



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



TESIS

**Remineralización del esmalte humano *in vitro*
con Caseína Fosfatasa- Fosfato de Calcio Amorfo**

POR:

C. D. Daniel Eugenio Guajardo Hernández.
2004

Para obtener el grado de Maestría en Ciencias Odontológicas
con Especialidad en Odontopediatría.

Monterrey N.L Julio de 2012

ASESORES:

Coordinadora del Posgrado de Odontopediatria.

C. D. Especialidad en Odontología infantil M.C.F. Martha Elena García Martínez ,PhD

Director de Tesis

C.D. Posgrado en Ortodoncia M.C. Hilda Torre Martínez PhD

Asesor Estadístico

M.C.P. Especialidad en Pediatría. M. en C., Dr. en Ciencias Francisco González Salazar

Asesor de biología celular

C.D.M.C.D.C Myriam A. de la Garza Ramos.

Asesor morfológico

Ricardo Martínez

Asesor externo:

Rick Rogers Ph.D

Coordinadora del Posgrado de Odontopediatria.

C. D. Especialidad en Odontología infantil M.C.Martha Elena García Martínez PhD

SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS DE POSGRADO

C.D.M.E.O Sergio Eduardo Nakagoshi Cepeda, PhD

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Los miembros del jurado aceptamos la tesis y aprobamos el documento que avala a la misma, que como opción a obtener el grado de Maestría en Ciencias Odontológicas con especialidad en Odontopediatria presenta el Cirujano Dentista Daniel Eugenio Guajardo Hernández.

Honorables miembros del jurado:

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y mis hermanos que me acompañaron en esta etapa de mi vida , por haberme brindado una educación de amor y valores.

A Norita , mi amiga , colega , mi novia y esposa, por tantos momentos que vivimos en el posgrado donde la conocí.

Gracias a Dios por todas las bendiciones que he recibido en todos los momentos de mi vida.

Agradezco a todos los doctores que se involucraron en esta investigación. A la Dra. Myriam A. de la Garza Ramos que creyó desde el principio en el proyecto . Al Dra. Hilda Torre Martínez, como directora de tesis que estuvo al pendiente en el proceso de elaboración. Al Dr. Francisco Gonzales por su tiempo y paciencia al aportar su conocimiento. Al Dr. Ricardo Martínez Pedraza por su aportaciones al del proyecto. A la Quimica Vilma Rosa Suárez Martinez por su dedicación y tiempo. En especial al Dr. Rick Rogers y la Dra. Rosalinda ...que nos ayudaron a concluir el trabajo en la Universidad de Harvard.

A la Dra. Martha E. García Martínez por su apoyo como coordinadora del posgrado. A mis compañeras de generación por estos tres años que pasamos .

Índice

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
ANTECEDENTES.....	5
Esmalte.....	5
Caries.....	6
Teorías de la formación de las caries.....	8
Mancha Blanca.....	9
Microorganismos.....	10
Desmineralización y Remineralización.....	10
Saliva.....	12
Remineralización.....	13
ACP.....	15
Prevalencia.....	17
Microscopio Electrónico de Barrido.....	18
MATERIALES Y METODOS.....	20
Descripción de procedimientos.....	20
Definición de Variable.....	22
Forma de captación de Variables.....	23
Análisis e interpretación de la información.....	26
Tamaño de la muestra.....	26
Resultados.....	27
Discusión.....	32
Conclusión.....	34
Recomendaciones.....	35

Referencias.....	36
Anexos.....	39

Resumen

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

C.D. Daniel Eugenio Guajardo Hernández.

Candidato a obtener el grado de Maestría en Ciencias Odontológicas con Especialidad en Odontopediatría 2012.

RESUMEN.

Páginas:44

Área de Estudio: Posgrado de Odontopediatría Facultad de Odontología U.A.N.L.

Remineralización del esmalte humano *in vitro* con Caseína Fosfatasa- Fosfato de Calcio Amorfo

Propósito: **Determinar** la remineralización del esmalte humano con Caseína Fosfatasa- Fosfato de Calcio Amorfo después de una lesión de mancha blanca.

Método de estudio: Se usaron un total de 12 premolares extraídos por razones ortodónticas libres de caries, se distribuyeron en 4 premolares para cada grupo como sigue: Grupo control, Grupo desmineralización, Grupo remineralización. Los tres grupos se observaron con Microscopia Electrónica de Barrido. En el grupo desmineralización se provocó una lesión de mancha blanca por medio de ácido láctico de la fermentación de carbohidratos proveniente de microorganismos cariogénicos, Posteriormente el grupo de remineralización después de que se indujo la lesión de mancha blanca se trató con Caseína Fosfatasa –Fosfato de Calcio Amorfo ((MiPaste®) por 30 días. La comparación de frecuencia que se utilizó fue Chi cuadrada, para determinar la diferencia de frecuencias en los grupos se determinó el valor de p menor de 0.05.

Resultados: En el grupo desmineralización, se observó una superficie irregular generalizada. Se encontraron zonas con color grisáceo y blanquecino, las cuales presentan depresiones o socavamientos de diversos tamaños. En el grupo de remineralización, se encontró una superficie lisa e irregular con indicios de pequeños socavamientos. En los pequeños socavamientos se encuentran casi obliterados en la entrada y superficie de los prismas del esmalte, lo cual disminuye la profundidad de estos socavamientos.

Conclusiones: En este estudio se demostró que las piezas inducidas a una desmineralización de mancha blanca registraron lesiones irreversibles en el esmalte, donde las estructuras de los prismas se volvieron irregulares con una superficie porosa y con pérdida de material. Después del tratamiento con Caseína Fosfatasa –Fosfato de Calcio Amorfo ((MiPaste ®) se indujo el proceso de remineralización. Sin embargo, con este proceso no se recupera la estructura de los prismas del esmalte antes de ser dañados, pero se incrementa la cantidad de material cubriendo las porosidades y socavamientos irregulares reduciendo el tamaño del defecto

Director de Tesis _____

C.D. Posgrado en Ortodoncia M.C. Hilda Torre Martínez PhD

INTRODUCCIÓN

El esmalte es el tejido más duro y mineralizado del cuerpo humano, este tejido cubre la superficie de la corona del diente. En la caries dental, la desmineralización del esmalte es causada por ácidos producidos por la fermentación de carbohidratos de la dieta por bacterias de la placa dental.

La caries dental se considera una enfermedad crónica e infecciosa. Es la enfermedad más común en la infancia, es 5 veces más frecuente que el asma y 7 veces más que la bronquitis. Se estima que cinco millones de personas en el planeta han sufrido caries dental en la actualidad. Según la OMS la caries dental en México es la enfermedad dental más prevalente en la infancia y es una de las causas primordiales de la pérdida de los dientes en el adulto. Se ha reportado que el 95% de los niños de la población mexicana padece de esta enfermedad.

A lo largo del tiempo se ha intentado evitar la pérdida de dientes y estructura dentaria tratando la caries. La forma en que se intenta solucionar este problema es por medio de la prevención, pero la otra opción es el tratamiento temprano de las lesiones cariosas. Por ello, es importante detectar a tiempo el proceso de desmineralización de las piezas dentales, lo cual es la etapa inicial del proceso carioso.

La lesión inicial de la caries dental se llama mancha blanca, que es una zona translúcida de avance interno, que se forma por la desmineralización.

El fenómeno de desmineralización y remineralización es un ciclo continuo que se repite con la ingesta de alimentos. La desmineralización ocurre al ingerir alimentos con alta cantidad de carbohidratos, que al ser metabolizados por la placa dental, forman ácidos que reaccionan en la superficie del esmalte.

En la cavidad oral hay un continuo proceso de remineralización y desmineralización. Si el pH salival se sitúa por debajo de 5.5 en el esmalte de los dientes, se libera iones de calcio y fosfato, lo que produce su desmineralización. Por otro lado, cuando el pH está por arriba de 5.5, los iones de calcio y fosfato que se encuentran en saliva se pueden reintegrar al esmalte con la consecuente remineralización.

Si la estructura del diente está intacta, la desmineralización del esmalte puede ser reversible en las pequeñas lesiones del esmalte con un tratamiento no agresivo y preventivo.

