

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 782**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

A61B 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2007 E 07848668 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.10.2014 EP 2125035**

54 Título: **Composición y procedimiento de detección de desmineralización**

30 Prioridad:

21.12.2006 GB 0625678

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

12.12.2014

73 Titular/es:

**CALCIVIS LIMITED (100.0%)
9 Edinburgh Bioquarter, Little France, Edinburgh
Midlothian EH16 4UX , GB**

72 Inventor/es:

**PERFECT, EMMA y
LONGBOTTOM, CHRIS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 524 782 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición y procedimiento de detección de desmineralización

La invención se refiere a una composición para la detección de la desmineralización de los dientes. Más específicamente, la invención se refiere a una composición que comprende un complejo capaz de producir una señal óptica característica de la presencia de iones libres, a los usos farmacéuticos de dicha composición, y a procedimientos y a un kit de detección de la desmineralización activa en las superficies dentales usando dicha composición.

El esmalte dental contiene cristales de apatita de gran tamaño que forman una estructura apretada. Sin embargo los cristales están separados por pequeños espacios o poros intercristalinos que se llenan de agua y materia orgánica. La forma de la apatita que se encuentra en los dientes es la hidroxiapatita, la unidad de repetición más pequeña a la que pertenece $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot 2(\text{OH})$. Los componentes del cristal se pueden sustituir. Los sustituyentes conocidos incluyen estroncio, bario, plomo, sodio, potasio y magnesio para el calcio; halógenos (F, Cl, I, Br) para el hidróxido y el carbonato; y fosfato de hidrógeno para el fosfato. Entre dichas sustituciones, se ha informado que el fluoruro y el carbonato son los más importantes, previniendo y reparando el fluoruro las caries; y el carbonato, aumentado la susceptibilidad a la caries. También se ha publicado la presencia de muchos otros iones tales como cinc, estaño y hierro en el esmalte superficial. La materia orgánica (1 % en peso, 2 % en volumen) que se encuentra en el esmalte completamente formado se compone principalmente de enamelinas (masa de 50-70 kDa), pero también contiene lípidos de bajo peso molecular, y algunos hidratos de carbono y ácidos orgánicos tales como el citrato y el lactato. Las enamelinas se pueden detectar por análisis de inmunotransferencia.

Muchos de los problemas dentales se producen como consecuencia de la desmineralización de los dientes. La desmineralización es un proceso subyacente que participa en el desarrollo de las caries dentales, la erosión dental y la hipersensibilidad de la dentina. La desmineralización de uno o más de los tejidos dentales duros provoca una pérdida de la integridad de los dientes. En general, los minerales se encuentran presentes en los tejidos dentales duros en un estado de mineralización, y la desmineralización implica la liberación de iones libres.

Las lesiones de caries dentales dañan la estructura de los dientes. Las caries dentales pueden provocar dolor, infección, mal aliento, mal sabor y pérdida de piezas dentales. En los casos graves, la infección se puede extender a los tejidos blandos circundantes, pudiendo incluso provocar la muerte. Los factores que generan caries incluyen bacterias, que se acumulan alrededor de los dientes en una masa pegajosa conocida como placa, y la comida y la bebida ingerida. Las bacterias asociadas con la desmineralización temprana son *Streptococcus mutans*, mientras que los lactobacilos parecen estar relacionados con la progresión de la lesión. Dichas bacterias convierten los azúcares de los alimentos/las bebidas en ácidos tales como ácido láctico, a través de la fermentación y, si se dejan en contacto con los dientes, estos ácidos provocan la desmineralización. Esta eliminación del mineral de la superficie del cristal de los dientes aumenta la porosidad de la estructura y la hace más susceptible al ataque. A medida que los poros aumentan de tamaño, el ácido puede penetrar más profundamente en el tejido y disolver los minerales de la superficie inferior. Finalmente, tras la desmineralización, se produce la desintegración de la materia orgánica. Si se permite que esto siga progresando, se pierde el contenido mineral en la medida en que la materia orgánica retenida se desintegra formando una cavidad o una rotura en la integridad de la superficie del diente. La presencia de la biopelícula de placa en la superficie es esencial para que la caries progrese.

Existen tecnologías para determinar la ubicación y la extensión (pérdida de mineral en profundidad y/o volumen) de las lesiones de caries. La identificación de las zonas de desmineralización es usada actualmente por los dentistas para detectar las caries y otros problemas dentales. Esto puede implicar un examen visual por parte del dentista, radiografía o tecnologías del estado de la técnica tales como DIAGNOdent (número de patente US4290433). El empleo del examen visual para detectar las caries se basa en la habilidad del evaluador y, sobre todo, en el grado de desmineralización/erosión. A menudo, ya se han producido daños significativos en el momento en el que se detectan las caries de este modo. El análisis de rayos X puede revelar la presencia de caries invisibles para el ojo humano, sin embargo se requiere una evaluación continua para determinar la actividad de la caries. Las tecnologías del estado de la técnica que pueden ayudar en el diagnóstico de las caries incluyen la iluminación de fibra óptica con luz o láser. DIAGNOdent (US4290433) y la fluorescencia inducida por luz cuantitativa (QLF) (US4290433) implican la iluminación de la superficie del diente con la luz roja del láser (633 nm) o la luz azul de alta intensidad, respectivamente, y después, el análisis de la fluorescencia emitida. La naturaleza de la fluorescencia emitida se puede correlacionar con el grado de desmineralización del diente. Otros procedimientos tales como el detector ultrasónico de caries (UCD) emplean ondas ultrasónicas (US2007238996) para crear una imagen del diente, donde el nivel de reflectancia es proporcional a la densidad del tejido; o la espectroscopia de Raman (US2005283058) que es sensible a la orientación del mineral y del cristal para caracterizar la superficie de esmalte.

La erosión dental es una pérdida progresiva del espesor del tejido duro de forma incremental de la superficie del diente y, con frecuencia, está causada por las bebidas/los alimentos ácidos (que pueden ser o no azucarados), que causan la desmineralización y pueden hacer que la dentina quede al descubierto. La erosión también se puede acelerar mediante el cepillado del esmalte debilitado por los ácidos (o la dentina), lo que conduce a la completa eliminación del esmalte y la consiguiente exposición de la dentina. En concreto, erosión se refiere a los procedimientos no bacterianos que causan la pérdida progresiva del tejido dental duro. La erosión dental se produce

cuando el esmalte de los dientes es desgastado por el ácido. Normalmente, el calcio contenido en la saliva ayudará a remineralizar (o fortalecer) los dientes tras el consumo de pequeñas cantidades de ácido, pero la presencia de una gran cantidad de ácido en la boca impide la remineralización. El ácido puede proceder de muchas fuentes, incluyendo las bebidas carbonatadas. Todas las bebidas "gaseosas" contienen ácido y pueden disolver el esmalte muy rápidamente. El aumento de la cantidad consumida conduce al aumento del daño, así como el mantenimiento de la bebida en la boca durante más tiempo. El zumo de fruta puro contiene ácido y, por lo tanto, actúa de una manera similar a las bebidas carbonatadas. La bulimia y el reflujo ácido pueden contribuir a la erosión dental debido a la exposición de los dientes a los ácidos estomacales.

Hay una serie de signos de la erosión dental, que varían de sus primeras etapas (sensibilidad, decoloración, redondeado de los dientes) hasta las etapas posteriores, más graves (grietas, sensibilidad severa, ahuecamiento). El desgaste del esmalte protector conduce a una mayor exposición de las terminaciones nerviosas de la pulpa dental, provocando dolor al consumir alimentos y bebidas calientes, fríos o dulces. Por lo tanto, el paciente a menudo puede presentar sensibilidad. La sensibilidad grave se puede desarrollar cuanto más se desgaste el esmalte y los dientes se vuelvan cada vez más sensibles. Los pacientes también pueden presentar decoloración dental, ya que se pueden volver ligeramente amarillos cuando la dentina queda al descubierto. Los dientes pueden tener un aspecto redondeado o "limpiado a chorro de arena" como resultado de la erosión. Los dientes delanteros pueden parecer ligeramente transparentes cerca de los bordes adherentes. Se puede producir una decoloración avanzada - los dientes pueden volverse más amarillos al quedar más dentina al descubierto debido a la pérdida del esmalte dental. Pueden aparecer pequeñas grietas y rugosidades en los bordes de los dientes, pudiéndose generar un ahuecamiento, pues pueden aparecer pequeñas marcas en la superficie de masticación de los dientes. También pueden aparecer rellenos elevados por fuera del diente. Si la erosión dental se puede identificar precozmente, se puede aplicar el tratamiento, protegiéndose los dientes. Por ejemplo, se pueden sellar las zonas problemáticas para evitar una mayor desmineralización. La detección y el diagnóstico precoz son, por tanto, de suma importancia.

La hipersensibilidad de la dentina es el dolor que surge cuando la dentina queda al descubierto, normalmente como respuesta a estímulos externos (y que no se pueden explicar por ninguna otra forma de enfermedad dental). Los túbulos dentinales abiertos expuestos conducen directamente a los tejidos de la pulpa, que incluyen los nervios en su interior. Cuando el cemento que cubre la dentina de la raíz ha desaparecido (debido a la erosión o abrasión) una vez que las encías han retrocedido, los túbulos quedan expuestos, y se puede producir sensibilidad y dolor. En los casos de hipersensibilidad, la dentina tiene hasta 8 veces más túbulos abiertos en la superficie de la dentina, y el diámetro de los túbulos es más ancho que cuando no hay dolor. Esto proporciona una mayor superficie disponible para la desmineralización, tal como por bebidas ácidas, y también conduce a la liberación de más calcio tras la aplicación de dichos productos.

