

NECESIDAD O NO DEL USO DE COLORANTES DURANTE LA REMOCIÓN DE LA DENTINA CARIADA: SOPORTE MICROBIOLÓGICO

LIBBE MARIACA DE BOTERO*; GLADYS MARTÍNEZ CIFUENTES**; PATRICIA RIVAS PULIDO ***; BEATRIZ RESTREPO ESPINAL ****.

RESUMEN: MARIACA DE BOTERO LIBBE; GLADYS MARTÍNEZ C.; PATRICIA RIVAS P.; BEATRIZ RESTREPO E. "Necesidad o no del uso de colorantes durante la remoción de la dentina cariada: Soporte microbiológico", Rev. Fac. Odont. Univ. Ant. 9(1): 4-12, 1997

La remoción completa de la dentina cariada es un proceso complejo, por la escasa definición de criterios objetivos, para diferenciar la dentina infectada de la afectada. Una de las formas de reducir la subjetividad es la utilización de colorantes, aunque existe controversia respecto a las indicaciones, ventajas y desventajas de su uso.

Este estudio comparó la efectividad de la técnica convencional óptica y táctil con la utilización de rojo ácido al 1%, en la remoción de la dentina cariada, y microbiológicamente cuantificó y clasificó los microorganismos de la dentina remanente, en 34 pacientes con caries moderada.

Se encontró que el 97% de las cavidades presentaron tinción de la dentina, siendo más frecuente ésta en la pared pulpar y unión dentinoamélica, pero el colorante no siempre tiñó bacterias, por lo cual llevó a remoción innecesaria de dentina y a varias exposiciones pulpares.

*El 61.81% del total de los microorganismos cultivables no se logró identificar y su papel en el progreso de la caries no se conoce. Los *S. Mutans* y *Lactobacillus* representaron sólo el 12.79% del total de los microorganismos.*

No se encontró correlación entre el frente de decoloración, el sitio de tinción y el frente bacteriano.

Palabras claves: Caries, colorantes, remoción de caries, microbiología, colorantes rojo ácido.

ABSTRACT: MARIACA DE BOTERO LIBBE; GLADYS MARTÍNEZ C.; PATRICIA RIVAS P.; BEATRIZ RESTREPO E. "Caries detector dye, its use during dentinal caries removal. Microbiologic support", Rev. Fac. Odont. Univ. Ant. 9(1): 4-12, 1997

The complete dentinal caries removal is a complex process, because the difficulty in define an objective judgment in order to distinguish between infected and affected dentin.

One way to reduce that subjectivity is using a caries detector dye. Nevertheless, there is a controversy about indications, advantages and disadvantages of this technique.

This study compared the effectiveness of a conventional tactile and optical criteria and the use of a caries detector dye (1% acid red in propylene glycol) in dentinal caries removal.

The microbiological sampling of dye stained and dye unstained dentin were quantify and classify in 34 patients who presented moderate tooth decay.

The results of this investigation showed that 97% of the cavities after dentinal caries removal, showed dye stain more frequently in the pulpal wall and the enamel - dentin junction.

It is known that dyes stain carious dentin, sound circumpulpal dentine and enamel-dentin junction, and it's use could result in unnecessary sound dentin removal and several pulpal exposure.

*The *Lactobacilli* and *Mutans streptococci* comprised only 12.79% of the cultivable flora and 61.81 % were not identify and their role in the progression in dental caries is unknown.*

It was not found correlation between the caries advanced front, decoloration and bacterial front.

Key words: Caries, caries detector dye, caries removal, microbiology, acid red dye.

Este artículo es el resultado de una investigación realizada como requisito parcial para optar el título de Especialista en Odontología Integral del Niño de las dos últimas autoras. Financiado por el Centro de Investigaciones Odontológicas.

* Odontóloga, Especialista en Odontopediatría, Master en Ciencias, Boston University, Profesora titular de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia

** Odontóloga, Especialista en Odontología Integral del Niño, Profesora de Cátedra de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia.

*** Odontóloga, Especialista en Odontología Integral del Niño, Profesora de Cátedra de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia.

**** Bacterióloga, Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia.

INTRODUCCIÓN

Una de las formas de asegurar la salud dental después de un proceso carioso, es mediante la remoción de toda la dentina cariada. Muchos han sido los criterios establecidos con el fin de identificar clínicamente entre la dentina infectada y la afectada, pero ninguno de ellos lo suficientemente objetivos para asegurar el procedimiento anterior.

Se han descrito varias capas de la lesión cariosa y es de particular interés la capa descalcificada, la cual consta de una zona superficial, infectada, muerta y no remineralizable y otra profunda que es vital, no infectada y remineralizable (1-5).

Se enfatiza en la remoción de la dentina infectada, ya que los microorganismos de la dentina pueden permanecer viables por un largo período de tiempo (6-10).

Generalmente se ha reconocido la necesidad de remover toda la dentina blanda cariada antes de realizar la restauración, pero no se sabe qué tanto debe ser removido (4,11). Sin embargo la remoción completa de dentina blanda no siempre es necesaria porque hay una distancia apreciable entre el frente de ablandamiento y el bacteriano (4) y algunos consideran que el resultado clínico es mejor cuando se deja parte de la dentina blanda para evitar exposiciones pulpares (12). Otros al contrario, prefieren exponer que dejar material blando (13). Sin embargo con una rigurosa excavación de la dentina cariada, dejando las paredes duras, no se asegura una ausencia de microorganismos en la cavidad (14), pero el número de bacterias viables localizadas en los tejidos duros y profundos en las lesiones crónicas, se consideran bajos e insignificantes (9,15).

