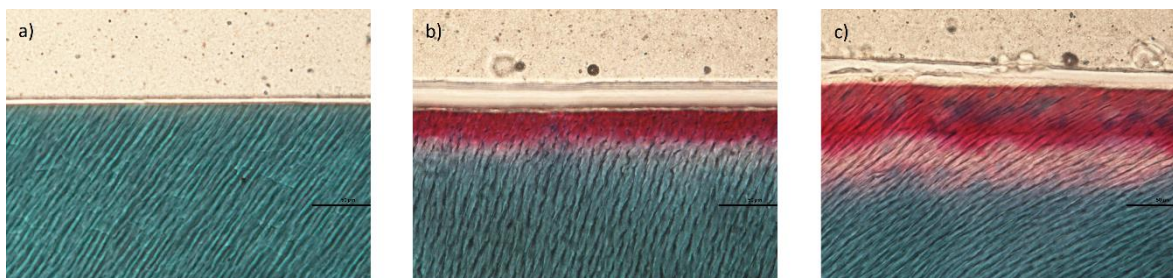


Figura 32. Fase de desmineralización. Imágenes de la tinción tricrómica de Masson (TTM). A) dentina sana, b) CpH 14, y c) CpH 28. La banda roja indica colágeno desmineralizado de tipo I. Barra de escala: $50 \mu\text{m}$.

4.2 Fase de remineralización

4.2.1 Análisis con espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier – Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR)

Los perfiles y las asignaciones de los picos dentro de la banda de absorción del carbonato se muestran en la Figura 33 ($\nu_2 \text{CO}_3^{2-}$; $855\text{-}890 \text{ cm}^{-1}$) para los grupos de DS, CpH 28 y los productos remineralizadores (PR). En esta sección del espectro se observa un estiramiento y una ligera disminución en la amplitud relativa de los perfiles del pico a 866 cm^{-1} (carbonato inestable-lábil) en los grupos de CpH 28, solución de fluoruro de sodio al 0.2 % (NaF), fosfopéptido de caseína-fosfato de calcio amorfo (FPC-FCA) y péptido de autoensamblaje P₁₁₋₄ (CR) en comparación con el grupo de DS. También se observa una elevada disminución del pico a 866 cm^{-1} en el grupo del péptido P₁₁₋₄ + monofluorofosfato de sodio (CD) en comparación con el resto de grupos. Con respecto a la amplitud relativa de los perfiles de los picos a 871 cm^{-1} (sustitución de carbonato tipo B- PO_4^{3-}) y 878 cm^{-1} (sustitución de carbonato tipo A-OH⁻), se observa un estiramiento y un ligero aumento en el grupo de CpH 28 y el conjunto de grupos de PR, en comparación con el grupo de DS. La Tabla 6 presenta los valores de área relativa (media y desviación estándar) y las diferencias estadísticas para los picos en la banda $\nu_2 \text{CO}_3^{2-}$. Particularmente, para P1_CO3_a866 cm^{-1} (carbonato inestable-lábil) se observa una

disminución de los valores en el grupo de CpH 28 y los grupos de PR en comparación con el grupo de DS, mientras que se produce un aumento de los valores para el P3_CO3_a878 cm^{-1} (sustitución de carbonato tipo A-OH \cdot) en los grupos CpH 28 y PR en comparación con el grupo de DS, con diferencias estadísticamente significativas. En cuanto P2_CO3_a871 cm^{-1} (sustitución de carbonato tipo B-PO $_4^{3-}$), muestra valores más bajos en los grupos de CpH 28, FPC-FCA y CR en comparación con el grupo de DS, y valores más elevados en los grupos de NaF y CD en comparación con el control negativo (DS), aunque en este caso no se presentan diferencias significativas.

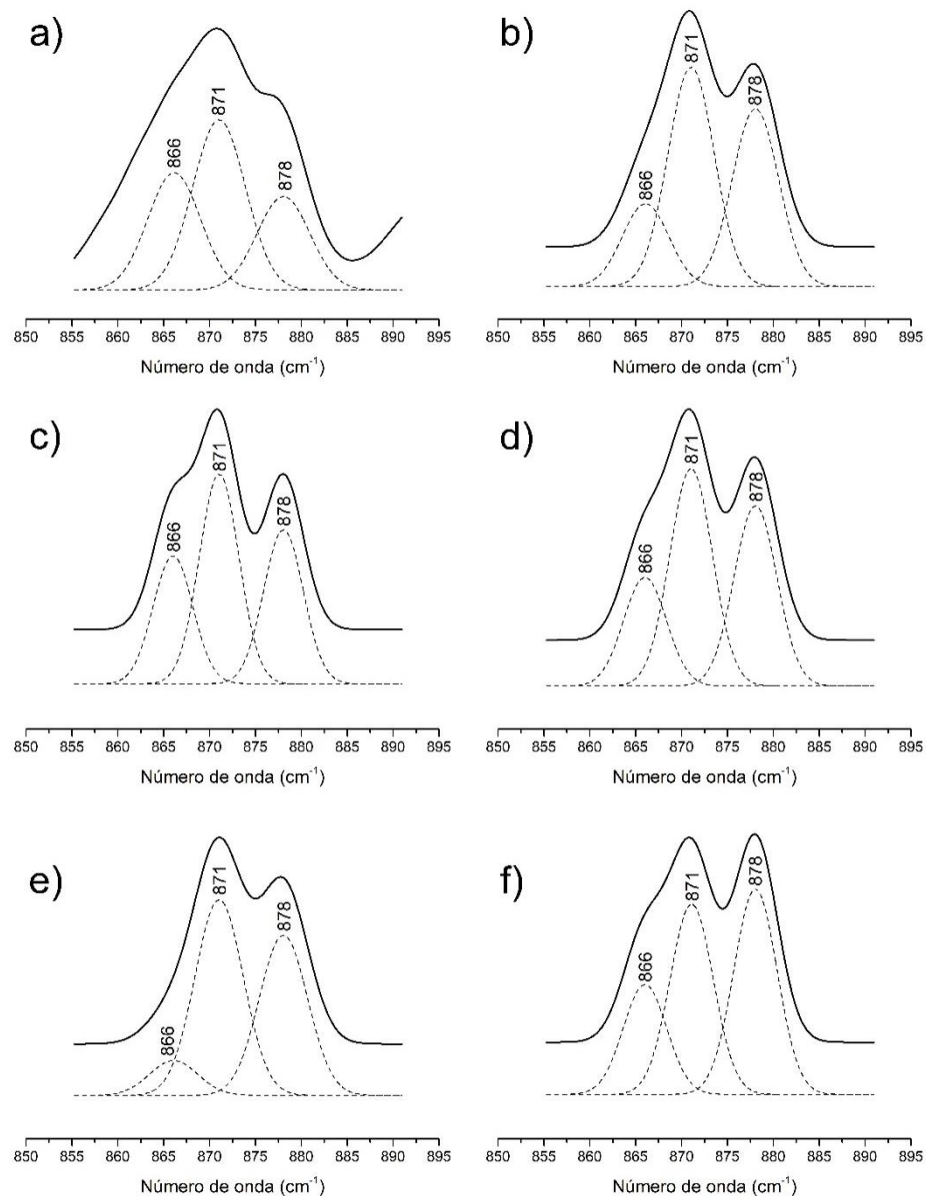


Figura 33. Fase de remineralización. Perfil de los picos de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier – Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) en la banda de absorción de carbonato ($\nu_2 \text{CO}_3^{2-}$): a) dentina sana, b) CpH 28, c) CpH 28 + solución NaF, d) CpH 28 + GC Tooth Mousse®, e) CpH 28 + Curodont™ D'Senz y f) CpH 28 + Curodont™ Repair. La asignación de los tres picos corresponde a carbonato inestable-lábil ($\sim 866 \text{ cm}^{-1}$), carbonato tipo B ($\sim 871 \text{ cm}^{-1}$) y carbonato tipo A ($\sim 878 \text{ cm}^{-1}$) (141,148).

Tabla 6. Fase de remineralización. Media y desviación estándar (DE) de las áreas relativas de los picos de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier – Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) en las bandas de absorción de carbonato ($\nu_2 \text{CO}_3^{2-}$) y fosfato ($\nu_1, \nu_3 \text{PO}_4^{3-}$). Diferentes letras mayúsculas en superíndice muestran diferencias estadísticas entre grupos ($p < 0.05$).

Número de onda (cm^{-1})	Dentina sana (n=10)	CpH 28 (n=10)	NaF (n=10)	GC Tooth Mousse® (n=10)	Curodont™ D'Senz (n=10)	Curodont™ Repair (n=10)
P1_CO ₃ _a866	0.386 ± (0.073) ^A	0.197 ± (0.075) ^B	0.202 ± (0.123) ^B	0.145 ± (0.095) ^B	0.108 ± (0.053) ^B	0.160 ± (0.076) ^B
P2_CO ₃ _a871	0.474 ± (0.068) ^A	0.449 ± (0.051) ^A	0.517 ± (0.144) ^A	0.455 ± (0.162) ^A	0.482 ± (0.296) ^A	0.395 ± (0.211) ^A
P3_CO ₃ _a878	0.140 ± (0.029) ^A	0.353 ± (0.068) ^B	0.282 ± (0.186) ^{A,B}	0.400 ± (0.222) ^B	0.410 ± (0.276) ^{A,B}	0.445 ± (0.236) ^B
P1_PO ₄ _a940	0.080 ± (0.019) ^A	0.009 ± (0.005) ^B	-	-	-	-
P2_PO ₄ _a960	0.129 ± (0.014) ^A	0.030 ± (0.008) ^B	-	-	-	-
P3_PO ₄ _a989	0.205 ± (0.021) ^A	0.050 ± (0.018) ^B	-	-	-	-
P4_PO ₄ _a1005	0.192 ± (0.037) ^A	0.134 ± (0.015) ^B	0.033 ± (0.005) ^C	0.035 ± (0.008) ^{C,D}	0.034 ± (0.009) ^C	0.041 ± (0.010) ^D
P5_PO ₄ _a1020	0.131 ± (0.016) ^A	0.231 ± (0.020) ^B	0.116 ± (0.006) ^C	0.113 ± (0.012) ^{C,D}	0.101 ± (0.017) ^D	0.121 ± (0.017) ^{A,C}
P6_PO ₄ _a1030	0.085 ± (0.008) ^A	0.183 ± (0.012) ^B	0.204 ± (0.014) ^C	0.193 ± (0.015) ^{B,C}	0.185 ± (0.024) ^{B,D}	0.195 ± (0.015) ^{B,C,D}
P7_PO ₄ _a1044	0.046 ± (0.011) ^A	0.100 ± (0.008) ^B	0.145 ± (0.015) ^C	0.136 ± (0.010) ^{C,D}	0.130 ± (0.013) ^D	0.142 ± (0.009) ^C
P8_PO ₄ _a1056	0.031 ± (0.009) ^A	0.060 ± (0.008) ^B	0.116 ± (0.007) ^C	0.112 ± (0.006) ^C	0.108 ± (0.007) ^C	0.114 ± (0.006) ^C
P9_PO ₄ _a1060	0.028 ± (0.008) ^A	0.056 ± (0.007) ^B	0.116 ± (0.015) ^C	0.121 ± (0.014) ^C	0.115 ± (0.010) ^C	0.115 ± (0.013) ^C
P10_PO ₄ _a1078	0.032 ± (0.007) ^A	0.060 ± (0.008) ^B	0.116 ± (0.018) ^C	0.131 ± (0.017) ^C	0.128 ± (0.020) ^C	0.119 ± (0.022) ^C
P11_PO ₄ _a1092	0.026 ± (0.004) ^A	0.050 ± (0.006) ^B	0.074 ± (0.010) ^C	0.081 ± (0.015) ^{C,D}	0.095 ± (0.017) ^D	0.075 ± (0.011) ^{C,D}
P12_PO ₄ _a1109	0.017 ± (0.005) ^A	0.036 ± (0.006) ^B	0.052 ± (0.006) ^C	0.050 ± (0.007) ^C	0.069 ± (0.011) ^D	0.050 ± (0.006) ^C
P13_PO ₄ _a1123	-	-	0.028 ± (0.014) ^A	0.028 ± (0.006) ^A	0.036 ± (0.015) ^A	0.028 ± (0.011) ^A

En la Figura 34, se muestran los perfiles y las asignaciones de los picos dentro de la banda de absorción de fosfato ($\nu_1, \nu_3 \text{PO}_4^{3-}$; 890-1150 cm^{-1} para los grupos de DS y CpH 28 / $\nu_1, \nu_3 \text{PO}_4^{3-}$; 985-1145 cm^{-1} para los grupos de PR). En esta sección se observan cambios notables cuando se comparan los grupos correspondientes a CpH 28 y el conjunto de los grupos de PR con el de DS. Entre estas diferencias se identifica una disminución relativa de la amplitud de los picos en la región de 940 cm^{-1} a 1005 cm^{-1} y un aumento de la amplitud de los picos de 1020 cm^{-1} a 1109 cm^{-1} cuando el grupo de CpH 28 se compara con el grupo de DS. Por otra parte, se observa una desaparición de los picos en la región de 940 cm^{-1} a 989 cm^{-1} y una aparición del pico a 1123

cm⁻¹ cuando los grupos de PR se comparan con el grupo de DS y el de CpH 28. La Tabla 6 muestra los resultados descriptivos y las diferencias significativas de las áreas relativas de los picos dentro de la banda del fosfato. Para las variables comprendidas entre P1_PO₄_a940 cm⁻¹ a P3_PO₄_a989 cm⁻¹ el grupo de CpH 28 presenta valores más bajos que el grupo de DS. Para P4_PO₄_a1005 cm⁻¹ se observa una disminución de los valores para los grupos de CpH 28 y de PR en comparación con el grupo de DS. Por el contrario, entre las variables P6_PO₄_a1030 cm⁻¹ a P12_PO₄_a1109 cm⁻¹ se produce un aumento de los valores en los grupos correspondientes a los PR respecto al control positivo (CpH 28) y al control negativo (DS). En particular, para P5_PO₄_a1020 cm⁻¹, el grupo de DS presenta un valor superior a los grupos de PR y un valor inferior respecto al grupo de CpH 28. Además, existen diferencias significativas entre las comparaciones de grupos, excepto en casos como P5_PO₄_a1020 cm⁻¹ (*e.g.*, DS vs. CR, FPC-FCA vs. CD) y P6_PO₄_a1030 cm⁻¹ (*e.g.*, CpH 28 vs. FPC-FCA, CD y CR).

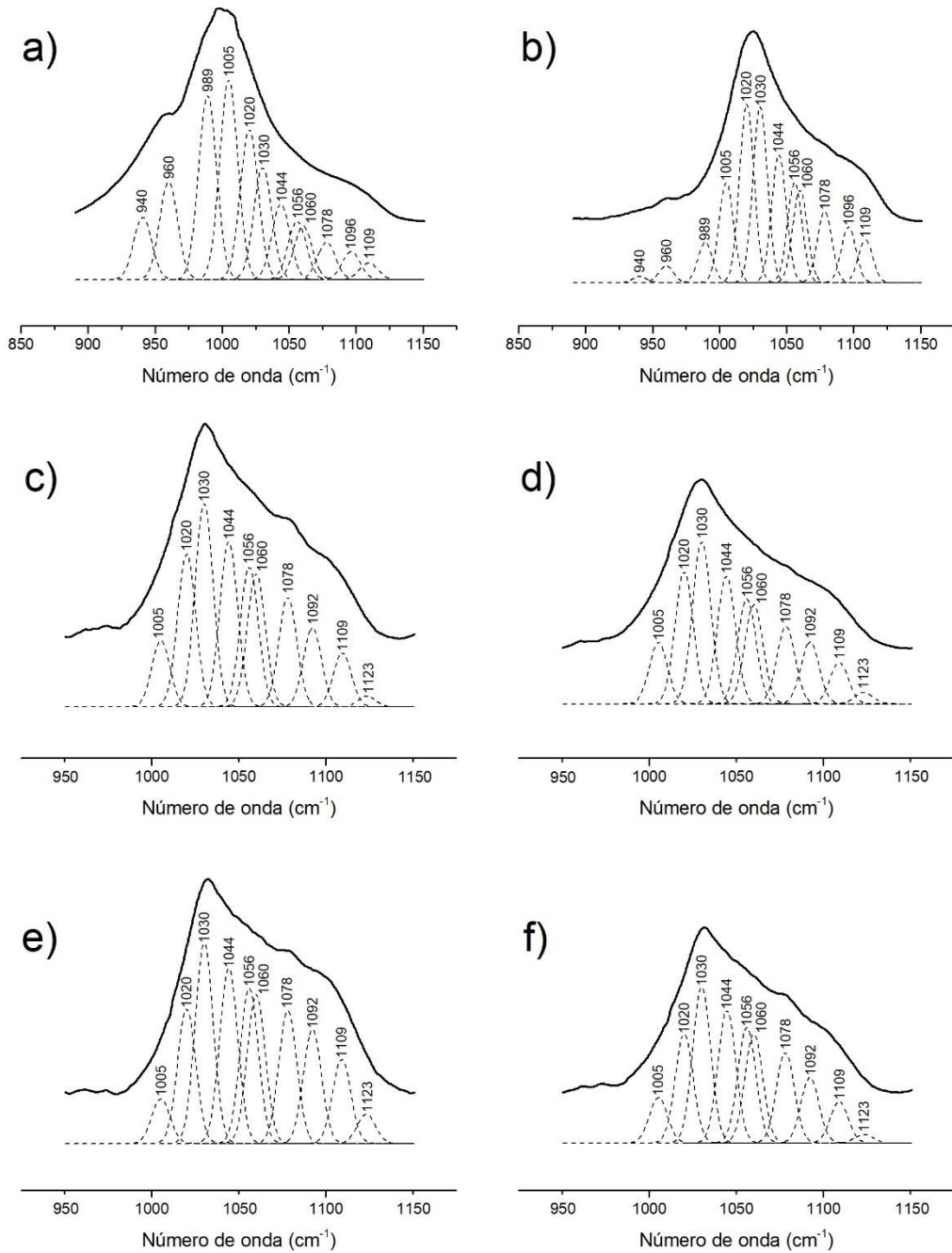


Figura 34. Fase de remineralización. Perfil de los picos de ATR-FTIR en la banda de absorción del fosfato (v_1 , v_3 PO_4^{3-}): a) dentina sana, b) CpH durante 28 días, c) CpH 28 + solución de NaF, d) CpH 28 + GC Tooth Mousse®, e) CpH 28 + Curodont™ D'Senz and f) CpH 28 + Curodont™ Repair. Asignación de picos: ~ 940 cm^{-1} (modo de estiramiento de simetría v_1 P-O), ~ 960 cm^{-1} (v_1 PO_4^{3-}), ~ 996 cm^{-1} (PO_4^{3-} en ambiente de apatito), ~ 1005 cm^{-1} (v_3 PO_4^{3-}), ~ 1020 cm^{-1} (v_3 PO_4^{3-} en apatitos pobremente cristalinos), ~ 1030 cm^{-1} (v_3 PO_4^{3-} en apatitos estequiométricos), ~ 1044 cm^{-1} (apatitos con HPO_4^{2-} y sustitución carbonatada de tipo B), ~ 1056 cm^{-1} (modos vibracionales T_2 de los apatitos), ~ 1060 cm^{-1} (v_3 PO_4^{3-} en apatitos pobremente cristalinos), ~ 1075 cm^{-1} (v_3 PO_4^{3-} en apatitos pobremente cristalinos), ~ 1092 cm^{-1} (apatitos estequiométricos), ~ 1100 cm^{-1} (v_3 PO_4^{3-} en apatitos pobremente cristalinos), ~ 1109 cm^{-1} (apatitos pobremente cristalinos), y ~ 1123 cm^{-1} (HPO_4^{2-}) (141,149–153).

En relación con los parámetros de ATR-FTIR representados en la Figura 35, las razones carbonato a fosfato (Figura 35a: MinCO_3) y mineral a orgánico (Figura 35b: Grado de mineralización) muestran valores inferiores en los grupos CpH 28 y el conjunto de los grupos correspondientes a los PR respecto al grupo de DS, e incluso valores menores en los grupos de los PR respecto al grupo de CpH 28. Por el contrario, el índice de cristalinidad (Figura 35c: IC) muestra valores más elevados en los grupos de los PR respecto a los grupos de DS y CpH 28. Por otro lado, para todas las variables, los análisis estadísticos revelan diferencias significativas entre el grupo de DS vs. CpH 28, DS vs. PR y CpH 28 vs. PR. Además, no hay diferencias para estos parámetros entre los grupos de PR, excepto para el IC (Figura 35c) donde existen diferencias significativas entre CD y CR.

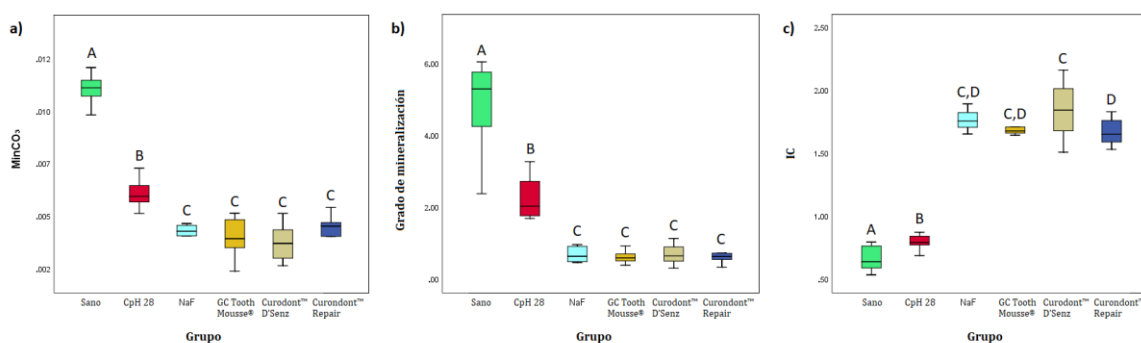


Figura 35. Fase de remineralización. Resultados de las variables de espectroscopía ATR-FTIR. a) Razón carbonato a fosfato, b) Razón carbonato a CH_2 , y c) Índice de cristalinidad. Letras mayúsculas diferentes muestran diferencias estadísticas entre grupos ($p < 0.05$).