Es probable que el fosfato y el calcio que se encuentran en saliva sean insuficientes para mantener la remineralización del esmalte, ya que ésta depende de la presencia de suficientes cantidades de estos elementos en la saliva.

En este estudio se pretende comparar la remineralización del esmalte en piezas con una lesión de mancha blanca formada a base de microorganismos cariogénicos en un medio controlado simulando un medio bucal *in vitro* con un producto llamado Caseína Fosfatasa- Fosfato de Calcio Amorfo MiPaste®.

El objetivo de este trabajo fue determinar la remineralización del esmalte humano *in vitro* inducida por Caseína Fosfatasa- Fosfato de Calcio Amorfo MiPaste®, después de inducir la desmineralización con bacterias cariogénicas en un medio bucal *in vitro*.

Los objetivos específicos fueron:

- Determinar la estructura de los prismas del esmalte por medio de microscopía electrónica de barrido.
- Desmineralizar los molares obtenidos con ácido láctico, producido por *E.mutans* y *E. Sobrinus*.
- Identificar las características del esmalte desmineralizado por medio de Microscopía Electrónica de Barrido MEB.
- Evaluar por medio de Microscopía Electrónica de Barrido MEB la capacidad de remineralización del esmalte inducida por Caseína Fosfatasa- Fosfato de Calcio Amorfo MiPaste®, por 30 días .

La hipótesis de investigación fue: Los premolares extraídos con una desmineralización producida por ácido láctico por medio de bacterias cariogénicas presentan una remineralización del esmalte a los 30 días de aplicar Caseína Fosfatasa- Fosfato de Calcio Amorfo (MiPaste®).

Éste fue un estudio prospectivo, experimental, analítico y longitudinal.

ANTECEDENTES

Esmalte

Es un tejido duro (el más duro y mineralizado del cuerpo humano), a celular que cubre la superficie de la corona del diente.

La dureza del esmalte se debe a que posee un porcentaje muy elevado de matriz inorgánica (95%) y menor de matriz orgánica (0.36-2%). Los cristales de hidroxiapatita constituidos por fosfato de calcio representan el componente inorgánico del esmalte.

La unidad básica son los prismas del esmalte, estructuras compuestas por cristales de hidroxiapatita, este conjunto de prismas forman el esmalte prismático que constituye parte de la matriz extracelular mineralizada. Los prismas son una estructura longitudinal de 4nm de espesor promedio, que va desde la conexión amelodentinaria hasta la superficie del esmalte. El diámetro de cada prisma varía entre 4-10nm.(Gomez, Campos 2004).

Los prismas guardan un paralelismo completo y se agrupan en haces llamados fascículos, que con los prismas forman cierta homogeneidad formando la mayor parte del tejido tisular, el cual es fácilmente rompible si no está sostenido por la dentina. El número de prismas del esmalte va desde 5 millones en los incisivos inferiores laterales hasta 12 millones en los primeros molares superiores. Los prismas situados en la cúspide, la parte más gruesa del esmalte, son más largos que los de las áreas cervicales de los dientes. Los prismas del esmalte tienen apariencia cristalina, lo cual permite que la luz pase a través de ellos. En general los prismas están orientados en ángulo recto hacia la superficie de la dentina. (Bhaskar 1989).

Caries

Se describe la caries dental como la acción de los ácidos orgánicos sobre el fosfato de calcio del diente. Se mostró después de incubar dientes en saliva y carbohidratos, que los ácidos formados desmineralizaron la porción del diente. (Nisengard y Newman 1994).

Caries es una enfermedad bacteriana que cuando progresa, los ácidos producidos por la acción bacteriana en carbohidratos fermentables (glucosa, sacarosa, fructosa) se dispersa en el diente y disuelve el mineral hidroxapatita carbonatada por medio de un proceso llamado desmineralización. Estos ácidos pueden disolver el fosfato de calcio del esmalte y dentina del diente por medio de la desmineralización. (Featherstone 2000).

En sus resultados, encontraron la presencia de micro defectos o laminillas del esmalte; estas estructuras de hipo mineralización, se extendían en el espesor del tejido adamantino, desde la superficie externa hacia la conexión amelo-dentinario en el 100% de los casos. Los micro defectos pueden ser considerados también como sitios predisponentes a la caries, porque contienen gran cantidad de material orgánico. (Amerise 2000).

La caries es causada por la interacción de varios factores, como un huésped susceptible, flora oral cariogénica y fermentable, sustrato de carbono y saliva. Este concepto fue representado por los anillos de Keye. (Clarkson 1999).

Las bacterias patógenas producen ácido láctico por la fermentación de carbohidratos y estos ácidos disuelven los cristales de hidroxipatita de la estructura del diente. Caufield, y Griffen.2000 Las dos principales bacterias involucradas en la formación de caries son *S. mutans* y *Lactobacilos*. (Touger-Decker, van Loveren.2003).

En general las lesiones tempranas de caries en el esmalte se observan como un punto opaco blanco, la lesión es ligeramente más suave que el esmalte alrededor y se incrementa la blancura cuando se seca con aire. La lesión cariosa es un defecto del esmalte donde las estructuras del esmalte situadas en la superficie y sub-superficie del diente están dañadas.

En experimentos hechos con microscopía electrónica se encontraron estas conclusiones:

1. La superficie que cubre la lesión del esmalte es porosa pero sigue siendo un área rica de mineral.
2. La superficie del cuerpo de la lesión es bajo en minerales en un 10-70% vol.
3. La superficie morfológica de la lesión inicial es ligeramente diferente del esmalte alrededor.(Arends y Christoffersen 1996).

Caries es una enfermedad infecciosa en la que múltiples factores influyen su iniciación y progresión. Se requiere de un huésped (pieza dental en ambiente oral), sustrato dietario, y bacterias acidúricas. La saliva (también considerada un componente del huésped), el sustrato y las bacterias forman un biofilm (placa) que se adhiere a la superficie dental. La presencia del sustrato sirve como nutriente para las bacterias, y las bacterias producen ácidos que pueden desmineralizar al diente.

Se sabe que la caries comienza típicamente en el esmalte y progresa lentamente en etapas iniciales del proceso. (McDonald y col 2004).

La caries se presenta típicamente en niños como manchas o líneas blancas en incisivos superiores. Si estas lesiones no se tratan, estas pueden rápidamente progresar en cavidades con color amarillo o café y la enfermedad continuará en las piezas posteriores. Douglass y col 2004. Estos ácidos pueden disolver el fosfato de calcio del esmalte y dentina del diente por medio de la desmineralización. (Featherstone 2000).

Teorías de la formación de la caries

Quimioparasitaria

Miller la formuló en 1882 y dice que la desintegración dental es una enfermedad quimio parasitaria en dos etapas, descalcificación o ablandamiento de tejidos y disolución del residuo reblandecido.

Glucógeno

Egyedi propone que la susceptibilidad a la caries guarda relación con alta ingesta de carbohidratos durante periodos de desarrollo del diente, de lo que resulta el depósito de glucógeno y glucoproteínas en exceso en la estructura del diente.

Organotrópica

Leimgruber propone que la caries no es una destrucción local de los tejidos dentales, sino una enfermedad de todo el órgano del esmalte. Esta teoría considera al diente como parte de un sistema biológico compuesto por pulpa, tejidos duros y saliva.

Biofísica

Neumann y DiSalvo afirman que en la respuesta de proteínas fibrosas a esfuerzos de compresión, postularon que las altas cargas masticatorias producen un efecto esclerosante sobre los dientes, independiente de la acción de atrición. (Lazzari 1970).

En la teoría ácida, se considera que los ácidos producidos por las bacterias resultan en placa que desmineraliza el esmalte.

1. El pH de la placa puede caer a 5.5 por extensos periodos por la producción de bacterias.
2. Medidas del pH en lesiones cariosas bajan si están alrededor de tejido dental.
3. Incidencia de caries correlacionados con la presencia de *S. mutans* y *Lactobacilos*, ambos son productores orgánicos de los ácidos por la fermentación de azúcares. (Nisengard y Newman 1994).