Como se ha mencionado anteriormente, el desarrollo de caries, la erosión o la hipersensibilidad están causados por una pérdida de la integridad de los dientes a través de la desmineralización de uno o más de los tejidos dentales duros. La hidroxiapatita, el componente principal del esmalte, se vuelve soluble cuando se expone a ambientes ácidos. Los dientes están sometidos a un ataque constante de su entorno externo. Las bacterias de la placa que se encuentra sobre la superficie del diente producen ácidos y, después de las comidas o aperitivos azucarados, la acidez de la placa puede aumentar drásticamente. Durante la exposición a cualquier entorno ácido, las porciones de contenido de materia inorgánica de la superficie de los dientes se disuelven y pueden permanecer disueltas durante más de 2 horas. El ácido puede penetrar en los poros microscópicos creados por dicha desmineralización de la superficie y se puede crear una capa subsuperficial desmineralizada en el interior del diente cuando la capa superficial se remineraliza parcialmente a medida que la acidez de la placa vuelve a niveles más bajos. Los períodos de oscilación de la desmineralización y remineralización son, por lo tanto, una característica "normal" de la superficie de los dientes en presencia de placa.

La dentina y el cemento son más susceptibles a la desmineralización ácida que el esmalte, pues tienen un contenido de mineral inferior. El proceso de la caries es un proceso dinámico que comienza en la superficie de un diente, pero debido a complejos procesos de desmineralización-remineralización relacionados con los gradientes de concentración de mineral en el fluido del interior del diente y de la placa, la superficie se vuelve más altamente mineralizada que la zona subsuperficial. La sustitución se produce fácilmente en la estructura inorgánica del esmalte, y por tanto, la desmineralización genera la liberación de muchos iones diferentes. Este factor es especialmente importante para la detección precoz, pues la superficie del esmalte es la ubicación de captación inicial y también el primer punto de ataque de los ácidos.

Los sustituyentes comunes incluyen sodio, magnesio, fluoruro y carbonato. El magnesio y el carbonato pueden penetrar en el esmalte, y se sabe que cambian la estructura cristalina de la apatita de manera que se vuelve más soluble. Por lo tanto, dichos iones se pierden preferentemente desde la subsuperficie tras el ataque ácido. También se encuentran mayores concentraciones de cinc, plomo, estaño y hierro en el esmalte superficial en comparación con las capas más profundas. Los análisis de las lesiones de caries en el esmalte generalmente muestran altos niveles de fluoruro junto con niveles apreciables de magnesio, lo que se cree que se debe a la rápida absorción de dichos iones por parte de las capas de apatita recién expuestas.

Aunque existen algunas tecnologías para determinar la ubicación y extensión (pérdida de mineral en profundidad y/o volumen) de la lesiones de caries, un importante inconveniente de dichos procedimientos es que no abordan la

naturaleza del proceso de las caries, es decir, si son activas o inactivas en un determinado punto temporal. Las lesiones de caries inactivas pueden no requerir tratamiento, mientras que las lesiones de caries activas (por definición) indican una desmineralización en curso. También sería beneficioso tener información sobre la desmineralización lo antes posible. A menudo, la caries activas permanecerán sin ser detectadas hasta el final del proceso y cuando ya se ha producido un daño significativo de la integridad del diente. A veces, es solo cuando el paciente comienza a sentir dolor cuando se usa una radiografía para confirmar la presencia de caries. En la actualidad, la naturaleza activa de las caries solo se puede determinar mediante la evaluación de los progresos de la lesión de la caries a lo largo del tiempo, por lo general, durante un período de más de un año en el caso de las radiografías (rayos X). Si es posible identificar la caries, la erosión dental o los dientes hipersensibles de manera precoz, se puede aplicar el tratamiento, protegiéndose los dientes. Por ejemplo, se pueden sellar las zonas problemáticas para evitar una mayor desmineralización. La detección y el diagnóstico precoz son, por tanto, de suma importancia. Además, es preferible obtener la información sobre la actividad en una exploración.

El diagnóstico de caries inicial implica el examen de todas las superficies visibles de los dientes, a menudo usando un explorador dental o punzón metálico y un espejo, iluminado por una fuente de luz brillante. En algunos casos, el signo de una lesión de caries o de la desmineralización del esmalte es la aparición de una mancha de color blanco tiza en la superficie del diente. Sin embargo, dicha mancha no siempre es visible.

Una técnica común para diagnosticar las caries tempranas es soplar aire a través de la superficie sospechosa de tenerla. La pérdida resultante de humedad de la superficie cambia las propiedades ópticas del esmalte desmineralizado, permitiendo la visualización de una lesión manchada de blanco que indica la caries en una fase temprana. A medida que continúan a desmineralizarse, las caries pueden volverse marrones y, con el tiempo, convertirse en una cavidad. Las grandes lesiones de caries a menudo se pueden ver a simple vista. Sin embargo, las lesiones más pequeñas pueden ser muy difíciles de identificar. Una vez que se forma una cavidad, la estructura del diente que se ha perdido no se puede regenerar. El proceso previo a dicho punto puede ser reversible, por lo tanto, es esencial identificar las caries lo antes posible.

Las tecnologías del estado de la técnica que pueden ayudar en el diagnóstico de las caries incluyen la iluminación de fibra óptica con luz o láser. Diagnodent es una tecnología abordada por la patente estadounidense US 6.769.911, mediante la que una herramienta que contiene un elemento de sonda y una fuente de luz roja integrada genera fluorescencia en la región cariada infectada por bacterias de un diente, que tras pasar a través de un filtro apropiado, se mide con el dispositivo. Sin embargo, dicho procedimiento no proporciona ninguna indicación en cuanto a si la caries es activa o inactiva.

También se han usado colorantes, incluyendo los colorantes fluorescentes, para identificar la ubicación de las bacterias y la presencia de ácido en los dientes como un procedimiento para detectar la caries dental. Sin embargo, estos colorantes tienden a ser tóxicos y, por lo tanto, no son adecuados para el análisis en el interior de la boca. Además, el esmalte es autofluorescente y, por tanto, la fluorescencia de fondo puede ser prohibitivamente elevada.

La erosión se detecta mediante examen visual, como se detectan las caries. Los signos y los síntomas que indican la erosión incluyen el aumento de la transparencia de los incisivos, rellenos elevados por encima de los dientes vecinos y el desgaste de las superficies que no se emplean para morder. Todos ellos necesitan un tiempo para desarrollarse en un grado visible, en el que el daño ya se haya creado. Sería deseable disponer de un procedimiento para analizar la desmineralización producida como resultado de la erosión, para una serie de razones. Por ejemplo, se podrían aplicar ciertos alimentos o bebidas en los dientes, seguidos de la composición desvelada. La composición que se desvela emitiría una señal detectable si los iones se estuvieran emitiendo como resultado de la comida o la bebida en contacto con el diente. Un fabricante, para determinar el potencial dañino que un producto comestible podría tener en los dientes, podría usar este ensayo, bien para medir productos alimenticios o bebidas convencionales, o en el desarrollo de productos respetuosos con los dientes (bajo potencial de provocar erosión) o productos de prevención de la erosión tales como pastas de dientes y selladores. Un dentista también puede usar la composición que se desvela para determinar la susceptibilidad de un paciente a la erosión y según lo determinado por la composición de los dientes y la saliva.

El paciente informará sobre la hipersensibilidad de la dentina, y el dentista la examinará. Las herramientas de diagnóstico útiles son la jeringa de aire/agua, el explorador dental, el ensayo de percusión, el ensayo del esfuerzo de mordida y otros ensayos térmicos, tales el del cubito de hielo y la evaluación de la oclusión. Sin embargo, dichos procedimientos, basados en la información aportada por el paciente, son subjetivos y carecen de precisión.

En las solicitudes de patente DE19926728 y WO0112237, se describe una técnica de detección alternativa. La técnica citada en dichas solicitudes usa un material de formación de películas deformable y curable para tomar una impresión de los dientes, que posteriormente se usa para el análisis. Dicha técnica tiene las desventajas de que requiere mucho tiempo y de que la detección no se realiza directamente en la superficie del diente.

Es un objeto de la invención mitigar problemas tales como los descritos anteriormente.

De acuerdo con un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso intraoral para detectar caries dentales activas y/o la desmineralización activa de los dientes debida a la erosión, que

comprende una proteína o un complejo proteico capaz de producir una señal óptica característica de la presencia de iones libres, en la que la proteína o el complejo proteico están seleccionados entre eucorina, obelina, clitina, mitocomina, halistaurina, fialidina, mnemiopsina, simplectina, gr-bolinopsina, caseína, calsecuestrina, calexcitina, cisteína proteasa de unión al calcio, calmodulina y otras proteínas de mano EF, berovina o mezclas de las mismas.

- 5 La composición puede comprender además un aditivo farmacéuticamente aceptable, y el aditivo es preferentemente un agente bactericida o bacteriostático.

La composición puede comprender un excipiente farmacéuticamente aceptable, y el excipiente es preferentemente un aditivo aromatizante o colorante.

- 10 Se prefiere que la composición esté en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable, y la composición es preferentemente un líquido, un polvo o un gel. La composición puede comprender de 1 ng/ml a 10 mg/ml de complejo, o cualquier concentración que dé una relación señal-ruido significativamente alta.

La composición puede comprender una proteína o un complejo proteico. Dicho complejo puede sufrir un cambio de configuración al unirse a iones libres, que conduce a la generación de una señal óptica.