En cuanto al color de la dentina cariada, se considera que la dentina profunda, fuertemente decolorada, se puede dejar aunque no esté completamente dura (16, 17). La opinión contraria acepta dejar dentina decolorada, pero si no está blanda (6) y otros consideran que toda la dentina decolorada debe removerse (18).

Hasta ahora no hay un acuerdo respecto a los criterios ópticos y táctiles durante la remoción de la dentina cariada, por lo cual se desarrolló el colorante, para el reconocimiento clínico de la extensión de la dentina que debe ser removida durante la preparación cavitaria.

El uso de colorantes como guía en la eliminación de caries puede ser una de las formas de reducir la subjetividad (19-21). El colorante se considera una guía clínica real para la completa remoción de la dentina infectada, especialmente en las caries agudas, sin embargo la excavación guiada por el detector, es siempre más profunda que la invasión

bacteriana, siendo mayor la profundidad en caries aguda que crónica (22, 23).

Su uso rutinario puede resultar en una innecesaria remoción de estructura dentaria, debido a que tiñe matriz orgánica colágena desnaturalizada e incluso dentina sana de la pared pulpar y unión dentinoamélica (24, 25). La tinción en estas zonas se ha tratado de explicar por la menor densidad mineral y por lo tanto mayor proporción de matriz orgánica teñible (24).

La tinción con el rojo ácido y la penetración bacteriana son fenómenos diferentes y no se puede esperar que correspondan exactamente (26). Algunos investigadores afirman que no es un buen predictor de la presencia de bacterias (27). Por lo tanto la remoción de dentina utilizando el colorante puede disminuir en forma apreciable, pero no absoluta, la posibilidad de dejar bacterias viables remanentes en la porción más profunda de la lesión cariosa.

Algunos investigadores han encontrado una mayor cantidad de microorganismos presentes en la dentina que tiñe comparada con la que no tiñe (23, 28), y otros observaron pequeñas cantidades y pocas diferencias entre ellas (26).

El uso de colorantes implica un incremento de tiempo y costo del tratamiento. Frente a este problema que conlleva la correcta utilización del colorante como único mecanismo objetivo de remoción de dentina cariada, se necesita investigar el comportamiento del método tradicional de eliminación de caries, utilizando los criterios ópticos y táctiles convencionales y compararlo con el uso del detector.

El análisis microbiológico cualitativo y cuantitativo de la dentina remanente nos sirve para demostrar el número y tipo de bacterias que podrían implicar la recidiva del proceso carioso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 34 niños de la Facultad de Odontología de la Universidad de Antioquia, con los siguientes criterios: presencia de lesiones cariosas moderadas, pacientes en dentición mixta y que al análisis clínico y radiográfico (con técnica paralela) no muestren un posible compromiso pulpar que el diente pueda ser aislado adecuadamente con dique de goma.

Procedimiento clínico

Se atendieron los pacientes en la clínica de postgrado de la Universidad de Antioquia, y bajo anestesia se realizó un completo aislamiento del campo operatorio, se hizo la apertura y preparación de la cavidad con fresa 330, refrigerada y a

alta velocidad; se retiró la dentina cariada con cucharilla estéril # 5 (Hu-Friedy), eliminando todo el tejido reblandecido hasta dejar pisos y paredes cavitarias completamente duras.

Se registró el color de la dentina comparándola con la guía de colores Vita, se recolectó la primera muestra de polvillo dentinario con una segunda cucharilla # 5 estéril y se depositó en un vial con solución de transporte Ringer (NaCl 2.25 gr/l, KCl 0.105 gr/l, Na HCO₃ 0.05 gr/l).

Luego se aplicó el detector de caries Rojo Acido al 1% en Propenilglycol (Seek: Caries Detector Kit, Ultradent Products, Ref 0209); se dejó penetrar por 10 segundos, se lavó 30 segundos y se secó 10 segundos. Se tomó la primera fotografía clínica con trípode y se registró el sitio de la cavidad que tiñó, eliminándose el tejido teñido con una tercera cucharilla # 5 estéril y se depositó en el segundo vial de solución Ringer. Se continuó aplicando el colorante y se removió el tejido hasta no observarse tinción. Por último, se tomó la tercera muestra de polvillo dentinario, se registró nuevamente el color y se tomó una segunda fotografía de la cavidad. En este momento se llevaron las tres muestras al laboratorio en un lapso menor de 20 minutos desde su recolección inicial.

Procedimiento Microbiológico

La muestra depositada en los viales con solución Ringer se homogenizó 15" y se sonicó durante 10". Cada muestra se sembró por duplicado en: Mitis Salivarius Agar, para recuento de estreptococos orales y Estreptococos de grupo "Mutans" y en agar base para sangre (Oxoid) suplementada con 5% de sangre de cordero y Hemina 5 mg/l, donde se aíslan microorganismos anaerobios estrictos y facultativos. En ambos medios se sembró 0.1 cc en superficie y se dispersó con varilla de vidrio.

En Rogosa Agar se sembró 1cc en profundidad para aislamiento y recuento de Lactobacilos.

Se incubaron los medios en anaerobiosis (Anaerogen) durante cuatro días, luego se hizo recuento total de microorganismos y se reportó en UFC / ml de muestra.