Mancha blanca

Al primer estadio de la caries se le denomina mancha blanca. En la mancha blanca la superficie del esmalte se encuentra intacta, la sub-superficie presenta pérdida de minerales pero se puede evitar que continúe este proceso. (Caufield, Griffen 2000).

La lesión se caracteriza por 4 zonas microscópicas:

- Zona translúcida con el 1.2% de mineral perdido
- Zona oscura con el 6% de mineral perdido
- Cuerpo de la lesión 24% de mineral perdido
- Zona superficial está intacta (Nisengard y Newman 1994).

Microorganismos

Se reportaron Lactobacilos, Streptococos y Micrococos como agentes cariogénicos. Se encontraron que 8 tipos de cepas de microorganismos destruyen diente humano en menos de 25 semanas. Estos microorganismos fueron *Lactobacillus casei*, *Streptococcus salivaries*, *Streptococcus fecales*, *Micrococcus pyogene var. Aureas*, *Micrococcus pyogenes var. Albus*, and *clostridium perfringens*. (Pigman y col.1956).

S.mutans ha sido implicado como uno de los mayores y más virulentos microorganismos productores de la caries. Loesche concluyó que existe evidencia de que *S.mutans*, *S.sobrinus*, y *Lactobacilos* sean los odontopatógenos humanos. (McDonald y col 2004).

Desmineralización y Remineralización

Clínicamente se llama Remineralización al regreso de minerales en una área desmineralizada. (Silverston 1984).

En los estadios tempranos de la caries hay un balance entre mineralización y desmineralización y este puede inclinarse a cualquier dirección. Puede remineralizarse a partir del calcio y del fosfato de la saliva, siempre y cuando sus superficies se mantengan limpias y libres de placa. (Williams ,Elliott 1990).

Desmineralización

El proceso de desmineralización de la caries se produce por la difusión generada de ácidos proveniente del biofilm de los dientes. Al producirse una caída de las concentraciones del pH de la placa y el aumento del nivel de ácidos produciendo un gradiente de concentración del ácido este penetra al esmalte, convirtiéndolo en una

superficie porosa perdiendo 1.4 nm a 2.4 nm que representa el 0.01 % a 0.08% de su volumen.

Este proceso toma lugar a nivel micro estructural en el espacio interciliar y el espacio interprismático (unión de prismas) y provoca defectos del esmalte. (Zero 1999).

En un estudio se utilizó en un estudio, un modelo de sistema *in vitro*, donde se combinó biofilm de *S. Mutans* colonizado en la superficie de bloques de esmalte humano. Se utilizó microscopía de luz y electrónica para observar secciones descalcificadas. También se verificó la interacción entre el biofilm de *S. Mutans* y cristales de esmalte, el pH del biofilm y el número de bacterias localizadas en el área adyacente de la superficie del esmalte.

La desmineralización ocurre primero en las vainas prismáticas, y después en el centro y la periferia de la cabeza prismática. Estas estructuras son consideradas susceptibles al ataque de los ácidos.

En este estudio *in vitro* se combinó el biofilm de *S. mutans* y cristales de esmalte humano en el proceso de caries dental:

1. Se utilizó esmalte dental de terceros molares no erupcionados.
2. Las coronas y raíces fueron cortadas usando una sierra de diamante de baja velocidad (Isomet, Buehler Ltd Lake Bluff, Il USA)
3. La superficie del diente fue pulida con papel abrasivo y arenado con mucha irrigación.

4. Se realizaron bloques de esmalte con medidas de 3x3x2 mm., se cortaron perpendicularmente a la superficie del diente usando discos de diamantes con irrigación.
5. Los bloques fueron lavados con ultrasonido y esterilizados con autoclave por 20 min a 120°C.
6. Se prepararon 59 bloques de esmalte.
7. Se utilizó saliva estimulada con parafina de un mismo paciente sano, no fumador adulto. La saliva fue clarificada con centrifuga 25,000 g por minuto a 4°C y filtrada con Steril Millex- HA, 0.20 nm unidad filtrada, Millipore, MA.
8. Los bloques del esmalte fueron cubiertos con esa saliva e incubada a 37 °C por 2 horas y lavadas dos veces con fosfato amortiguador.
9. Se utilizaron 7 bloques como control y se observaron con TEM.
10. Se utilizaron 52 bloques de esmalte, fueron colocados en placas metálicas sujetas con cera, y se sumergieron en 10 ml de una infusión estéril de cerebro-corazón con 5% de sacarosa con 0.1 ml de *S. Mutans* NTC 10449C.
11. La muestra fue incubada a 37°C por periodos de 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días.
12. Los bloques fueron transferidos a un cultivo fresco cada 24 horas para reanudar el ambiente, así se proveerán nutrientes para el desarrollo del biofilm.
13. Siete muestras fueron preparadas cada día para observación microscópica (microscopía de luz y TEM), y tres para medir el biofilm del pH.
(Hashizume y col 2002.)

Saliva

El nivel de saliva y su composición es un factor importante para modificar el proceso de la caries, teniendo una función de la saliva es de proteger al diente con su mecanismo de limpieza y disolución del ácido de la placa. Estas son propiedades antimicrobianas

que provee de componentes orgánicos e inorgánicos que inhiben la desmineralización del diente y asiste a remineralización en el proceso de reparación. (Zero 1999).

Remineralización

La remineralización es el reemplazo de mineral en las regiones parcialmente desmineralizadas de la lesión cariada de esmalte o dentina (incluyendo la raíz de diente). Como la saliva fluye sobre la placa y sus componentes neutralizan el ácido (elevando el pH), la desmineralización es detenida y revertida. La saliva está supersaturada con calcio y fosfato, que puede devolver el mineral al diente. (Featherstone 2000)

Silverstone en 1988, mostró que cuando una lesión es expuesta *in vitro* a cualquier fluido oral o fluido sintético calcificante, la lesión disminuye en tamaño dramáticamente. Además de mostrar características histológicas indicativas en un estadio temprano en la formación de la lesión, la zona oscura se vuelve más amplia, propagándose superficialmente hacia la superficie del esmalte. Así el cuerpo de la lesión muestra propiedades histológicas, de la fase anterior de la ruptura, la zona oscura. Lesiones que inicialmente no tienen zonas oscuras, las desarrollan después de la exposición a fluidos calcificantes. Esta zona muestra una reducción importante en la porosidad. (Silverstone 1998).

La remineralización es un proceso de precipitación de calcio, fosfato y otros iones en la superficie o en el interior del esmalte que se encuentra parcialmente desmineralizado. Los iones pueden proceder de la disolución del tejido mineralizado, o de una fuente externa o bien de la combinación de ambos; proceso mediante el cual se depositan minerales en la estructura dentaria, la remineralización ocurre bajo un pH neutro,

condición por la cual, los minerales presentes en los fluidos bucales se precipitan en los defectos del esmalte desmineralizado. (Monteverde Coronel 2002).

Koulourides y cols, en 1968 hicieron un trabajo de investigación de los efectos del pH y la fuerza iónica en la mineralización del esmalte desmineralizado, mostrando que valores altos de pH inducen a la mineralización, pero se obtenía una mejor mineralización con niveles de pH intermedios. (Silverstone 1977).

En un estudio *in vitro* se utilizó bloques de esmalte de terceros molares extraídos cubiertos por barniz resistente al ácido, excepto en una pequeña ventana de $1 \times 7 \text{ mm}^2$. Se creó una lesión en la ventana con ácido láctico en un pH de 4.8 a 37°C por cuatro días, la desmineralización producida fue una lesión de 80 a 110_{nm} de profundidad.

Cada bloque fue suspendido en solución remineralizante (CPP) por 10 días a 37°C . La solución se cambió todos los días. Los bloques fueron limpiados con agua destilada, de-ionizada, y el barniz fue eliminado con acetona.

Después de 10 días de inducir el proceso de remineralización de las lesiones de esmalte, estas estructuras fueron seccionadas y sujetas a microradiografía y el mineral contenido fue determinado por microdensimetría. La capacidad de remineralización es buena con las soluciones con alto niveles de CPP-estabilizado, calcio libre y iones fosfato.