- 15 Se prefiere que la proteína o el complejo proteico comprendan fusiones en tándem de proteínas fluorescentes y de proteínas de unión a iones tales como la calmodulina, un péptido de unión a la calmodulina (M13) y una proteína fluorescente emisora de verde o amarillo aumentada.

- 20 Estas se pueden modificar, por ejemplo, alterando la secuencia de ADN del gen, por acetilación, etoxicarbonilación, modificación con fluorescamina o marcaje con fluoresceína, o mediante la creación de proteínas quiméricas tales como GFP-eucorina (US2003175807) para aumentar la señal, prolongar la duración de la señal o alterar su espectro de emisión. También se pueden usar las proteínas y los complejos proteicos con función similar, tales como los sometidos a un cambio de configuración al unirse a un ión, conduciendo a una señal óptica.

La proteína o el complejo proteico comprenden preferentemente una proteína recombinante (expresada a una alta pureza). La proteína o el complejo de proteína-proteína se pueden administrar en una solución exenta del ión específico con el fin de reducir la señal de fondo. Esto se puede conseguir usando un quelante de iones.

- 25 Preferentemente, la composición será ópticamente transparente. Esto permitirá que la composición transmita la luz emitida cuando el indicador sensible a los iones entra en contacto con los iones libres. También se pueden añadir aditivos para alterar la señal, por ejemplo, un gel para prolongar el tiempo durante el que la señal detectable sigue siendo detectable, tampones para optimizar la reacción o sustrato modificado para prevenir un destello inmediato, pero que se puede producir más tarde, tal como el sistema Enduren para las luciferasas celentéreas.

- 30 La señal óptica producida por la composición al exponerse a iones libres se puede detectar mediante un espectrofotómetro, dispositivo de carga acoplada (CCD), semiconductor de óxido metálico complementario CMOS, cámara digital, cámara intensificada, cámara intraoral, videoscopio, película fotográfica, dispositivo de fibra óptica, detector fotométrico, fotomultiplicador, sistema micro-electromecánico (MEMS) o a simple vista.

- 35 De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona el uso de una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente para la fabricación de una preparación para la detección de caries dentales. Es posible diferenciar las caries dentales activas de las caries dentales inactivas en base a la presencia de desmineralización. Por lo tanto, la composición se puede usar en la fabricación de una preparación para su uso en la diferenciación entre la caries dental activa e inactiva. La invención también puede proporcionar el uso de una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente para la fabricación de una preparación para la detección de la desmineralización activa de los dientes debida a la erosión.

La invención también puede proporcionar el uso de una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente para la fabricación de una preparación para la detección de sitios de desmineralización de la dentina relacionada con la hipersensibilidad dentinaria.

- 45 De acuerdo con un tercer aspecto de la invención, se proporciona un kit para su uso en la detección de la desmineralización, que comprende una composición que comprende un complejo sensible a iones, medios para aplicar la composición y una unidad de detección. El kit también puede incluir una solución sensibilizante ácida o azucarada. El kit puede incluir además un marcador tal como una rejilla para marcar superficies de interés en un diente o modelo de diente. El kit se podría adquirir por una serie de razones. Un dentista puede desear tener un kit de ensayo disponible en el mercado conveniente para su uso en la evaluación de la susceptibilidad del paciente a la erosión. Un consumidor podría usar un ensayo de uso doméstico de la susceptibilidad a la erosión, quien luego podría decidir qué medidas preventivas tomar. Los fabricantes de productos alimenticios o de bebidas podrían adquirir el ensayo si les interesara comprobar las propiedades de erosión dental de sus productos.

Así pues, la invención busca proporcionar una composición, un uso de la composición y un kit que contiene la composición para la detección de iones libres en aplicaciones dentales.

La invención se describirá con mayor profundidad únicamente a modo de ejemplo y con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

5 la Figura 1 es una representación esquemática de FRET en indicadores Cameleon;
 La Figura 2 muestra premolares extraídos con “ventanas” enmascaradas marcadas en la superficie de los mismos;
 la Figura 3 muestra imágenes de dientes extraídos tras la aplicación de gel de ácido y del gel que se desvela;
 las Figuras 4 y 5 muestran el uso de un programa de análisis de imágenes ImageJ para determinar el brillo de la superficie tratada con gel de ácido y el gel que se desvela;
 10 la Figura 6 muestra el uso de obelina como una composición que se desvela;
 las Figuras 7a a 7b muestran los resultados de los experimentos llevados a cabo en la raíz de un diente con una caries;
 las Figuras 8a y 8b muestran los resultados de los experimentos llevados a cabo en la dentina en un diente;
 las Figuras 9a a 9b muestran los resultados de los experimentos llevados a cabo en relación con la identificación de cavidades;
 15 las Figuras 10a a 10b muestran los resultados de experimentos adicionales llevados a cabo en relación con la identificación de cavidades;
 las Figuras 11a a 11b muestran los resultados de experimentos adicionales llevados a cabo en relación con la identificación de caries;
 la Figura 12 muestra imágenes de molares deciduos con lesiones de cavidades (A). Las Figuras 12a y c muestran imágenes de los dientes a la luz, y la Figura 12b y 12d muestran una imagen monocromática tras la aplicación del gel que se desvela;
 20 la Figura 13A muestra un incisivo (deciduo) con una gran lesión de caries (conocido como síndrome del biberón), habiendo sido tomada la imagen del diente a la luz;
 la Figura 13B es una imagen monocromática de un incisivo (deciduo) con una gran lesión de caries (conocida como síndrome del biberón) tras la aplicación del gel que se desvela;
 25 la Figura 14A es una imagen que muestra la superficie lisa de un molar (deciduo), habiendo sido tomada la imagen del diente a la luz;
 la Figura 14B es una imagen monocromática que muestra la superficie lisa de un molar (deciduo) tras la aplicación del gel que se desvela;
 30 la Figura 15A y 15B muestra imágenes de la superficie oclusal del molar (permanente). La Figura 15A muestra una imagen del diente a la luz, y la Figura 15B muestra una imagen monocromática tras la aplicación del gel que se desvela;
 La Figura 16A es una imagen de un molar (deciduo) tomada a la luz;
 la Figura 16B muestra una imagen monocromática tras la aplicación del gel que se desvela;
 35 la Figura 16C es una representación gráfica de la luz generada a través de una lesión;
 la Figura 17A muestra una radiografía de molares permanentes;
 la Figura 17B muestra molares permanentes cuya superficie mesial también se examinó con rayos X tras la aplicación del gel que se desvela;
 40 la Figura 18A muestra una imagen de un diente que se había enjuagado en agua desionizada y retirado antes de su evaluación;
 la Figura 18B muestra un diente que se había enjuagado y evaluado en saliva;
 la Figura 18C muestra un diente que se había enjuagado en saliva, pero que se había retirado antes de su evaluación;
 45 la Figura 18D muestra un diente que se había incubado en saliva, retirado y enjuagado en agua desionizada antes de su evaluación;
 la Figura 19A muestra un cálculo supragingival fotografiado tras la adición de la solución que se desvela;
 la Figura 19B muestra un cálculo supragingival fotografiado tras la adición de la solución que se desvela;
 la Figura 20A muestra una imagen del diente a la luz tras la aplicación del gel que se desvela; el recuadro indica la superficie del cálculo;
 50 la Figura 20B muestra una imagen monocromática tras la aplicación del gel que se desvela; el recuadro indica la superficie del cálculo;
 la Figura 21A muestra imágenes de la superficie oclusal del molar (permanente) a la luz antes de la aplicación del gel que se desvela;
 la Figura 21B es una imagen monocromática de la superficie oclusal del molar (permanente) tras la aplicación del gel que se desvela;
 55 las Figuras 22a a 22c muestran los resultados de los experimentos llevados a cabo en relación con la erosión dental y la hipersensibilidad;
 las Figuras 23a a 23c muestran los resultados de experimentos adicionales llevados a cabo en relación con la erosión dental y la hipersensibilidad;
 60 las Figuras 24a a 24c muestran los resultados de más experimentos adicionales llevados a cabo en relación con la erosión dental y la hipersensibilidad;
 las Figuras 25a a 25c muestran los resultados de los experimentos llevados a cabo usando dientes atacados con ácido;
 65 las Figuras 26a a 26d muestran los resultados de experimentos adicionales llevados a cabo usando dientes atacados con ácido;

las Figuras 27A y 27B son gráficos que muestran el efecto protector de la saliva sobre el esmalte tratado con ácido en comparación con el agua desionizada;

la Figura 28 es un gráfico que muestra los efectos de soluciones de diferente pH a diferentes niveles de desmineralización, medidos por un cambio en el brillo, con soluciones de pH inferior que generan más desmineralización (más brillo); y

la Figura 29 es un gráfico que indica que es posible determinar el efecto de los productos alimenticios en la desmineralización de los dientes usando la composición que se desvela y el procedimiento de ensayo de la invención.

En el contexto de la invención, un "complejo sensible a iones" significa un complejo capaz de producir una señal óptica característica de la presencia de iones libres liberados como resultado de la desmineralización. El complejo puede ser un colorante, quelante de iones sintético tal como un complejo de EDTA-indicador o un macrociclo tal como un complejo de éter corona e indicador, un complejo de proteínas o de proteína-indicador, un complejo de polímero impreso molecular-indicador o el empalme de Holliday, que se puede modificar para aumentar la sensibilidad a los iones, con el fin de mejorar la potencia de la señal, de prolongar la señal, de mejorar la relación señal-ruido o de mejorar la respuesta espectral. También se puede usar proteína recombinante o modificada.