RESULTADOS

Después de la remoción completa de caries en las 34 cavidades preparadas según los criterios clínicos convencionales (ópticos y táctiles), se encontró que la dentina presentó tinción con el rojo ácido en algún sitio de la cavidad, en un 97% (Tabla 1).

Hubo mayor tinción de dentina en cavidades más profundas, por lo cual, al remover todo el tejido teñido se presentaron exposiciones pulpares en algunos casos (20%).

De las 33 cavidades cuya dentina tiñó con el rojo ácido, se encontró que el sitio que más presentó tinción fue la pared pulpar (39.4%), seguido de la unión dentinoamélica (36.4%) (Gráfica 1). No hubo diferencia estadísticamente significativa entre el número de microorganismos en los diferentes sitios de tinción. Sin embargo, se observó una mayor cantidad de microorganismos en la pared pulpar y un bajo recuento en la unión dentino - amélica. (Tabla 2)

En todos los dientes hubo presencia de microorganismos en la dentina después de removida la caries y se demostró que la dentina que tiñe contiene 5 veces más UFC/ muestra que aquella no tiñe, siendo esta diferencia estadísticamente significativa de la primera a tercera muestra para cada grupo de microorganismos y para la totalidad de ellos. (Gráfica 2)

Un alto porcentaje de los microorganismos de las muestras de dentina remanente no fueron identificados (61.81%) y el 38.19% correspondió a Estreptococos No Mutans, Estreptococos Mutans y Lactobacilos. (Tabla 3)

La intensidad del color inicial siempre fue igual o mayor a la intensidad del color final (Gráfica 3), sin embargo, no se encontró una relación estadísticamente significativa entre la intensidad de color y la cantidad de microorganismos.

TABLA No. 1

DISTRIBUCION DE FRECUENCIA DE TINCION EN 34 NIÑOS DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGIA DE LA U. de A., 1997

SITIO DE LA CAVIDAD	NUMERO DE CAVIDADES	PORCENTAJE
CON TINCION	33	97%
SIN TINCION	1	3%
TOTAL	34	100%

GRAFICA No. 1

DISTRIBUCION DE FRECUENCIA DEL SITIO CON TINCIÓN EN 33 NIÑOS DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGIA DE LA U. de A., 1997

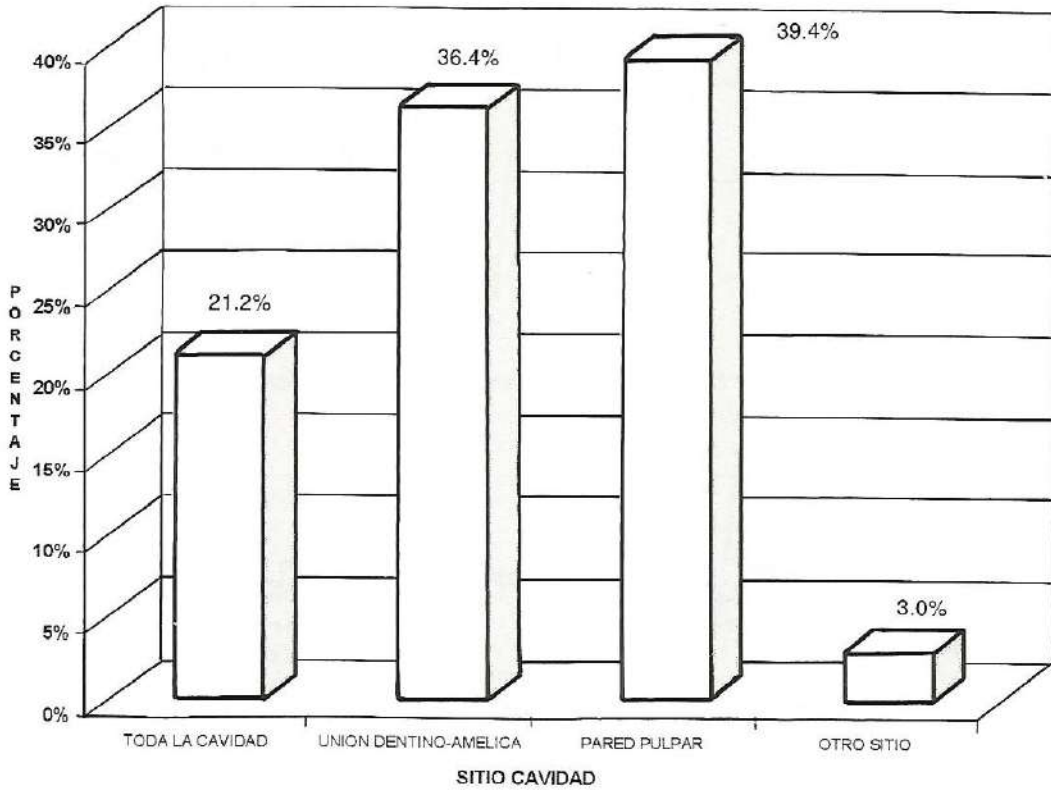


TABLA No. 2

RECUENTO DE MICROORGANISMOS TOTALES EN LOS DIFERENTES SITIOS CON TINCIÓN, EN 33 NIÑOS EN LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA U. de A., 1997