4.2.2 Análisis con espectroscopía Raman

Los parámetros obtenidos a partir del análisis de los espectros Raman se muestran en la Figura 36. Los valores de la razón carbonato a fosfato (Figura 36a) muestran una disminución en el grupo de CpH 28 (sin diferencias significativas) y un aumento de los valores en los grupos de los PR (con diferencias estadísticamente significativas) respecto al grupo de control negativo (DS). Además, los grupos de los PR mostraron valores mayores cuando se compararon con el grupo de CpH 28 (con diferencias estadísticamente significativas). La razón fosfato a CH_2 (Figura 36b) indica una disminución en el CpH 28 y los grupos de los PR en comparación con el grupo de DS. También se observa una disminución en los grupos de los PR en comparación con el grupo de CpH 28. Todas estas diferencias mencionadas para esta variable (*i.e.*, razón fosfato a CH_2) son estadísticamente significativas. El Índice de cristalinidad (Figura 36c) muestra

valores más elevados en el grupo de DS comparado con los grupos de CpH 28 y los PR con diferencias significativas. Además, existen valores menores en los grupos de los PR comparados con el grupo de CpH 28 sin diferencias significativas entre CpH 28 vs. NaF. Entre el conjunto de los grupos de los PR, se presentan diferencias estadísticamente significativas entre NaF vs. CD y CR. En la Figura 37 se muestran espectros representativos de los grupos de DS, CpH 28 y PR (CR) con los picos utilizados para calcular: *i*) razón carbonato a fosfato, *ii*) razón fosfato a CH₂ y *iii*) índice de cristalinidad.

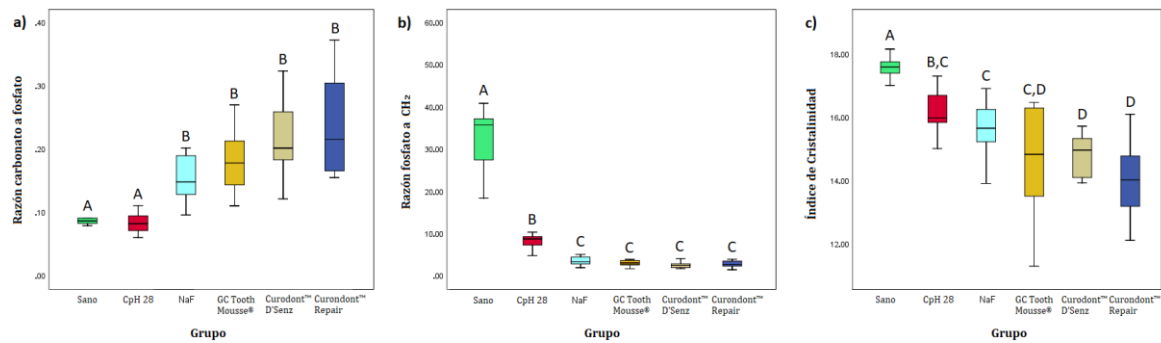


Figura 36. Fase de remineralización. Resultados de las variables de espectroscopía Raman. a) Razón carbonato a fosfato, b) Razón carbonato a CH₂, y c) Índice de cristalinidad. Letras mayúsculas diferentes muestran diferencias estadísticas entre grupos ($p < 0.05$).

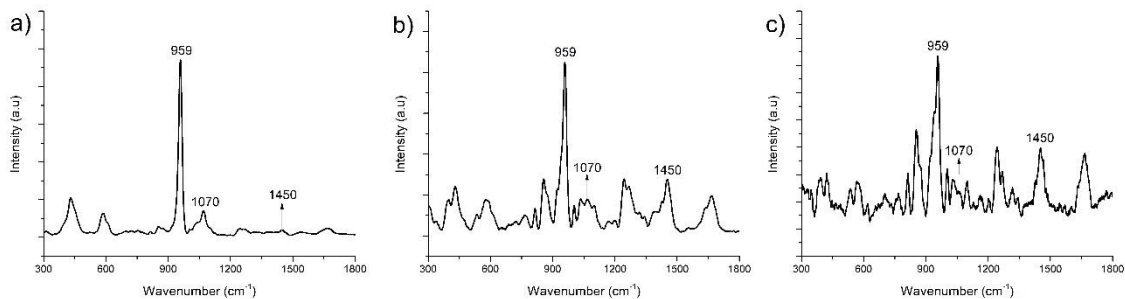


Figura 37. Espectros representativos de a) dentina sana - DS -, b) Ciclaje de pH durante 28 días - CpH 28 -, y c) grupo de productos remineralizadores (Curodont™ Repair - CR -). Asignaciones de picos: ~959 cm⁻¹ (modo de estiramiento simétrico ν_1 de PO_4^{3-}), ~1070 cm⁻¹ (modo de estiramiento simétrico ν_1 del carbonato tipo B) y ~1450 cm⁻¹ (modo de cabeceo CH₂ de cadenas laterales de moléculas de colágeno).

5 Discusión

5.1 Fase de desmineralización

La caries dental es un proceso natural de desmineralización *in vivo* controlado por la actividad metabólica bacteriana. La simulación *in vitro* de una lesión cariosa mediante un procedimiento estandarizado proporciona resultados de gran interés para la investigación odontológica. En esta investigación, evaluamos el método de ciclaje de pH (CpH) a diferentes tiempos experimentales (*i.e.*, 14 y 28 días) para la inducción de caries residual natural. El análisis exhaustivo de la dentina tratada con CpH reveló alteraciones minerales a nivel composicional, microestructural y morfológico que se asemejan en cierta medida a las características de la caries natural. Estas características también son críticas en la realización de tratamientos clínicos de intervención mínima, donde la caries residual (blanda o firme/cuerosa) se deja en el fondo de la cavidad de la caries para evitar la exposición pulpar y los síntomas postoperatorios (19,125). Además, el CpH, al igual que la caries natural, afecta las propiedades mecánicas de los dientes (154,155), el comportamiento de los sistemas adhesivos (156,157) y la respuesta de muchos otros tratamientos dentales. Por lo tanto, es importante identificar las similitudes morfológicas e histológicas del CpH en relación con la profundidad de la dentina cariada para la aplicación eficaz de materiales en restauraciones dentales.

Hasta el momento se han desarrollado varios métodos para simular el proceso de caries bajo condiciones controladas, como soluciones de gel acidificadas, modelos microbiológicos y procedimientos de CpH, con varias limitaciones, como: la simulación incompleta de las condiciones intraorales, la complejidad en la formulación de la composición y el volumen de saliva, la imposibilidad de imitar la razón del área de la superficie sólida/soluciones, etc. (158,159). Sin embargo, el procedimiento de CpH, al simular ciclos de des-remineralización, es generalmente aceptado y empleado en la investigación dental debido a la sencillez técnica del método y a la reproducibilidad de los resultados (159). Los ciclos de desmineralización corresponden al periodo de exposición de los dientes a los ácidos bacterianos, mientras que los ciclos de remineralización corresponden a la acción remineralizadora de la saliva entre las exposiciones ácidas (160). Durante su desarrollo se han aplicado diversas variaciones en el procedimiento de CpH que influyen en las lesiones resultantes, como los tiempos de inmersión/exposición, la temperatura, la agitación de la solución, el pH y la duración (días). Por otra parte, se ha demostrado que la cantidad de disolución mineral cambia en función del pH y el tiempo de inmersión (161,162). Además, algunos estudios (163,164) han explorado los

efectos del CpH en tiempos superiores a los 14 días, establecidos por Marquezan et al. (127), para la inducción de caries, sin mayor comparación con las características químicas y estructurales de la caries natural. Por lo tanto, la extensión del tiempo de CpH (8 h de desmineralización/16 h de remineralización) por 28 días, como se propone en el presente estudio, también debería inducir cambios superficiales y subsuperficiales similares al proceso de caries natural, que también son críticos en la respuesta de la dentina a los tratamientos clínicos.

Las espectroscopías infrarroja (IR) y Raman se han aplicado ampliamente para analizar los grupos funcionales químicos en las estructuras dentales (165). En la presente investigación, los análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) y Raman mostraron diferencias en los grupos moleculares relacionados con los componentes orgánicos e inorgánicos de las muestras de dentina cariada y tratada con CpH con respecto al grupo de control (*i.e.*, dentina sana). En cuanto a los análisis de ATR-FTIR, estos resultados mostraron una disminución del grado de mineralización y MinCO_3 , así como un aumento de la cristalinidad en el grupo de caries natural y en ambos grupos de CpH en comparación con el grupo de dentina sana (DS). La reducción del grado de mineralización puede explicarse por la disolución del HAp a través de los ácidos del proceso de desmineralización, causada por el metabolismo bacteriano en el caso de la caries natural; y la acción química de las soluciones en el procedimiento de CpH, que produce iones H^+ y HPO_4^{2-} como productos finales de este mecanismo de disolución (4). Además, Marin et al., indican que la dentina desmineralizada bajo soluciones ácidas no presenta cambios en el componente orgánico (*i.e.*, bandas de absorción relacionadas con los grupos amida) (161). Estos resultados son similares a los de un estudio anterior que empleó ATR-FTIR para comparar la composición química de la dentina humana y bovina sometida a CpH durante 3, 7 y 14 días (162). Por otra parte, también hay que tener en cuenta que en la caries natural se produce una descomposición de la matriz orgánica de la dentina debido a la actividad de las metaloproteinasas (166,167). Así, los bajos valores del grado de mineralización de la caries natural residual observados mediante ATR-FTIR pueden ser el resultado del efecto combinado de la degradación del colágeno expuesto y la pérdida mineral. Los análisis Raman también presentaron una relación similar en el grado de mineralización para ambos grupos de CpH, considerando las bandas de absorción variables de fosfato a CH_2 (*i.e.*, mineral/matriz). Sin embargo, el grupo de DS y el de dentina cariada no mostraron diferencias para la variable anterior, lo que puede deberse a la posible degradación térmica producida por el láser Raman en la matriz orgánica de las

muestras de caries natural (168). Los resultados de la sustitución mineral carbonato/fosfato mostraron cómo la incorporación de estos grupos moleculares conduce a una distorsión de la estructura cristalina causando una disminución de la cristalinidad del apatito (obtenida mediante los análisis Raman) como resultado de la disminución del apatito no estequiométrico que contiene HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , y vacantes a nivel estructural (145). Además, nuestros resultados indicaron una relación inversa entre los índices de cristalinidad (variables de índice de cristalinidad) obtenidos por espectroscopias ATR-FTIR y Raman. Por un lado, un aumento en las razones $1030/1020 \text{ cm}^{-1}$ (obtenidas mediante análisis ATR-FTIR), como el observado para los grupos de caries natural y CpH, se ha relacionado con una mayor madurez mineral, *i.e.*, una mayor proporción de dominios apatíticos en comparación con los no apatíticos en la composición mineral (169). Esta distribución específica en los grupos fosfato en diferentes ambientes cristalinos se confirma a partir de la disolución diferencial de los diversos modos vibracionales cristalinos obtenidos a partir del análisis detallado de ATR-FTIR (véase a continuación para una descripción más detallada). Por otra parte, las diferencias observadas en el índice de cristalinidad (IC) obtenido de la espectroscopia Raman se relacionan específicamente con la cristalinidad asociada a la organización estructural de la red cristalina del apatito (170). Esta relación coincide con los parámetros de tamaño del cristalito determinados a partir de las medidas de difracción de Rayos X (XRD).

El análisis detallado de ATR-FTIR de las áreas integradas de las bandas de absorción del carbonato ($\nu_2 \text{CO}_3^{2-}$) y del fosfato ($\nu_1, \nu_3 \text{PO}_4^{3-}$) nos permitió determinar la disolución selectiva de los componentes minerales en el grupo de caries natural y en los grupos expuestos a CpH. En la banda del carbonato ($800\text{-}890 \text{ cm}^{-1}$), se observó una mayor disolución de los grupos de carbonatos inestables a favor de una mayor concentración relativa de carbonato de tipo A para los grupos de caries y de CpH. Esta disolución preferencial de las especies lábiles de carbonatos (866 cm^{-1}) está relacionada con una mayor solubilidad de estos grupos con respecto a las posiciones estructurales de tipo A y B (171). La banda de absorción más pronunciada de los grupos fosfato ($900\text{-}1200 \text{ cm}^{-1}$) en los espectros FTIR nos permitió analizar la distribución de los diferentes ambientes cristalinos de fosfato del apatito durante la disolución mediante CpH. Cabe destacar que las fases minerales asociadas a los tejidos mineralizados (*i.e.*, hueso y dientes) tienen muchas de las características del apatito poco cristalino (172). En esta investigación, la disolución diferencial de los modos vibracionales del fosfato puede deberse a la reorganización de posiciones moleculares lábiles o menos organizadas en la estructura cristalina, siendo similar entre el grupo de dentina cariada y los grupos de CpH. Además, la

disolución preferente de las fracciones más solubles del apatito y la metaestabilidad resultante pueden conducir a la formación de otras fases de fosfato cálcico con diferentes tasas de solubilidad. La solubilidad de los apatitos biológicos no estequiométricos se complica debido a la complejidad de su composición química y a los defectos reticulares de su estructura (173) que controlan la tasa de disolución de los fosfatos de diferentes ambientes cristalinos.

El análisis de los patrones de difracción de Rayos X bidimensionales (2D-XRD) de las muestras proporciona información detallada sobre la cristalinidad mineral relacionada con el tamaño del cristalito (*i.e.*, dominios cristalinos) de los cristales de apatito en la estructura dentinaria. En este trabajo se puede observar cómo los patrones 2Theta calculados (integrados en barridos XRD unidimensionales) muestran un ensanchamiento del pico altamente anisótropo (anchura a media altura, FWHM en inglés), dado que los cristales de bioapatito se desarrollan estructuralmente a lo largo del eje *c* (*i.e.*, correspondiente a la reflexión 002). Los resultados obtenidos indican una mayor disminución del tamaño del cristalito en el grupo cariado en comparación con el grupo de DS, con una reducción menor en los grupos de CpH. La solubilidad y el comportamiento de disolución del apatito estarán estrechamente relacionados con los parámetros subestructurales, ya que el tamaño del cristalito y las imperfecciones de la red determinan en gran medida la química del cristal (174,175). Estudios previos indicaron que la fracción mineral menos cristalina se elimina preferentemente en los minerales de hueso cortical durante la desmineralización inducida por ácidos (176). Además, estas variaciones de cristalinidad superficial se han propuesto previamente como una estimación aproximada del avance del frente de reacción por las variaciones inducidas por la desmineralización (174). También debe tenerse en cuenta que el efecto del aumento de la desmineralización subparcial en la superficie de la dentina resultó en un aumento del área de cristal superficial expuesta a la desmineralización, permitiendo que la extensión alterada pudiera progresar en profundidad. Durante esta disolución mineral, la estructura de colágeno puede servir de andamiaje para el crecimiento mineral, favoreciendo la precipitación de fases de fosfato cálcico, esencial para la remineralización de la dentina desmineralizada en los tratamientos clínicos.

A nivel morfológico, las imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) de la superficie de la dentina muestran diferencias significativas entre el grupo de dentina cariada y los grupos tratados con CpH. La caries natural presenta características como, una superficie irregular y el colapso de las zonas de colágeno, que el modelo químico de CpH no es capaz de simular. Para ello, otros estudios *in vitro* han empleado colagenasas en la solución remineralizadora (177) o han realizado un modelo microbiológico en el que las bacterias producen colagenasas (127)

con el objetivo de afectar a la matriz orgánica. En nuestra investigación, los grupos de CpH muestran una mayor apertura de los túbulos dentinarios en comparación con el grupo de DS debido al efecto de la desmineralización, coincidiendo con otros estudios que realizaron métodos artificiales similares para simular caries de dentina (127,178). Junto con esta mayor apertura de los túbulos dentinarios, las soluciones del CpH se pueden difundir más fácilmente, permitiendo un mayor avance en la profundidad del frente de disolución mineral con el tiempo de CpH. Además, también se observan túbulos ocluidos en la superficie dentinaria de los grupos de CpH, aunque en menor medida, debido a la deposición de cristales en el interior de los túbulos dentinarios (126,179). Los resultados obtenidos por energía dispersiva de Rayos X (EDX) son similares a los de otras investigaciones en las que los valores relativos de Ca y P fueron inferiores en la dentina desmineralizada con CpH respecto a la DS (180,181). El estudio de la relación entre los componentes inorgánicos y orgánicos a nivel subsuperficial puede proporcionar más información sobre la profundidad de la alteración durante los tratamientos con CpH.

Las imágenes de la tinción tricrómica de Masson (TTM) permiten estudiar la profundidad del frente de desmineralización con el tiempo de CpH. Los resultados de la TTM mostraron una sección transversal de la estructura de la dentina en la que se observaba un mayor grosor de la superficie desmineralizada (*i.e.*, la banda roja en la tinción con colágeno expuesto) en el ciclo de 28 días de CpH en comparación con el ciclo de 14 días de CpH. La falta de consistencia de las muestras de dentina cariada no permitió realizar las pruebas de TTM, aunque la progresión de esta alteración dependería directamente del tiempo de desarrollo de este proceso de desmineralización natural (182). Estos resultados demuestran cómo un procedimiento controlado de creación de lesiones artificiales puede conducir a una pérdida mineral subsuperficial y también permiten predecir las características químicas y estructurales de las lesiones inducidas. El mantenimiento de la estructura del colágeno mediante el protocolo de CpH puede contribuir a posteriores procedimientos dentales *in vitro* (*i.e.*, comportamiento de adhesión y sustancias de remineralización) que no son posibles con la desmineralización que se produce en la caries natural.

5.2 Fase de remineralización

La caries dental es una enfermedad dinámica que representa un importante problema de salud en los países industrializados según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (183). Cuando el proceso de desmineralización en la superficie dental excede los procesos de des-

remineralización que se dan normalmente entre las estructuras mineralizadas del diente y medio oral, las lesiones de caries dental comienzan a desarrollarse (184). A pesar de que en la actualidad el flúor (F) sigue siendo la terapia estándar para detener las lesiones de caries, se han desarrollado varios productos remineralizadores como alternativas para superar sus problemas de eficacia y seguridad. Estudios previos han demostrado que estos agentes promueven la remineralización (185), restauran la microdureza del esmalte y la dentina afectada por caries (186), e inhiben la desmineralización y la degradación del colágeno (177). La presente investigación pretendió evaluar el efecto de cuatro productos remineralizadores en la dentina (*i.e.*, solución de fluoruro de sodio al 0.2 %, fosfopéptido de caseína-fosfato de calcio amorfo, el péptido de autoensamblaje (PAE) P₁₁₋₄ y el péptido P₁₁₋₄ en combinación con monofluorofosfato de sodio) basándose en sus características composicionales a nivel molecular. Particularmente, en estudios *in vitro*, las terapias con NaF, fosfopéptido de caseína-fosfato de calcio amorfo (FPC-FCA) y P₁₁₋₄ han demostrado mejorar la fuerza adhesiva de las restauraciones sobre dentina desmineralizada artificialmente (75,136). Los productos antes mencionados han sido reportados como enfoques remineralizadores en varios estudios *in vitro*, con diferente composición y mecanismos de acción, por lo que se esperaba que muestren un proceso remineralizador diverso a nivel molecular, así como también, diferente eficacia. La información obtenida a partir de los análisis complementarios mediante la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) y Raman en este estudio, mostraron cambios en la composición química de la dentina en la que se aplicaron los cuatro productos remineralizadores con respecto a ambos controles: dentina sana (DS) (control negativo) y dentina sometida a ciclaje de pH a 28 días (CpH 28) (control positivo).

Los productos remineralizadores deberían evaluarse sobre una superficie cariada en condiciones ideales para así, conocer idóneamente sus posibles efectos *in vitro* en este sustrato. El desarrollo de un modelo que reproduzca las características de las estructuras dentales desmineralizadas, surge como necesidad debido a la complejidad del manejo de las lesiones cariosas naturales. A pesar de que se han desarrollado diversos métodos para crear lesiones similares a las de la caries (*e.g.*, microbiológico, estático y CpH), en esta investigación se empleó el CpH porque simula los ciclos de des-remineralización que se producen en la cavidad oral. En el CpH, los ciclos de desmineralización corresponden al tiempo que los tejidos dentales están expuestos a los ácidos bacterianos, mientras que los ciclos de remineralización corresponden al efecto remineralizador de la saliva (160). Para este estudio se consideró el tiempo de CpH a 28 días ya que en la fase de desmineralización se reveló que este produce lesiones más

profundas que el CpH a 14 días con características composicionales y microestructurales similares a la caries residual natural (obtenida por eliminación selectiva de caries a dentina firme/cuerosa). Los efectos del método CpH a los 28 días sobre la dentina se han explicado detalladamente en la fase de desmineralización (apartado 5.1).

En el presente estudio, los análisis detallados de ATR-FTIR revelaron que el carbonato de tipo B (871 cm^{-1}) del componente mineral de la dentina mostraron valores más elevados en NaF y en Curodont™ D'Sens (CD) con respecto al resto de agentes remineralizadores (*i.e.*, grupos de FPC-FCA y Curodont™ Repair). En un estudio previo, el pico principal de carbonato se localizó en la posición a 872 cm^{-1} en el espectro de IR tras aplicar NaF en esmalte primario humano desmineralizado, no siendo característico en los grupos experimentales tratados con fluoruro de fosfato acidulado y con fluoruro diamino de plata (187). Además, estos productos también muestran la presencia de picos de absorción definidos, en relación a diferentes bandas del carbonato, fosfato y grupos amidas, asociados con la incorporación de fluoruro en la red cristalina (187). Asimismo, la variable MinCO_3 obtenida mediante ATR-FTIR mostró valores inferiores, mientras que los análisis mediante espectroscopía Raman mostraron un aumento en la razón $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ para los grupos de productos remineralizadores (PR) cuando se compararon con los grupos de DS y CpH 28. En este aspecto cabe destacar que pueden existir dos vías para la sustitución de carbonatos en la composición mineral del apatito: *i*) a través de la sustitución de los grupos fosfato, que da lugar al carbonato tipo B y *ii*) sustituyendo los grupos hidroxilo, dando lugar al carbonato tipo A (188,189). Considerando que el apatito libre o con bajo contenido en carbonatos es menos soluble, los valores inferiores de la razón $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ (MinCO_3) para ATR-FTIR observados en los grupos de PR indicaron que se forma este tipo de variación composicional (*i.e.*, conjunto de sustituciones en carbonato A/B y lábil) en estas fases, en lugar del mineral original (previo a la desmineralización) (43). Por otro lado, el aumento de la razón $\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$ (particularmente, carbonato tipo B a fosfato) en la espectroscopía Raman indicó la presencia de minerales recién formados como reacción de los grupos de PR con la lesión de caries artificial, incluyendo preferentemente carbonato de tipo B en la red de apatito (188). Debido a la inexistencia de carbonato disponible en el ambiente oral, la incorporación de carbonato parece ocurrir exclusivamente durante el desarrollo del tejido mineralizado (190). En vista de que durante el proceso de CpH hay disolución mineral, el aumento de carbonato tipo B podría deberse a su retención en la red de apatito por acción de los PR, los cuales, además, incorporarían iones de Ca^{2+} en dicha vacante estructural.