La invención se refiere al nuevo uso farmacéutico de un colorante sensible a iones o de una combinación de colorantes sensibles a iones, quelantes de iones sintéticos tales complejos de EDTA-indicador o macrociclos tales como complejos de éter corona e indicador, complejos de proteínas o de proteína-indicador, complejos de polímero impreso molecular-indicador o sondas moleculares tales como los empalmes de Holliday como indicadores en la detección de la desmineralización dental. Como se ha tratado anteriormente, la presencia de iones libres en la superficie del diente indica la presencia de desmineralización. Dichos indicadores se pueden usar para detectar la presencia de iones libres en los dientes, lo que ayuda a detectar problemas dentales específicos.

En presencia de iones libres, se emite una señal óptica desde el indicador sensible a iones. Los espectros, la intensidad o duración de la señal son proporcionales a la cantidad de iones libres. Los diferentes tejidos tienen diferentes cantidades y tipos de iones disponibles y, por tanto, la respuesta a los indicadores sensibles a iones variará entre los tejidos. En el proceso de erosión dental, la dentina finalmente puede quedar al descubierto. En el proceso de hipersensibilidad de la dentina, el cemento se retira y la dentina de la raíz queda al descubierto. La dentina y el cemento se mineralizan menos que el esmalte y, por lo tanto, responden directamente a los indicadores sensibles a iones. Estos rasgos desmineralizados de los dientes se pueden identificar por las superficies que tienen señales ópticas más intensas.

En presencia de caries activa, se seguirán liberando iones libres a medida que el diente es desmineralizado por el ambiente ácido y las bacterias. La ubicación y la intensidad de dicha señal permiten determinar la localización de las caries activas.

La composición puede contener uno o más de los siguientes: colorante, quelante de iones sintético tal como un complejo de EDTA-indicador o un macrociclo tal como un complejo de éter corona e indicador, un complejo de proteínas o de proteína-indicador, un complejo de polímero impreso molecular-indicador o una sonda molecular tal como el empalme de Holliday. La proteína o el complejo proteico pueden incluir fotoproteínas sensibles a iones, proteínas fluorescentes sensibles a iones o complejos de proteínas detectables por fluorescencia, bioluminiscencia, quimioluminiscencia o transferencia de energía de resonancia fluorescente (BRET, CRET o FRET)), anticuerpos marcados que reconocen materia orgánica, por ejemplo, enamelinas. El quelante de iones sintético o los complejos proteicos pueden tener incorporado un resto de fluorescencia que se apaga al unirse a iones, o complejos proteicos que tienen incorporado un resto de fluorescencia y un inactivador, retirándose este último al unirse al ión generando una liberación de la luz.

Se pueden detectar diferentes iones usando diferentes complejos. El magnesio se detecta con colorantes fluorescentes tales como Mag-Fura-2 y Mag-Fura-5. Se podrían usar para medir *in situ* el magnesio (excitación a 340-380 nm, emisión a 500-510 nm). Preferentemente, los colorantes no son tóxicos.

Hay una serie de colorantes que son sensibles al calcio, pero que pueden ser demasiado tóxicos para usarlos en la boca. Fura-2, Calcio verde-1, Fluo-3, Indo-1 y cSNARF-1 son todos colorantes fluorescentes, que se unen al calcio libre intracelular. Indo-1 y cSNARF-1 son colorantes de emisión dual. Los colorantes fluorescentes de unión al calcio usados para detectar y medir el calcio libre pueden ser útiles como una alternativa a las fotoproteínas luminiscentes. Además, dichos colorantes se pueden usar en un procedimiento novedoso para la medición simultánea del calcio y del estroncio en la saliva si se usa en combinación con halistaurina. Se han usado Fura-2, calcio verde-1, Indo-1 y sus derivados de acetometiléster en ratones (*in vivo*) para controlar la actividad neuronal. Rhod-2 también es un colorante sensible al calcio, aunque es menos sensible que Fluo-3. Las longitudes de onda de excitaciones y emisiones más largas de Rhod-2 (~556/576 nm) hacen que el indicador sea útil para los experimentos en células y tejidos que tengan altos niveles de autofluorescencia y para los experimentos donde se use a la vez otro colorante fluorescente de longitudes de onda más cortas. Como se sabe que el esmalte emite fluorescencia, dicha longitud de onda de emisión larga sería una ventaja significativa.

- La detección del fluoruro se puede lograr con colorantes fluorescentes. Generalmente, en las lesiones de caries se encuentran altos niveles de fluoruro, que se cree que se deben a la alta absorción de los iones en los sitios de desmineralización. Se ha investigado y se sigue investigando mucho sobre los sistemas fluorescentes sensibles al fluoruro, tanto para aplicaciones industriales como médicas. Uno de dichos complejos es Zr(IV)-EDTA-oxina, que presenta una disminución de la fluorescencia tras la unión al fluoruro. También se ha informado de sensores de fluoruro que muestran un aumento en la fluorescencia en presencia de fluoruro. Dichos sensores incluyen compuestos de ácido borónico y derivados de tioureido-naftaleno. En la actualidad, los compuestos de ácido borónico son relativamente insensibles (nivel de detección de 50 a 70 mM), sin embargo, se cree que con las modificaciones apropiadas, se podría mejorar la selectividad del fluoruro hasta cualquier intervalo de concentraciones deseado. Los nuevos derivados de tioureido-naftaleno presentan un aumento 40 veces mayor de la fluorescencia en presencia de fluoruro, y tienen una selectividad muy alta por el fluoruro frente a otros halógenos. Como alternativa, (Tae-Hyun Kim y Timothy M. Swager (2003, *Chem. Int. Ed. Angewandte* 42, 4803-4806) se describe un sistema en el que la escisión de un enlace Si-O por el fluoruro conduce a la formación de una molécula de cumarina altamente fluorescente.
- La detección del potasio se puede realizar con un colorante fluorescente tal como SBIF, que es sensible tanto al potasio como al sodio (excitación a 340-380 nm, emisión a 510 nm). El potasio está vinculado a la hipersensibilidad dental y, posiblemente, a las caries. Como alternativa, una fotoproteína, derivada del calamar okinawan (*Symplectoteuthis oualaniensis*), es sensible al potasio, y se puede usar (US2004191884).
- Cuando la composición incluye una proteína o un complejo proteico, puede producir una señal óptica al unirse con los iones libres. Dicha proteína o dicho complejo proteico se pueden modificar, por ejemplo, mediante la alteración de la secuencia de ADN del gen, por acetilación, etoxicarbonilación, modificación con fluorescamina o marcaje con fluoresceína, o mediante la creación de proteínas quiméricas tal como GFP-ecuatorina (US2003175807) para aumentar la señal, prolongar la duración de la señal o alterar su espectro de emisión. También se pueden usar proteínas y los complejos proteicos con función similar, tales como los sometidos a un cambio de configuración al unirse a un ión o materia orgánica, conduciendo a una señal óptica.
- Son ejemplos de dichas proteínas o complejos de proteínas las fotoproteínas. Las fotoproteínas son complejos de enzima-sustrato estables que consisten en una o varias cadenas polipeptídicas y un sustrato preactivado con oxígeno, tal como 2-hidroperoxicoelenterazina, que se une fuertemente pero no covalentemente con la proteína. La bioluminiscencia se puede generar, por ejemplo, por Ca^{2+} , y se produce como consecuencia de la descarboxilación del sustrato unido a la proteína. Otra fotoproteína que se puede usar de acuerdo con la invención es la halistaurina. La halistaurina se puede usar para detectar el estroncio, que se piensa que reemplaza una pequeña fracción de calcio en el cristal de hidroxiapatita durante la mineralización. La deficiencia de estroncio está vinculada a las caries dentales ("strontium and dental caries". *Nutr Rev* 1983; 41:342-344). La detección del estroncio se puede realizar con un fotoproteína tal como la halistaurina. Se han publicado amplios intervalos de valores de estroncio en los dientes (por ejemplo, 66-564 ppm) en las diferentes zonas de Estados Unidos.
- Otro ejemplo de fotoproteína es la ecuorina, que se produce de manera natural en la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria* o se puede expresar de forma recombinante. La ecuorina es una proteína capaz de almacenar una gran cantidad de energía, que se libera en presencia de calcio. La apoecuorina interactúa con su sustrato, la coelenterazina, para formar un complejo relativamente estable, que es activado por el calcio. La unión de dos iones de calcio a la ecuorina provoca cambios de configuración en la proteína, generando la apertura de la proteína y la descomposición del peróxido de coelenterazina en coelenteramida y CO_2 , acompañada de la emisión de una señal óptica o de luz. En Shimomura *et al.*, (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 75, 2611-2615; Head *et al.*, (2000) *Nature* 405, 372-376; y Shimomura (2005) *Journal of Microscopy* 217, 3-15, se puede encontrar una descripción adicional de la ecuorina.
- Otros ejemplos de fotoproteínas incluyen obelina, clitina, mitrocomina, halistaurina, fialidina, mnemiopsina, simplectina, gr-bolinopsina y berovina. Dichas fotoproteínas muestran una alta homología secuencial y contienen tres sitios de unión al calcio "de mano EF". En Prasher *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126 (1985); Inouye *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82 (1985), pág. 3154-3158; Prasher *et al.*, *Biochemistry* 26 (1987), pág. 1326-1332; Inouye *et al.*, *FEBS Lett.* 315 (1993), pág. 343-346; T. F. Fagan *et al.*, *FEBS Lett.* 333 (1993), pág. 301-305; Illarionov *et al.*, *Dokl. Akad. Nauk* 326 (1992), pág. 911-913; Illarionov *et al.*, *Gene* 153 (1995), pág. 273-274; Shimomura *et al.*, (1985), *Biochem J. Jun* 15; 228(3):745-9; Ward *et al.*, (1974) *Biochemistry*. Mar 26; 13(7):1500-10, se puede encontrar una descripción adicional de dichas fotoproteínas. En Markova *et al.*, *Biochemistry* 41 (2002), pág. 2227-2236; Charbonneau *et al.*, *Biochemistry* 24 (1985), pág. 6762-6771; Tsuji *et al.*, *Photochem. Photobiol.* 62 (1995), pág. 657-661, se puede encontrar una descripción más detallada del modo de acción de dichas proteínas.
- La composición puede comprender un quelante de iones sintético, tal como un complejo de EDTA-indicador o un macrociclo tal como un complejo de éter corona e indicador. Hay muchos ejemplos de éstos, que se unen a los iones y forman complejos con los indicadores. Por ejemplo, la unión de un fluoróforo y receptores selectivos usando la transferencia de electrones fotoinducida para el calcio usando BAPTA como se ha descrito en el John F. Callan, A. Prasanna de Silvaa y Nathan D. McClenaghan (2004) *Chem. Commun.* 2048-2049. También la patente estadounidense US 5409835 describe compuestos heterocíclicos de sonda de unión al calcio fluorescentes para determinar la concentración de iones de calcio en las muestras.