SITIO DE LA CAVIDAD	OBSERVACIONES	MICROORGANISMOS TOTALES	MEDIA
TODA LA CAVIDAD	7	509,980.000	72,854.286
UNIÓN DENTINO-AMELICA	12	146,705.000	12,225.417
PARED PULPAR	12	695,610.000	57,967.500
OTRO SITIO	1	0.000	0.000

Estadígrafo Kruskal - Wallis = 4.492

Probabilidad Asociada = 0.212991

GRAFICA No. 2

PROMEDIO DEL RECUENTO DE ANAEROBIOS, ESTREPTOCOCOS NO MUTANS, ESTREPTOCOCOS MUTANS Y LACTOBACILOS EN LAS TRES MUESTRAS DE 32 NIÑOS EN LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA U de A., 1997

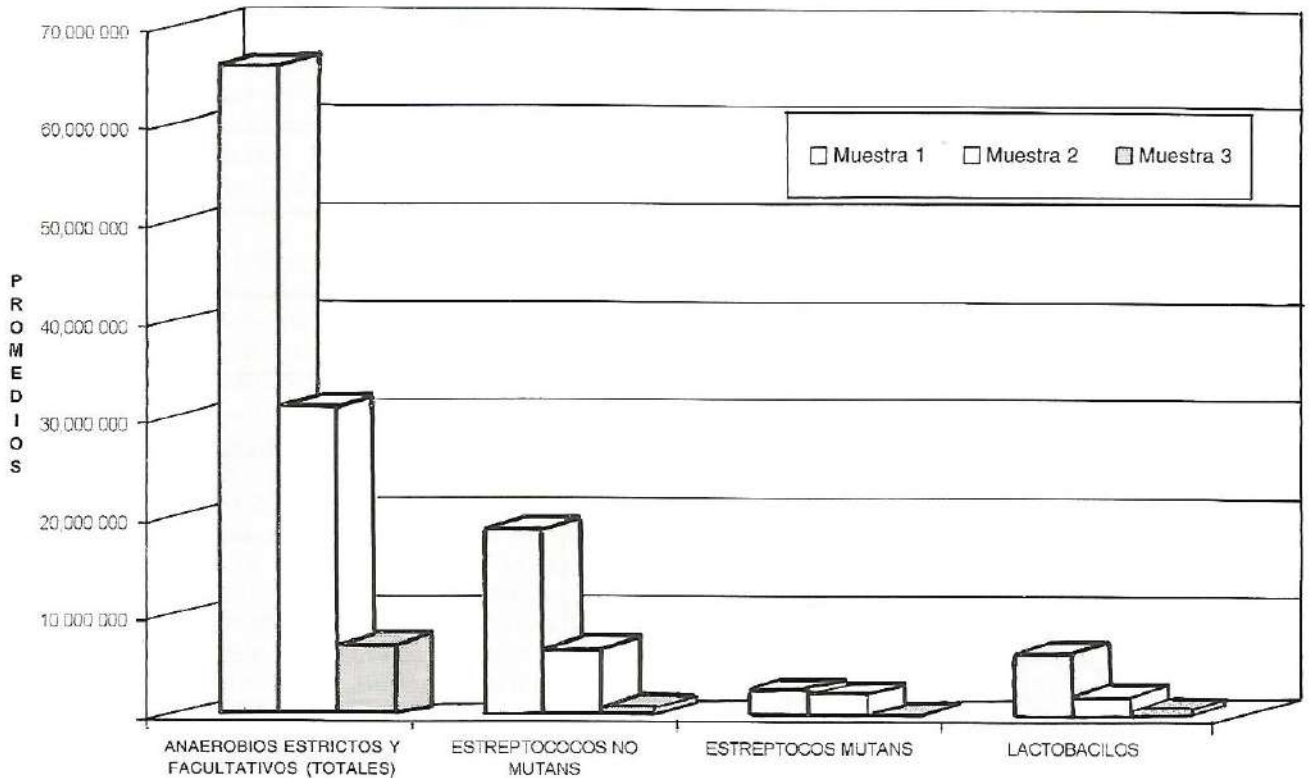


TABLA No. 3

PROMEDIO DEL RECUENTO DE MICROORGANISMOS EN LAS TRES MUESTRAS DE 32 NIÑOS EN LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA U. de A., 1997

MICROORGANISMOS	PROMEDIO DE MICROORGANISMOS	GRUPOS HOMOGENEOS
ANAEROBIOS	34,806.563	X
ESTREPTOCOCOS NO MUTANS	8,842.115	X
ESTREPTOCOCOS MUTANS	1,584.427	X
LACTOBACILOS	2,868.229	X