En cuanto a los resultados obtenidos mediante ATR-FTIR para la banda $\nu_1, \nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ cuando se comparan los grupos de PR con los grupos de CpH 28 y DS, se observan características, tales como la desaparición del conjunto de picos a 940 cm^{-1} (modo de estiramiento de simetría $\nu_1 \text{P-O}$), a 960 cm^{-1} ($\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$) y a 989 cm^{-1} (PO_4^{3-} en el ambiente de apatito); y el desplazamiento del pico a 1096 cm^{-1} ($\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ en apatitos pobremente cristalinos) a 1092 cm^{-1} (apatitos estequiométricos). También se observa en los grupos de PR con respecto a los grupos de CpH 28 y DS, un aumento del pico a 1109 cm^{-1} (apatitos pobremente cristalinos) y la aparición del pico a 1123 cm^{-1} (HPO_4^{2-}) como consecuencia del efecto de los tratamientos remineralizadores, asociados a la formación de fosfatos de diferentes ambientes de cristalinidad. Asimismo, cabe señalar que los valores de fosfatos altamente cristalinos aumentaron igualmente en los PR. Esto concuerda con Zhang et al., que obtuvieron un aumento significativo del pico a 1026 cm^{-1} ($\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ en apatitos estequiométricos) en el tratamiento de dentina desmineralizada con una solución de NaF con 2 ppm de F⁻, que podría atribuirse a la formación de minerales Ca-P (191). Una investigación que tuvo como objetivo evaluar la remineralización del FPC-FCA combinado con tripolifosfato sódico ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) sobre dentina desmineralizada artificialmente, concluyó que el pico a 1025 cm^{-1} ($\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ en apatitos estequiométricos) es característico de la banda de absorción del PO_4^{3-} , indicando la completa remineralización de la dentina (192). La investigación de Tezvergil-Mutluay et al., encontró la banda de absorción más prominente a 1100 cm^{-1} ($\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ apatitos pobremente cristalinos) como consecuencia de la precipitación de fosfato cálcico mediante el uso de vidrio bioactivo rico en fosfato con fluoruro sobre dentina desmineralizada (193).

Los resultados obtenidos para el grado de mineralización y la razón $\text{PO}_4^{3-} / \text{CH}_2$ son similares para ATR-FTIR y Raman, respectivamente (*i.e.*, valores menores para los grupos de PR respecto a los grupos de DS y al CpH 28). Podemos suponer que esta disminución se debe a una menor deposición mineral en relación con el componente orgánico, manteniéndose inalterada su matriz orgánica a pesar del proceso de desmineralización por el CpH. Además, como se describió en la fase desmineralización, el CpH no afecta a los componentes orgánicos de la dentina, incluidas las bandas relacionadas con los grupos amida (161). Debe tenerse en cuenta que el tiempo de remineralización fue de 24 h (solución remineralizadora) para recrear un entorno ideal de remineralización en una fase temprana con una única aplicación previa de los PR. Los cambios químicos que se producen en la remineralización temprana de la dentina (30 min) se han estudiado mediante la utilización de *i)* clorhexidina, *ii)* saliva artificial, *iii)* solución de PO_4^{3-} , *iv)* solución de Cl_2Zn y *v)* solución de ZnO, lo que produjo un aumento de los

componentes minerales (194). En un entorno clínico, la saliva está fácilmente disponible para la remineralización, sin embargo, en un entorno *in vitro*, las diferentes formulaciones de saliva simulada pueden influir en la remineralización de la dentina (194,195). Nuestro estudio empleó una formulación de saliva basada en Jenkins que ha demostrado una remineralización óptima en la dentina (194,195), aunque aparentemente no se consiguen los niveles de precipitación o formación mineral de la estructura dental sana asociada al componente orgánico.

El aumento notable del índice de cristalinidad (IC) para ATR-FTIR (razón $1030\text{ cm}^{-1} / 1020\text{ cm}^{-1}$) se debe a incorporación de elementos en la red de apatito por parte de los PR y está relacionado con la madurez del cristal (169). Lo anteriormente nombrado se ve apoyado por el aumento del área de la banda de fosfatos ($985\text{-}1145\text{ cm}^{-1}$), especialmente, los fosfatos altamente cristalinos con respecto a los de menor cristalinidad. Por otro lado, el IC de la espectroscopía Raman considera la distorsión reticular en los cristales de fosfato, sin estar influenciado por la cantidad general de grupos fosfato (161). En este sentido, valores elevados de la anchura a media altura (en inglés, FWHM) a 959 cm^{-1} significan menor madurez cristalográfica y cristalinidad en los minerales (196). Por lo tanto, nuestros resultados de IC proporcionados por la espectroscopía Raman indicaron altas características de madurez y cristalinidad en la dentina remineralizada por el NaF, el FPC-FCA, el CD y el Curodont™ Repair (CR), ya que los picos más estrechos a 959 cm^{-1} sugieren una menor variación estructural en las distancias y ángulos de enlace (más cristalino) (197), también en relación con la diferencia entre las proporciones de apatito asociados a ambientes de alta y pobremente cristalinos observados mediante ATR-FTIR.

Las interacciones del F^- (*i.e.*, NaF y monofluorofosfato de sodio) con el apatito explicarían sus efectos sobre la dentina desmineralizada observados en este estudio. Estas interacciones pueden ocurrir de la siguiente manera (198): *i*) a través del intercambio de iones F^- por iones OH^- , *ii*) mediante el crecimiento cristalino de fluorapatito (FAp) a partir de soluciones sobresaturadas y *iii*) a través de la disolución de apatito con formación de CaF_2 . El porcentaje de sustituciones de iones fluoruro determinará si el producto es FAp ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) (se sustituyen totalmente los iones OH^-) o fluorohidroxiapatito ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{F}_{2x}$, $0 < x < 1$) (se sustituye parcialmente a los iones OH^-). La formación exclusiva de FAp no es deseable debido a que no posee propiedades biológicas adecuadas (199,200). Además, la obtención de FAp puro es difícil de conseguir en una situación clínica (200). El fluoruro se adsorbe en la superficie del apatito desmineralizado y atrae a los iones Ca^{2+} . También se ha demostrado que el F^- actúa como catalizador para la adición de iones de PO_4^{3-} y Ca^{2+} en la red cristalina,

permitiendo el crecimiento de apatito (201). Además, el F⁻ puede actuar como reservorio de fluoruro y calcio mediante la formación de glóbulos de CaF₂. Estos glóbulos se forman en concentraciones de F⁻ superiores a 100 ppm, inicialmente, por una ligera disolución del apatito que permite liberar iones de Ca²⁺, los cuales reacciona con el F⁻, formando los glóbulos de CaF₂ que se depositarían en la superficie de los tejidos dentales y porosidades provocadas por el CpH (43,198). El efecto del F⁻ se ve a su vez influenciado por la presencia y estructura de matriz orgánica del tejido. Dado que el CpH preserva la matriz orgánica desmineralizada, el efecto F⁻ no disminuye. Esto está respaldado por un estudio *in vitro* en el que el NaF redujo la pérdida de tejido dental en un 60% cuando no se eliminó la matriz orgánica (202).

La remineralización biomimética simula el proceso de regulación que lleva a cabo el componente no colágeno en la dentina (192). El FPC es un péptido bioactivo que estabiliza el CaPO₄ en una solución metaestable, facilitando altas concentraciones de iones Ca²⁺ y PO₄³⁻, incluyendo CaHPO₄ (57). El FPC también mantiene las altas actividades de los iones Ca²⁺ y PO₄³⁻ libres durante la remineralización a través del depósito de FCA asociado. Además, en el proceso de remineralización, existe una difusión de CaHPO₄ y de iones Ca²⁺ y PO₄³⁻ a través de los poros llenos de proteínas y agua de la lesión cariosa inducida por el CpH. Estos iones Ca²⁺ y PO₄³⁻ en el cuerpo de la lesión cariosa, por disociación, aumentarían la reactividad química de Ca²⁺ y PO₄³⁻ formando HAp (57) y mejorando la cristalinidad (203).

Un enfoque prometedor y alternativo a las actuales estrategias biomiméticas para el tratamiento de las lesiones cariosas es el PAE P₁₁₋₄. Se han empleado técnicas espectroscópicas como la FTIR para caracterizar la formación de la matriz de fibras del P₁₁₋₄. La banda de absorción a 1644 cm⁻¹ en el espectro FTIR es característica del P₁₁₋₄ monomérico, mientras que una banda de absorción a 1616 cm⁻¹ se presenta en la forma fibrilar del P₁₁₋₄ (76). Los resultados obtenidos mediante espectroscopía en este estudio apoyan que una sola aplicación del P₁₁₋₄ es capaz de producir cambios composicionales en la lesión de caries inducida por el CpH. Cabe señalar que los efectos del P₁₁₋₄ sobre la dentina se han estudiado en pocas investigaciones, las cuales se han enfocado en la fuerza de adhesión y en la interacción con el colágeno. Parece ser que los agentes biomineralizadores logran una efectiva remineralización de la dentina, reponiendo los componentes minerales tanto en el colágeno extrafibrilar como en el intrafibrilar (204). Siendo así, los resultados expuestos por de Sousa et al., (138) son relevantes ya que mostraron que el P₁₁₋₄ aumenta la resistencia de las fibras de colágeno tipo I frente a la actividad proteolítica de las colagenasas. Además, se ha demostrado que diferentes concentraciones de P₁₁₋₄ inducen la deposición mineral, siendo mayor en 1 µg/mL del péptido

que en 0.5 µg/mL (205). Debido a que Curodont™ Repair tiene 10 mg/mL, se esperaría una mayor remineralización por parte esta presentación comercial. El mecanismo de acción del péptido P₁₁₋₄ radica en la formación de una matriz 3D que atraería iones Ca²⁺ y sería capaz de nuclear HAp *de novo* (76). Debido a que la remineralización y la eficacia del P₁₁₋₄ depende del contenido mineral de la saliva (entorno *in vivo*), la solución remineralizadora empleada en este estudio, proporciona al PAE P₁₁₋₄ los iones necesarios que le permitirían la formación de HAp *de novo*. Los resultados del ensayo clínico realizado por Brunton et al., (13) concluyen que una sola aplicación se asocia con una regeneración significativa del esmalte. Por otro lado, la investigación *in vitro* realizada por Kirkham et al., indicó que una sola aplicación de P₁₁₋₄ (5 mg/mL) sobre una lesión artificial de caries en el esmalte y posteriormente, sometida a CpH durante 5 días, resultó en una ganancia mineral neta, apoyando la formación de HAp (81). Con respecto al CD, este producto está indicado para el tratamiento de la hipersensibilidad dentinaria, siendo el primer producto basado en PAEs diseñado para este fin. Hasta ahora, solo un estudio *in vitro* ha documentado efectos significativos del CD sobre la oclusión tubular (206). Aunque una investigación reciente *in vivo* demostró que el CD es eficaz en la reducción de la hipersensibilidad dentinaria (207), el presente estudio se interesó por su potencial remineralizador, principalmente por la presencia del PAE P₁₁₋₄ combinado con monofluorofosfato de sodio (MFFS). Debido a que el CD tiene F⁻ (MFFS) disponible en su composición y sitios de unión a Ca²⁺ proporcionados por el PAE P₁₁₋₄, se espera la formación de HAp *de novo* por acción combinada de P₁₁₋₄ y F⁻. La información proporcionada por las técnicas espectroscópicas empleadas en la presente investigación, reveló que las características composicionales de la dentina tratada con el PAE P₁₁₋₄ son similares a las de la dentina tratada con NaF y con FPC-FCA. Es importante considerar que los resultados de este estudio pueden diferir de la situación *in vivo*. Debido a las similitudes composicionales (relacionadas con la remineralización) del P₁₁₋₄ con los otros productos evaluados, parece adecuado para su uso en procedimientos clínicos sobre caries dentinaria (*e.g.*, tratamientos restauradores). Por ello, se recomienda la realización de estudios *in vivo* sobre este sustrato.

6 Conclusiones

1. El ciclaje de pH (CpH) produce lesiones cariosas en dentina con características composicionales, microestructurales y morfológicas similares a las presentes en caries residual natural, tales como la disminución del contenido mineral y del tamaño del cristalito, cambios en la cristalinidad, y una apertura extensa de algunos túbulos dentinales.
2. El CpH es un método químico-dinámico adecuado para la simulación de caries en dentina. Entre los tiempos experimentales de ejecución considerados (14 y 28 días), el CpH a 28 días produce lesiones de mayor profundidad, manteniendo la estructura del colágeno de la dentina.
3. Los productos remineralizadores (PR) evaluados: solución de fluoruro de sodio al 0.2% (NaF), fosfopéptido de caseína-fosfato de calcio amorfo (FPC-FCA), péptido de autoensamblaje (PAE) P₁₁₋₄ y PAE P₁₁₋₄ en combinación con monofluorofosfato de sodio (MFFS) producen cambios composicionales a nivel molecular en la dentina previamente desmineralizada mediante CpH.
4. Los PR demostraron inducir cambios similares (*e.g.*, deposición mineral y alteraciones en la cristalinidad) en la dentina tras su aplicación e inmersión en solución remineralizadora por 24 h, observables a nivel químico mediante técnicas analíticas complementarias basadas en la espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier-Reflectancia total atenuada (ATR-FTIR) y Raman.
5. Los resultados analíticos muestran como el PAE P₁₁₋₄ (Curodont™ D'Senz y Curodont™ Repair), produce cambios composicionales en la caries residual artificial (dentina desmineralizada con CpH a 28 días) similares a la terapia estándar con F⁻.

7 Referencias

1. Nanci A. Structure of the oral tissues. In: Nanci A, editor. *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function*. 9th ed. St. Louis, MO, USA: Elsevier; 2018. p. 1–11.
2. Nanci A. Development of the tooth and its supporting tissues. In: Nanci A, editor. *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function*. 9th ed. St. Louis, MO, USA: Elsevier; 2018. p. 68–90.
3. de La Dure-Molla M, Fournier BP, Manzanares MC, Acevedo AC, Hennekam RC, Friedlander L, et al. Elements of morphology: Standard terminology for the teeth and classifying genetic dental disorders. *Am J Med Genet A*. 2019;179(10):1913–81.
4. Skucha-Nowak M, Gibas M, Tanasiewicz M, Twardawa H, Szklarski T. Natural and controlled demineralization for study purposes in minimally invasive dentistry. *Adv Clin Exp Med*. 2015;24(5):891–8.
5. Curzon M, Featherstone JDB. Chemical composition of enamel. In: Lazari E, Levy B, editors. *CRC handbook of experimental aspects of oral biochemistry*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 1983. p. 123–34.
6. Kay MI, Young RA, Posner AS. Crystal structure of hydroxyapatite. *Nature*. 1964;204:1050–2.
7. Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML. Dental enamel formation and implications for oral health and disease. *Physiol Rev*. 2017;97(3):939–93.
8. Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Strafford S, Wood SR, Kirkham J. The chemistry of enamel caries. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(4):481–95.
9. Nanci A. Enamel: composition, formation and structure. In: Nanci A, editor. *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function*. 9th ed. St. Louis, MO, USA: Elsevier; 2018. p. 118–56.
10. Boyde A. Enamel. In: Oksche A, Vollrat L, editors. *Handbook of microscopic anatomy*. Berlin: Springer Verlag; 1989.
11. Ichijo T, Yamashita Y, Terashima T. Observations on the structural features and characteristics of biological apatite crystals. 2: Observation on the ultrastructure of human enamel crystals. *Bull Tokyo Med Dent Univ*. 1992;39(4):71–80.
12. Elliott JC. *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier; 1994.
13. Brunton PA, Davies RPW, Burke JL, Smith A, Aggeli A, Brookes SJ, et al. Treatment of early caries lesions using biomimetic self-assembling peptides-a clinical safety trial. *Br Dent J*. 2013;215(4):E6.
14. Carlson SJ. Vertebrate dental structures. In: Carter JG, editor. *Skeletal biomineralization: patterns, processes and evolutionary trends Volume 1*. 1st ed. New York, United States: Van Nostrand; 1990. p. 531–56.

15. Pashley DH. Dentin: a dynamic substrate--a review. *Scanning Microsc.* 1989;3(1):161–74; discussion 174-76.
16. Fuentes Fuentes MV. Propiedades mecánicas de la dentina humana. *Av Odontostomatol.* 2004;20(2):79–83.
17. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Prim.* 2017;3:17030.
18. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):95–108.
19. Machiulskiene V, Campus G, Carvalho JC, Dige I, Ekstrand KR, Jablonski-Momeni A, et al. 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. Pretty IA. Caries detection and diagnosis: novel technologies. *J Dent.* 2006;34(10):727–39.
21. Mount GJ, Hume WR. Preservation and restoration of tooth structure. 2nd ed. Sandgate, Queensland: Knowledge Books and Software, 2005.; 2005.
22. Baca García P, Baca García A, Maestre Vera JR. Microbiología de la caries. In: Liébana Ureña J, editor. *Microbiología Oral.* 2nd ed. McGraw-Hill / Interamericana de España, S.A; 2002. p. 561–70.
23. Takahashi N. Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *Int Congr Ser.* 2005;1284:103–12.
24. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet.* 2007;369(9555):51–9.
25. Femiano F, Femiano R, Femiano L, Jamilian A, Rullo R, Perillo L. Dentin caries progression and the role of metalloproteinases: an update. *Eur J Paediatr Dent.* 2016;17(3):243–7.
26. Pitts NB, Ekstrand KR, ICDAS Foundation. International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and its International Caries Classification and Management System (ICCMS) - methods for staging of the caries process and enabling dentists to manage caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2013;41(1):e41–52.
27. Marcenes W, Kassebaum NJ, Bernabé E, Flaxman A, Naghavi M, Lopez A, et al. Global burden of oral conditions in 1990-2010: a systematic analysis. *J Dent Res.* 2013;92(7):592–7.
28. Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Laverty D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. *J Clin Periodontol.* 2017;44(Suppl 18):S94–105.
29. Montero J, Rosel E, Barrios R, López-Valverde A, Albaladejo A, Bravo M. Oral health-related quality of life in 6- to 12-year-old schoolchildren in Spain. *Int J Paediatr Dent.* 2016;26(3):220–30.
30. White DA, Tsakos G, Pitts NB, Fuller E, Douglas GVA, Murray JJ, et al. Adult Dental Health Survey 2009: common oral health conditions and their impact on the

- population. *Br Dent J*. 2012;213(11):567-72.
31. Ehrlich H, Koutsoukos PG, Demadis KD, Pokrovsky OS. Principles of demineralization: Modern strategies for the isolation of organic frameworks. Part I. Common definitions and history. *Micron*. 2008;39(8):1062-91.
 32. Bertassoni LE, Habelitz S, Kinney JH, Marshall SJ, Marshall. Jr. GW. Biomechanical perspective on the remineralization of dentin. *Caries Res*. 2009;43(1):70-7.
 33. Gebauer D, Raiteri P, Gale JD, Cölfen H. On classical and non-classical views on nucleation. *Am J Sci*. 2018;318(9):969-88.
 34. Niu LN, Zhang W, Pashley DH, Breschi L, Mao J, Chen JH, et al. Biomimetic remineralization of dentin. *Dent Mater*. 2014;30(1):77-96.
 35. Liu Y, Mai S, Li N, Yiu CK, Mao J, Pashley DH, et al. Differences between top-down and bottom-up approaches in mineralizing thick, partially-demineralized collagen scaffolds. *Acta Biomater*. 2011;7(4):1742-51.
 36. Kim J, Arola DD, Gu L, Kim YK, Mai S, Liu Y, et al. Functional biomimetic analogs help remineralize apatite-depleted demineralized resin-infiltrated dentin via a bottom-up approach. *Acta Biomater*. 2010;6(7):2740-50.
 37. He L, Hao Y, Zhen L, Liu H, Shao M, Xu X, et al. Biomineralization of dentin. *J Struct Biol*. 2019;207(2):115-22.
 38. Lynch RJ, Smith SR. Remineralization agents - new and effective or just marketing hype? *Adv Dent Res*. 2012;24(2):63-7.
 39. O'Mullane DM, Baez RJ, Jones S, Lennon MA, Petersen PE, Rugg-Gunn AJ, et al. Fluoride and oral health. *Community Dent Health*. 2016;33(2):69-99.
 40. Pessan JP, Toumba KJ, Buzalaf MAR. Topical use of fluorides for caries control. *Monogr Oral Sci*. 2011;22:115-32.
 41. Axelsson P. Use of fluorides. In: Axelsson P, editor. *Preventive Materials, Methods, and Programs*. 1st ed. Quintessence Publishing (IL); 2004. p. 263-8.
 42. Featherstone JDB. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1999;27(1):31-40.
 43. Buzalaf MAR, Pessan JP, Honório HM, ten Cate JM. Mechanisms of action of fluoride for caries control. *Monogr Oral Sci*. 2011;22:97-114.
 44. Arends J, Christoffersen J. Nature and role of loosely bound fluoride in dental caries. *J Dent Res*. 1990;69(2 Suppl):601-5.
 45. Marquis RE, Clock SA, Mota-Meira M. Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;26(5):493-510.
 46. Koo H. Strategies to enhance the biological effects of fluoride on dental biofilms. *Adv Dent Res*. 2008;20(1):17-21.
 47. Svensäter G, Sjögreen B, Hamilton IR. Multiple stress responses in *Streptococcus mutans* and the induction of general and stress-specific proteins. *Microbiology*. 2000;146(Pt 1):107-17.