La composición puede comprender un complejo que emite fluorescencia a una longitud de onda característica que indica la presencia de iones. Dichos complejos fluorescentes responden a iones mediante la alteración de la intensidad o el color de la luz. Dichos complejos pueden ser proteínas o complejos proteicos.

5 Los ejemplos preferidos de proteínas fluorescentes incluyen proteínas o indicadores Cameleon. Los Cameleon son una nueva clase de indicadores para las concentraciones de iones de calcio en las células vivas que funcionan a través de un cambio de configuración que genera la "transferencia de energía de resonancia de Förster" (FRET o "transferencia de energía de resonancia fluorescente") en presencia de iones de calcio. La Figura 1 muestra una representación esquemática de FRET en los indicadores Cameleon. Más específicamente, la FRET implica la transferencia no radiactiva de energía de excitación del fluoróforo donante y excitado a un fluoróforo aceptor en el estado fundamental por medio de interacciones dipolo-dipolo en un intervalo intermolecular largo (10-100 Å). Los indicadores Cameleon consisten de una proteína artificial modificada a partir de la proteína verde fluorescente (GFP). La estructura molecular de los Cameleon se modela como un producto de fusión entre dos proteínas fluorescentes (que tienen diferentes características de excitación y de emisión), la calmodulina (CaM) y el dominio de unión a la calmodulina de la miosina quinasa de cadena ligera (M13). La calmodulina es capaz de unirse a los iones calcio libres, y la cadena de M13 se puede unir a la calmodulina tras unirse a los iones de calcio. Los genes de estas cuatro proteínas se unen linealmente, y los genes de fusión se expresan en una variedad de células. Cuando la calmodulina se une al calcio libre, cambia de estructura, con lo que las dos proteínas fluorescentes se acercan más entre sí y se produce la FRET. Así pues, en lugar de la proteína fluorescente azul verdosa emisora de luz azul, esta luz se transfiere a la proteína fluorescente amarilla, lo que genera una fluorescencia de color amarillo. En Miyawaki *et al* (1997) *Nature* 388 (6645):882; Miyawaki *et al*, "Proceedings of the National Academy of Sciences" (EE.UU.) 96: 2135-2140 (1999), se puede encontrar una descripción adicional de los indicadores.

Un ejemplo adicional de proteína fluorescente es Pericam, que es una forma modificada de GFP. La interacción inducida por Ca^{2+} entre CaMy el péptido de unión M13 de Pericam conduce a cambios en las características de fluorescencia de (cp)YFP permutado circularmente según lo descrito en Nagai *et al*, *PNAS* 98 (6): 3197 (2001).

25 Un ejemplo adicional de enfoque fluorescente es la sonda Camgaroo, en la que la unión del calcio interacciona con la calmodulina provocando un cambio de configuración de la proteína y un aumento de la fluorescencia emitida por la proteína amarilla fluorescente, y provoca un aumento en la fluorescencia (como se analiza en Rüdiger Rudolf, Marco Mongillo, Rosario Rizzuto y Tullio Pozzan, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 579-586).

30 Otro ejemplo de enfoque fluorescente son las fotoproteínas fluorescentes quiméricas, por ejemplo, la GFP-ecuatorina (tal como aparece en el documento US2003175807), en la que la molécula fluorescente se une covalentemente con una fotoproteína, y hay una transferencia de energía mediante la transferencia de energía de resonancia quimioluminiscente (CRET).

35 Dichos ejemplos sirven para ilustrar el uso de complejos de proteína-indicador en la detección de iones. Las proteínas implicadas pueden ser cualquier número que se una o cambie de configuración al unirse con un determinado ión. Para el calcio, dichas proteínas podrían ser caseína, calsecuestrina, calexitina, cisteína proteasa de unión al calcio, calmodulina y otras proteínas de mano EF. Los indicadores pueden ser colorantes, o proteínas fluorescentes o luminiscentes.

40 La composición puede comprender un complejo que tenga incorporada una sonda molecular tal como una sonda Scorpion, sonda TaqMan, empalme de Holliday o sonda lineal. La fluorescencia o la luminiscencia se pueden producir al unirse el ión a la sonda. Los ejemplos preferidos de sondas moleculares son los empalmes de Holliday. Se trata de empalmes móviles formados entre cuatro hebras de ADN. Normalmente, se usan para la detección de secuencias específicas de ADN, sin embargo, se sabe que los iones metálicos desempeñan un papel importante en la determinación de la configuración del empalme mediante la unión a determinados sitios (Thorpe J. H., Gale B. C., Teixeira S. C. y Cardin C. J. (2003) *J Mol Biol.* 14 de marzo de 2003; 327(1):97-109). Por tanto, dichos empalmes se podrían usar para detectar la presencia de iones tales como sodio, calcio y estroncio.

45 Es posible usar una serie de procedimientos combinados. Por ejemplo, se pueden usar quelantes para secuestrar un ión, dejando otro para que se una a una fotoproteína. Así pues, la fotoproteína halistaurina se une tanto al calcio como al estroncio. El estroncio puede ser una buena medida de la enfermedad, y el calcio, que de otro modo enmascararía la cantidad de estroncio presente, podría ser secuestrado antes de añadir la fotoproteína al diente, dejando que la fotoproteína responda sola al estroncio. Los agentes secuestrantes de calcio podrían basarse en proteínas (calmodulina, calciclina) o basarse en compuestos químicos (BAPTA, EGTA). El BAPTA (ácido 1,2-bis(o-aminofenoxi)etano-*N,N,N',N'*-tetraacético) es un quelante específico del calcio, y los compuestos a base de BAPTA se encuentran entre los más populares para medir el Ca^{2+} intracelular libre.

55 Las fotoproteínas y las proteínas fluorescentes se pueden usar conjuntamente usando la transferencia de energía de resonancia bioluminiscente (BRET), en la que la señal óptica producida a partir de una fotoproteína se transfiere a una proteína fluorescente muy próxima y, a continuación, se mide la fluorescencia de la proteína fluorescente. De esta manera, se puede alterar el color de la señal o aumentarse la duración de la señal para mejorar la formación de imágenes. Uno de los problemas con la formación de imágenes con colorantes fluorescentes en los dientes es que, a menudo, hay situaciones donde no es práctico usar una fuente de luz de alta intensidad debido a la alta

autofluorescencia intrínseca de los dientes. Una posible ventaja de usar la BRET es que se puede usar para la excitación de una sonda fluorescente que se localiza en una superficie específica donde el calcio está presente.

5 La composición se puede usar para análisis en el interior de la boca, por ejemplo, para detectar la presencia de caries activas; y análisis fuera de la boca, tales como en un laboratorio para el estudio de caries inducidas artificialmente, el desarrollo de nuevos alimentos y formulaciones no dañinos para los dientes, y el estudio de la capacidad de erosión de los productos alimenticios. Los análisis fuera de la boca usando la composición también se pueden llevar a cabo usando un modelo dental tal como los modelos de hidroxiapatita o secciones de esmalte.

10 La composición puede ser usada, por ejemplo, por los dentistas e higienistas dentales para la detección precoz de la desmineralización activa, la determinación del mejor tratamiento, para el seguimiento de un problema o tratamiento con el tiempo, y la identificación de los individuos que puedan ser susceptibles a ciertos problemas dentales (por ejemplo, erosión o hipersensibilidad); por investigadores de laboratorio para el desarrollo de nuevos productos (por ejemplo, pastas de dientes, bebidas); o para el mercado de la atención domiciliar para la detección y la evaluación de la enfermedad dental activa (por ejemplo, en forma de un enjuague bucal o los comprimidos que se desvelan).

15 Actualmente, no se dispone de ningún procedimiento de una sola etapa para la detección de caries activas. Las caries activas tienden a producir iones libres debido a la continua desmineralización; las caries inactivas producirán pocos iones libres, si es que producen alguno, debido a la ausencia de desmineralización. La desmineralización se puede detectar mediante la medición de la producción de señal óptica tras la aplicación de indicadores sensibles a iones, pudiéndose comparar con las caries no activas donde hay poca o ninguna desmineralización.