* Prueba de Turkey ** Nivel de significancia en el análisis de varianza 0.0000

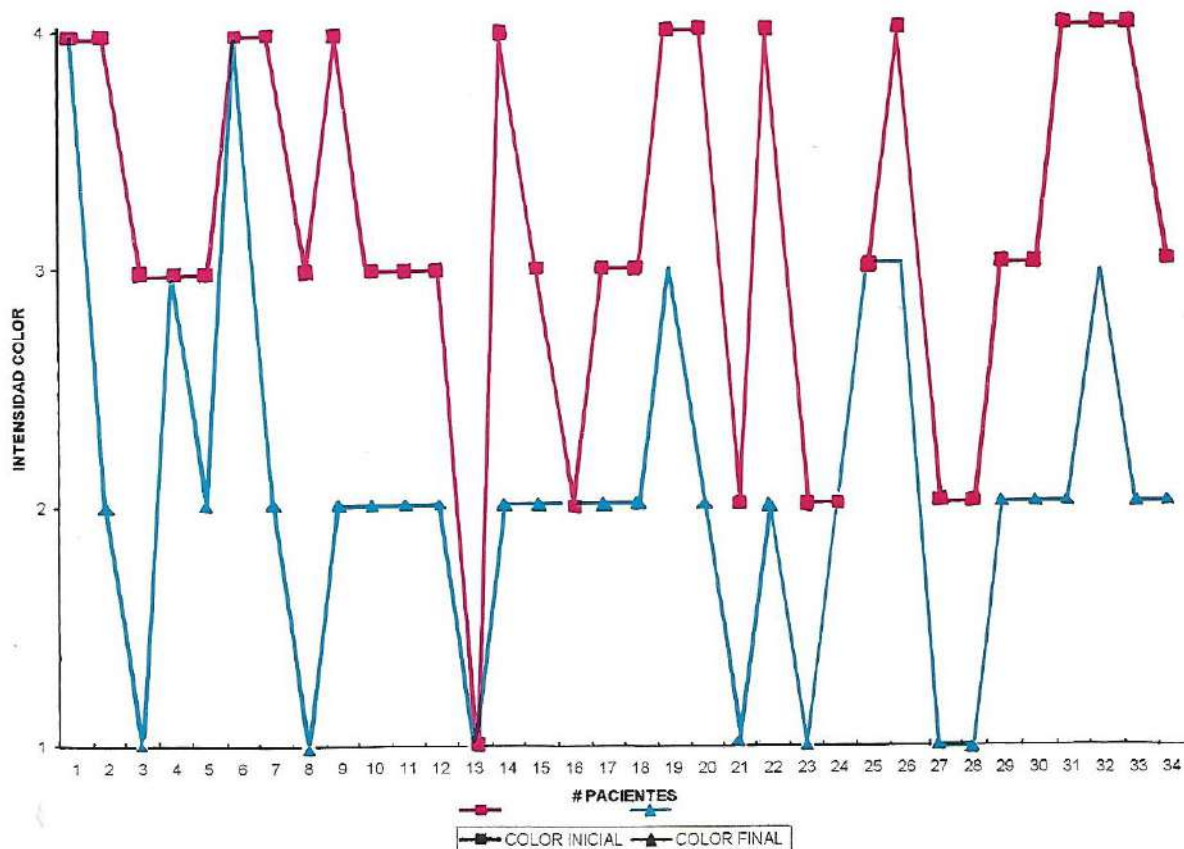
DISCUSIÓN

Se ha reconocido a través de la historia la dificultad para detectar adecuadamente la dentina cariada por los criterios ópticos y táctiles (20, 25, 29).

En el presente estudio se prepararon 34 cavidades, utilizando la dureza como criterio clínico para la remoción de dentina cariada, basados en el estudio de Charbeneau 81, dejando dentina completamente dura donde sólo es posible

remover polvillo dentinario (30). Sin embargo, en esta investigación no se encontró relación entre la dureza con la cantidad y tipo de microorganismos, debido a que en el 100% de los dientes hubo bacterias cultivables, después de removida la caries, lo que está de acuerdo con otros estudios en los cuales se observó que aunque se realice una rigurosa excavación de dentina cariada no se asegura la ausencia de microorganismos (14, 31). Lo importante no es el número de microorganismos residuales sino su viabilidad y destino, y ello de-

GRAFICA No 3
COMPORTAMIENTO DE LA INTENSIDAD DEL COLOR DE LA PRIMERA A LA TERCERA MUESTRA EN
34 NIÑOS EN LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA U de A., 1997



pende de la capacidad para satisfacer sus requerimientos nutricionales, los cuales podrían estar disponibles por microfiltración marginal o por difusión del tejido pulpar, y si esto ocurre, estarían en capacidad de reactivar el proceso carioso (28). Otros investigadores como Crone (68) y Mc Gregor (61), afirman que el efecto acidogénico de los microorganismos depende sólo del abastecimiento externo de carbohidratos fermentables, por lo cual, si hay un adecuado selle de la restauración, se va a tener poca actividad biológica (14, 31).

En este estudio se utilizó Rojo Acido al 1% en Propenil Glicol como colorante, tal como lo sugirió Fusayama (88, 32); Yip (94, 24) y Kidd (93, 26), ya que es tan efectivo como la Fuchsina básica, pero sin el potencial carcinogénico de ésta (en altas concentraciones) (33). Una vez se finalizó la eliminación de caries bajo los criterios ópticos y táctiles convencionales; se aplicó el colorante, se encontró que el 97% de los dientes presentaron tinción en algún sitio de la cavidad, lo cual está apoyado por varias investigaciones (20, 29). Aunque algunos reportes dicen que los detectores ayudan a remover sólo dentina infectada dejando tejido sano (21, 22), se observó que el detector tiñó dentina infectada no infectada ya que en el análisis microbiológico diferentes muestras de dentina

teñida, no cultivaron ningún microorganismo y clínicamente en algunas ocasiones se removió más estructura dentaria de la necesaria, llevando exposiciones pulpares. Esto está de acuerdo con los resultados de varios investigadores, quienes demostraron que el colorante puede resultar en una innecesaria remoción de dentina sana y su utilización está contraindicada en la pared pulpar de preparaciones profundas, por el riesgo de exposiciones pulpares (20, 24). Además, se ha observado que el uso del colorante no asegura la ausencia de microorganismos remanentes, ya que se ha visto que el 20% (28), 15% (34) y 25% (27), de los dientes contiene bacterias después de la remoción de dentina que tiñe. Aunque el detector puede disminuir la probabilidad de dejar dentina con bacterias viables, se ha encontrado que el colorante no tiñe las bacterias, sino matriz orgánica desmineralizada, probablemente fibras colágenas expuestas, de la capa externa de la dentina cariada (32). El propilene Glicol es el responsable de establecer una tinción selectiva, al sólo penetrar fibras colágenas irreversiblemente destruidas en sus uniones intermoleculares (35).