48. Goldman AS, Yee R, Holmgren CJ, Benzian H. Global affordability of fluoride toothpaste. *Global Health*. 2008;4:7.
49. Twetman S. Caries prevention with fluoride toothpaste in children: an update. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2009;10(3):162–7.
50. Walsh T, Worthington HV, Glenny AM, Marinho VC, Jeronic A. Fluoride toothpastes of different concentrations for preventing dental caries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;3(3):CD007868.
51. Bratthall D, Hänsel-Petersson G, Sundberg H. Reasons for the caries decline: what do the experts believe? *Eur J Oral Sci*. 1996;104(4 (Pt 2)):416–22.
52. Newbrun E. Evolution of professionally applied topical fluoride therapies. *Compend Contin Educ Dent*. 1999;20(Suppl 1):5–9.
53. Marinho VC, Chong LY, Worthington HV, Walsh T. Fluoride mouthrinses for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;7(7):CD002284.
54. Gupta N, Mohan Marya C, Nagpal R, Singh Oberoi S, Dhingra C. A review of casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate (CPP-ACP) and enamel remineralization. *Compend Contin Educ Dent*. 2016;37(1):36–9; quiz 40.
55. Gurunathan D, Somasundaram S, Kumar SA. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: a remineralizing agent of enamel. *Aust Dent J*. 2012;57(4):404–8.
56. Aimutis WR. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *J Nutr*. 2004;134(4):989S–995S.
57. Reynolds EC. Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J Dent Res*. 1997;76(9):1587–95.
58. Gupta R, Prakash V. CPP-ACP complex as a new adjunctive agent for remineralisation: a review. *Oral Health Prev Dent*. 2011;9(2):151–65.
59. Castellanos JE, Marín LM, Úsuga MV, Castiblanco GA, Martignon S. La remineralización del esmalte bajo el entendimiento actual de la caries dental [Enamel remineralization under the current caries understanding]. *Univ Odontol*. 2013;32(69):49–59.
60. Cross KJ, Huq NL, Reynolds EC. Casein phosphopeptides in oral health--chemistry and clinical applications. *Curr Pharm Des*. 2007;13(8):793–800.
61. Reynolds EC. Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides: a review. *Spec Care Dentist*. 1998;18(1):8–16.
62. Vacca-Smith AM, Van Wuyckhuysse BC, Tabak LA, Bowen WH. The effect of milk and casein proteins on the adherence of *Streptococcus mutans* to saliva-coated hydroxyapatite. *Arch Oral Biol*. 1994;39(12):1063–9.
63. Schüpbach P, Neeser JR, Golliard M, Rouvet M, Guggenheim B. Incorporation of caseinoglycomacropptide and caseinophosphopeptide into the salivary pellicle inhibits adherence of mutans streptococci. *J Dent Res*. 1996;75(10):1779–88.
64. Philip N, Walsh L. The potential ecological effects of casein phosphopeptide-amorphous

- calcium phosphate in dental caries prevention. *Aust Dent J*. 2019;64(1):66–71.
65. Rose RK. Binding characteristics of *Streptococcus mutans* for calcium and casein phosphopeptide. *Caries Res*. 2000;34(5):427–31.
 66. Rose RK. Effects of an anticariogenic casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaques. *Arch Oral Biol*. 2000;45(7):569–75.
 67. Cochrane NJ, Cai F, Huq NL, Burrow MF, Reynolds EC. New approaches to enhanced remineralization of tooth enamel. *J Dent Res*. 2010;89(11):1187–97.
 68. Trombe MC, Clavé C, Manias JM. Calcium regulation of growth and differentiation in *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol*. 1992;138(1):77–84.
 69. Zhang S. Discovery and design of self-assembling peptides. *Interface Focus*. 2017;7(6):20170028.
 70. Dawasaz AA, Togoo RA, Mahmood Z, Azlina A, Ponnuraj KT. Effectiveness of self-assembling peptide (P11-4) in dental hard tissue conditions: a comprehensive review. *Polymers (Basel)*. 2022;14(4):792.
 71. Aggeli A, Bell M, Boden N, Carrick LM, Strong AE. Self-assembling peptide polyelectrolyte β -sheet complexes form nematic hydrogels. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2003;42(45):5603–6.
 72. Kyle S, Aggeli A, Ingham E, McPherson MJ. Recombinant self-assembling peptides as biomaterials for tissue engineering. *Biomaterials*. 2010;31(36):9395–405.
 73. Alkilzy M, Splieth CH. Self-assembling peptides for caries prevention and treatment of initial carious lesions, a review. *Dtsch Zahnärztl Z Int*. 2020;2(1):21–5.
 74. Alkilzy M, Tarabaih A, Santamaria RM, Splieth CH. Self-assembling peptide P₁₁₋₄ and fluoride for regenerating enamel. *J Dent Res*. 2018;97(2):148–54.
 75. Barbosa-Martins LF, de Sousa JP, de Castilho ARF, Puppini-Rontani J, Davies RPW, Puppini-Rontani RM. Enhancing bond strength on demineralized dentin by pre-treatment with selective remineralising agents. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2018;81:214–21.
 76. Kind L, Stevanovic S, Wuttig S, Wimberger S, Hofer J, Müller B, et al. Biomimetic remineralization of carious lesions by self-assembling peptide. *J Dent Res*. 2017;96(7):790–7.
 77. Aggeli A, Bell M, Carrick LM, Fishwick CW, Harding R, Mawer PJ, et al. pH as a trigger of peptide β -sheet self-assembly and reversible switching between nematic and isotropic phases. *J Am Chem Soc*. 2003;125(32):9619–28.
 78. Aggeli A, Nyrkova IA, Bell M, Harding R, Carrick L, McLeish TC, et al. Hierarchical self-assembly of chiral rod-like molecules as a model for peptide β -sheet tapes, ribbons, fibrils, and fibers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(21):11857–62.
 79. Bonchev A, Vasileva R, Dyulgerova E, Yantcheva S. Self-assembling peptide P₁₁₋₄: a biomimetic agent for enamel remineralization. *Int J Pept Res Ther*. 2021;27(2):899–907.
 80. Carrick LM, Aggeli A, Boden N, Fisher J, Ingham E, Waigh TA. Effect of ionic strength on

- the self-assembly, morphology and gelation of pH responsive β -sheet tape-forming peptides. *Tetrahedron*. 2007;63(31):7457–67.
81. Kirkham J, Firth A, Vernals D, Boden N, Robinson C, Shore RC, et al. Self-assembling peptide scaffolds promote enamel remineralization. *J Dent Res*. 2007;86(5):426–30.
 82. Alkilzy M, Santamaria RM, Schmoeckel J, Splieth CH. Treatment of carious lesions using self-assembling peptides. *Adv Dent Res*. 2018;29(1):42–7.
 83. Suda S, Takamizawa T, Takahashi F, Tsujimoto A, Akiba S, Nagura Y, et al. Application of the self- assembling peptide P11-4 for prevention of acidic erosion. *Oper Dent*. 2018;43(4):E166–72.
 84. Lena Sezici Y, Yetkiner E, Aykut Yetkiner A, Eden E, Attin R. Comparative evaluation of fluoride varnishes, self-assembling peptide-based remineralization agent, and enamel matrix protein derivative on artificial enamel remineralization in vitro. *Prog Orthod*. 2021;22(1):4.
 85. Paris S, Hopfenmuller W, Meyer-Lueckel H. Resin infiltration of caries lesions: an efficacy randomized trial. *J Dent Res*. 2010;89(8):823–6.
 86. Smith BC. *Fundamentals of fourier transform infrared spectroscopy*. 2nd ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 2011. 1–183 p.
 87. Larkin PJ. *Infrared and Raman spectroscopy. Principles and spectral interpretation*. 1st ed. Elsevier; 2011. 1–230 p.
 88. Lopes C de CA, Limiro PHJO, Novais VR, Dechichi P. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) application chemical characterization of enamel, dentin and bone. *Appl Spectrosc Rev*. 2018;53(9):747–69.
 89. Stuart BH. Experimental methods. In: *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*. John Wiley & Sons; 2004. p. 15–44.
 90. Blum MM, John H. Historical perspective and modern applications of Attenuated Total Reflectance - Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR). *Drug Test Anal*. 2012;4(3–4):298–302.
 91. Griffiths PR, de Haseth JA. *Fourier transform infrared spectrometry*. 2nd ed. New York, NY, USA: John Wiley & Sons; 2007. 1–560 p.
 92. Wang R, Wang Y. Fourier transform infrared spectroscopy in oral cancer diagnosis. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1206.
 93. Chen Y, Zou C, Mastalerz M, Hu S, Gasaway C, Tao X. Applications of micro-Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in the geological sciences--A review. *Int J Mol Sci*. 2015;16(12):30223–50.
 94. Liceo AGB. Espectroscopía infrarrojo. Modos de vibración molecular [Internet]. 2018. Available from: <https://www.liceoagb.es/quimiorg/ir2.html>
 95. Kazarian SG, Chan KL. ATR-FTIR spectroscopic imaging: recent advances and applications to biological systems. *Analyst*. 2013;138(7):1940–51.
 96. METTLER TOLEDO AutoChem. What is ATR? (Attenuated Total Reflectance) - METTLER TOLEDO - EN [Internet]. 2020. Available from:

<https://www.youtube.com/watch?v=QW2uh1BQuGw>

97. Krafft C, Sergo V. Biomedical applications of Raman and infrared spectroscopy to diagnose tissues. *Spectroscopy*. 2006;20:195–218.
98. Ramakrishnaiah R, Ur Rehman G, Basavarajappa S, Al Khuraif AA, Durgesh BH, Khan AS, et al. Applications of Raman spectroscopy in dentistry: analysis of tooth structure. *Appl Spectrosc Rev*. 2015;50(4):332–50.
99. Ferraro JR, Nakamoto K, Brown CW. Basic theory. In: *Introductory Raman spectroscopy*. 2nd ed. San Diego, CA, USA: Academic Press; 2003. p. 1–94.
100. Kaur H. *Instrumental methods of chemical analysis*. 6th ed. Meerut, India: Pragati Prakashan; 2010.
101. Das RS, Agrawal YK. Raman spectroscopy: recent advancements, techniques and applications. *Vib Spectrosc*. 2011;57(2):163–76.
102. Jones RR, Hooper DC, Zhang L, Wolverson D, Valev VK. Raman techniques: fundamentals and frontiers. *Nanoscale Res Lett*. 2019;14(1):231.
103. Saletnik A, Saletnik B, Puchalski C. Raman method in identification of species and varieties, assessment of plant maturity and crop quality — a review. *Molecules*. 2022;27(14):4454.
104. METTLER TOLEDO AutoChem. What is Raman Spectroscopy | Overview Video [Internet]. 2022. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=hue2TrYXY54>
105. Ferraro JR, Nakamoto K, Brown CW. Instrumentation and experimental techniques. In: *Introductory Raman spectroscopy*. 2nd ed. San Diego, CA, USA: Academic Press; 2003. p. 95–146.
106. Bruker Corporation. Raman basics | Principles of Raman spectroscopy | 7 minute tutorial [Internet]. 2022. Available from: https://www.youtube.com/watch?v=CvZ1N0ELanQ&list=RDCMUCRExIYvszBLIR-eyJB3f5rZg&start_radio=1&t=247s
107. Goodyear SR, Aspden RM. Raman microscopy and bone. In: Idris AI, editor. *Bone Research Protocols*. 3rd ed. New York, NY, USA: Humana Press; 2019. p. 651–9.
108. Aaron Celestian. Raman spectroscopy [Internet]. 2019. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=nQxeDtjnDhU>
109. Bunaciu AA, Udriștioiu EG, Aboul-Enein HY. X-Ray diffraction: instrumentation and applications. *Crit Rev Anal Chem*. 2015;45(4):289–99.
110. Veselinović L, Karanović L, Stojanović Z, Bračko I, Marković S, Ignjatović N, et al. Crystal structure of cobalt-substituted calcium hydroxyapatite nanopowders prepared by hydrothermal processing. *J Appl Crystallogr*. 2010;43:320–7.
111. Mitić Ž, Stolić A, Stojanović S, Najman S, Ignjatović N, Nikolić G, et al. Instrumental methods and techniques for structural and physicochemical characterization of biomaterials and bone tissue: a review. *Mater Sci Eng C*. 2017;79:930–49.
112. Zhao IS, Mei ML, Li QL, Lo ECM, Chu CH. Arresting simulated dentine caries with adjunctive application of silver nitrate solution and sodium fluoride varnish: an *in vitro*

- study. *Int Dent J*. 2017;67(4):206–14.
113. Connolly JR. *Introduction to X-Ray powder diffraction*. Spring; 2007.
 114. piofile. X-ray diffraction analysis: 2theta-theta and GIXRD scan [Internet]. 2021. Available from: <https://www.youtube.com/watch?v=HrWT2M63DbU>
 115. House KL, Pan L, O'Carroll DM, Xu S. Applications of scanning electron microscopy and focused ion beam milling in dental research. *Eur J Oral Sci*. 2022;130(2):e12853.
 116. Altawell N. Machine olfaction device nanostructure coating. In: *Introduction to machine olfaction devices*. 1st ed. Academic Press; 2021. p. 139–57.
 117. Rolf Grieseler. Microscopía electrónico de barrido [Internet]. 2020. Available from: https://www.youtube.com/watch?v=u_ls2KHibM8
 118. Kannan M. *Scanning Electron Microscopy: principle, components and applications*. In: *A textbook on fundamentals and applications of nanotechnology*. Daya Publishing House; 2018. p. 81–92.
 119. Subramani K, Ahmed W, editors. *Emerging nanotechnologies in dentistry*. 2nd ed. Elsevier; 2017.
 120. Kiernan JA. Methods for connective tissue. In: *Histological and histochemical methods. Theory and practice*. 5th ed. Scion Publishing Ltd; 2015. p. 184–204.
 121. Zheng L, Hilton JF, Habelitz S, Marshall SJ, Marshall GW. Dentin caries activity status related to hardness and elasticity. *Eur J Oral Sci*. 2003 Jun;111(3):243–52.
 122. Lenzi TL, Soares FZM, Tedesco TK, Rocha R de O. Is it possible to induce artificial caries-affected dentin using the same protocol to primary and permanent teeth? *J Contemp Dent Pract*. 2015;16(8):638–42.
 123. Scholtanus JD, Purwanta K, Dogan N, Kleverlaan CJ, Feilzer AJ. Microtensile bond strength of three simplified adhesive systems to caries-affected dentin. *J Adhes Dent*. 2010;12(4):273–8.
 124. Shibata S, Vieira LCC, Baratieri LN, Fu J, Hoshika S, Matsuda Y, et al. Evaluation of microtensile bond strength of self-etching adhesives on normal and caries-affected dentin. *Dent Mater J*. 2016;35(2):166–73.
 125. Schwendicke F, Dörfer CE, Paris S. Incomplete caries removal: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res*. 2013;92(4):306–14.
 126. Erhardt MC, Rodrigues JA, Valentino TA, Ritter AV, Pimenta LA. In vitro μ TBS of one-bottle adhesive systems: sound versus artificially-created caries-affected dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;86(1):181–7.
 127. Marquezan M, Corrêa FNP, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC, et al. Artificial methods of dentine caries induction: a hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol*. 2009;54(12):1111–7.
 128. Schwendicke F, Eggers K, Meyer-Lueckel H, Dörfer C, Kovalev A, Gorb S, et al. In vitro induction of residual caries lesions in dentin: Comparative mineral loss and nano-hardness analysis. *Caries Res*. 2015;49(3):259–65.

129. Marinho VC. Cochrane reviews of randomized trials of fluoride therapies for preventing dental caries. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2009;10(3):183–91.
130. Grandjean P, Landrigan PJ. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol*. 2014;13(3):330–8.
131. Philip N. State of the art enamel remineralization systems: the next frontier in caries management. *Caries Res*. 2019;53(3):284–95.
132. Do LG, Spencer AJ. Risk-benefit balance in the use of fluoride among young children. *J Dent Res*. 2007;86(8):723–8.
133. Amaechi BT, van Loveren C. Fluorides and non-fluoride remineralization systems. *Monogr Oral Sci*. 2013;23:15–26.
134. Reynolds EC. Calcium phosphate-based remineralization systems: scientific evidence? *Aust Dent J*. 2008;53(3):268–73.
135. Rahiotis C, Vougiouklakis G. Effect of a CPP-ACP agent on the demineralization and remineralization of dentine in vitro. *J Dent*. 2007;35(8):695–8.
136. Barbosa-Martins LF, de Sousa JP, Alves LA, Davies RPW, Puppim-Rontanti RM. Biomimetic mineralizing agents recover the micro tensile bond strength of demineralized dentin. *Materials (Basel)*. 2018;11(9):1733.
137. Moreira KM, Bertassoni LE, Davies RP, Joia F, Höfling JF, Nascimento FD, et al. Impact of biomineralization on resin/biomineralized dentin bond longevity in a minimally invasive approach: an “in vitro” 18-month follow-up. *Dent Mater*. 2021;37(5):e276–89.
138. de Sousa JP, Carvalho RG, Barbosa-Martins LF, Torquato RJS, Mugnol KCU, Nascimento FD, et al. The self-assembling peptide P₁₁-4 prevents collagen proteolysis in dentin. *J Dent Res*. 2019;98(3):347–54.
139. Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H, et al. The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2007;35(3):170–8.
140. Braun A, Guiraud LMJC, Frankenberger R. Histological validation of ICDAS II and radiological assessment of occlusal carious lesions in permanent teeth. *Odontology*. 2017;105(1):46–53.
141. Paschalis EP, DiCarlo E, Betts F, Sherman P, Mendelsohn R, Boskey AL. FTIR microspectroscopic analysis of human osteonal bone. *Calcif Tissue Int*. 1996;59(6):480–7.
142. Mata-Miranda MM, Guerrero-Ruiz M, Gonzalez-Fuentes JR, Hernandez-Toscano CM, Garcia-Andino JR, Sanchez-Brito M, et al. Characterization of the biological fingerprint and identification of associated parameters in stress fractures by FTIR spectroscopy. *Biomed Res Int*. 2019;2019:1241452.
143. Imbert L, Gourion-Arsiquaud S, Villarreal-Ramirez E, Spevak L, Taleb H, van der Meulen MCH, et al. Dynamic structure and composition of bone investigated by nanoscale infrared spectroscopy. *PLoS One*. 2018;13(9):e0202833.
144. Levallois B, Terrer E, Panayotov Y, Salehi H, Tassery H, Tramini P, et al. Molecular structural analysis of carious lesions using micro-Raman spectroscopy. *Eur J Oral Sci*.

2012;120(5):444–51.

145. Toledano M, Toledano-Osorio M, Guerado E, Caso E, Aguilera FS, Osorio R. Biochemical assessment of nanostructures in human trabecular bone: proposal of a Raman microspectroscopy based measurements protocol. *Injury*. 2018;49(Suppl. 2):S11–21.
146. Slimani A, Nouioua F, Desoutter A, Levallois B, Cuisinier FJG, Tassery H, et al. Confocal Raman mapping of collagen cross-link and crystallinity of human dentin–enamel junction. *J Biomed Opt*. 2017;22(8):1–8.
147. Cullity BD, Stock SR. *Elements of X-ray diffraction*. 3rd ed. Upper Saddle River, NJ, USA: Prentice-Hall; 2001.
148. Paschalis EP. Fourier transform infrared imaging of bone. In: Idris AI, editor. *Bone Research Protocols*. 3rd ed. New York, NY, USA: Humana Press; 2019. p. 517–25.
149. Neto AS, Fonseca AC, Abrantes JCC, Coelho JFJ, Ferreira JMF. Surface functionalization of cuttlefish bone-derived biphasic calcium phosphate scaffolds with polymeric coatings. *Mater Sci Eng C*. 2019;105:110014.
150. Liu Y, Wang Y. Proanthocyanidins' efficacy in stabilizing dentin collagen against enzymatic degradation: MALDI-TOF and FTIR analyses. *J Dent*. 2013;41(6):535–42.
151. Rodriguez-Navarro AB, Romanek CS, Alvarez-Lloret P, Gaines KF. Effect of in ovo exposure to PCBs and Hg on clapper rail bone mineral chemistry from a contaminated salt marsh in coastal Georgia. *Environ Sci Technol*. 2006;40(16):4936–42.
152. Magne D, Weiss P, Bouler JM, Laboux O, Daculsi G. Study of the maturation of the organic (type I collagen) and mineral (nonstoichiometric apatite) constituents of a calcified tissue (dentin) as a function of location: a Fourier transform infrared microspectroscopic investigation. *J Bone Miner Res*. 2001;16(4):750–7.
153. Paschalis EP, Mendelsohn R, Boskey AL. Infrared assessment of bone quality: a review. *Clin Orthop Relat Res*. 2011;469(8):2170–8.
154. Curylofo-Zotti FA, Tanta GS, Zucoloto ML, Souza-Gabriel AE, Corona SAM. Selective removal of carious lesion with Er:YAG laser followed by dentin biomodification with chitosan. *Lasers Med Sci*. 2017;32(7):1595–603.
155. Velo MMDAC, Magalhães AC, Shiota A, Farha ALH, Grizzo LT, Honório HM, et al. Profile of high-fluoride toothpastes combined or not with functionalized tri-calcium phosphate on root dentin caries control: an in vitro study. *Am J Dent*. 2018;31(6):290–6.
156. Lenzi TL, Soares FZM, Raggio DP, Pereira GKR, Rocha R de O. Dry-bonding etch-and-rinse strategy improves bond longevity of a universal adhesive to sound and artificially-induced caries-affected primary dentin. *J Adhes Dent*. 2016;18(6):475–82.
157. Nicoloso GF, Antoniazzi BF, Lenzi TL, Soares FZM, Rocha R de O. The bonding performance of a universal adhesive to artificially-created caries-affected dentin. *J Adhes Dent*. 2017;19(4):317–21.
158. White DJ. The comparative sensitivity of intra-oral, *in vitro*, and animal models in the “profile” evaluation of topical fluorides. *J Dent Res*. 1992;71(Spec Iss):884–94.
159. Buzalaf MAR, Hannas AR, Magalhães AC, Rios D, Honório HM, 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;18(4):316–34.
160. Goettsche ZS, Ettinger RL, Wefel JS, Hogan MM, Harless JD, Qian F. In vitro assessment of 3 dentifrices containing fluoride in preventing demineralization of overdenture abutments and root surfaces. *J Prosthet Dent.* 2014;112(5):1257–64.
 161. Marin E, Hiraishi N, Honma T, Boschetto F, Zanocco M, Zhu W, et al. Raman spectroscopy for early detection and monitoring of dentin demineralization. *Dent Mater.* 2020;36(12):1635–44.
 162. Enrich-Essvein T, Benavides-Reyes C, Álvarez-Lloret P, Bolaños-Carmona MV, Rodríguez-Navarro AB, González-López S. Influence of de-remineralization process on chemical, microstructural, and mechanical properties of human and bovine dentin. *Clin Oral Investig.* 2021;25(3):841–9.
 163. Hong L, Ettinger RL, Watkins CA, Wefel JS. In vitro evaluation of fluoride varnish on overdenture abutments. *J Prosthet Dent.* 2003;89(1):28–36.
 164. Darling LA, Ettinger RL, Wefel JS, Cooper SH, Qian F. Prevention of demineralization by CO₂ and Er,Cr:YSGG laser irradiation of overdenture abutments. *Am J Dent.* 2006;19(4):227–30.
 165. Salehi H, Terrer E, Panayotov I, Levallois B, Jacquot B, Tassery H, et al. Functional mapping of human sound and carious enamel and dentin with Raman spectroscopy. *J Biophotonics.* 2013;6(10):765–74.
 166. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* 1998;77(8):1622–9.
 167. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res.* 2006;85(1):22–32.
 168. Tsuda H, Ruben J, Arends J. Raman spectra of human dentin mineral. *Eur J Oral Sci.* 1996;104(2):123–31.
 169. Farlay D, Panczer G, Rey C, Delmas PD, Boivin G. Mineral maturity and crystallinity index are distinct characteristics of bone mineral. *J Bone Miner Metab.* 2010;28(4):433–45.
 170. Lin SY, Li MJ, Cheng WT. FT-IR and Raman vibrational microspectroscopies used for spectral biodiagnosis of human tissues. *J Spectrosc.* 2007;21(1):1–30.
 171. Rey C, Collins B, Goehl T, Dickson IR, Glimcher MJ. The carbonate environment in bone mineral: a resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study. *Calcif Tissue Int.* 1989;45(3):157–64.
 172. Boskey AL. Mineralization of bones and teeth. *Elements.* 2007;3(6):385–91.
 173. Dowker SEP, Anderson P, Elliot JC, Gao XJ. Crystal chemistry and dissolution of calcium phosphate in dental enamel. *Mineral Mag.* 1999;63(6):791–800.
 174. Danilchenko SN, Moseke C, Sukhodub LF, Sulkio-Cleff B. X-ray diffraction studies of bone apatite under acid demineralization. *Cryst Res Technol.* 2004;39(1):71–7.
 175. Berna F, Matthews A, Weiner S. Solubilities of bone mineral from archaeological sites:

- the recrystallization window. *J Archaeol Sci.* 2004;31(7):867–82.
176. Dominguez-Gasca N, Benavides-Reyes C, Sánchez-Rodríguez E, Rodríguez-Navarro AB. Changes in avian cortical and medullary bone mineral composition and organization during acid-induced demineralization. *Eur J Mineral.* 2019;31(2):209–16.
 177. Hiraishi N, Sono R, Islam MS, Otsuki M, Tagami J, Takatsuka T. Effect of hesperidin in vitro on root dentine collagen and demineralization. *J Dent.* 2011;39(5):391–6.
 178. Sereda G, VanLaecken A, Turner JA. Monitoring demineralization and remineralization of human dentin by characterization of its structure with resonance-enhanced AFM-IR chemical mapping, nanoindentation, and SEM. *Dent Mater.* 2019;35(4):617–26.
 179. Erhardt MC, Lobo MM, Goulart M, Coelho-de-Souza FH, Valentino TA, Pisani-Proenca J, et al. Microtensile bond strength of etch-and-rinse and self-etch adhesives to artificially created carious dentin. *Gen Dent.* 2014;62(3):56–61.
 180. Kucukyilmaz E, Savas S, Akcay M, Bolukbasi B. Effect of silver diamine fluoride and ammonium hexafluorosilicate applications with and without Er:YAG laser irradiation on the microtensile bond strength in sound and caries-affected dentin. *Lasers Surg Med.* 2016;48(1):62–9.
 181. Fathy SM. Remineralization ability of two hydraulic calcium-silicate based dental pulp capping materials: cell-independent model. *J Clin Exp Dent.* 2019;11(4):e360–6.
 182. Shivakumar KM, Vidya SK, Chandu GN. Dental caries vaccine. *Indian J Dent Res.* 2009;20(1):99–106.
 183. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ.* 2005;83(9):661–9.
 184. González-Cabezas C. The chemistry of caries: remineralization and demineralization events with direct clinical relevance. *Dent Clin North Am.* 2010;54(3):469–78.
 185. Enrich-Essvein T, Rodríguez-Navarro AB, Álvarez-Lloret P, Cifuentes-Jiménez C, Bolaños-Carmona M V., González-López S. Proanthocyanidin-functionalized hydroxyapatite nanoparticles as dentin biomodifier. *Dent Mater.* 2021;37(9):1437–45.
 186. Silva AP, Gonçalves RS, Borges AF, Bedran-Russo AK, Shinohara MS. Effectiveness of plant-derived proanthocyanidins on demineralization on enamel and dentin under artificial cariogenic challenge. *J Appl Oral Sci.* 2015;23(3):302–9.
 187. Jabin Z, Nasim I, Vishnu Priya V, Agarwal N. Quantitative analysis and effect of SDF, PAF, NaF on demineralized human primary enamel using SEM, XRD, and FTIR. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2021;14(4):537–41.
 188. Zhang J, Boyes V, Festy F, Lynch RJM, Watson TF, Banerjee A. In-vitro subsurface remineralisation of artificial enamel white spot lesions pre-treated with chitosan. *Dent Mater.* 2018;34(8):1154–67.
 189. Penel G, Leroy G, Rey C, Bres E. MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcif Tissue Int.* 1998;63(6):475–81.
 190. Weatherell JA, Robinson C, Hiller CR. Distribution of carbonate in thin sections of dental enamel. *Caries Res.* 1968;2(1):1–9.

191. Zhang X, Neoh KG, Lin CC, Kishen A. Remineralization of partially demineralized dentine substrate based on a biomimetic strategy. *J Mater Sci Mater Med*. 2012;23(3):733–42.
192. Zhou Z, Ge X, Bian M, Xu T, Li N, Lu J, et al. Remineralization of dentin slices using casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate combined with sodium tripolyphosphate. *Biomed Eng Online*. 2020;19(1):18.
193. Tezvergil-Mutluay A, Seseogullari-Dirihan R, Feitosa VP, Cama G, Brauer DS, Sauro S. Effects of composites containing bioactive glasses on demineralized dentin. *J Dent Res*. 2017;96(9):999–1005.
194. Toledano M, Cabello I, Cabrerizo Vílchez MA, Fernández MA, Osorio R. Surface microanalysis and chemical imaging of early dentin remineralization. *Microsc Microanal*. 2014;20(1):245–56.
195. Hara AT, Karlinsey RL, Zero DT. Dentine remineralization by simulated saliva formulations with different Ca and Pi contents. *Caries Res*. 2008;42(1):51–6.
196. Osorio R, Osorio E, Aguilera FS, Medina-Castillo AL, Toledano M, Toledano-Osorio M. Silver improves collagen structure and stability at demineralized dentin: a dynamic-mechanical and Raman analysis. *J Dent*. 2018;79:61–7.
197. Schwartz AG, Pasteris JD, Genin GM, Daulton TL, Thomopoulos S. Mineral distributions at the developing tendon enthesis. *PLoS One*. 2012;7(11):e48630.
198. Rølla G. On the role of calcium fluoride in the cariostatic mechanism of fluoride. *Acta Odontol Scand*. 1988;46(6):341–5.
199. Chen J, Yu Z, Zhu P, Wang J, Gan Z, Wei J, et al. Effects of fluorine on the structure of fluorohydroxyapatite: a study by XRD, solid-state NMR and Raman spectroscopy. *J Mater Chem B*. 2015;3(1):34–8.
200. Mei ML, Lo ECM, Chu CH. Arresting dentine caries with silver diamine fluoride: what's behind it? *J Dent Res*. 2018;97(7):751–8.
201. Clift F. Artificial methods for the remineralization of hydroxyapatite in enamel. *Mater Today Chem*. 2021;21.
202. Ganss C, Lussi A, Sommer N, Klimek J, Schlueter N. Efficacy of fluoride compounds and stannous chloride as erosion inhibitors in dentine. *Caries Res*. 2010;44(3):248–52.
203. Iijima Y, Cai F, Shen P, Walker G, Reynolds C, Reynolds EC. Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. *Caries Res*. 2004;38(6):551–6.
204. Bertassoni LE. Dentin on the nanoscale: hierarchical organization, mechanical behavior and bioinspired engineering. *Dent Mater*. 2017;33(6):637–49.
205. Araújo IJ de S, Guimarães GN, Machado RA, Bertassoni LE, Davies RPW, Puppini-Rontani RM. Self-assembly peptide P₁₁-4 induces mineralization and cell-migration of odontoblast-like cells. *J Dent*. 2022;121:104111.
206. Hill R, Chen X, Lysek DA, Gillam D. An *in vitro* comparison of a novel self-assembling peptide matrix gel and selected desensitizing toothpastes in reducing fluid flow by dentine tubular occlusion. *J Dent Maxillofac Res*. 2020;3(1):1–11.

207. Schlee M, Rathe F, Bommer C, Bröseler F, Kind L. Self-assembling peptide matrix for treatment of dentin hypersensitivity: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2018;89(6):653–60.

Anexo I.

Documento de aprobación del Comité de Ética en Investigación de la Universidad de Granada para desarrollo de la tesis doctoral.



**COMITE DE ETICA EN INVESTIGACION
DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA**

La Comisión de Ética en Investigación de la Universidad de Granada, visto el informe preceptivo emitido por la Presidenta del Comité en Investigación Humana, tras la valoración colegiada del Comité en sesión plenaria, en el que se hace constar que la investigación propuesta respeta los principios establecidos en la legislación internacional y nacional en el ámbito de la biomedicina, la biotecnología y la bioética, así como los derechos derivados de la protección de datos de carácter personal,

Emite un Informe Favorable en relación a la investigación titulada: 'DESMINERALIZACIÓN Y REMINERALIZACIÓN DE LA DENTINA, COMPARACIÓN IN VITRO Y USO DEL PÉPTIDO P11-4' que dirige D./Dña. JUAN SEBASTIAN ZULUAGA MORALES, con NIF Y4298242Q, quedando registrada con el nº: 942/CEIH/2019.

Granada, a 27 de Enero de 2020.

EL PRESIDENTE
Fdo: Enrique Herrera Viedma

EL SECRETARIO
Fdo: Francisco Javier O'Valle Ravassa

Anexo II.

Publicación en *International Journal of Medical of Dentistry* 2022;26(4):585-608.

pH-CYCLING, DYNAMIC CHEMICAL MODEL IN DENTINE CARIES CREATION. A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS

Juan Sebastián ZULUAGA-MORALES¹, María Victoria BOLAÑOS-CARMONA²,
Pedro ÁLVAREZ-LLORET³

¹PhD student, University of Granada, Granada, Spain

²Associate Professor, PhD, University of Granada, Granada, Spain

³Associate Professor, PhD, University of Oviedo, Oviedo, Spain

Corresponding autor: Juan Sebastián Zuluaga-Morales; e-mail: juanseodonto@correo.ugr.es

Abstract

Introduction: The pH-cycling (pHc) is a widely used method applied by cariology researches for lesions-like caries creation. This study evaluates the methodological aspects of pHc, proposes a specific protocol to standardize this demineralization method and quantifies the demineralization yielded by this *in vitro* model in dentine. **Materials and methods:** PubMed, Scopus and WOS databases were used to select studies. Meta-analyses were performed for microtensile bond strength test (μ TBS), hardness test, microradiography (MRG) and polarized light microscopy (PLM). **Results and discussion:** Sixty-seven references were selected for qualitative assessment and 32 for meta-analysis. Significant differences were found between sound/ untreated dentine and pH-cycled dentine in all analytical techniques. Considerable heterogeneity was showed by meta-analyses. The results for the depth of demineralization by pHc averaged between 194.95 μ m and 298.17 μ m for MRG and PLM, respectively. **Conclusions:** pHc is an effective and reproducible *in vitro* procedure to simulate dentine caries lesions for cariology and dental materials research.

Keywords: dental caries, dentine, meta-analysis, pH-cycling, systematic review, tooth demineralization.

Ten Cate and Duijsters [4] first identified the mineral imbalance in enamel subjected to pH-cycling (pHc), as an experimental model to create artificial caries lesions *in vitro*. The pHc model involves a series of combined demineralization and remineralization cycles designed to simulate the dynamics of mineral loss and gain involved during caries formation [5]. In addition to the artificial formation of caries processes, the pHc has also been used for many other purposes, *e.g.*, to simulate pH oral fluctuation [6], to test agents for caries formation [7], for prevention and treatment [8], and even for the creation of erosive lesions [9]. Overall, these applications employ different methodologies by modifying some of the experimental parameters (*i.e.*, exposure time, pH, number of cycles and chemical composition of demineralization-remineralization solutions), depending on the particular research objectives.

Considering the large number of reported protocols for the pHc model, the importance of having summarized data, based on a systematic search of the scientific literature should be highlighted for caries research. Current research and analysis provide an accurate and precise assessment for *in vitro* investigations involving carious processes.

Therefore, the objectives of this systematic review were to evaluate the available scientific literature, to characterize and analyze the methodological approach and uses of the pHc model in caries formation. Likewise, this work aimed at quantifying, by meta-analysis, the

1. INTRODUCTION

Dental caries is defined as a localized acid attack of the dental hard tissue as a result of the metabolism of bacterial plaque biofilm [1]. The caries process consists of rapidly alternating periods of tooth demineralization and remineralization, leading to the initiation of specific lesions at particular anatomical sites on the teeth [2]. *In vitro* models under different experimental conditions simulate high cariogenic situations, aiming at developing artificial lesions comparable to those produced *in vivo* [3].

demineralization effects produced by the pHc procedure from the mechanical properties of teeth and depth of demineralization in dentine. Additionally, in this review we propose a specific procedure for dental caries research using pHc in order to standardize this *in vitro* demineralization method.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. ELIGIBILITY CRITERIA

The current systematic review was developed according to the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) checklist methodology [10]. For this search, the included studies satisfied the following criteria: (1) use pHc *in vitro* model for the development of artificial dentine caries lesions. In addition, (2) studies conducted to test the remineralization agents or previous procedures to pHc were included if at least one experimental or control group was not pre-treated. Moreover, (3) studies performed to test the remineralizing products during pHc were also included when there was an independent experimental or control group treated with distilled/ deionized water. Studies performed in enamel, cementum, natural caries, restorations and other dental materials

were excluded. Furthermore, studies employing lesion formation by another *in vitro* model (*i.e.*, static or microbiological model) were not considered. Erosion studies, review articles and books were also excluded from the reference search.

2.2. SEARCH STRATEGY

An electronic bibliographic research was performed in the following databases: Medline - National Library of Medicine (PubMed), Web of Science (Thompson Reuters) and Scopus (Elsevier). The search was limited to the English language but not to date. The search was performed using controlled wordings through Medical Subject Headings (MeSH terms) and open terms around "caries", "pH cycling" and "dentine". The search was first carried out in the PubMed database and then fitted to Web of Science and Scopus. From the eligible studies, a reference search was conducted in order to include other related studies.

2.3. SCREENING AND REFERENCES SELECTION

All references were managed with the Ryvan QCRI online software [11]. Abstracts and titles were subjected to a screening process by two reviewers (co-authors: #1 and #2), who followed a flow chart as an assistant tool for references selection (Fig. 1).

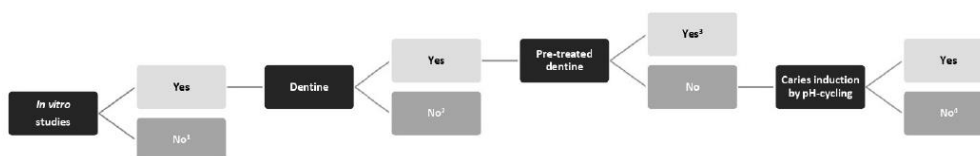


Fig. 1. Flow chart for screening and references selection. Excluding references;

- 1: *in vivo* studies, erosion studies, reviews, books and off topic studies;
- 2: studies on enamel, cementum, materials, restorations and natural caries;
- 3: remineralizing agents or procedures before pH-cycling (pHc);
- 4: caries formation by microbiological or static model.

Treatment during pHc (including remineralizing agents, artificial saliva, laser therapy, etc.).

2.4. RISK OF BIAS ASSESSMENT

The assessment of risk of bias was performed on the basis of CRIS guidelines (Checklist for Reporting *In-vitro* Studies) [12], fitted to the characteristics of the current systematic review. For this purpose, the following parameters were extracted from the references: sample size calculation, sample selection (*i.e.*, sound/healthy teeth, caries-free or free crack teeth), explanation of sample preparation, randomization of groups, subgroups and testing machines, presence of a control location/group [negative (sound) or positive (natural caries) control], description of the solutions and of the pH used during cycling, solutions renovation, and blinding operator of testing machines. In the event that the authors report any of the above parameters, it was set "+" or, inversely, "-" if the data was not reported. Based on these assignments, studies that received between one to three "+" were considered to be high risk of bias (-), four or five were considered as medium risk of bias (½), and those above were considered to be at lowest risk of bias (+).

2.5. DATA EXTRACTION AND STATISTICAL META-ANALYSIS

From the studies included, the following data and information were extracted: dental structure, demineralizing solution composition, immersion time and pH of the demineralizing solution, remineralizing solution composition, immersion time and pH of the remineralizing solution, pHc temperature, agitation/ stirring of solutions, type of induced caries, and pHc evaluation tests and characterization (*i.e.*, analytical techniques).

Meta-analysis was performed separately for the most commonly used pHc evaluation tests. For this purpose, two subgroups were compared: 1) type of dentition: primary *vs.* permanent teeth and 2) type of teeth: human

vs. bovine teeth. Selected studies performed a negative control group (sound dentine/untreated dentine) and an experimental group (artificially created caries by pHc). Data extraction was made according to Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions [13], indicating mean, standard deviation and sample size obtained from the selected studies, when such data was available. Analysis was carried out with Review Manager software (RevMan version 5.3 software, Cochrane Collaboration; Copenhagen, Denmark) with random effects model, a statistical significance established as a *p*-value ≤ 0.05 and using as effect measure the mean differences between sound dentine and artificially created caries through pHc. Besides, in the event that no negative control group was performed, an estimation of the effect and standard error of data was done. For quantifying heterogeneity, the I^2 test was interpreted as follows: 0%-40% (not important), 30%-60% (moderate heterogeneity), 50%-90% (substantial heterogeneity), and 75%-100% (considerable heterogeneity) [13].

3. RESULTS

3.1. SEARCH AND STUDY SELECTION

The search strategy using PubMed, WOS, Scopus and other references search included a total of 661 studies. The combinations of terms used in the literature search resulted in a number of 340 duplicates that were excluded. Therefore, 321 records were screened following the eligibility criteria and, as a result, 254 studies were excluded. Sixty-seven studies [14-18,22-31,33-73,75-85] were selected for qualitative analysis and 32 studies for further inclusion in meta-analysis [15-17,22,23,26-28, 35,36,39,43,46,47-51,53-55,58-61,65,67, 68,70-72,85] (Fig. 2).

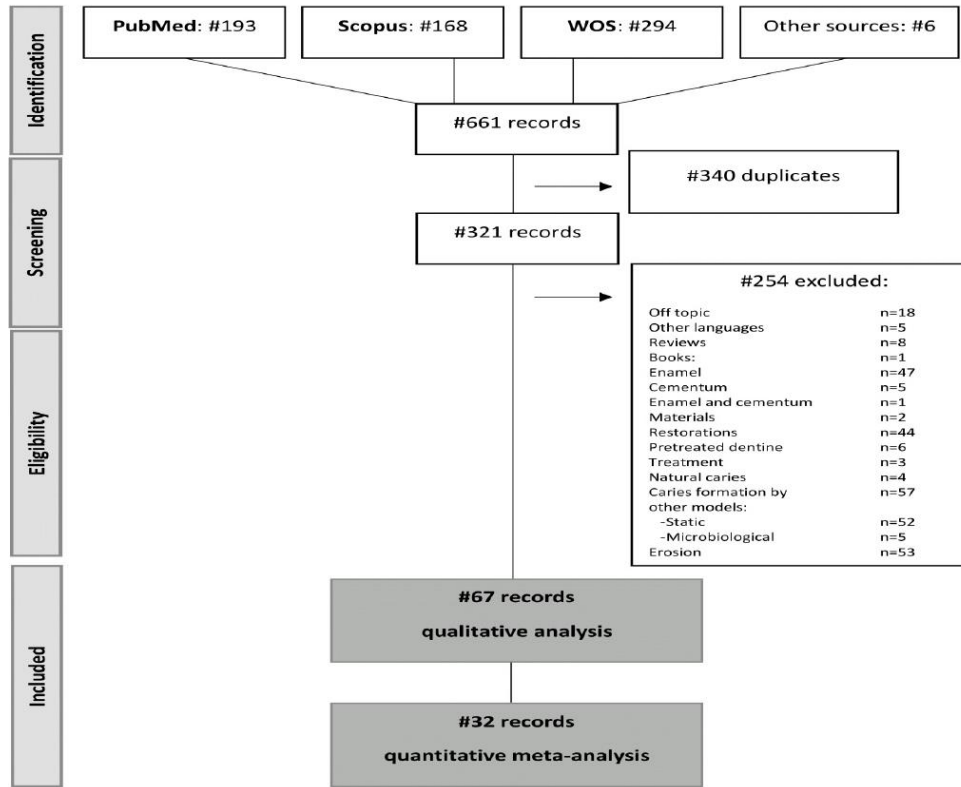


Fig. 2. Flow diagram reference selection based on PRISMA checklist

3.2. METHODOLOGICAL FEATURES

Table 1 summarizes the methodological features from each reference. The dental substrates used for pHc model in dentine were mainly human teeth (50 studies) representing around 75% of the included studies, compared to bovine teeth (16 studies, around 24% remaining). One study compared human dentine with bovine dentine (1%). Considering all studies, crown (45 studies) or root dentine

(22 studies) were employed, representing around 67% and 33%, respectively. For human teeth, only three studies used both permanent and primary teeth for comparison, and one study employed bovine and human teeth. Without taking into account the four previously mentioned records, 30 studies used permanent teeth, while 17 studies used primary teeth. For bovine teeth, seven studies used crown and nine, root dentine.