El CPP, por estabilización del calcio fosfato en solución, mantiene altas concentraciones de gradientes de calcio, iones fosfato y pares de iones en la superficie de la lesión. Así aumentan los niveles de esmalte remineralizado.(Reynolds 1997).

Se realizó un estudio clínico doble ciego para investigar la capacidad del CPP-ACP adherido a leche de bovino para remineralizar las lesiones de superficies del esmalte *in situ*. 10 sujetos fueron incluidos en el estudio, donde se utilizaron 3 tipos de muestras de leche. La muestra uno se adicionó con 2.0 gr de CPP-ACP., la segunda muestra fue con 5.0 gr. de CPP-ACP y la tercera fue un grupo control. Tomaron leche 1 vez al día por 3 semanas. Se retiraron las placas que contenían al esmalte remineralizado y se determinó con microradiografía y microdensinometría. Los resultados mostraron que las muestras de leche que contenían CPP-ACP producían una significativa remineralización en comparación a la muestra control que contenía solo leche. Con 2 gr. se produjo un incremento de mineral del 70 % y un 48% con 5 gr. (Walker y col 2006).

Se ha demostrado los efectos anticariogénicos de productos lácteos de uso diario (leche, leche condensada, en polvo y quesos) en estudios de laboratorio *in situ* con modelos de caries en animales y humanos.

El efecto anticariogénico fue atribuido al multifosfoseril contenido en la secuencia de la caseína y su habilidad de estabilizar el fosfato de calcio.

ACP

El fosfato de calcio amorfo es un precursor en la formación de la hidroxipatita biológica, tiene la capacidad para desprender iones de fosfato y calcio en la saliva. (Skrtie y col 2003).

Esta secuencia se puede realizar enzimáticamente por la caseína fosfatasa (CPP). Con la estabilización del Fosfato de Calcio Amorfo (ACP) en solución por la formación de nanocomplejos de CPP-ACP.

El CPP-ACP se aplica en la superficie de la cara del diente previniendo la desmineralización e induciendo la remineralización en lesiones superficiales del esmalte (Reynolds 1998).

Se ha demostrado en diferentes estudios que la leche y los productos de la leche, principalmente quesos, tienen un efecto protector contra el desarrollo de las caries dentales. Se ha observado que después que el esmalte se ha tratado tópicamente con leche se ha reportado el aumento de solubilidad del esmalte a la alta concentración de calcio y fosfato.

También se reportó en algunos experimentos en animales, que la leche o derivados de la leche reduce el número de *S.mutans*. (Schumbach y col. 1996).

En otro estudio, *in vitro*, con terceros molares se utilizó CPP-ACP en lesiones de esmalte. Después de un periodo de 10 días de remineralización el esmalte con CPP-ACP fueron seccionadas las muestras, y sujetas a microradiografía donde los minerales contenidos fueron revisados con un microdensinómetro.

La capacidad de remineralización fue buena en soluciones con altos niveles de CPP-estabilizado libre de calcio y iones de fosfato. Aun así, la remineralización tiene correlación con el grado de saturación del dihidrato fosfato calcio ($\text{CaH PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Esto es atribuido a una significativa correlación de remineralización con la actividad de gradientes de concentración. El CPP, por estabilización del fosfato de calcio en solución, mantiene altos los niveles de concentración del calcio y fosfato y estos pares de iones en la superficie de la lesión correlacionan con alto grado de remineralización del esmalte (Reynolds 1997).

El CPP estabiliza los iones de calcio y fosfato en una condición neutral y forma una solución metastable alcalina, que esta supersaturada con respecto al calcio básico en la fase de fosfato. En estas condiciones, el CPP se une a su equivalente en peso de calcio y fosfato(Cross 2005).

En un estudio realizado para evaluar la remineralización con CPP-ACFP en bloques de esmalte de terceros molares con una lesión artificial, 28 muestras fueron analizadas en grupos de cuatro, en solución remineralizadora en 1, 3, 5 y 10 días respectivamente. Para valorar la remineralización se utilizó microradiografía y el conteo de mineral con microdensinometría. Las solución remineralizadora remplazo 9.19%, 14.27%, 29.07%, 38.45% de mineral perdido en 1, 3, 5, 10 días respectivamente. (Zaho , Cai 2001).

PREVALENCIA

Caries dental es una de las enfermedades más comunes en la niñez. Es 5 veces más común que el asma y 7 veces más común que la bronquitis crónica y su prevalencia aumenta con la edad a través de la adultez. De niños con edades de 5 a 9 años de edad 51.6% han tenido 1 o más obturaciones o lesiones cariosas. US Department of Health and Human Services 2000.

La OMS estima que cinco mil millones de personas en el planeta han sufrido caries dental, ésta afecta entre el 60% y el 90% de la población escolar.
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr15/es/>

En México, la caries dental es la enfermedad dental mas prevalente durante la niñez y es la causa primordial de pérdidas de dientes en adultos. México, de acuerdo con la OMS, se encuentra entre las naciones de alto rango de frecuencia en enfermedades bucales, de las cuales la caries dental, aqueja a más del 90% de la población. (Treviño 2005)

Se ha reportado que el 95% de los niños mexicanos menores de 6 años de edad presentan caries dental. (Milgrom y col 2006).

Microscopio electrónico de barrido

Un microscopio electrónico de barrido crea una imagen ampliada de la superficie de un objeto. No es necesario cortar el objeto en capas para observarlo, sino que puede colocarse en el microscopio con muy pocos preparativos. El microscopio electrónico de barrido explora la superficie de la imagen punto por punto.

Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz muy concentrado de electrones. Los electrones del haz pueden dispersarse de la muestra o provocar la aparición de electrones secundarios. Los electrones perdidos y los secundarios son recogidos y contados por un dispositivo electrónico situado a los lados del espécimen. Cada punto leído de la muestra corresponde a un pixel en un monitor de televisión. Cuanto mayor sea el número de electrones contados por el dispositivo, mayor será el brillo del pixel en la pantalla. A medida que el haz de electrones barre la muestra, se presenta toda la imagen de la misma en el monitor. Los microscopios electrónicos de

barrido pueden ampliar los objetos 200.000 veces o más.

<http://fai.unne.edu.ar/biologia/microscopia/meb.htm#MEB>

En un estudio con microscopio electrónico de barrido MEB se observó esmalte dental sano, el cual se trató con una solución ácida para desmineralizar y para la remineralización se trató con EDTA.

Se observó en el diente sin tratamientos líneas de imbricación y la perykimata, con una superficie relativamente lisa, presentando fisuras ocasionalmente y artefactos. El esmalte tratado con una solución ácida con un ph 4 contenía superficies porosas y zonas en proceso de desmineralización. El esmalte remineralizado por 24 horas se observó con líneas de imbricación y perykimata con parcial destrucción de su superficie. (Hoffman y col 1969).

MATERIALES Y METODOS

Este es un estudio prospectivo, experimental, analítico y longitudinal. Fu realizado en el periodo de Febrero de 2009 a Febrero de 2012 en la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León en colaboración con la Universidad de Harvard en Boston.

La muestra accesible para el presente trabajo de investigación, fue conformada por premolares libres de caries, extraídos por razones ortodónticas.

Criterios de Selección.

Inclusión. Premolares libre de caries, primero o segundo premolar,

Exclusión. Premolares con caries, lesiones de mancha blanca en las superficies, desgaste oclusal, fracturas y fisuras del esmalte.

Eliminación. Premolares con problemas periodontal, hipoplasia en el esmalte, pigmentaciones extrínsecas.

Descripción de procedimientos

Se utilizaron un total de 12 premolares libres de caries, extraídos por razones ortodónticas. Se utilizaron 4 premolares para cada grupo: Grupo control, Grupo desmineralización, Grupo remineralización.

Grupo control: se seleccionaron 4 premolares libres de caries. (anexo1)

Los premolares se lavaron en PBS (Bufere de Fosfato), se hicieron cortes coronales y sagitales con una sierra de diamante. Los cortes fueron procesados en etanol por 48 horas al 100%. Se continuó la deshidratación con HMDS (hexametildisilazane – Electron microscopes Cat 16700) hasta que se evaporara. Se procedió a montarlos en la

base de acero inoxidable de 9 mm cubiertos con una capa adherente de carbón. Se mantuvieron en desecador hasta que se metalizaron en alto vacío con oro por 5 min con angulación y rotación (sputter coater, Cressington, mod 208HR). Se analizaron en nanoescalas con alto vacío, con un microscopio electrónico de barrido (SEM Supra 55VP, Carl Zeiss).