Se observó mayor frecuencia en la pared pulpar y la unión dentinoamélica igual a los reportes de otros estudios (20, 24, 29) Se ha tratado de explicar

estos resultados por la menor densidad mineral y mayor proporción de matriz orgánica teñible de la dentina circumpulpar y la unión dentino-amélica (36, 37).

Hubo una mayor cantidad de microorganismos en la pared pulpar y un bajo recuento en la unión dentinoamélica, siendo este resultado similar a los de otros estudios donde se encontraron pocas UFC en la unión dentino-amélica (26, 28).

En el presente estudio el promedio de UFC en la dentina teñida fue de 10.564 y de 2.126 en la que no tiñó. Estos resultados están en desacuerdo con los de Kidd (93), quien estableció que no hay una diferencia significativa entre el número de bacterias asociadas con la dentina que tiñe y la que no tiñe (26). Las discrepancias probablemente resultan del hecho de que en su estudio sólo se tuvo en cuenta la unión dentinoamélica y en este estudio se analizó el recuento total sin importar el sitio de la cavidad. Empero, la diferencia 5 veces más de UFC-Muestra en la dentina teñida con aquella que no tiñe, no es tan marcada como lo reportado por Anderson (85) (1.300 veces) (28). Esta gran discrepancia puede explicarse debido a que Anderson tomó la muestra inicial de dentina teñida, antes de remover la caries, y en este estudio se hizo después de su remoción. Se encontró un valor decreciente en el número de microorganismos en la dentina de la primera a la tercera muestra, como en el estudio de Zacharía (95, 35). Aunque este patrón decreciente no es consistente debido a que en varias ocasiones se encontraron numerosas bacterias en la dentina teñida por el colorante, y en otras ocasiones esta dentina teñida estaba libre de microorganismos. Estas inconsistencias se observan más en los del grupo de *S. mutans* y *Lactobacillus*, los cuales son considerados los más patógenos de la caries dental.

El gran problema para estudiar la microbiota de la caries de dentina, sobre todo en el frente de avance de la lesión, está en tomar una muestra sin contaminar de bacterias procedentes de la boca, placa bacteriana o de la capa más superficial de la dentina destruida. Otra dificultad es la consistencia de la muestra de dentina, la cual fue relativamente dura, siendo necesaria una cucharilla humedecida para poder recolectar dicha muestra, ésta se debía homogenizar, para así poder realizar una adecuada siembra, por lo tanto, no se pudo garantizar en el proceso de homogenización la disolución total de la muestra, lo cual finalmente pudo haber sido sembrado en un solo cultivo.

En este estudio los microorganismos anaerobios estrictos y facultativos representan la totalidad de la microbiota cultivable en dentina, y esto puede deberse a que cuando las bacterias invaden los

túbulos dentinales las circunstancias ambientales cambian sobre todo cuando la apertura de la lesión en el esmalte es pequeña. En estas condiciones el PH es menor debido a una mayor concentración de ácidos, donde se favorece el crecimiento de bacterias anaerobias (38). También se observó un bajo promedio para los *Lactobacillus* y aún menor para los *S. mutans*. Esto podría explicarse ya que en el presente estudio se seleccionó únicamente caries de dentina y el impacto del ambiente en la composición de la flora es evidente en el frente de avance de la lesión, donde los bacilos grampositivos, como los *Lactobacillus* predominan, con un menor número de bacterias como los *S. mutans*, los que están asociados con placa supragingival y esmalte sano (39).

Al avanzar en la remoción de dentina, la intensidad del color siempre fue igual o menor a la inicial, y no se observó una relación entre el frente de decoloración y el frente bacteriano. Por lo tanto, con estos hallazgos al igual que los de Charbeneau 81, se considera que el color por sí solo no es una guía real para detectar la presencia de dentina cariada (30). Se debe reconocer la limitación metodológica para asignarle al color un valor de una guía universal, cuando el color de la dentina en sí presenta una gran diferencia en sus tonalidades, las cuales comprenden desde blanco lechoso hasta café oscuro. Además, las percepciones del color son subjetivas según el operador y hubo grandes dificultades de visualización por la ubicación del diente y profundidad de la lesión.

En el presente estudio: el total de los microorganismos no fueron identificados y su papel en el progreso de la caries no se conoce. Por esto, al igual que Kidd (96) quien encontró un 70% de flora no identificable (40), se recomienda este tópico para futuras investigaciones.

CONCLUSIONES

Después de la remoción completa de caries bajo los criterios ópticos y táctiles, el 97% de las cavidades presentaron tinción de la dentina.

Los sitios que más presentaron tinción fueron: la pared pulpar y la unión dentinoamélica.