Table 1. References included in the systematic review and methodological features

Reference	Dentine type (structure)	Deminerilizing solution	DS: Time/pH	Reminerilizing solution	RS: Time/pH	Days	T°	Agitation/Stirring	Type of caries	Evaluation test (properties measurement)
Herkeströter et al., 1991 [14]	Human root (premolars)	3 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O, 3 mM KH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂ pH adjusted with KOH	0.5 h/4.5	1.5 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0.9 mM KH ₂ PO ₄ and 20 mM HEPES, pH adjusted with KOH	0.5 h-1 h-1.5 h-2 h/7.0	24 h	NR	Yes	NR	MRG (mineral loss)
Fittinger et al., 1994 [15]	Human root (anterior teeth)	2.2 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O, 2.2 mM KH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	6 h/ 4.3	1.5 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0.9 mM KH ₂ PO ₄ and 150 mM KCl	17 h/7.0	17 days	NR	NR	NR	PLM (lesion depth), MRG (lesion depth, remineralization band), overall demineralization
Fittinger et al., 1997 [16]	Human root (anterior teeth)	2.2 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O, 2.2 mM KH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	6 h/ 4.3	1.5 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0.9 mM KH ₂ PO ₄ and 150 mM KCl	17 h/7.0	18 days	NR	NR	NR	PLM (lesion depth), MRG (lesion depth, remineralization band), overall demineralization
Shinkai et al., 2001 [17]	Human root (fluid molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ , 50 mM C ₂ H ₄ O ₂ and 1 ppm of NaF	7 h/4.5	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 150 mM KCl	17 h/7.0	8 days	37°C	NR	Secondary caries	Cross-Sectional Microhardness (plus mineral profile, integrated area of mineral content, mineral loss measurements)
Featherstone et al., 2003 [18]; White and Featherstone 1987 [19]; Featherstone et al., 1990 [20]; Featherstone et al., 1998 [21]	Human crown (molars and premolars)	NR	18 h/4.70	NR	6 h/7.0	5 days	NR	NR	NR	PLM (demineralization pattern) Microhardnes (with integrated mineral loss, % inhibition)
Hong et al., 2003 [22]	Human root (anterior and premolar teeth)	2.2 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O, 2.2 mM KH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	6 h/4.3	1.5 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0.9 mM KH ₂ PO ₄ and 150 mM KCl	17 h/7.0	21 days	NR	NR	NR	PLM (lesion depth), Contact MRG (remineralization band), net demineralization

Darling et al., 2006 [23]	Human root (canines, premolars and molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2H ₂ O, 2.2 mM KH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	6 h/ 5.5 (18 days) 4.7 (16 days)	1.5 mM CaCl ₂ , 2H ₂ O, 0.9 mM KH ₂ PO ₄ and 150 mM KCl	18 h/ 7.0	32 days	NR	NR	NR	PLM (lesion depth)
de Menezes et al., 2007 [24]	Bovine root (incisors)	1.4 mM Ca, 0.9 mM PO ₄ and 0.05 mM buffer solution of acetate	4 h/5.0	1.5 mM Ca, 0.9 mM PO ₄ and 0.1 mMol Tris buffer	20 h/7.0	2 days	NR	NR	NR	Microhardness/ Knoop
Erhardt et al., 2008 [25]	Bovine crown (incisors)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ , 50 mM C ₂ H ₄ NaO ₂ , 50 mM, C ₂ H ₄ O ₂ and 1 ppm NaF	3 h/4.5	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM KCl, 100 mM Tris buffer and 10 ppm NaF	45 h/7.0	16 days	37°C	NR	CAD	µTBS, Microhardness/ Knoop, SEM (interface analysis)
Marquezan et al., 2009 [26]	Human crown (second primary molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 150 mM KCl	16 h/7.0	14 days	Room	No	CAD	Microhardness/ Knoop, SEM (morphological analysis)
Paranhos et al., 2009 [27]	Human crown (third molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ , 50 mM C ₂ H ₄ O ₂ and 1 ppm of NaF	7 h/4.5	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 150 mM KCl	17 h/7.0	8 days	37°C	NR	CAD	SEM (fractographic analysis)/EDS (% elements determined area), µTBS
Marquezan et al., 2010 [28]	Human crown (primary second molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 150 mM KCl	16 h/7.0	14 days	37°C	No	CAD	µTBS, SEM (fractographic analysis)
Esteves-Oliveira et al., 2011 [29]	Bovine root (incisors)	1.4 mM Ca(NO ₃) ₂ , 0.91 mM NaH ₂ PO ₄ , 50 mM acetate buffer and 0.06 µg NaF/ml	4 h/5.0	1.5 mM Ca(NO ₃) ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM KCl, 100 mM Tris buffer and 0.05 µg NaF/ml	20 h/7.0	9 days	37°C	Yes	NR	ICP-OES (Ca, P release)
³ Hiraiishi et al., 2011 [30]	Bovine root (incisors)	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM KH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂ , pH adjusted with KOH	14 h/5.0	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM KH ₂ PO ₄ , 130 mM KCl and 20 mM HEPES buffer. pH adjusted with KOH	8 h/7.0	8 days	37°C	NR	NR	AAS (Ca ion release), HPLC (degraded collagen/hydroxyproline), Transverse MRGB (mineral loss, lesion depth)

Alves et al., 2013a [38]	Human crown (primary second molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 150 mM KCl	16 h/7.0	14 days	Room	No	CAD	μTBS, SEM (nanoleakage)
Alves et al., 2013b [39]	Human crown (second primary molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	14 days	NR	NR	CAD	μTBS, SEM (nanoleakage)
Comar et al., 2013 [40]	Bovine root (incisors)	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM KH ₂ PO ₄ and 50 mM lactic buffer	8 h/5.0	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM KH ₂ PO ₄ , 130 mM KCl, 20 mM HEPES buffer and 5 mM Na ₂ S ₂ O ₅	16 h/7.0	7 days	37°C	No	NR	Cross-Sectional Hardness/Knoop
de-Melo et al., 2013 [41]	Human crown (third molars)	2 mM CaCl ₂ , 2H ₂ O, 2 mM of KH ₂ PO ₄ , 75 mM C ₂ H ₄ O ₂ , 0.030 ppm NaF and 0.1 mM Tris buffer	4 h/4.6	1.5 mM of CaCl ₂ , 0.9 mM KH ₂ PO ₄ , 0.050 ppm NaF, and 150 mM KCl	20 h/7.4	2 / 4 / 8 days	37°C	NR	NR	Cross-Sectional Hardness (integrated area microhardness loss vs. lesion depth, hardness profile), μTBS
Lenzi et al., 2013a [42]	Human crown (second primary molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM of C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM of NaH ₂ PO ₄ and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	14 days	NR	NR	Carious dentine	μTBS
Lenzi et al., 2013b [43]	Human crown (second primary molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	14 days	NR	NR	CAD	μTBS, SEM (interface analysis)
Calvo et al., 2014 [44]	Human crown (second primary molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	14 days	NR	NR	CAD	μTBS

Erhardt et al., 2014 [45]	Bovine crown (incisors)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ , 50 mM NaC ₂ H ₃ O ₂ , 50 mM C ₂ H ₄ O ₂ , and 1 ppm NaF	CAD: 3 h CID: 2 h/4.5	Hyper-RS: 1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM KCl, 100 mM Tris buffer and 10 ppm NaF/RS: 1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM KCl and 100 mM Tris buffer	CAD (Hyper-RS): 45 h/7.0 CID: 4 days	37°C	NR	CAD and CID	μTBS, SEM (interface analysis)
Goetsche et al., 2014 [46]	Human root (posterior teeth)	2.2 mM CaCl ₂ , 2H ₂ O, 2.2 mM KH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	2 t X 3 h/4.3	1.5 mM CaCl ₂ , 2H ₂ O, 0.9 mM KH ₂ PO ₄ , and 150 mM KCl	1 t X 2.5 h 1 t X ≈15 h / 7.0	NR	NR	NR	PLM (cavitation, remineralization band, total lesion depths) μTBS
Lenzi et al., 2014a [47]	Human crown (second primary molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ , and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	NR	NR	CAD	μTBS, SEM (nanoleakage)
Lenzi et al., 2014b [48]	Human crown (second deciduous molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ , and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	Room	No	CAD	μTBS, SEM (nanoleakage)
Lenzi et al., 2014c [49]	Human crown (second primary molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 150 mM KCl	16 h/7.0	Room	No	CAD	μTBS, SEM (nanoleakage)
Rocha et al., 2014 [50]	Human crown (third molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ , 50 mM CH ₃ NaO ₂ , 50 mM C ₂ H ₄ O ₂ , and 1 ppm NaF	3 h/4.5	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ , 150 mM KCl, 100 mM Tris buffer and 10 ppm NaF	45 h/7.0	NR	NR	CAD	μSBS, Vickers Hardness
Tedesco et al., 2014a [51]	Human crown (second primary molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ , and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	NR	NR	CAD	μTBS
Tedesco et al., 2014b [52]	Bovine crown (incisors)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ , and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	NR	NR	Carious dentine	μSBS

⁷ Epasinghe et al., 2015 [53]	Human root (single rooted teeth)	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM KH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂ pH adjusted with KOH	14 h/5.0	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM KH ₂ PO ₄ and 20 mM HEPES buffer. pH adjusted with KOH	8 h/7.0	8 days	37°C	NR	Root caries	Transverse MRG (lesion depth, mineral loss), CLSM (fluorescent band), Microhardness Test/Knoop
Lenzi et al., 2015a [54]	Human crown (second primary molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	14 days	Room	No	CAD	μTBS
Lenzi et al., 2015b [55]	Human crown (second primary molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	14 days	NR	NR	CAD	μTBS, SEM (nanoleakage)
Lenzi et al., 2015c [56]	Human crown (primary and permanent molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	14 days	Room	No	CAD	Microhardness/Knoop
Melo et al., 2015 [57]	Human crown (third molars)	2.0 mM CaCl ₂ , 2.0 mM KH ₂ PO ₄ and 750 mM C ₂ H ₄ O ₂	4 h/4.6	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM KH ₂ PO ₄ , 150 mM KCl, 100 mM Tris buffer and 0.05 ppm NaF	20 h/7.4	2 / 4 / 8 days	37°C	No	CAD	SEM (morphological characteristics after laser irradiation)
⁸ Silva et al., 2015 [58]	Bovine root (incisors)	2.25 mM CaCl ₂ , 2H ₂ O, 1.35 mM KH ₂ PO ₄ , 50 mM acetate and 130 mM KCl	6 t X 30 min/5.0	2.25 mM CaCl ₂ , 2H ₂ O, 1.35 mM KH ₂ PO ₄ , 130 mM KCl and 20 mM HEPES	6 t X 10 min 1 t X ≈ 19 h / 7.0	8 days	NR	Yes	Root caries	Surface and Cross-Sectional Microhardness, PLM (qualitative analysis)
Dias et al., 2016 [59]	Human crown (primary molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	14 days	Room	No	NR	Microhardness/Knoop, Micro-Raman Spectroscopy (qualitative analysis of mineral composition)
Kucukyilmaz et al., 2016 [60]	Human crown (molar teeth)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	14 days	Room	NR	CAD	μTBS, SEM (surface morphology analysis)/EDS(chemical analysis)

Lenzi et al., 2016 [61]	Human crown (second primary molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	14 days	Room	No	CAD	μTBS (Weibull)
Nicoloso et al., 2016 [62]	Human crown (third molars and primary molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.5	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	14 days	Room	No	CAD	μTBS, SEM (failure mode)
Sung et al., 2016 [63]	Human root (premolars)	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM KH ₂ PO ₄ and 50 mM acetate buffer	24 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM KH ₂ PO ₄ and 20 mM HEPES	24 h/7.0	14 days	37°C	NR	CAD	SEM/EPMA (elemental contents, lesion width, mineral loss of Ca and P and Ca/P ratio)
Curylofo-Zotfi et al., 2017 [64]	Bovine crown (incisors)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 150 mM KCl	16 h/7.0	14 days	Room	NR	CAD	Microhardness/Knoop, SEM (morphological analysis)/EDS (% Ca, P and Ca/P ratio)
*Epasinghe et al., 2017 [65]	Human root (single rooted teeth)	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM KH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂ , pH adjusted with KOH	14 h/5.0	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM KH ₂ PO ₄ and 130 mM KCl and 20 mM HEPES buffer. pH adjusted with KOH	8 h/7.0	8 days	37°C	NR	Root caries	Transverse MRG (lesion depth, mineral loss), CLSM (minerals formation), XRD (crystal characterization), Chloramine T-assay (solubilized collagen peptides/hydroxyproline release)
Li et al., 2017 [66]	Human crown (third molars)	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM KH ₂ PO ₄ and 50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH adjusted with C ₂ H ₄ O ₂	0.5 h X 50 cycles/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ , 130 mM KCl and 5 mM Na ₂ S ₂ O ₅ , pH adjusted with HEPES buffer	2.5 h X 50 cycles/7.0	≈6 days	Room	NR	CAD	SEM-BSE/FEG-EPMA (deminerzalization depth, remineralization depth, D _{384'} -I _{384'} elemental composition)

Nicoloso et al., 2017 [67]	Human crown (third molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.5	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	14 days	NR	NR	CAD	μTBS
de Moraes et al., 2018 [68]	Human crown (molar teeth)	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	μTBS, SEM (fracture patterns)/EDX (Ca and P analysis) semi-quantitative analysis)
Dias et al., 2018 [69]	Human crown (primary molars)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	14 days	Room	No	Affected dentine layer	Microhardness/Knoop, SEM (qualitative analysis)/EDS (Ca, P and F analysis), Micro-Raman Spectroscopy (qualitative analysis of mineral composition)
Follak et al., 2018a [70]	Bovine crown (incisors)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂ , pH adjusted with 100 mM KOH	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	14 days	NR	NR	CAD	μTBS
Follak et al., 2018b [71]	Bovine crown (incisors)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂	8 h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	14 days	NR	NR	CAD	μTBS, SEM (differences between substrates)
¹⁰ Velo et al., 2018 [72]	Bovine root (incisors)	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM KH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₄ O ₂ buffer	8 h/5.0	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM KH ₂ PO ₄ , 130 mM KCl, 20 mM HEPES buffer and 5 mM NaH ₂ PO ₄	16 h/7.0	7 days	37°C	NR	Root caries	Surface and Cross-Sectional Hardness/Knoop, Transverse MRG (lesion depth, integrated mineral loss, average mineral loss), Fluoride Ion Electrode (fluoride concentration)
¹¹ Al-Hasnawi & Radhi 2019 [73]; Jeon et al., 2008 [74]	Human crown (maxillary first premolars)	NR	NR	NR	NR	5 days	NR	NR	Caries like lesion	Fluoride Ion Electrode (fluoride quantities)

dos Santos Ferreira et al., 2019 [75]	Bovine root (incisors)	1.4 mM Ca, 0.91 mM PO ₄ ³⁻ , 0.06 ppm F and 0.05 M acetate buffer	2 h/5.0	1.5 mM Ca, 0.9 mM PO ₄ ³⁻ , 150 mM KCl, 0.05 ppm F and 0.1 M Tris buffer	22 h/7.0	8 days	NR	NR	NR	Initial caries lesions	ATR-FTIR (chemical evaluation), SEM (morphological effects)
Fathy 2019 [76]; Marqezan et al., 2009 [26]	Human crown (maxillary premolars)	NR	8 h/ 3.0	NR	16 h/7.0	NR	NR	NR	CAD	CAD	SEM (surface analysis)/EDS (mineral % Ca and P)
Zander et al., 2019 [77]	Bovine root (incisors)	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM KH ₂ PO ₄ and 50 mM C ₂ H ₃ O ₂ . pH adjusted with KOH	14 h/5.0	1.5 mM CaCl ₂ , 130 mM KH ₂ PO ₄ and 20 mM HEPES. pH adjusted with KOH	10 h/7.0	8 days	37°C	NR	NR	Root caries	Micro CT (lesion depth, mineral loss, surface layer mineral density)
Bassi et al., 2020 [78]	Bovine crown (incisors)	2.2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.05 M acetic acid	8 h/4.5	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.15 mM KCl	16 h/7.0	14 cycles	Room	No	CAD	CAD	µSBS, Stereomicroscopy (failure mode)
¹²⁵I Leal et al., 2020 [79]	Bovine root (incisors)	1.4 mM Ca, 0.91 mM P, 0.06 µg F/mL and 0.05 M acetate buffer	6 h/ 5.0	1.5 mM Ca, 0.9 mM P, 150 mM KCl, 0.05 µg F/mL and 0.1 M Tris buffer	18 h/ 7.0	10 days	NR	NR	NR	NR	Longitudinal hardness (lesion area)
Luk et al., 2020 [80]	Human crown (third molars)	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM KH ₂ PO ₄ and 50 mM acetate	16 h/4.5	150 mM KCl, 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, 0.9 mM KH ₂ PO ₄ and 1.5 mM CaCl ₂	8 h/7.0	8 days	25°C	NR	NR	NR	Micro CT (lesion depth), nanoindentation, SEM (surface morphology assessment)/EDS (elemental analysis)
Sadoon et al., 2020 [81]; Marqezan et al., 2009 [26]	Human crown (third molars)	NR	8 h/NR	NR	16 h/NR	14 days	Room	No	NR	NR	EDX (surface mineral content), Optical Microscopy (surface analysis), Microhardness/Vickers
¹³⁵Okayama et al., 2021 [82]	Human root (molars)	3 mM CaCl ₂ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄ and 0.2 M lactic acid	6 t X 2 m /4.5	3 mM CaCl ₂ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄ and 0.02 M HEPES and 130 mM KCl	5 t X 176 m /1 t X 8.9 h/7.0	28 days	NR	NR	NR	NR	PLM (lesion depth), PIXE/PIGE (fluorine, titanium and calcium contents)

Enrich-Essevein et al., 2021a [83]	Human crown (anterior teeth)	2.2 mM CaCl ₂ , 2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM acetic acid	8h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.15 M KCl	16 h/7.0	14 days	Room	No	NR	Three-point bending test (flexural strength) ATR-FTIR (chemical composition), TGA (chemical composition), XRD (mineralogical characteristics)
Enrich-Essevein et al., 2021b [84]	Human crown (upper incisors) and bovine crown (lower incisors)	2.2 mM CaCl ₂ , 2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM acetic acid	8h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.15 M KCl	16 h/7.0	3 / 7 / 14 days	Room	No	NR	Three-point bending test (flexural strength) ATR-FTIR (chemical analysis), TGA (chemical analysis), XRD (microstructural analysis)
Cifuentes-Jimenez et al., 2021 [85]	Human crown (permanent molars)	2 mM CaCl ₂ , 2.2 mM NaH ₂ PO ₄ and 50 mM acetic acid	8h/4.8	1.5 mM CaCl ₂ , 0.9 mM NaH ₂ PO ₄ and 0.15 M KCl	16 h/7.0	14 days	Room	No	CAD	ATR-FTIR (chemical composition), XRD (crystalline characteristics), SEM (morphological changes and tubular occlusion)/EDS (elemental analysis), μ TBS

1*: all specimens were treated with one of the test solutions/ materials for 4 minutes;
 2*: it took a half-hour twice a day to brush, treat, and move the specimens from one solution to another;
 3*: treatment solutions for 2 hours; 4*: treatment solutions for 30 minutes;
 5*: one hour is missing to complete 24 hours cycle; 6*: treatment slurries for 6 minutes;
 7*: testing solutions or pastes for 2 hours;
 8*: treatment (6 t x 10 minutes);
 9*: testing solutions or pastes for 2 hours; 10*: testing toothpastes for 5 minutes twice a day;
 11*: After pH cycling, specimens were submitted 2 days in remineralizing solutions;
 12*: dentine specimens remained for an additional 24 h in the remineralizing solution;
 13*: 6 t X 2 m in deionized water.
 Specimens were soaked weekly for 5 min in TH₄ or NaF solution.
 After that, specimens were washed with deionized water for 10 m and then returned to pH cycling.

Abbreviations: CAD, caries-affected dentine; CID, caries-infected dentine; DS, demineralizing solution; RS, remineralizing solution; NR, not reported; t, times; MRG, microradiography; PLM, polarized light microscopy; μ TBS, microtensile bond strength; SEM, scanning electron microscopy; EDS/EDX, energy dispersive x-ray spectroscopy; ICP-OES, inductively coupled plasma-optical emission spectrometer; AAS, atomic absorption spectrophotometer; Micro CT, micro computed tomography; TEM, transmission electron microscopy; EPMA, electron probe micro analysis; μ SBS, microshear bond strength; CLSM, confocal laser scanning microscopy; XRD, X-ray diffraction; BSE, back scattered electron; FE, field emission-gun; D_{RM} , relative remineralization depth; I_{RM} , relative remineralization intensity; HPLC, high-pressure liquid chromatography; ATR-FTIR, Attenuated total reflection Fourier transformed infrared spectroscopy; PIXE, μ -particle-induced X-ray emission; PIGE, particle-induced gamma emission; TGA, thermogravimetry

During pHc, the composition of demineralizing and remineralizing solutions varied at specific concentrations. For demineralizing solutions, the molar concentrations for calcium compounds ranged from 1.5 mM-3 mM using $CaCl_2$ or 1.4 mM for $Ca(NO_3)_2$, for phosphates salts molar concentrations ranged from 0.9 mM-3 mM for KH_2PO_4 and 0.91 or 2.2 mM for NaH_2PO_4 , while the acid buffers employed were acetic acid (50, 75, or 750 mM), acetate buffer (0.05 mM or 50 mM) or 50 mM lactic buffer. Regarding the remineralizing solutions, the molar concentrations for calcium were 1.5 or 2.25 mM for $CaCl_2$ and 1.5 mM for $Ca(NO_3)_2$, for phosphates ranged from 0.9 mM-130 mM employing KH_2PO_4 and 0.9mM when using NaH_2PO_4 . Another compound added to the remineralizing solution was KCl, with molar concentrations ranging from 0.15 mM-150 mM. Other less used compounds were NaF, $C_2H_3NaO_2$, HEPES buffer and Tris buffer added to the remineralizing solution. Only two studies used collagenase in remineralizing solution [30,65].