La finalidad de este grupo fue observar la estructura del esmalte en estado natural, sin recibir ningún tratamiento previo.

Grupo Desmineralización: Las cuatro piezas de este grupo se indujeron al primer estadio de caries (mancha blanca) en el laboratorio. Se produjo el ácido láctico con *S. mutans*, *S. sobrinus*, y sacarosa por 9 días. Los premolares, se sumergieron en dicha sustancia, para provocar la aparición de lesiones de manchas blancas en la superficie del esmalte. Los premolares se lavaron en PBS (Búfer de Fosfato), se hicieron cortes coronales y sagitales con una sierra de diamantes. Los cortes fueron procesados, en etanol por 48 al 100%. Se continuó la deshidratación con HMDS (hexametildisilazano – Electron microscopes Cat 16700) hasta que se evaporara. Se procedió a montarlos en la base de acero inoxidable de 9 mm cubiertos con una capa adherente de carbón. Se mantuvieron en desecador hasta que se metalizaron en alto vacío con oro, por 5 min con angulación y rotación (sputter coater, Cressington, mod 208HR). Se analizaron en nanoescalas con alto vacío con un microscopio electrónico de barrido (SEM Supra 55VP, Carl Zeiss)._{(Anex}

La finalidad de este grupo fue observar la estructura del esmalte con un proceso de desmineralización.

Grupo Remineralización: Las cuatro piezas de este grupo se indujeron al primer

estadio de caries (mancha blanca) en el laboratorio, produciendo el ácido láctico con *S. mutans*, *S. sobrinus*, y *S. saccharosa* por 9 días. Los premolares, se sumergieron en dicha sustancia, para provocar la aparición de lesiones de manchas blancas en la superficie del esmalte. Después de provocar la mancha blanca se realizó un tratamiento de 30 días de Remineralización aplicando Caseína fosfatasa- fosfato de calcio amorfo (Mipaste) 2 veces al día 5 grm cada una , las piezas se mantuvieron en pomaderas con saliva sustituta(Saliva Substitute).

Los premolares se lavaron en PBS(Bufer de Fosfato), se hicieron cortes coroneales y sagitales con una sierra de diamante. Los cortes fueron procesados en etanol por 48 horas al 100%. Se continuó la deshidratación con HMDS (hexametildisilazano – Electron microscope Cat 16700) hasta que se evaporara. Se procedió a montarlos en la base de acero inoxidable de 9 mm cubiertos con una capa adherente de carbón. Se mantuvieron en desecador hasta que se metalizaron en alto vacío con oro por 5 min con angulación y rotación (sputter coater, Cressington, mod 208HR) Se analizaron en nano escalas con alto vacío con un microscopio electrónico de barrido (SEM Supra 55VP, Carl Zeiss).

La finalidad de este grupo fue observar la estructura del esmalte después de un tratamiento de remineralización.

DEFINICION DE VARIABLES

Variable dependiente: mineralización del esmalte de los dientes extraídos. Desmineralización y remineralización es una variable cuantitativa, la escala es nominal y los valores fueron desmineralización y remineralización.

Variable independiente: la aplicación de caseína fosfatasa-fosfato de calcio amorfo es

una variable cualitativa la escala es nominal y los valores fueron aplicación o no aplicación.

FORMA DE CAPTACION DE VARIABLE

Se usó esmalte dental humano de premolares extraídos con fines ortodonticos.

Se estudiaron 12 premolares. Cuatro premolares serán incluidos en un grupo control y se observarán en microscopía electrónica de barrido, 4 premolares se sumergirán en 10 ml de una infusión estéril de cerebro-corazón que contiene 5% de sacarosa con 500 microlitros de *S. mutans* y *S. Sobrinus*.



Preparación de infusión cerebro-corazón con *S. mutans*, *S. sobrinus* y sacarosa.



Premolares sumergidos en infusión estéril de cerebro-corazón que contiene *S.mutans* y *S.sobrinos*. preparados para incubarse.

Las muestras fueron incubadas a 37 °C por un periodo de 7 días, los premolares se transfirieron a un cultivo fresco cada 24 horas para reanudar el ambiente, así se suministro de nutrientes para que crezca el biofilme. Al séptimo día se utilizó Microscopia Electronica de Barrido MEB para observar los cambios.



Microscopio electrónico de barrido (SEM Supra 55VP, Carl Zeiss).

Para el grupo de remineralización 4 premolares se sumergieron en 10 ml de una infusión estéril de cerebro-corazón que contiene 5% de sacarosa con con 500 microlitros de *S. mutans* y *S. Sobrinos*.

La muestra se incubó a 37 °C por un periodo de 7 días, los premolares fueron transferidos a un cultivo fresco cada 24 horas para reanudar el ambiente, así se suministró de nutrientes para que crezca el biofilme. Después de los 7 días de colocarse en solución desmineralizante, los 4 premolares fueron suspendidos en saliva artificial por 30 días. Se aplicó diariamente una pasta de Caseína Fosfatasa- Fosfato de Calcio Amorfo MiPaste® con un isopo en la superficie afectada por la lesión blanca cada 24 hrs. Después de los días indicados se utilizó Microscopía Electrónica de Barrido



Caseína Fosfatasa- Fosfato de Calcio Amorfo MiPaste®

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LA INFORMACIÓN

El análisis se realizó por la observación directa de fotografía tomada por Microscopia Electrónica de Barrido, la comparación de frecuencia que se utilizó fue Chi cuadrada con la ayuda del programa estadístico SPSS versión 10.0. Fueron seleccionados 12 premolares extraídos por fines de ortodoncia. Los experimentos se analizaron y compararon sus características de mineralización de las piezas tratadas contra las piezas de control.

Para determinar la diferencia de la frecuencia en los grupos se determinó el valor de p menor a 0.05.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se usaron un total de 12 premolares libres de caries, extraídos por razones ortodónticas. Se utilizaron 4 premolares para cada grupo: Grupo control, Grupo desmineralización, Grupo remineralización. En este experimento se realizaron 8 pruebas y 4 controles.

El tamaño de la muestra se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula.

$$z = \frac{\hat{p}_1 - \hat{p}_2}{\sqrt{\frac{\hat{p}_1 \hat{q}_1}{n_1} + \frac{\hat{p}_2 \hat{q}_2}{n_2}}}$$

RESULTADOS

En el grupo control se observó una superficie regular de textura uniforme, homogénea con líneas de imbricación del esmalte, y de color homogéneo grisáceo. (Fig 1 y 2)

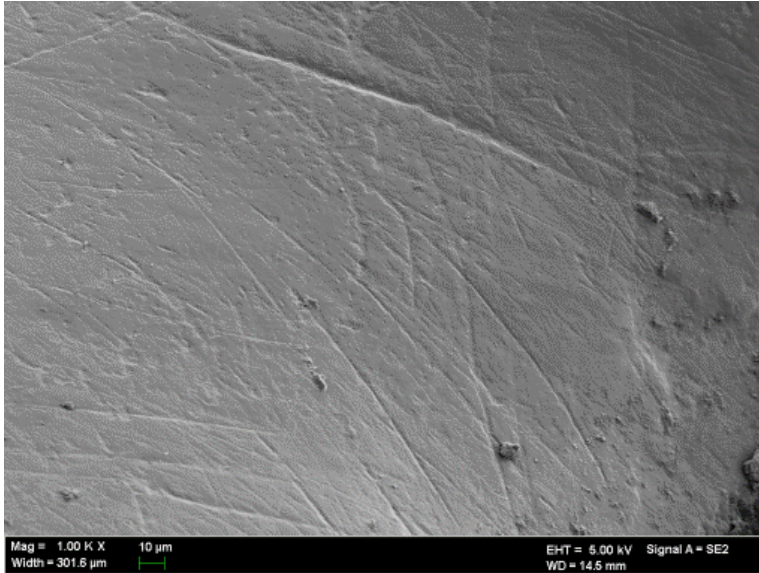


Fig 1. Grupo Control. superficie regular de textura uniforme, homogénea con líneas de imbricación del esmalte, y de