20 Por lo tanto, los indicadores sensibles a iones pueden proporcionar una medida de una sola vez de la naturaleza activa de la caries, y eliminar la necesidad de realizar múltiples visitas al dentista. Los indicadores sensibles a iones también se pueden usar para determinar la susceptibilidad de un individuo a la enfermedad dental, por ejemplo, a la erosión dental. En este caso, se podría añadir una solución de erosión suave, por ejemplo, un ácido débil, a los dientes, y la respuesta de los dientes, medida por una señal emitida por la composición de detección indicaría el grado de desmineralización y la probabilidad de encontrar problemas de erosión en el futuro.

25 El procedimiento para la detección de la desmineralización activa de los dientes puede incluir opcionalmente las etapas de retirar saliva de la superficie del diente, y cuando sea apropiado, eliminar la placa (si está presente), exponiendo, a continuación, la superficie del diente en estudio a una composición como se ha descrito anteriormente y la detección de la señal óptica resultante.

30 El procedimiento puede comprender además la etapa de exponer el diente a una solución sensibilizante, tal como una solución azucarada o ácida, antes de la exposición a la composición de proteínas. Las soluciones sensibilizantes imitan los efectos de desmineralización con el fin de detectar la hipersensibilidad y la erosión, y se pueden usar para evaluar la magnitud de un determinado problema. Por ejemplo, se puede usar una solución de ácido para identificar las superficies de dentina (por ejemplo, de la erosión dental) o la exposición de la raíz (por ejemplo, retracción de encías). Esto se debe a que determinadas partes del diente responderán con mayor potencia a las soluciones ácidas que otras partes, pudiendo identificarse de este modo. Por ejemplo, debido a la menor extensión de la mineralización dentro de la dentina y del cemento, en comparación con el esmalte, la adición de una solución sensibilizante causará la liberación de más calcio de la dentina y del cemento que del esmalte. Tras la aplicación del indicador sensible a los iones, las regiones de dentina (correspondientes a las regiones de la erosión de la dentina o hipersensibilidad) serán más brillantes, es decir, tendrán una señal óptica más potente, que las regiones de esmalte, indicándose así la magnitud del problema. Esto puede mejorar la exactitud de los resultados.

40 Las soluciones sensibilizadoras también se pueden usar para evaluar la susceptibilidad de un individuo a padecer una determinada afección. Aquellos individuos más susceptibles a la erosión dental mostrarán más desmineralización y, por tanto, una mayor respuesta. La estructura y la composición del esmalte son menos importantes en la evaluación de la susceptibilidad a la erosión dental que la saliva. La composición, el volumen y el flujo de la saliva desempeñan un papel importante en la determinación de la susceptibilidad de la erosión de un individuo. La tecnología de la invención puede ser capaz de determinar la resistencia del esmalte dental al ataque de los ácidos, incluyendo la protección otorgada por la saliva de cada persona (en particular, la película salival). Dicho ensayo cuantitativo puede ser beneficioso para los dentistas e higienistas dentales, para determinar la susceptibilidad del paciente y para vigilar el tratamiento, y para los creadores de pastas de dientes y los científicos de la alimentación que deseen entender qué efecto tienen los cambios en las formulaciones en el nivel de desmineralización. Además, este ensayo será útil en el fomento de nuevos recubrimientos de prevención de la erosión. Por lo tanto, una versión alternativa del ensayo de la desmineralización debida a la erosión puede implicar la espera de un período de tiempo, por ejemplo, de menos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 segundos después de la exposición a la solución de erosión, de manera que la saliva se pueda acumular en la boca y, a continuación, analizar el grado de desmineralización con la composición de detección. El período de tiempo se podría extender si fuera necesario hasta 1, 2 o 5 minutos para que la saliva se volviera a acumular.

La señal óptica resultante se puede detectar usando un espectrofotómetro, un dispositivo de carga acoplada (CCD), un semiconductor de óxido de metal complementario (CMOS), una cámara digital, una cámara intensificada, una película fotográfica, un dispositivo de fibra óptica, un detector fotométrico, un sistema micro-electromecánico fotomultiplicador (MEMS) o a simple vista. Para las pruebas de laboratorio, por ejemplo, en el desarrollo de bebidas no dañinas para los dientes, el procedimiento puede usar una cámara, un luminómetro o un fluorómetro para la automatización y el alto rendimiento de las muestras.

Se puede usar un programa informático para analizar la intensidad de la luz, la ubicación de la luz y la duración de la luz producida. Se puede usar para mejorar la señal y proporcionar una superposición "superpuesta" sobre una imagen de los dientes con el fin de permitir a los dentistas dirigirse con precisión a determinadas zonas y ayudar en el control de los cambios producidos a lo largo del tiempo o después del tratamiento.

Por lo tanto, la presente invención también permite la evaluación del potencial de una mayor erosión, así como la hipersensibilidad de la dentina (a través de la desmineralización, provocando una mayor apertura de los túbulos dentinales expuestos), mediante la determinación de la cantidad de calcio libre. Así pues, el procedimiento permite la identificación de los pacientes que son más susceptibles a la erosión dental, así como de los dientes hipersensibles. Esto permitiría la adopción de medidas preventivas por las personas que sean propensas a la erosión, y también puede permitir ensayos basados en laboratorio para investigar nuevas pastas de dientes contra la hipersensibilidad, o para analizar productos alimenticios o bebidas en cuanto a sus propiedades de erosión dental.

Los siguientes experimentos se llevaron a cabo usando una técnica de luminiscencia basada en imágenes y la proteína ecurina sensible a los iones. Todo el trabajo se realizó usando dientes humanos extraídos. En la boca, se podría usar una variedad de procedimientos de aplicación. Por ejemplo, puede haber un dispositivo portador para la composición que se desvela. Este puede ser una boquilla tal como una charola dental. Una ventaja de usar un dispositivo portador es que mantiene la saliva lejos del diente y la composición que se desvela. La charola puede no ser personalizada, es decir, tener solo una forma y un tamaño aproximados de la boca del paciente, o ser personalizada, es decir, que se usa un diente del paciente como molde para hacer la charola. La charola podría actuar como superficie de contacto entre la composición que se desvela y el detector. Preferentemente, el dispositivo portador es ópticamente transparente. La composición que se desvela se puede añadir al dispositivo portador antes de ser colocado en la boca de un paciente o inyectarse en el dispositivo portador cuando está en la boca. Como alternativa, se puede usar una tira de la composición que se desvela. Esta sería similar a las tiras de blanqueamiento dental conocidas en la técnica anterior, que se aplican en la zona de interés. Las tiras de blanqueamiento convencionales comprenden una tira de plástico flexible recubierta con un gel de blanqueamiento dental de viscosidad moderada y relativamente poca pegajosidad en el lado de la tira que se encuentra enfrentado a los dientes del usuario. Como alternativa, la composición que se desvela se podría pulverizar en los dientes o aplicarse en un enjuague bucal.

Se preparó una solución de ecurina de la siguiente manera. Se expresó ecurina recombinante en *E. coli* usando la secuencia del gen originario de *Aequorea victoria*, formando un complejo con el sustrato de coelenterazina, y se liofilizó. La preparación madre seca contenía ecurina al aproximadamente 1 % p/p en manitol (Prolume™). Para preparar una solución de trabajo de ecurina para su aplicación en los dientes, se disolvió la preparación de ecurina madre seca a una concentración de 1 mg/ml p/v en agua purificada exenta de calcio. Como alternativa, se preparó 1 mg/ml p/v de ecurina en gel Akucell 3625 al 1 % con EDTA 1 mM. Cuando se añaden iones de calcio a esta solución o gel de ecurina, se emite un destello de luz azul.

Se colocaron las muestras en una caja oscura sobre una fase de altura ajustable y se registraron las imágenes usando un dispositivo de carga acoplada de poca luz o CCD (cámara CCD enfriada termoeléctricamente dotada de una macrolente Tamron™ Starlight Xpress HX-9™). En la mayoría de los casos, se usó un binning (separación en diferentes clases de tolerancia del color) de soporte físico de 2 x 2 píxeles para aumentar la sensibilidad de la detección y reducir los tiempos de exposición. Las imágenes se guardaron como archivos .TIF. Se capturaron imágenes a la luz del día con la puerta de la caja oscura abierta para permitir que la luz ambiental iluminara las muestras, y se capturaron usando una exposición de 10/100 segundos y binning de 2 x 2. Las imágenes oscuras se tomaron con la puerta de la caja oscura cerrada, y el uso de un tiempo de exposición de 1 o 2 minutos, con binning de 2 x 2 píxeles.

Se abrieron las imágenes de la escala de los grises (256 niveles) en Image J y (cuando fue necesario), se ajustó el contraste para aumentar la claridad de la imagen, antes de insertarla en el documento de Microsoft Word™. Para las imágenes producidas para los mismos experimentos se realizaron los mismos ajustes en cada imagen. Las imágenes resultantes se pueden usar para mapear la luminiscencia, correspondiente a la presencia de calcio en la muestra. Las regiones más oscuras (negras) indican las regiones de la luz más baja, y las regiones más claras (blancas) indican las regiones de luz creciente.

Experimento A: desmineralización de los dientes usando gel de ácido

Un procedimiento convencional usado en la industria para imitar la generación de caries activas en el laboratorio es la creación de regiones de desmineralización usando soluciones o gels de ácido (por ejemplo, la referencia Amaechi *et al.* *Arch Oral Biol* 1998; 43: 619-628). Los presentes inventores han llevado a cabo experimentos

similares con el fin de determinar si el material de la divulgación se puede usar para identificar las regiones de desmineralización.