The immersion times during pHc in demineralizing solutions were mostly 8 h, with an upper and lower limit of 24 h and 0.5 h,

respectively. The acidic pH in the demineralizing solution ranges from 3.0 to 5.0. For remineralizing solutions, 16 h was the most widely used time, the upper limit being 45 h and the lower 0.5 h. In the remineralizing solution, the pH was neutral, whereas 7.0 and 7.4 were the most common values. Some studies used a higher number of shorter cycles in the demineralization phase, with the aim of simulating the exposure conditions similar to the usual daily intake [46,58]. Other studies used exclusive time scales to test remineralization products, 2 h being the most common time of exposure.

Although some studies did not report the temperature, the most frequently used values were room temperature and 37°C (body temperature). The application days of the pHc ranged from one to 21 days, 14 days being the most common time to induce caries-affected dentine (CAD). Although some studies only referred to "artificial caries lesions" or even did not report the type of induced caries, most of the included studies reported CAD induction and only one [45] reported caries infected dentine (CID) induction.

The main protocols used for the characterization of the samples subjected to pHc were microtensile bond strength (μ TBS) and the hardness tests. In addition, other analytical techniques were also frequently used to characterize the compositional and microstructural properties of the samples: scanning electron microscopy (SEM) coupled with energy dispersive x-ray spectroscopy (EDS/EDX) detectors, microradiography (MRG) and polarized light microscopy (PLM). Other less used analytical techniques employed in these studies were microcomputed tomography (Micro CT), confocal laser scanning microscopy (CLSM), and Raman spectroscopy.

3.3. RISK OF BIAS ASSESSMENT

The study on the risk of bias is reported in Figure 3, indicating the percentage for each item and the average for the total included studies. Thirteen studies presented high risk of bias (score below three "+"), most of them had medium risk (41 studies with score four or five "+"), and 13 studies low risk of bias (score up to six to eight "+"). Among them, the more common

risks of bias were: (1) no sample size calculation and (2) no blinding operator to testing machines.

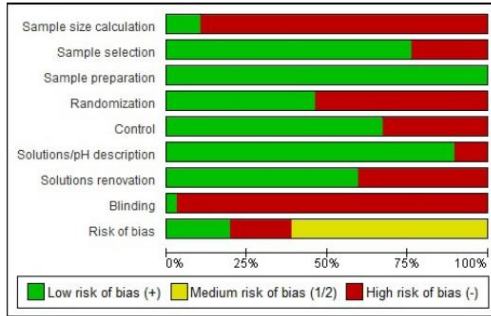


Fig. 3. Summary of quality and risk of bias assessment for each item studied included

Figure 4 shows the detailed report of the risk of bias for the analyzed references. From the studies with low risk of bias, only two described sample size calculation and blinding operator to the testing machine [70,77]. Regarding randomization, several studies received “-”, because there was no randomization to experimental subgroups or test machines. In a particular study, due to lack of complete “randomization” in the design of the experimental groups and the evaluation test, the item received “-”. In the solutions/ pH description item, only seven studies received “-”, including a proceeding paper [18], which did not report solutions composition.

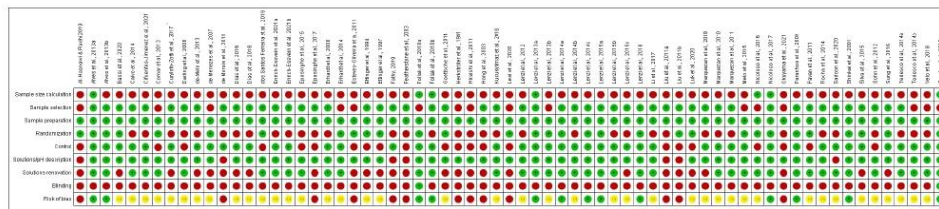


Fig. 4. Risk of bias assessment for the references included in the study

3.4. META-ANALYSES

For meta-analyses, μ TBS was the most employed evaluation test, followed by hardness test, MRG and LPM, resulting in 32 studies included for quantitative analyses. For the adhesion test (μ TBS), studies that reported immediate bond strength, untreated samples and adhesive systems used according to manufacturer’s instructions were considered. Regarding the hardness test, only cross-sectional hardness studies that considered 20 μ m depth and immediate pHc were taken into account when measurements were performed at different depths. The effect of pHc demineralization has been limited to 100 μ m depth in dentine [25], increasing the heterogeneity of the meta-analysis results up to this limit. Three global analyses were performed, considering the type of dentition (permanent *vs.* primary teeth) and type of teeth

(human *vs.* bovine teeth) for the μ TBS test, and type of teeth (human *vs.* bovine teeth) for the hardness test. Analyses on the type of teeth for the hardness test were not performed, as only a few studies were conducted on this topic (#3 references: two studies for permanent teeth *vs.* one for primary teeth).

Forest plots of the μ TBS and hardness tests meta-analyses are shown in Figures 5-6, respectively. The three analyses showed differences between sound/ untreated dentine and pH cycled dentine ($p < 0.001$), with a heterogeneity $I^2 > 90\%$. With respect to the μ TBS test (Fig. 5), there were differences between sound/ untreated dentine and the dentine submitted to pHc in all subgroups. Permanent ($I^2 = 96\%$) and primary ($I^2 = 82\%$) teeth subgroups had p -values = 0.008 and < 0.001 , respectively (Fig. 4-Left). For human ($I^2 = 93\%$) and bovine

teeth ($I^2 = 0\%$), the p -values were < 0.001 for both subgroups (Fig. 4-Right). Regarding the hardness test (Fig. 6), the analyses revealed differences ($p < 0.001$) with $I^2 = 99\%$ for sound/untreated dentine and pHc dentine. Furthermore, significant differences were found for both

human and bovine teeth subgroups meta-analysis ($p < 0.001$) with $I^2 = 98\%$. Forest plots for MRG and LPM are shown in Figure 7. The overall effect had p -values < 0.001 for both tests ($I^2 = 99\%$). The depth of demineralization was $194.95 \mu\text{m}$ and $298.17 \mu\text{m}$ for MRG and LPM, respectively.

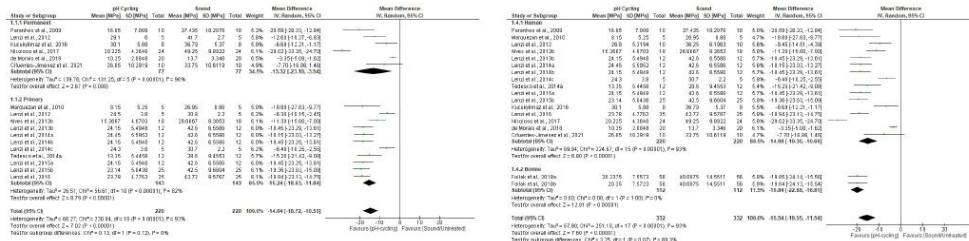


Fig. 5. Forest plots for microtensile bond strength of adhesives systems: permanent vs. primary teeth (Left), and for microtensile bond strength of adhesive systems: human vs. bovine teeth (Right)

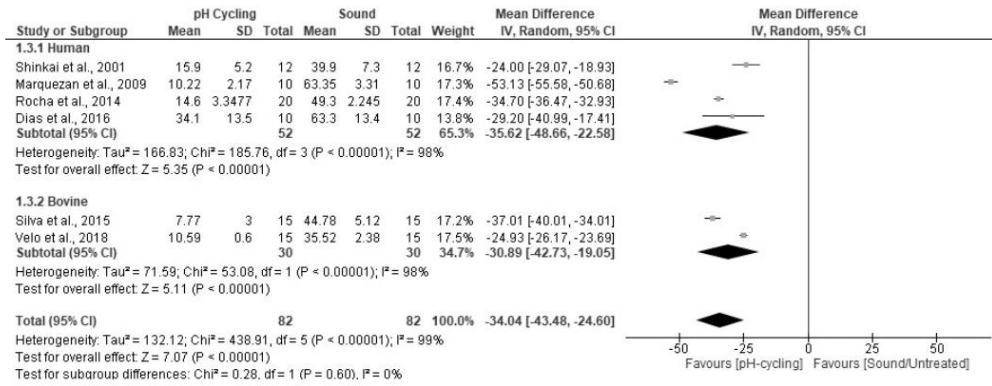


Fig. 6. Forest plot for hardness test: human vs. bovine teeth

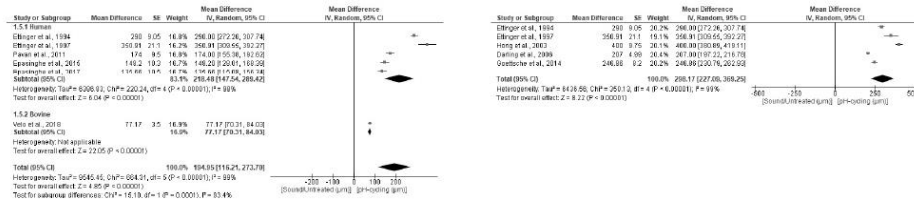


Fig. 7. Forest plots for microradiography - MRG (Left) and for polarized light microscopy - PLM (Right)

4. DISCUSSION

The pHc is considered a simple experimental procedure used as a preliminary step in many investigations, addressing many methodological aspects, depending on the research. The pHc procedure was initially created for the development of artificial caries lesions in the enamel [4], which were later transferred to dentine, simulating the loss or gain of mineral in both substrates. This procedure has the advantage of simulating a dynamic carious process in which demineralization is higher than remineralization, in opposition to the static method using buffers or acid gels, ultimately producing caries lesions. Despite pHc limitations, such as incomplete chemical simulation of oral conditions or lack of bacterial activity [86], it is an *in vitro* model often used in caries research. In this regard, a comprehensive systematic search and meta-analysis of the experimental parameters employed during pHc is of great interest for determining the methodological conditions required for specific studies in dental research.

Worth noting is the large number of pHc studies conducted on primary teeth, despite the difficulty of gathering them. There are several differences between primary and permanent teeth in terms of their chemical composition and microstructural characteristics (*e.g.*, enamel thickness, phosphate and calcium concentration in dentine) [87]. Between these differences, the lower relative content of mineral and organic components in the primary teeth [88,89] makes them more susceptible to demineralization. On the other hand, bovine teeth are presented as an alternative to human teeth due to some compositional and structural similarities [90,91], two systematic reviews performed with meta-analysis supporting their reliable substitution in bond strength studies [92,93]. To date, there is one study comparing the effect of the pHc method between bovine and human dentine [84]. So far, most of these comparative researches employed other methods to induce artificial caries [94,95] or used healthy teeth [96,97]. The limited use of bovine incisors may be due to the fact that the characteristics of

human teeth approach more closely to a real clinical situation, allowing the results to be extrapolated to dental practice.

Regarding the compounds and concentrations of the demineralization and remineralization solutions, an extensive part of the research followed the concentration ranges existing in the oral fluid reported by Jenkins [98]. The demineralizing solution is acidic, with critical limit of pH values = 5.5 and 4.5 for the solubility of hydroxyapatite (HAp) and fluorapatite (FAP) [99], being undersaturated with respect to the inorganic phases providing mineral loss, which simulates the acid attack by bacterial metabolism. On the other side, remineralizing solutions aim at acting as the composition of saliva, through the concentration of Ca^{2+} , $(\text{PO}_4)^{3-}$, and F^- ions at a neutral pH, promoting the formation of HAp and FAP in the dental substrate [99]. Overall, the demineralizing and remineralizing solutions tend to simulate the loss and gain of minerals, respectively, limiting the effect on the organic components of the dental tissue. Several studies propose to use collagenase in order to promote the degradation of the demineralized collagen matrix, approaching the actual situation in a carious process [7,30,65]. In the pHc, collagenase acts in the remineralizing solution [7] unlike under *in vivo* conditions, where not only bacterial collagenase or dentine metalloproteinases, but also salivary metalloproteinases are active [100,101].

The pHc makes use of different experimental parameters, such as immersion/ exposure time, pH, agitation, temperature and duration (days) of the pH cycle, which decisively influence the resulting demineralization. Exposure times (*i.e.*, demineralization and remineralization duration cycles) are based on the changes occurring in the oral environment during food intake. On one side, demineralization times correspond to the period in which the teeth are exposed to the simulated bacterial acids, while remineralization corresponds to the time intervals between these acid exposures [22,46]. Herkströter *et al.* [14] demonstrated that a 1:1 ratio for the demineralization/ remineralization cycles showed higher mineral loss than other experimental exposure ratios (*e.g.*, 1:2, 1:3, and 1:4). Likewise, de-Melo *et al.* [41] showed that

mineral loss was significantly higher when the number of days/ cycles of pHc increased. Regarding the experimental temperatures, the most common were 37°C and room temperature. However, *in vitro* erosion studies showed an increase in the effects of demineralization erosion with the temperature of acidic solutions [102-104]. This increased mineral alteration is explained by the influence of higher temperatures on the reaction rates in solutions [104]. Moreover, the effect of pH lies in the fact that a decrease in pH condition logarithmically increases the solubility of apatite [105,106]. As previously mentioned, the recommended pH values for pHc associated with the natural process of caries range between 5.0 and 4.5, since a lower pH would result in a dental erosion unrelated to caries process [99]. Regarding the agitation and/or stirring of solutions, Eisenburger and Addy [103] showed the strong relationship between the depth of erosion and the effect of the mechanical stirring of solutions, explained by the enhanced mobility and ion exchange and, consequently, the increasing rate of tooth demineralization.

Regarding analytical techniques, the references mainly employed μ TBS and hardness tests to assess the mechanical and physical properties of pHc samples. The μ TBS methodology, implemented by Sano *et al.*, [107] consists of evaluating the effectiveness in the adhesion of different materials and, consequently, in predicting the longevity of dental restorations [108]. The hardness test consists of measuring the resistance of a material or dental substrate to the penetration of a mechanical indenter. In addition, the hardness data obtained also provides information on the mineral loss in dental substrates [17,41]. Transverse MRG was used to observe and measure the mineral loss in the substrate profile, and to quantify the lesion depth caused during the pHc, the later being also characterized by PLM. SEM observations were also carried out for the morphological analysis of the interfaces or nanoleakage evaluation, as well as for examining the failure mode in bond strength studies. *In situ* characterization techniques, such as SEM coupled with EDS/EDX detectors or electron probe microanalysis (EPMA), were

used to determine the chemical composition of the mineral component. Furthermore, other spectroanalytical methods, such as atomic absorption spectrophotometer (ASS) and inductively coupled plasma optical emission spectrometer (ICP-OES), were employed for elemental analysis.

In order to quantify the demineralization yielded by pHc, a meta-analysis was performed on a total of 31 studies, including the four main analytical techniques for sample characterization (*i.e.*, μ TBS, hardness, MRG and PLM). All analyses showed considerable heterogeneity ($I^2 > 90\%$) in all subgroups, except bovine teeth subgroup ($I^2 = 0\%$) for μ TBS, as only two references with similar data (*i.e.*, mean, standard deviation and sample size) met the inclusion criteria. Since heterogeneity is inevitable by methodological diversity [109], a common factor for this heterogeneity was the variety of pHc protocols and, even if less considered, the biological variability of samples. The increased heterogeneity for μ TBS results may be due to the type of adhesive systems considered (etch-and-rinse, self-etch and multimode adhesives). Comparing the studies on human *vs.* bovine teeth, the human subgroup included permanent and primary teeth so that the morphological and structural differences between them favor the observed heterogeneity. Similarly, the heterogeneity for the hardness test is also increased by considering the permanent and primary teeth together, as well as by the analytical differences in the results between the microhardness and hardness tests in the included studies. In PLM meta-analysis, all studies used human teeth while, in MRG, five studies used human and only one study used bovine teeth. The heterogeneity observed for these results can be explained by some of the reasons mentioned above (*i.e.*, variety of pHc protocols, biological variability of samples and differences between human and bovine teeth). Despite the considerable heterogeneity, the forest plots showed that the direction of effects is clearly favoring pHc (*i.e.*, producing a demineralization of substrates), where the μ TBS and hardness values decreased with respect to the sound/ untreated dentine. Likewise, the comparative analysis of the results describing

the depth of the lesion using MRG and LPM techniques gave ranges between 200-300 µm, considering the heterogeneity of the included studies.

Through the years, many pHc models have been developed and described in literature. In accordance with the research objectives, we distinguish the pHc protocols as aiming: 1) to induce a previous caries lesion, and 2) to test the effects of the targeted remineralizing agents. The first approach for evaluating a method to induce CAD was proposed by Erhardt *et al.*, [25] although this procedure was not validated with natural caries. Later on, Marquezan *et al.* [26] aimed at evaluating artificial caries by using three different caries induction methods (*i.e.*, static, pHc and microbiological), based on hardness analysis and morphological characterization techniques. From this procedure, several methodological variations were introduced, for example; removing NaF of the solutions, increasing the immersion time and pH of the demineralizing solution, reducing the immersion time in the remineralizing solution, duration of the procedure and room temperature and agitation conditions. Nowadays, the principle of minimally invasive dentistry has prompted research on the induction of artificial caries that reproduces the characteristics of residual caries remaining underneath the restorations after selective removal [110]. In the current research, only one of the studies included in the analysis [45] was aimed at inducing CID through pHc, although it was not evaluated with positive controls (natural caries). Summarizing, on the basis of the methodological aspects discussed in this review, the recommended parameters to develop the pHc procedure are: 1) maintaining the composition and concentration for the de- and remineralizing solutions in the ranges described, 2) immersion in demineralizing solution for three periods of 2 h each, 3) immersion in remineralizing solution for three periods: two per 1.5 h (between demineralization periods) and one for 15 h (overnight), 4) maintaining the pH between 4.5 and 5.5 in the demineralizing solution, 5) keeping the pH at 7.0 in the remineralizing solution, 6) methodological interest of incorporating

collagenase in the remineralizing solution, 7) agitation and 37°C temperature, 8) the days of execution must be validated with natural residual caries.

5. CONCLUSIONS

The current study reports that the pHc model, widely accepted by cariology researchers, is a feasible and reproducible procedure to simulate different types of caries lesions in dentine. Although most of the included studies have a medium risk of bias and heterogeneity of results, the performed quantitative meta-analysis shows a well-defined effect that indicates pHc as an effective procedure to produce *in vitro* demineralization.