color homogéneo grisáceo

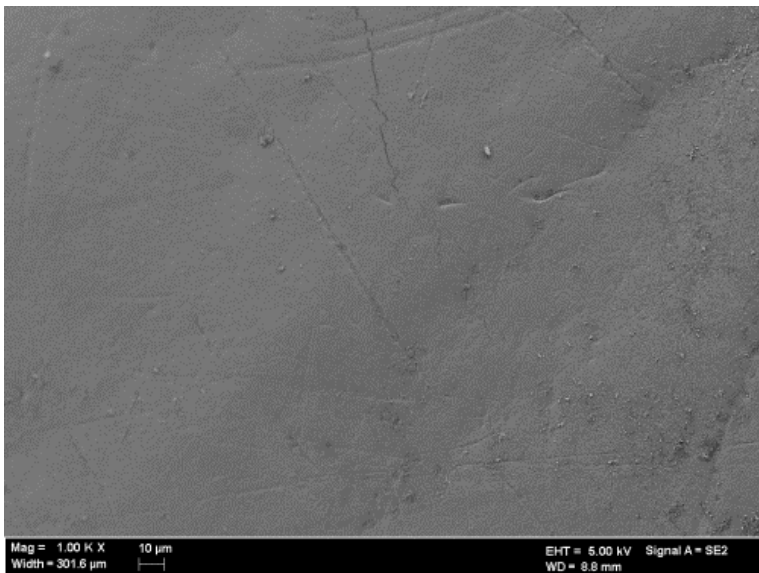


Fig 2 Grupo Control. Líneas de imbricación del esmalte .

En el grupo de desmineralización, se observó una superficie irregular generalizada con depresiones o socavamientos de menor tamaño y algunas de gran tamaño con un color de aspecto grisáceo y blanquecino, en el área blanquecina es donde se encuentran los socavamientos. A mayor aumento se observó en las áreas socavadas los prismas del esmalte destruidos en su estructura y organización. Se encontró en esa zona restos de material calcificado del esmalte.

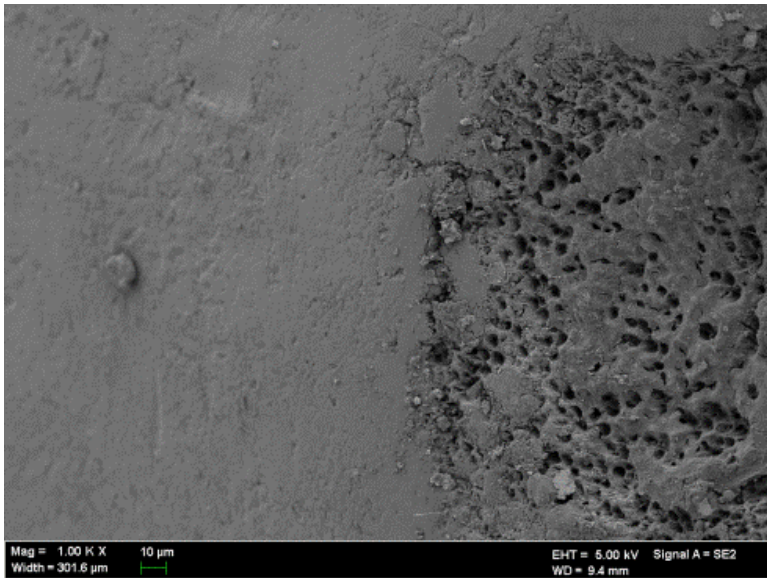


Fig. 3 Grupo Desmineralizado. A mayor aumento se observó en las áreas socavadas los prismas del esmalte destruidos en su estructura y organización. Se encontró en esa zona restos de material calcificado del esmalte.

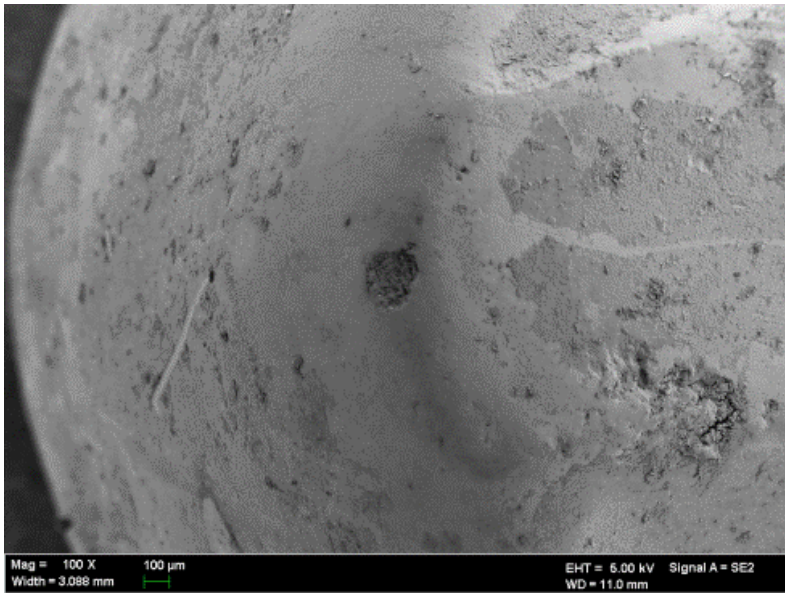


Fig 4 Grupo Desmineralizado. superficie irregular generalizada con depresiones o socavamientos de menor tamaño y algunas de gran tamaño con un color de aspecto grisáceo y blanquecino, en el área blanquecina es donde se encuentran los socavamientos

En el grupo de Remineralización, se observó una superficie lisa e irregular con indicios de pequeños socavamientos, en los pequeños socavamientos se encontraron casi obliterados los prismas del esmalte en la entrada y superficie. Esto disminuyó la profundidad de dichos socavamientos.

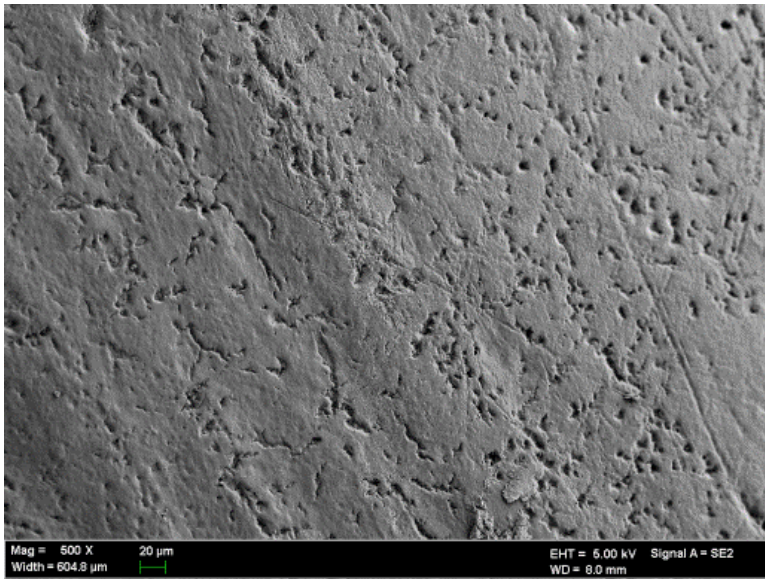


Fig 5 Grupo Remineralizado. superficie lisa e irregular con indicios de pequeños socavamientos.