5 Se preparó gel de carboximetilcelulosa (Akucell 1985 al 3 % p/v) a pH 4,7 o pH 6,4 (usando ácido láctico 0,1 M, neutralizado con hidróxido de potasio 5 M). Se seleccionó este intervalo de pH porque el esmalte se disuelve a un pH crítico de aproximadamente 5,4. Se crearon "ventanas" de aproximadamente 4 x 4 mm en las superficies lisas de los dientes premolares extraídos usando laca de uñas, Figura 2. Las ventanas eran de tamaño similar (ya que se sabe que el tamaño afecta al grado de pérdida de mineral). Se aplicó el gel (bien a pH 4,7 o a pH 6,4) en la ventana, y se incubó el diente en un entorno hidratado y a 37 °C durante 5, 10, 14 o 21 días. Se usaron 5 duplicados de los dientes en cada punto temporal y pH. Además, se incubaron 15 dientes durante 14 días en cada gel a pH 4,7, se evaluaron y, a continuación, se incubaron con gel bien a pH 4,7 o a pH 6,4 durante 5 días más antes de volver a evaluarlos. Esto permite determinar si la desmineralización se puede detener mediante la neutralización del gel.

15 Tras la incubación, se retiró el gel suavemente de la superficie del diente con un pañuelo de papel y se enjuagó la superficie con agua desionizada. Se fotografió el diente con una cámara Sony HX9 usando un binning de 2 x 2 y un tiempo de captura de imágenes de 10 ms en la luz. Se transfirieron 0,2 cm³ de 1 mg/cm³ de ecurina en gel Akucell 3625 al 1 % (gel de la divulgación) preparado con EDTA 1 mM al diente con una pipeta automática. De inmediato, se tomó una imagen de 1 minuto con un binning de 2 x 2 a oscuras.

Las imágenes del ejemplo se muestran en la Figura 3. Se modificó el contraste de las imágenes para mejorar la presentación y se aplicaron exactamente los mismos ajustes a todas las imágenes. Se usó Image J para determinar el brillo de la superficie del interior de las ventanas, Figuras 4 y 5.

20 Dichos resultados muestran claramente que los dientes incubados con gel a pH 4,7 mostraron niveles más altos de luz, es decir, liberación de calcio libre y desmineralización, que los incubados con gel a pH 6,4. Además, la producción de luz se redujo cuando los dientes se incubaron primero en gel de ácido y luego se transfirieron a gel neutro, en comparación con los dientes transferidos desde el gel de ácido al gel de ácido.

25 Dichos resultados proporcionan pruebas sólidas de que las fotoproteínas sensibles al calcio tales como la ecurina pueden detectar superficies de desmineralización. Significativamente, la desmineralización se podría detectar después de tan solo 5 días. Se trata de una técnica anterior a otras técnicas que se describen en la literatura publicada, proporcionando evidencias de que el presente procedimiento proporcionará datos para la desmineralización muy precoz.

Experimento B: Uso de materiales de la divulgación alternativos

30 Hay una serie de materiales que se pueden usar para identificar regiones de desmineralización mediante la determinación de la liberación de iones. El Ejemplo A usó la fotoproteína ecurina. También se pueden usar otros materiales.

35 La Figura 6 muestra cómo se puede usar también la obelina (una fotoproteína sensible al calcio). Se incubó un diente extraído en ácido cítrico al 1 % durante 2 minutos. Se sabe que el ácido causa la desmineralización del esmalte. Se retiró el diente, se enjuagó en agua desionizada y luego se ensayó. Se fotografió el diente con una cámara Sony HX9 usando un binning de 2 x 2 y un tiempo de captura de la imagen de 10 ms a la luz. Se transfirieron 0,2 cm³ bien de 1 mg/cm³ de ecurina o de 50 ug/ml de obelina en gel Akucell 3625 al 1 % (gel que se desvela) preparado con EDTA 1 mM al diente con una pipeta automática. Se tomó una imagen de 1 minuto con binning de 2 x 2 inmediatamente a oscuras. Para mejorar la presentación, se ajustó el contraste de la imagen usando ImageJ; se hizo el mismo ajuste en las dos imágenes. La Figura 6A muestra la luz generada a partir del gel de ecurina y la 6B, a partir de gel de obelina. Los resultados indican cómo se puede usar un número de diferentes indicadores para indicar la presencia de iones libres y de desmineralización.

Experimento C. Exposición de las raíces

45 Se sumergió un diente extraído en ecurina para analizar si todas las zonas del diente respondían de la misma manera a la solución de ecurina. Se cepilló ligeramente el diente con agua purificada exenta de calcio y se colocó en una placa de Petri de 3 cm de diámetro en una caja oscura. Se tomó una imagen a la luz del día con la cámara CCD.

50 Se aplicaron con una pipeta 5 ml de 1 mg/ml de solución de ecurina directamente sobre la superficie del diente. Se tomó una imagen de inmediato, usando una exposición de 2 minutos, con un binning de 2 x 2. A continuación, se "enmascaró" la raíz del mismo diente con látex líquido (CopyDex™) y se volvió a añadir solución de ecurina y se tomó la imagen como antes. Los resultados se muestran en las Figuras 7a y 7b.

55 Las Figuras 7A y 7B son imágenes de un diente tras la exposición a ecurina, y una raíz de diente enmascarado con Copydex™ antes de la exposición a la ecurina, respectivamente. En la Figura 7A, las zonas más claras (mayor luminiscencia) corresponden a la raíz, y en la Figura 7B, hay una ausencia de luz desde zona de la raíz que se ha enmascarado. La producción de luz es ligeramente diferente debido a la reorientación del diente después del enmascaramiento. La flecha indica la presencia de caries en la corona del diente, que se evidencia en forma de una

mancha blanca y es confirmada por un dentista.

- 5 Los resultados indican que la raíz del diente reacciona más potentemente a la ecurina de lo que lo hace la corona, lo que indica una cantidad mucho más elevada de calcio libre en la raíz. Se cree que esto se debe a la menor mineralización de los tejidos de la raíz (dentina y cemento) en comparación con el esmalte de la corona. Se puede usar un ensayo sensible al calcio, tal como el procedimiento descrito en el presente documento, usando ecurina, para identificar el tejido de la raíz expuesta, por ejemplo, como parte del estudio de los mecanismos de hipersensibilidad. Como alternativa, las raíces se pueden enmascarar, por ejemplo, con CopyDex™, antes de la adición de la ecurina permitiendo el examen de la corona sin la interferencia de la raíz.

Experimento D: Exposición de la dentina

- 10 Los geles o las soluciones de la divulgación que identifican la desmineralización debida a la liberación de iones también se pueden usar para detectar y evaluar la magnitud y la ubicación de la desmineralización que se produce como consecuencia de la erosión (e indirectamente, la hipersensibilidad).

15 Cuando se rompe un trocito de las corona de un diente, es decir, se pierde algo de esmalte, la dentina del diente puede quedar al descubierto. Del mismo modo, cuando los dientes son erosionados, por ejemplo, por ácido, la dentina queda al descubierto. En el presente experimento, se usó un diente roto para examinar si la dentina expuesta se podía identificar usando un ensayo de indicador sensible a iones. Se cepilló ligeramente un diente extraído con agua purificada exenta de calcio. En el procedimiento se rompió un trocito del esmalte, quedando al descubierto la dentina subyacente. Se "enmascaró" la raíz del diente con látex líquido (CopyDex™). Se colocó el diente en una placa de Petri de 3 cm situada en una caja oscura. Se tomó una imagen a la luz del día. Se aplicaron con una pipeta 4 ml de 1 mg/ml de solución de ecurina directamente sobre la superficie del diente. Se tomó una imagen de inmediato completamente a oscuras, usando una exposición de 2 minutos, con un binning de 2 x 2. Los resultados se muestran en las Figuras 8a y 8b.

25 La Figura 8a es una imagen tomada a la luz del día de un diente y la Figura 8b es una imagen de un diente después de la exposición a ecurina. La zona rodeada muestra la región de la rotura. La flecha indica la región de la raíz que no está completamente cubierta por CopyDex™.

Los resultados indican que se produce mucha cantidad de luz a partir de la ecurina en contacto con la zona recién rota del diente. Esto indica que la dentina expuesta reacciona con la ecurina para producir luz. Por lo tanto, se podría usar un ensayo con indicador sensible a iones, por ejemplo, uno que use ecurina, para identificar las regiones en las que la dentina queda al descubierto, por ejemplo, después de la erosión dental.

30 Experimento E: Identificación de cavidades

Un dentista experimentado identificó la presencia de una cavidad en un diente extraído. Se enmascaró la raíz del diente usando Copydex™. Se cepilló ligeramente el diente con agua purificada exenta de calcio y se colocó en una placa de Petri de 3 cm situada en una caja oscura. Se tomó una imagen a la luz del día con la cámara CCD.

35 Se aplicaron con una pipeta 5 ml de 1 mg/ml de solución de ecurina directamente sobre la superficie del diente. Se tomó una imagen de inmediato completamente a oscuras, usando una exposición de 2 minutos, con un binning de 2 x 2. Los resultados se muestran en las Figuras 9a a 9b, y 10a a 10b.

Las Figuras 9a a 9b son (a) una imagen de un diente deciduo (o "leche") a la luz, y (b) una imagen monocromática. Tras el procesamiento de la imagen, las regiones de poca luz aparecen en negro, indicando las regiones grises y blancas el aumento de la luz. La flecha indica la cavidad identificada por el dentista.

40 La Figuras 10a a 10b son una imagen de un diente permanente a la luz, y una imagen monocromática, respectivamente. Tras el procesamiento de la imagen, las regiones de poca luz aparecen en negro, indicando las regiones grises y blancas el aumento de la luz. La flecha indica la cavidad identificada por el dentista.