El colorante no es un buen predictor de presencia o ausencia de bacterias en la dentina, debido a que en algunos casos hubo tinción de dentina libre de microorganismos.

El uso del colorante puede llevar a exposiciones pulpares, debido a la remoción innecesaria de dentina.

Se encontró un valor decreciente de microorganismos de la primera a la tercera muestra.

El 61.81% del total de los microorganismos cultivables no fueron identificados y su papel en el progreso de la caries no se conoce.

Los *S. mutans* y *Lactobacillus* representaron sólo el 12.79% del total de microorganismos.

No hay una relación entre el frente de decoloración, el sitio de tinción y el frente bacteriano.

CORRESPONDENCIA:

Libbe Mariaca de Botero
Facultad de Odontología U. de A.

BIBLIOGRAFIA

1. Miller, W. and Massler, M. Permeability and staining of active and arrested lesions in dentine. *British Dental Journal*. Vol. 12, No. 5 (1962); p 187 - 197.
2. Iwaku, M. et al. Conservative Dentistry with caries detector and chemically Adhesive composite. *British Dental Journal*. Vol. 155, No. 19 (1983); p 19 - 22.
3. Fusayama, T. and Terachima, S. Differentiation of two Layers of Carious Dentin by staining. *Bul. Tokyo Med. Dent. Univ.*, 19 (J. Dent. Res. Vol. 51, No. 3 (1972); research annotation). Citado por: Fusayama, T. and Kurusaki, N. Structure and removal of the carious dentin. *International Dental Journal*. Vol. 22, No. 3 (1972); p 401 - 411.
4. Fusayama, T. and Kurusaki, N. Structure and removal of carious dentin. *International Dental Journal*. Vol. 22, No. 3 (1972); p 401 - 411.
5. Kato and Fusayama J. *Dent. Res.* Vol. 49 (1970); p 1060-1067. Citado por: Fusayama, T. and Terachima, S. Differentiation of two Layers of Carious Dentin by staining. *J. Dent. Res.* Vol. 51, No. 3 (1972); p 866.
6. Euler, H. *Lehrbuch der Zahnheilkunde*. Munchen, Verlag Von J.F. Bergmann, (1929); p 454. Citado por: Fusayama, T. et al. Relationship between hardness, discoloration, and microbial Invasion in carious dentin. *J. Dent. Res.* Vol. 45, No. 4 (1966); p 1033 - 1046.
7. Prader, F. Conservative treatment of the floor of the carious cavity. *International Dental Journal*. 8: 627 - 38, (1958). Citado por: Fusayama, T. et al. Relationship between hardness, discoloration, and microbial Invasion in carious dentin. *J. Dent. Res.* Vol. 45, No. 4 (1966); p 1033 - 1046.
8. Plathner, C. H. Die Natürliche pulpenüberkappung *Osterreichische zeitschrift fur stomatologie*, 58: 18 - 22, (1961). Citado por: Fusayama, T. et al. Relationship between hardness, discoloration, and microbial Invasion in carious dentin. *J. Dent. Res.* Vol. 45, No. 4 (1966); p 1033 - 1046.
9. Besic, F. C. The fate of bacteria sealed in dental cavities. *Jour. Dental Res.* Vol. 22 (1943); p 349. Citado por: Fusayama, T. et al. Relationship between hardness, discoloration, and microbial Invasion in carious dentin. *J. Dent. Res.* Vol. 25, No. 4 (1966); p 1033 - 1046.
10. Shouboe, T. and Mc Donald, J. B. Prolonged vitality of organisms sealed in dental caries. *Arch. Oral Biol*, 7, (1962) p 525. Citado por: Fusayama, T. et al. Relationship between hardness, discoloration, and microbial Invasion in carious dentin. *J. Dent. Res.* Vol. 25, No. 4, (1966); p 1033 - 1046.
11. Oghushi, K. and Fusayama, T. Electron microscopic structure of the two layers of carious dentin. *Journal Dental Research*. Vol. 54, No. 5 (1975); p 1019 - 1026.
12. Canaby, C. P. and Burnett, G.W. Clinical management of deep carious lesion. *Oral Surg*, 16, (1963); p 999. Citado por: Fusayama, T et al. Relationship between hardness, discoloration, and microbial Invasion in carious dentin. *J. Dent. Res.* Vol. 25, No. 4 (1966); p 1033 - 1046.
13. Black, G. V. *Operative dentistry Vol. II: The technical procedures in filling teeth*. Medico - dental publishing company, Chicago, (1908). Citado por Crone, F.L. Deep dentinal caries from a microbiological point of view. *International Dental Journal*. Vol. 18 No. 3, (1968); p 481 - 488.
14. Crone, F. L. Deep dentinal caries from a microbiological point of view. *International Dental Journal*. Vol. 18 No. 3, (1968), p 481 - 488.
15. Parikh, S. R. et al. Microorganism in active and arrested carious lesions of dentine. *New York Dent. J.* 29: 347-355 Oct (1963). Citado por: Fusayama, T. and Terachima, S. Differentiation of two Layers of Carious Dentin by staining. *J. Dent. Res.* Vol. 51, No. 3 (1972); (research annotation).
16. Miller, W. A. Spread of carious lesions in dentin. *Journal of American Dental association*. Vol. 78, (1969); p.1327-1330.
17. Parikh, S. R. et al. Microorganism in active and arrested carious lesions of dentine. *New York Dent. J.* 29: 347-355 Oct (1963). Citado por: Miller, W.A. Spread of carious lesions in dentin. *J.A.D.A.* Vol. 78, (1993); p 1327-1330.
18. Fusayama, T. et al. Relationship Between Hardness, discoloration and Microbial Invasion in carious dentin. *J. Dent. Res.* Vol. 45 No. 4, (1966); p 1033-46.
19. Miller, W. D. *Microorganisms of the Human mouth*. Philadelphia: Withe dental Mfg. Co., 1980. 117 p. Citado por: Anderson, M. H., Loesche, W. J. and Charbeneau, G. T. Bacteriological study of a Basic Fuchsin caries-disclosing dye. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. Vol. 54, N° 1, (1985); p.51.
20. Franco, S. and Kelsey, W.P. Caries removal with and without a disclosing solution of basic Fuchsin. *Operative Dentistry*. Vol. 6, (1981); p. 46-48.
21. Fusayama, T. Two layers of carious dentin: diagnosis and treatment. *Operative Dentistry*. Vol. 4, (1979); p. 63-70.
22. Sato, Y. and Fusayama, T. Removal of the dentin by fushin staining. *J. Dental Res.* Vol. 55 No. 4 (1976); p 678 - 683.
23. Shimizu, C. et al. Caries detector for pulpless teeth. *Operative Dentistry*. Vol. 8, (1983); p. 94-98.