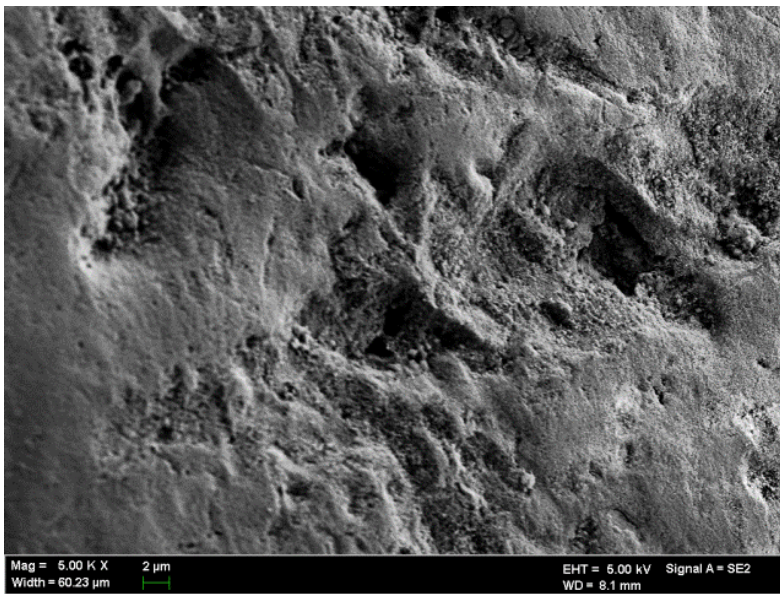


Fig.6 Grupo Desmineralizado. Se encuentran casi obliterados los prismas del esmalte en la entrada y superficie.

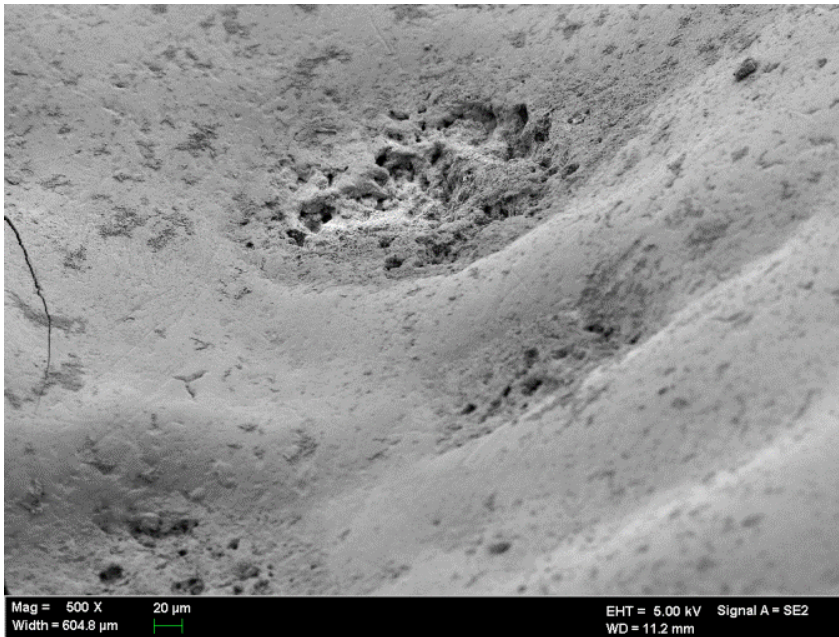


Fig 7 Grupo Desmineralizado. Se disminuye la profundidad de dichos socavamientos.

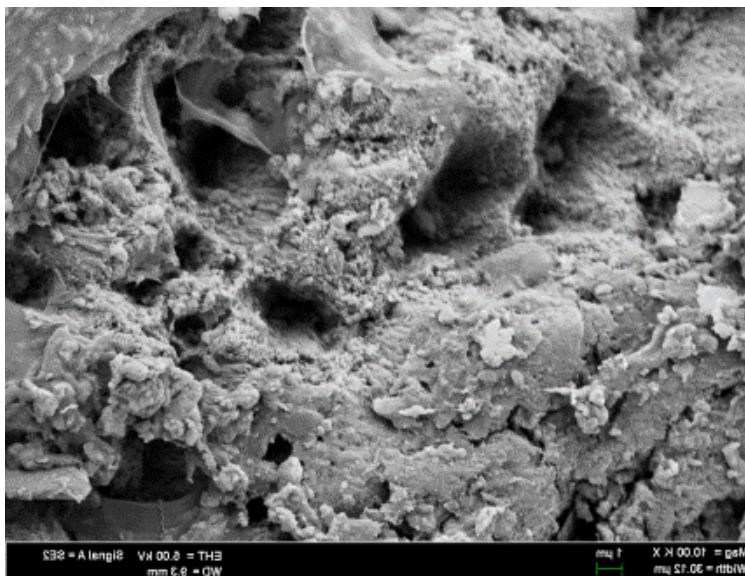


Fig. 8 Grupo Desmineralizado. Agregación de material mineral dentro de los socavamientos.

DISCUSIÓN

En este estudio evidenciamos los cambios histopatológicos ocasionados por el proceso de desmineralización del esmalte y además se demostró que estos cambios pueden revertirse parcialmente con el CPP-ACP.

Algunos autores han tratado de encontrar estos mismos cambios en estudios previos como Seymour y col 1969. En uno de los primeros trabajos en MEB observaron también, que en el esmalte sano presentaba una superficie lisa con líneas de imbricación con un color homogéneo grisáceo, además una similitud en los grupos de desmineralización donde se encontró pequeños socavamientos, superficies porosas de un color grisáceo y blanquecino. Sin embargo, se destaca una ligera diferencia al compararlo con nuestro estudio porque ellos utilizaron EDTA como agente remineralizante. En este punto, en el grupo de tratamiento con remineralización se observó en nuestro estudio los pequeños socavamientos mostraron en la entrada con mayor cantidad de material calcificado.

También, Walker y col 2006, realizaron un estudio clínico doble ciego para investigar la capacidad del CPP-ACP para remineralizar las lesiones de superficies del esmalte. Ellos encontraron, que las muestras que contenían CPP-ACP producían una significativa remineralización que la muestra control. Este resultado concuerda con este estudio donde en la lesión cariosa se observó incremento significativo de mineral obliterado el espacio y los socavamientos producido por la lesión.

En otro estudio, Bhaskar 1989 muestra que la composición de los prismas del esmalte sano guardan un paralelismo completo y se agrupan en haces llamados fascículos, otorgando cierta homogeneidad en la mayor parte del tejido tisular. En este estudio

observamos esta misma homogeneidad en el tejido sano, probablemente por la formación de los mismos fascículos.

En otro estudio, Monteverde Coronel y col. 2004. Afirman que la remineralización es un proceso de precipitar calcio, fosfato y otros iones en la superficie o dentro del esmalte parcialmente desmineralizado. Cabe mencionar que el depósito de minerales en los socavamientos no restaura la estructura básica de los cristales del esmalte, solamente los tapa. Falta por demostrar que esta obliteración sea ocasionada por depósito de minerales.

El ACCP-CCP es un precursor en la agregación de minerales Calcio y Fosfato a los prismas del esmalte dañados por una lesión cariosa mas no es un regenerador de sustancia inorgánica. Se observa agregación irregular de mineral en las superficies obliteradas pero no vuelve a su estado original antes de la lesión provocada.

CONCLUSIONES

En este estudio, se demostró que las piezas inducidas al primer estadio de la caries, en la etapa de desmineralización; se observaron lesiones irreversibles en el esmalte, donde las estructuras de los prismas se volvieron irregulares, con una superficie porosa y con pérdida de material. Después del tratamiento con Caseína Fosfatasa –Fosfato de Calcio Amorfo (MiPaste®) se indujo el proceso de remineralización. Sin embargo, con este proceso no se regenera la estructura de los prismas del esmalte antes de ser dañados, lo que hace es que se incrementa la cantidad de material cubriendo las porosidades y socavamiento irregulares evitando el aumento del defecto.

- Se observó con MEB, las estructuras del esmalte con que no se aplicó ningún tratamiento con una superficie regular de textura uniforme, de color homogéneo con líneas de imbricación del esmalte.
- Se desmineralizaron las piezas con ácido láctico con *S.mutans* y *S.sobrinus* provocando una lesión de mancha blanca en la superficie del esmalte.
- Se observó con MEB esmalte desmineralizado donde se observó, áreas de aspecto grisáceo y blanquecino, zonas socavadas, prismas del esmalte destruidos en su estructura y organización.
- Se observó con MEB el esmalte remineralizado por 30 días con Caseína Fosfatasa- Fosfato de Calcio Amorfo(MiPaste), donde se observó superficies lisas e irregulares con pequeños socavamientos, los socavamientos se encuentran casi obliterados en la entrada de la superficie donde se disminuyó en profundidad.