FUNDING: *This work was supported by the Research Project of the Spanish Government: CGL2015-64683-P and PCI2019-111931-2.*

References

1. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental Caries. *Lancet*. 2007;369(9555):51-9.
2. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*. 2017;3:17030.
3. Paradella IC, de Sousa FA, Koga-Ito CY, Jorge AO. Microbiological or chemical models of enamel secondary caries compared by polarized-light microscopy and energy dispersive X-ray spectroscopy. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*. 2009;90(2):635-40.
4. ten Cate JM, Duijsters PP. Alternating demineralization and remineralization of artificial enamel lesions. *Caries Res*. 1982;16(3):201-10.
5. Skucha-Nowak M, Gibas M, Tanasiewicz M, Twardawa H, Szklarski T. Natural and controlled demineralization for study purposes in minimally invasive dentistry. *Adv Clin Exp Med*. 2015;24(5):891-8.
6. Wierichs RJ, Stausberg S, Lausch J, Meyer-Lueckel H, Esteves-Oliveira M. Caries-Preventive effect of NaF, NaF plus TCP, NaF plus CPP-ACP, and SDF varnishes on sound dentin and artificial dentin caries *in vitro*. *Caries Res*. 2018;52(3):199-211.
7. Kawasaki K, Featherstone JD. Effects of collagenase on root demineralization. *J Dent Res*. 1997;76(1):588-95.
8. Arita S, Suzuki M, Kazama-Koide M, Shinkai K. Shear bond strengths of tooth coating materials including the experimental materials contained

- various amounts of multi-ion releasing fillers and their effects for preventing dentin demineralization. *Odontology*. 2017;105(4):426-36.
9. Siqueira FSF, Cardenas AM, Ocampo JB, Hass V, Bandeca MC, Gomes JC, Reis A, Loguercio AD. Bonding performance of universal adhesives to eroded dentin. *J Adhes Dent*. 2018;20(2):121-32.
 10. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med*. 2009;6(7):e1000097.
 11. Ouzzani M, Hammady H, Fedorowics Z, Elmagarmid A. Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev*. 2016;5(1):210.
 12. Krithikadatta J, Gopikrishna V, Datta M. CRIS Guidelines (Checklist for Reporting *In-vitro* Studies): a concept note on the need for standardized guidelines for improving quality and transparency in reporting *in-vitro* studies in experimental dental research. *J Conserv Dent*. 2014;17(4):301-4.
 13. Higgins JPT, Green S, eds. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions* Version 5.1.0 [updated March 2011]. The Cochrane Collaboration, 2011. Available from: www.handbook.cochrane.org.
 14. Herkströter FM, Witjes M, Arends J. Demineralization of human dentine compared with enamel in a pH-cycling apparatus with a constant composition during de- and remineralization periods. *Caries Res*. 1991;25(5):317-22.
 15. Ettinger RL, Bergman W, Wefel J. Effect of fluoride on overdenture abutments. *Am J Dent*. 1994;7(1):17-21.
 16. Ettinger RL, Olson RJ, Wefel JS, Asmussen C. In vitro evaluation of topical fluorides for overdenture abutments. *J Prosthet Dent*. 1997;78(3):309-14.
 17. Shinkai RS, Cury AA, Cury JA. *In vitro* evaluation of secondary caries development in enamel and root dentin around luted metallic restoration. *Oper Dent*. 2001;26(1):52-9.
 18. Featherstone JDB, Fried D, Le CQ. Effect of a new carbon dioxide laser treatment on artificial caries progression in dentin. In: Rechmann P, Fried D, Henning T, eds. *Conference on Lasers in Dentistry IX*; 2003 Jan 26-27; San Jose, CA. Bellingham: SPIE-Int Soc Optical Engineering; 2003. pp. 236-240.
 19. White DJ, Featherstone JD. A longitudinal microhardness analysis of fluoride dentifrice effects on lesion progression in vitro. *Caries Res*. 1987;21(6):502-12.
 20. Featherstone JD, Glana R, Shariati M, Shields CP. Dependence of *in vitro* demineralization of apatite and remineralization of dental enamel on fluoride concentration. *J Dent Res*. 1990;69 Spec No:620-5.
 21. Featherstone JD, Barrett-Vespone NA, Fried D, Kantorowitz Z, Seka W. CO₂ laser inhibitor of artificial caries-like lesion progression in dental enamel. *J Dent Res*. 1998;77(6):1397-403.
 22. Hong L, Ettinger RL, Watkins CA, Wefel JS. In vitro evaluation of fluoride varnish on overdenture abutments. *J Prosthet Dent*. 2003;89(1):28-36.
 23. Darling LA, Ettinger RL, Wefel JS, Cooper SH, Qian F. Prevention of demineralization by CO₂ and Er,Cr:YSGG laser irradiation of overdenture abutments. *Am J Dent*. 2006;19(4):227-30.
 24. de Menezes M, Turssi CP, Faraoni-Romano JJ, Serra MC. Susceptibility of bleached enamel and root dentin to artificially formed caries-like lesions. *Am J Dent*. 2007;20(3):173-6.
 25. Erhardt MC, Rodrigues JA, Valentino TA, Ritter AV, Pimenta LA. *In vitro* microTBS of one-bottle adhesive systems: sound versus artificially-created caries-affected dentin. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;86(1):181-7.
 26. Marquezan M, Corrêa FN, Sanabe ME, Rodrigues Filho LE, Hebling J, Guedes-Pinto AC, Mendes FM. Artificial methods of dentine caries induction: a hardness and morphological comparative study. *Arch Oral Biol*. 2009;54(12):1111-7.
 27. Paranhos MP, Spohr AM, Marcondes M, Oshima HM, Mota EG, Burnett LH Jr. Influence of Nd:YAG laser irradiation on microtensile bond strength of adhesive systems to sound or carious dentin. *Quintessence Int*. 2009;40(2):145-53.
 28. Marquezan M, Osorio R, Ciamponi AL, Toledano M. Resistance to degradation of bonded restorations to simulated caries-affected primary dentin. *Am J Dent*. 2010;23(1):47-52.
 29. Esteves-Oliveira M, Zezell DM, Ana PA, Yekta SS, Lampert F, Eduardo CP. Dentine caries inhibition through CO₂ laser (10.6 µm) irradiation and fluoride application, in vitro. *Arch Oral Biol*. 2011;56(6):533-9.
 30. Hiraishi N, Sono R, Islam MS, Otsuki M, Tagami J, Takatsuka T. Effect of hesperidin in vitro on root dentine collagen and demineralization. *J Dent*. 2011;39(5):391-6.
 31. Liu Y, Li N, Qi Y, Niu LN, Elshafiy S, Mao J, Breschi L, Pashley DH, Tay FR. The use of sodium trimetaphosphate as a biomimetic analog of matrix phosphoproteins for remineralization of artificial caries-like dentin. *Dent Mater*. 2011a;27(5):465-77.
 32. ten Cate JM, Buijs MJ, Damen JJ. pH-cycling of enamel and dentin lesions in the presence of low concentrations of fluoride. *Eur J Oral Sci*. 1995;103(6):362-7.
 33. Liu Y, Mai S, Li N, Yiu CK, Mao J, Pashley DH, Tay FR. Differences between top-down and bottom-up approaches in mineralizing thick, partially-demineralized collagen scaffolds. *Acta Biomater*. 2011b;7(4):1742-51.
 34. Marquezan M, Skupien JA, da Silveira BL, Ciamponi AL. Nanoleakage related to bond strength in RM-GIC and adhesive restorations. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2011;12(1):15-21.

35. Pavan S, Xie Q, Hara AT, Bedran-Russo AK. Biomimetic approach for root caries prevention using a proanthocyanidin-rich agent. *Caries Res.* 2011;45(5):443-7.
36. Lenzi TL, Tedesco TK, Soares FZ, Loguercio AD, Rocha Rde O. Chlorhexidine does not increase immediate bond strength of etch-and-rinse adhesive to caries-affected dentin of primary and permanent teeth. *Braz Dent J.* 2012;23(4):438-42.
37. Sohn S, Yi K, Son HH, Chang J. Caries-preventive activity of fluoride-containing resin-based desensitizers. *Oper Dent.* 2012;37(3):306-15.
38. Alves FB, Hesse D, Lenzi TL, Guglielmi Cde A, Reis A, Loguercio AD, Carvalho TS, Raggio DP. The bonding of glass ionomer cements to caries-affected primary tooth dentin. *Pediatr Dent.* 2013a;35(4):320-4.
39. Alves FBT, Lenzi TL, Reis A, Loguercio AD, Carvalho TS, Raggio DP. Bonding of simplified adhesive systems to caries-affected dentin of primary teeth. *J Adhes Dent.* 2013b;15(5):439-45.
40. Comar LP, Souza BM, Gracindo LF, Buzalaf MA, Magalhães AC. Impact of experimental nano-HAP pastes on bovine enamel and dentin submitted to a pH cycling model. *Braz Dent J.* 2013;24(3):273-8.
41. de-Melo MA, Goes Dda C, de-Moraes MD, Santiago SL, Rodrigues LK. Effect of chlorhexidine on the bond strength of a self-etch adhesive system to sound and demineralized dentin. *Braz Oral Res.* 2013;27(3):218-24.
42. Lenzi TL, Bonifácio CC, Bönecker M, Amerongen WE, Nogueira FN, Raggio DP. Flowable glass ionomer cement layer bonding to sound and carious primary dentin. *J Dent Child (Chic).* 2013a;80(1):20-4.
43. Lenzi TL, Mendes FM, Rocha Rde O, Raggio DP. Effect of shortening the etching time on bonding to sound and caries-affected dentin of primary teeth. *Pediatr Dent.* 2013b;35(5):E129-33.
44. Calvo AFB, Alves FBT, Lenzi TL, Tedesco TK, Reis A, Loguercio AD, Raggio DP. Glass ionomer cements bond stability in caries-affected primary dentin. *Int J Adhes Adhes.* 2014;48:183-7.
45. Erhardt MC, Lobo MM, Goulart M, Coelho-de-Souza FH, Valentino TA, Pisani-Proenca J, Conceicao EN, Pimenta LA. Microtensile bond strength of etch-and-rinse and self-etch adhesives to artificially created carious dentin. *Gen Dent.* 2014;62(3):56-61.
46. Goettsche ZS, Ettinger RL, Wefel JS, Hogan MM, Harless JD, Qian F. In vitro assessment of 3 dentifrices containing fluoride in preventing demineralization of overdenture abutments and root surfaces. *J Prosthet Dent.* 2014;112(5):1257-64.
47. Lenzi TL, Tedesco TK, Calvo AF, Ricci HA, Hebling J, Raggio DP. Does the method of caries induction influence the bond strength to dentin of primary teeth? *J Adhes Dent.* 2014a;16(4):333-8.
48. Lenzi TL, Braga MM, Raggio DP. Shortening the etching time for etch-and-rinse adhesives increases the bond stability to simulated caries-affected primary dentin. *J Adhes Dent.* 2014b;16(3):235-41.
49. Lenzi TL, Tedesco TK, Soares FZ, Loguercio AD, Rocha RDO. Chlorhexidine application for bond strength preservation in artificially-created caries-affected primary dentin. *Int J Adhes Adhes.* 2014c;54:51-6.
50. Rocha C, Faria-e-Silva A, Peixoto A. Bond strength of adhesive luting agents to caries-affected dentin. *Oper Dent.* 2014;39(4):383-8.
51. Tedesco TK, Alves FBT, Lenzi TL, Calvo AFB, Reis A, Loguercio AD, Raggio DP. Effect of 2 years water aging on bond strength stability of adhesive systems to artificial caries-affected primary dentin. *Int J Adhes Adhes.* 2014a;54:172-176.
52. Tedesco TK, Bonifácio CC, Hesse D, Kleverlaan CJ, Lenzi TL, Raggio DP. Bonding longevity of flowable GIC layer in artificially carious dentin. *Int J Adhes Adhes.* 2014b;51:62-6.
53. Epasinghe DJ, Yiu CKY, Burrow MF. Synergistic effect of proanthocyanidin and CPP-ACFP on remineralization of artificial root caries. *Aust Dent J.* 2015;60(4):463-70.
54. Lenzi TL, Calvo AF, Tedesco, Ricci HA, Hebling J, Raggio DP. Effect of method of caries induction on aged resin-dentin bond of primary teeth. *BMC Oral Health.* 2015a;15:79.
55. Lenzi TL, Raggio DP, Soares FZ, Rocha Rde O. Bonding performance of a multimode adhesive to artificially-induced caries-affected primary dentin. *J Adhes Dent.* 2015b;17(2):125-31.
56. Lenzi TL, Soares FZM, Tedesco TK, Rocha Rde O. Is it possible to induce artificial caries-affected dentin using the same protocol to primary and permanent teeth? *J Contemp Dent Pract.* 2015c;16(8):638-42.
57. Melo MA, Lima JP, Passos VF, Rodrigues LK. The influence of dentin demineralization on morphological features of cavities using Er:YAG laser. *Photomed Laser Surg.* 2015;33(1):22-8.
58. Silva AP, Gonçalves RS, Borges AF, Bedran-Russo AK, Shinohara MS. Effectiveness of plant-derived proanthocyanidins on demineralization on enamel and dentin under artificial cariogenic challenge. *J Appl Oral Sci.* 2015;23(3):302-9.
59. Dias GF, Chibinski ACR, dos Santos FA, Hass V, Alves FBT, Wambier DS. The hardness and chemical changes in demineralized primary dentin treated by fluoride and glass ionomer cement. *Rev Odontol UNESP.* 2016;45(1):33-40.
60. Kucukyilmaz E, Savas S, Akcay M, Bolukbasi B. Effect of silver diamine fluoride and ammonium hexafluorosilicate applications with and without Er:YAG laser irradiation on the microtensile bond strength in sound and caries-affected dentin. *Lasers Surg Med.* 2016;48(1):62-9.

61. Lenzi TL, Soares FZ, Raggio DP, Pereira GK, Rocha Rde O. Dry-bonding etch-and-rinse strategy improves bond longevity of a universal adhesive to sound and artificially-induced caries-affected primary dentin. *J Adhes Dent*. 2016;18(6):475-82.
62. Nicoloso GF, Antoniazzi BF, Lenzi TL, Soares FZ, Rocha Rde O. Is there a best protocol to optimize bond strength of a universal adhesive to artificially induced caries-affected primary or permanent dentin? *J Adhes Dent*. 2016;18(5):441-6.
63. Sung YH, Son HH, Yi K, Chang J. Elemental analysis of caries-affected root dentin and artificially demineralized dentin. *Restor Dent Endod*. 2016;41(4):255-61.
64. Curylofo-Zotti FA, Tanta GS, Zucoloto ML, Souza-Gabriel AE, Corona SAM. Selective removal of carious lesion with Er:YAG laser followed by dentin biomodification with chitosan. *Lasers Med Sci*. 2017;32(7):1595-603.
65. Epasinghe DJ, Kwan S, Chu D, Lei MM, Burrow MF, Yiu CKY. Synergistic effects of proanthocyanidin, tri-calcium phosphate and fluoride on artificial root caries and dentine collagen. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;73:293-9.
66. Li X, De Munck J, Yoshihara K, Pedano M, Van Landuyt K, Chen Z, Van Meerbeek B. Re-mineralizing dentin using an experimental tricalcium silicate cement with biomimetic analogs. *Dent Mater*. 2017;33(5):505-13.
67. Nicoloso GF, Antoniazzi BF, Lenzi TL, Soares FZM, Rocha Rde O. The bonding performance of a universal adhesive to artificially-created caries-affected dentin. *J Adhes Dent*. 2017;19(4):317-21.
68. de Moraes RC, Silveira RE, Chinelatti M, Geraldeli S, de Carvalho Panzeri Pires-de-Souza F. Bond strength of adhesive systems to sound and demineralized dentin treated with bioactive glass ceramic suspension. *Clin Oral Investig*. 2018;22(5):1923-31.
69. Dias GF, Alves FBT, Samways DM, dos Santos FA. Mineral exchange between dentin pre-treatment with dolomite powder on demineralized dentin in deciduous molars. *Braz Dent Sci*. 2018;21(3):341-50.
70. Follak AC, Miotti LL, Lenzi TL, Rocha RO, Soares FZ, Maxnuck Soares FZ. The impact of artificially caries-affected dentin on bond strength of multi-mode adhesives. *J Conserv Dent*. 2018a;21(2):136-41.
71. Follak AC, Miotti LL, Lenzi TL, Rocha RO, Soares FZ. Degradation of multimode adhesive system bond strength to artificial caries-affected dentin due to water storage. *Oper Dent*. 2018b;43(2):E92-101.
72. Velo MMAC, Magalhães AC, Shiota A, Farha ALH, Grizzo LT, Honório HM, Wang L. Profile of high-fluoride toothpastes combined or not with functionalized tri-calcium phosphate on root dentin caries control: an in vitro study. *Am J Dent*. 2018;31(6):290-6.
73. Al-Hasnawi KIM, Radhi NJMH. The impact of selected fluoride materials and Nd: YAG LASER on dentine (*in vitro study*). *J Res Med Dent Sci*. 2019;7(4):1-7.
74. Jeon RJ, Hellen A, Matvienko A, Mandelis A, Abrams SH, Amaechi BT. Experimental investigation of demineralization and remineralization of human teeth using infrared photothermal radiometry and modulated luminescence. In: Oraevsky AA, Wang L V, eds. *Proc SPIE 6856, Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2008: The Ninth Conference on Biomedical Thermoacoustics, Optoacoustics, and Acousto-optics*. 2008. pp. 68560B.
75. dos Santos Ferreira E, Prates ITK, dos Santos Jr. SLM, Del Valle M, Zzell DM, Ana PA. In vitro study of Er,Cr:YSGG laser effects when used for the prevention of dentin demineralization. In: Costa-Felix R, Machado JC, Alvarenga AV, eds. *XXVI Brazilian congress on biomedical engineering IFMBE Proceedings Volume 70/2*. Singapore: Springer; 2019. pp. 825-9.
76. Fathy SM. Remineralization ability of two hydraulic calcium-silicate based dental pulp capping materials: cell-independent model. *J Clin Exp Dent*. 2019;11(4):e360-6.
77. Zander V, Chan D, Sadr A. Microcomputed tomography evaluation of root dentin caries prevention by topical fluorides and potassium iodide. *Sensors (Basel)*. 2019;19(4):874.
78. Bassi JC, Tedesco TK, Raggio DP, Santos AMA, Bianchi RMD, de Sant'Anna GR. Is it necessary to pre-treat dentine before GIC restorations? Evidence from an in vitro study. *Acta Odontol Latinoam*. 2020;33(1):27-32.
79. Leal AMC, Beserra dos Santos MV, da Silva Filho EC, Menezes de Carvalho AL, Tabchoury CPM, Vale GC. Development of an experimental dentifrice with hydroxyapatite nanoparticles and high fluoride concentration to manage root dentin demineralization. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:7469-79.
80. Luk K, Zhao IS, Yu OY, Mei ML, Gutknecht N, Chu CH. Caries prevention effects of silver diamine fluoride with 10,600 nm carbon dioxide laser irradiation on dentin. *Photobiomodul, Photomed, Laser Surg*. 2020;38(5):295-300.
81. Sadoon NY, Fathy SM, Osman MF. Effect of using biomimetic analogs on dentin remineralization with bioactive cements. *Braz Dent J*. 2020;31(1):44-51.
82. Okuyama K, Matsuda Y, Yamamoto H, Sakurai M, Naito K, Shintani K, Saito T, Hayashi M, Tamaki Y. Distribution of elements in teeth and inhibition of demineralization by titanium fluoride: effects of concentration and pH in a titanium fluoride solution. *Dent Mater J*. 2021;40(3):736-42.
83. Enrich-Essvein I, Rodríguez-Navarro AB, Álvarez-Lloret P, Cifuentes-Jiménez C, Bolaños-Carmona MV, González-López S. Proanthocyanidin-functionalized

- hydroxyapatite nanoparticles as dentin biomodifier. *Dent Mater.* 2021;37(9):1437-45.
84. Enrich-Essvein T, Benavides-Reyes C, Álvarez-Lloret P, Bolaños-Carmona MV, Rodríguez-Navarro AB, González-López S. Influence of de-remineralization process on chemical, microstructural, and mechanical properties of human and bovine dentin. *Clin Oral Investig.* 2021;25(3):841-9.
 85. Cifuentes-Jimenez C, Alvarez-Lloret P, Benavides-Reyes C, Gonzalez-Lopez S, Rodriguez-Navarro AB, Bolaños-Carmona MV. Physicochemical and mechanical effects of commercial silver diamine fluoride (SDF) agents on demineralized dentin. *J Adhes Dent.* 2021;23(6):557-67.
 86. Buzalaf MA, Hannas AR, Magalhães AC, Rios D, Honório HM, Delbem AC. pH-cycling models for *in vitro* evaluation of the efficacy of fluoridated dentifrices for caries control: strengths and limitations. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(4):316-34.
 87. Koutsi V, Noonan RG, Horner JA, Simpson MD, Matthews WG, Pashley DH. The effect of dentin depth on the permeability and ultrastructure of primary molars. *Pediatr Dent.* 1994;16(1):29-35.
 88. Mortimer KV. The relationship of deciduous enamel structure to dental disease. *Caries Res.* 1970;4(3):206-23.
 89. Angker L, Nockolds C, Swain MV., Kilpatrick N. Quantitative analysis of the mineral content of sound and carious primary dentine using BSE imaging. *Arch Oral Biol.* 2004;49(2):99-107.
 90. Soares LE, Santo AM. Morphological and chemical comparative analysis of the human and bovine dentin-adhesive layer. *Microsc Microanal.* 2015;21(1):204-13.
 91. Teruel Jde D, Alcolea A, Hernández A, Ruiz AJ. Comparison of chemical composition of enamel and dentine in human, bovine, porcine and ovine teeth. *Arch Oral Biol.* 2015;60(5):768-75.
 92. Soares FZ, Follak A, da Rosa LS, Montagner AF, Lenzi TL, Rocha RO. Bovine tooth is a substitute for human tooth on bond strength studies: a systematic review and meta-analysis of *in vitro* studies. *Dent Mater.* 2016;32(11):1385-93.
 93. de Carvalho MFF, Leijóto-Lannes ACN, Rodrigues MCN, Nogueira LC, Ferraz NKL, Moreira AN, Yamauti M, Zina LG, Magalhães CS. Viability of bovine teeth as a substrate in bond strength tests: a systematic review and meta-analysis. *J Adhes Dent.* 2018;20(6):471-9.
 94. Hara AT, Queiroz CS, Paes Leme AF, Serra MC, Cury JA. Caries progression and inhibition in human and bovine root dentine *in situ*. *Caries Res.* 2003;37(5):339-44.
 95. Lippert F, Churchley D, Lynch RJ. Effect of lesion baseline severity and mineral distribution on remineralization and progression of human and bovine dentin caries lesions. *Caries Res.* 2015;49(5):467-76.
 96. Anido-Anido A, Amore R, Lewgoy HR, Anauate-Netto C, Silva TM, Paiva Gonçalves SE. Comparative study of bond strength to human and bovine dentine at three different depths. *Braz Dent Sci.* 2012;15(2):56-62.
 97. Rüttermann S, Braun A, Janda R. Shear bond strength and fracture analysis of human vs. bovine teeth. *PLoS One.* 2013;8(3):e59181.
 98. Jenkins GN: The physiology and biochemistry of the mouth. Oxford: Blackwell Scientific;1978.
 99. Mount GJ, Hume WR. Preservation and restoration of tooth structure, 2nd ed. Queensland: Knowledge Books and Software; 2005.
 100. Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res.* 1998;77(8):1622-9.
 101. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res.* 2006;85(1):22-32.
 102. West NX, Hughes JA, Addy M. Erosion of dentine and enamel *in vitro* by dietary acids: the effect of temperature, acid character, concentration and exposure time. *J Oral Rehabil.* 2000;27(10):875-80.
 103. Eisenburger M, Addy M. Influence of liquid temperature and flow rate on enamel erosion and surface softening. *J Oral Rehabil.* 2003;30(11):1076-80.
 104. Steiger-Ronay V, Steingruber A, Becker K, Aykut-Yetkiner A, Wiedemeier DB, Attin T. Temperature-dependent erosivity of drinks in a model simulating oral fluid dynamics. *J Dent.* 2018;70:118-23.
 105. Larsen MJ. An investigation of the theoretical background for the stability of the calcium-phosphate salts and their mutual conversion in aqueous solutions. *Arch Oral Biol.* 1986;31(11):757-61.
 106. Larsen MJ, Nyvad B. Enamel erosion by some soft drinks and orange juices relative to their pH, buffering effect and contents of calcium phosphate. *Caries Res.* 1999;33(1):81-7.
 107. Sano H, Shono T, Sonoda H, Takatsu T, Ciucchi B, Carvalho R, Pashley DH. Relationship between surface area for adhesion and tensile bond strength - evaluation of a micro-tensile bond test. *Dent Mater.* 1994;10(4):236-40.
 108. El Mourad AM. Assessment of bonding effectiveness of adhesive materials to tooth structure using bond strength test methods: a review of literature. *Open Dent J.* 2018;12:664-78.
 109. Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. Measuring inconsistency in meta-analyses. *BMJ.* 2003;327(7414):557-60.
 110. Schwendicke F, Eggers K, Meyer-Lueckel H, Dörfer C, Kovalev A, Gorb S, Paris S. *In vitro* induction of residual caries lesions in dentin: comparative mineral loss and nano-hardness analysis. *Caries Res.* 2015;49(3):259-65.