24. Yip, H. K. and Beeley, J. A. The specificity of caries detector dyes in cavity preparation. *British Dental Journal*. Vol. 176, (1994); p.417-421.
25. Kidd, E. M. Caries diagnosis within restored teeth. *Operative Dentistry* 14 (1989); p 149 - 158. Citado por Boston, DW. and Graver, H. T. Histobacteriological analysis of acid red dye - stainable dentin found beneath intact amalgam restorations. *Operative Dentistry*. Vol. 19, (1994); p 65 - 69.
26. Kidd, E.A.M. et al. The use of a caries detector dye during cavity preparation: a microbiological assessment. *Br. Dent. J.* 174 (1993); p 245 - 248.
27. Boston, D.W. and Graver, H.T. Histobacteriological analysis of acid red dye - stainable dentin found beneath intact amalgam restorations. *Operative Dentistry*. Vol. 19, (1994); p. 65-69.
28. Anderson, et al. Bacteriologic study of a basic fuchsin caries- disclosing dye. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. Vol. 54, No. 1 (1985); p 51-55.
29. Anderson, M. H. & Charbeneau, G. T. A comparison of digital an optical criteria for detecting carious dentin. *Journal of Prosthetic Dentistry*. Vol. 53, No. 5 (1985); p. 643-646.
30. Charbeneau, G.T. et al. Principles and practices of Operative dentistry. ed. 2 Philadelphia (1981) Lea and Febiger. Citado por: Anderson, M. H. & Charbeneau, G. T. A comparison of digital an optical criteria for detecting carious dentin. *Jour. of Proste. Dentis*. Vol. 53, No. 5 (1985); p 643 - 646.
31. Mc Gregor, A. B. The position and extent of acid in the carious process. *Arch Oral Biology*. Vol. 4, (1961); p. 86-91.
32. Fusayama, T. Clinical guide for removing caries using a caries - detecting solution. *Quintessence International*. Vol. 19, No. 6 (1988); p 397 - 401.
33. Poole-Wilson, D. S. Occupational tumors of the bladder. *Proc Royal Soc Med (Urology)* 53: 801, (1960). Citado por Anderson, M. H. & Charbeneau, G. T. A comparison of digital an optical criteria for detecting carious dentin. *Jour. of Proste. Dentis*. Vol. 53, No. 5 (1985); p 643 - 646.
34. List, G. et al. Use of a dye in caries identification. *Quintessence International*. Vol. 18, No. 5 (1987); p 343 - 345.
35. Zacharia, M. A. and Munshi, A. K. Microbiological assessment of dentin stained with caries detector dye. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*. Vol. 19, No. 2 (1995); p 111 - 115 .
36. Herr, P. Holz, J. And Baume, L. J. Mantle dentine in man - a quantitative microradiographic study. *J. Biol Buccale*, Vol. 14 (1986), p 139-146. Citado por: Yip, H. K. and Beeley, J.A. The specificity of caries detector dyes in cavity preparation. *Br. Dent. J.* Vol. 176 (1994); p 417 - 421.
37. Hals E., Tveit, A.B. and Totdal, B. X-ray microanalysis of dentin: a review. *Scanning microsc.* Vol. 2 (1988); p 357 - 369. Citado por: Yip, H. K. and Beeley, J. A. The specificity of caries detector dyes in cavity preparation. *Br. Dent. J.* Vol. 176 (1994); p 417 - 421.
38. Liebana, U.J. *Microbiología Oral*. Ed. Interamericana Mc Graw - Hill España - Madrid 1ª Ed. 1995.
39. Edwardsson, S. Bacteriological studies on deep areas of carious dentine, *Odont. Revy* 1974; 25, Suppl 32. Citado por Thylstrup, A., Feyerskov, O. *Textboook of clinical cariology*. 2ª Ed. Muskgaar Copenhagen. 1994.
40. Kidd, E. A. M. et al. Criteria for caries removal at the enamel - dentine junction: a clinical and microbiological study. *Br. Dent. J.* Vol. 180, No. 8 (1996); p 287-291.