RECOMENDACIONES

Se recomienda a los padres de familia acudir a revisiones periódicas con el odontopediatra para diagnosticar si el paciente infantil presenta lesiones de mancha blanca y así poder realizar un tratamiento preventivo antes de que se caviten dichas lesiones.

Es importante conocer tratamientos alternativos a los convencionales para prevenir la aparición de la caries, como la Caseína Fosfatasa–Fosfato de Calcio Amorfo (Mipaste®) el cual es un producto derivado de la leche , fácil de usar tanto en la casa como en el consultorio dental.

La función de la Caseína Fosfatasa–Fosfato de Calcio Amorfo (Mipaste®) aplicado en las manchas blancas ayuda a que no se conviertan dichas lesiones en cavidades, recurriendo posterior mente a un tratamiento reconstructivo.

Además Caseína Fosfatasa–Fosfato de Calcio Amorfo (Mipaste®), como tratamiento preventivo, es una alternativa práctica, más económica que los tratamientos restaurativos.

En un futuro, se sugiere realizar estudios que comparen en estos mismos grupos las proporciones de minerales que se observan en los procesos de desmineralización y remineralización.

Se deben de realizar estudios que demuestren la formación del esmalte y no solo la agregación de mineral en las lesiones producidas por caries.

REFERENCIAS

Amerise C, Delgado AM, Meheris H, Gordillo de Albornoz.2002. “Análisis morfoestructural con microscopía óptica y electrónica de transmisión del esmalte dentario humano en superficies oclusales” Acta Odontológica Venezolana. V.40 n.1 Caracas Enero 2002

Arends J.and Christoffersen J.1986.*The nature of early caries lesions in enamel*, J Dent Res 65(1):2-11.

Bhaskar S.N.1989.Histología y Embriología bucal de Orban.Editorial Ateneo, Novena edición.Capitulo 3. Brazil.“Esmalte”. Pg 51-58

Caufield P.W, DDS.Phd, Griffen Ann L, DDS, MS.2000. DENTAL CARIES

Clarkson Brian: Introduction of Cariology. 1999.Dent. Clin. Of North V.43-4,569-578.

An infectious and Transmissible Disease,Pediatric Oral Healt,vo.47,num.5.

Cross Keith J., Huq N. Laila, Palamara Joseph E., Perich John W., and Reynolds Eric C.2005.*Physicochemical Characterization Of Casein Phoshopeptide-Amorphous Calcium Phosphate Nanocomplexes* , From the Center for Oral Health Science, School of Dental Science, The UniveofrsityMelbourne, Melbourne, Victoria 3010, Australia.January.

Douglass J M., Douglass A. B., Silk H.J.2004.*A practical guide to infant oral health.*
American Family Physician. Vol. 70, No.11.

Featherstone J. *The science and practice of caries prevention.*2000. J Am Dent Assoc.
Vol 131, No 7, 887-899.

Gómez De Ferraris M.A,Campos Muñoz.A, 2004. *Histología y Embriología Bucodental*
,Segunda Edición ,Editorial Medica Panamericana.España.Capitulo 10 “Esmalte”. Pg
229-265

Hashizume L.N, Shinada K, Kawaguchi Y. and Yamashita Y.2002. *Sequence of
ultrastructural changes of enamel crystals and Streptococcus mutans biofilm in early
enamel caries in vitro.*J. Med Dent Sci 2002; 49:67-75

<http://fai.unne.edu.ar/biologia/microscopia/meb.htm#MEB>

La OMS publica un nuevo informe sobre el problema mundial de las enfermedades
bucodentales. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr15/es/>

Lazzari Eugene P.1970 *Bioquímica Dental* ,Segunda Edicion, Iiteramericana.
Mexico.Capitulo 14 “Mecanismos De La Caries Dental “ (P237-242).

Leon M. Silverstone.1984.*The significance of remineralization in caries prevention*, J CANAD DENT ASSN, NO. 2

McDonald Ralph E., Avery David R., Dean Jeffrey A.2004. *Dentistry for the Child and Adolescent*. 8^o Edición. Cap 10. Ed. Mosby, San Louis Missouri, . pp. 205-210.

Milgrom P, Weinstein P.2006. *Caries de la Niñez Temprana: Una perspectiva multidisciplinaria para la prevención y tratamiento de la condición*. Publicaciones Puertorriqueñas Editores. P. 15.

Monteverde M.E, Delgado J, Martínez I, Guzman C, Espejel M. 2002“Desmineralización – remineralización del esmalte dental” Revista ADM. Vol. LIX No. 6. Noviembre-Diciembre 2002; pp 220-222

Nisengard R.J; Newman M.G.1994 *.Oral Microbiology And Immunology*, S, FAC DW.B SAUNDERS COMPANY SECOND EDITION Caries and Cariology – Lawrence E. Wolinsky,CAP 27 341-359

Pigman W, Gilman E, Powell R, And Muntz L.1956. *The Action Of Individual Bacterial Strains On Human Teeth Under In Vitro Conditions*.The University of Alabama, Dental School and Medical College, Departament of Biochemistry and Bacteriology, Birmingham.

Reynolds E.C, 1997.*Remineralization of Enamel Subsurface Lesions by Casein Phosphopeptide-Stabilized Calcium Phosphate Solutions*,J Dent Res 76(9): 1587-1595,September.

Reynolds E.C,2003 *Dairy Components In Oral Health*,*Australian Journal Of Dairy Technology* 58 (2): 79-81 Aug.

Reynolds E.C,1996.*Remineralization Of Enamel Subsurface Lesions By Casein Phosphopeptide-Stabilized Calcium Phosphate Solutions*.*J Dent Res* 76(9): 1587-1595,September.

Seymour H, William S. Ewan and Charles D.1969 *Scanning Electron Microscope Studies of Dental Enamel*. *J Dent Res* March-Abril.

Silverstone M. Leon: *Remineralization Phenomena*.1977. *Caries Research* 11:suppl. 1:59-84, 1977.

Silverstone M. Leon.1998. Dynamic factors affecting lesion initiation and progresión in human dental enamel, Part I. The dynamic nature of enamel caries; *Quistessence Int.* 19:683:711:1998.

Schumbach P, Neeser J.R, Golliard M, Rouvet M.,and Guggenheim B.1996. *Incorporation Of Caseinoglycomacropeptide And Caseinophosphopeptide Into The Salivary Pellicle Inhibits Adherence Of Mutans Streptococci**J Dent Res* 75(10): 1779-1788, October.

Skrtie D. and Antonucci J.M , Eanes E.D, J. *Res.Natl.Inst.*2003 *Stand.Technol.*108.(167-182)

Touger-Decker Riva, van Loveren Cor. *Sugars and Dental Caries*.2003. *The AmericanJournal of Clinical Nutrition*. Vol. 78. No. 4, 881S-892S.

Treviño M. A., Tijerina de Mendoza L, Ramos E. G. y Cantu M. P.2005 *Salud Bucodental en escolares de estrato social bajo*. Revista de la Facultad de Salud Publica y Nutricion. Volumen 6. No 2, Abril-Junio.

US Department of Health and Human Services.2000. US Public Health Service. *Oral health in America. A report of the surgeon general*. Rockville, MD: National Institutes of Health.

Walker G, Shen PY, Reynolds C, Ward B, Honda S, Koganei M, Oda M, Reynolds E.*Increased Remineralization Of Tooth Enamel By Milk Containing Added Casein Phosphopeptide-Amorphous Calcium Phosphate*.2006 Journal of Dairy Research 73 (1): 74-78 FEB 2006

Williamas R.A.D, Elliott,Bioquimica J.C ,1990.*Dental Basica y Aplicada “Aspectos bioquimicos de la caries dental y la enfermedad periodontal”*.Manual Moderno.Cuarta edición.289cap 15.

Zero D.T.1999. DDS, MS, *Dental Caries Process*.Dent.Clin.Of North.V.43-4,569-578.

Zhao Q, Cai F. 2001.The remineralization of enamel lesions by casein phosphopeptide-amorphous calcium fluoride phosphate in vitro,Chinese journal of staomatologyC2001 Nov;36(6):421-3.