45 La composición de acuerdo con la presente invención responde a los iones libres mediante la emisión de luz, y la intensidad de la señal óptica es una medida de la cantidad de iones libres presentes. La duración de la luz emitida indica la naturaleza de los iones liberados, por ejemplo, un brillo más prolongado puede indicar una liberación continua de iones o de aquellos liberados de los tejidos más profundos. Las distintas partes del diente responden de manera diferente a la proteína sensible a iones, debido a la naturaleza química de los iones libres presentes. Por ejemplo, la dentina responde más que el esmalte debido a la cantidad de mineralización. Esto se puede usar para identificar las caries activas de los dientes, la erosión activa, la dentina expuesta tras el retroceso de las encías, etc.

50 La ubicación de la señal óptica indicará la localización del problema, por ejemplo, las caries activas. El tamaño de la superficie de luz indica la magnitud del problema, por ejemplo, la superficie de la caries activa. La duración del brillo puede indicar la magnitud del problema, por ejemplo, la magnitud del efecto de la provocación con ácido (es decir, la susceptibilidad individual de un diente/paciente a las caries o a la erosión) o el tipo de tejido afectado. Las caries activas se pueden distinguir de las caries inactivas por la intensidad, la duración o el color de la señal óptica producida. En las caries activas, la desmineralización es continua, de manera que hay más calcio presente y se

55

produce más señal. Una lesión totalmente inactiva solo producirá niveles de señal de “fondo”. Una lesión parcialmente activa mostrará las zonas de actividad e inactividad, es decir, las zonas con señal y las zonas sin señal.

5 Por lo tanto, las zonas de desmineralización se pueden detectar usando complejos sensibles a iones antes de la formación clínicamente visible de la lesión de caries, de manera que se pueda aplicar el tratamiento, por ejemplo, fluoruro, para evitar un mayor progreso del proceso de formación de la caries.

Experimento F: Identificación de caries I

10 Se pueden usar estudios de laboratorio para crear caries artificiales, usando soluciones ácidas. Preferentemente, para probar dicha metodología, se usan dientes extraídos de la boca y con caries. Estos tendrán caries generadas de manera natural, proporcionando una mejor imitación de los dientes en la boca.

Un dentista experimentado identificó la presencia de una caries en un diente extraído, tras identificar una región “blanca” bajo la luz brillante. Esto indica una zona de desmineralización, y es un procedimiento tradicional de identificación de caries.

15 Se enmascaró la raíz del diente usando CopyDex™. Se cepilló ligeramente el diente con agua purificada exenta de calcio y se colocó en una placa de Petri de 3 cm situada en una caja oscura. Se tomó una imagen a la luz del día con la cámara CCD. Se aplicaron con una pipeta 5 ml de 1 mg/ml de solución de ecurina directamente sobre la superficie del diente. Se tomó una imagen de inmediato completamente a oscuras, usando una exposición de 2 minutos, con un binning de 2 x 2.

20 Las Figuras 11a a 11b son una imagen de un diente a la luz del día y una imagen en la escala de los grises, respectivamente. Tras el procesamiento de la imagen, las regiones de poca luz aparecen en negro, indicando las regiones grises y blancas el aumento de la luz. La flecha indica la caries identificada por el dentista usando procedimientos tradicionales.

25 Como muestran las imágenes, la región “blanca” identificada por el dentista experimentado como una lesión de caries (activa cuando se extrajo el diente) se identifica como una zona más brillante en el ensayo con ecurina. Esto indica que el ensayo con ecurina puede reemplazar a los procedimientos “a primera vista” tradicionales.

Experimento G: Identificación de caries, evaluación de dientes recién extraídos

30 Se adquirieron dientes que habían sido extraídos por razones de ortodoncia u otros motivos inmediatamente después de su extracción. No había información disponible sobre el paciente, aunque el dentista predijo en algunos de los dientes caries activas debidas a la edad (era una clínica infantil) y el estado de los dientes. Inmediatamente después de la extracción, se enjuagaron los dientes con agua desionizada para eliminar parte de la sangre y materia biológica adheridas. Los dientes se ensayaron de inmediato con el gel de la divulgación.

35 Se determinó el efecto del cepillado de los dientes extraídos en agua desionizada mediante la comparación de la producción de luz de los dientes cepillados y sin cepillar con lesiones de cavidades; Figura 12. Se observó un efecto limitado, por lo que se cepilló el resto de los dientes, ya que los presentes inventores consideraron que dicha metodología era la que mejor imitaba las acciones de un paciente cuando va a acudir a la consulta de un dentista.

40 Un dentista evaluó los dientes en cuanto a las lesiones de caries y marcó con un lapicero qué lado del diente había que mirar. Se colocó dicho lado boca arriba en una placa de Petri y se tomó una imagen del diente con la cámara Sony HX9, usando un binning de 2 x 2 y un tiempo de captura de la imagen de 10 ms a la luz. Se transfirieron 0,2 cm³ de 1 mg/cm³ de ecurina en gel Akucell 3625 al 1 % (gel de la divulgación) preparado con EDTA 1 mM al diente con una pipeta automática. De inmediato, se tomó una imagen de 1 minuto con un binning 2 x 2 a oscuras.

Se usó Image J para modificar el contraste de las imágenes. Aunque las diferencias son fácilmente visibles sin modificación de la imagen, esto se llevó a cabo con el fin de presentar mejor los datos. Las regiones de menor luz aparecen en negro, indicando las regiones grises y blancas un aumento de la luz. Los resultados se muestran en la Figura 13-16.

45 A continuación, se hicieron tomas de rayos X de los dientes para determinar si las regiones de desmineralización activa identificadas en el ensayo de fotoproteína eran visibles mediante los procedimientos tradicionales. A pesar de que los rayos X se usan para controlar la progresión de las lesiones, las caries que se detectaron con el gel de la divulgación no fueron visibles por rayos X, Figura 17. Esto indica la inutilidad de dicha metodología para la identificación precoz de las lesiones de caries.

Experimento H: Evaluación de interferencias

50 Se examinaron las posibles interferencias producidas por otros productos, por ejemplo, por pastas de dientes, porque si se produjera luz en respuesta a los mismos, entonces, el presente ensayo podría ser problemático para su uso en la boca.

Saliva: se enjuagaron los dientes extraídos bien en agua desionizada o en saliva (agrupaciones de 8 individuos). Antes de la adición de la solución de la divulgación, se tomaron imágenes de los dientes con una cámara Sony HX9 usando un binning de 2 x 2 y un tiempo de captura de la imagen de 10 ms a la luz. A continuación, se añadieron 5 cm³ de 1 mg/ml de ecurina en agua desionizada (solución de la divulgación) y se tomaron imágenes durante 2 minutos, binning de 2 x 2 a oscuras. Los dientes se fotografiaron bien en saliva, retirados de la saliva o retirados y enjuagados en agua desionizada, Figura 18. Los resultados indican que la saliva contiene cantidades significativas de calcio. Sin embargo, dado el diente no está en volúmenes de saliva, no debería interferir con el análisis. Incluso en la boca, el volumen de saliva será mínimo y, por lo tanto, no se espera que la saliva sea un problema para el análisis.

10 Experimento H2 - Cálculo

Se extrajo un cálculo mediante el raspado de los dientes durante un tratamiento dental y se proporcionó en forma de escamas en suspensión en agua. Se evaluó tanto a nivel subgingival como supragingival. Las muestras se filtraron antes de su uso con un filtro de membrana Millipore y sujeción, al vacío, y se lavaron con agua desionizada. A continuación, se añadieron 5 cm³ de 1 mg/ml de ecurina en agua desionizada y se tomaron imágenes de las muestras durante 1 minuto, Figura 19a y 19b. Se ajustó el contraste usando ImageJ para mejorar la presentación, se aplicó el mismo ajuste a ambas muestras.

También se examinó el efecto del cálculo *in situ*. Se añadieron 5 cm³ de 1 mg/cm³ de ecurina en agua desionizada y se fotografiaron las muestras durante 2 minutos, binning de 2 x 2, Figura 20.

Experimento H3 – Relleno de resina

20 Se evaluó un diente con un relleno de resina. Se fotografió el diente con una cámara Sony HX9 usando binning de 2 x 2 y un tiempo de captura de la imagen de 10 ms a la luz. Se transfirieron 0,2 cm³ de 1 mg/cm³ de ecurina en gel Akucell 3625 al 1 % (gel de la divulgación) preparado con EDTA 1 mM al diente con una pipeta automática. De inmediato, se tomó una imagen de 1 minuto con un binning de 2 x 2 a oscuras, Figura 21.

25 Los resultados indican que se obtuvieron pequeñas cantidades de luz, pero es probable que sean demasiado bajas para interferir en el ensayo. En efecto, las regiones de menor luz sobre un diente pueden indicar la presencia de un cálculo.

Experimento H4 - Pasta de dientes

30 Se cepillaron los dientes con agua desionizada o pasta de dientes y agua desionizada antes de su evaluación con 2 cm³ de 1 mg/cm³ de ecurina en agua desionizada. No se observó más luz procedente de las superficies tratadas con la pasta de dientes en comparación con los controles, lo que indica que la pasta de dientes no debería interferir en el ensayo (datos no mostrados).

Experimento I: Erosión e hipersensibilidad dental

35 Los refrescos carbonatados contienen altos niveles de ácido y se sabe que provocan la erosión de los dientes, pudiendo agravar la hipersensibilidad de la dentina. Se incubó una serie de dientes extraídos en dichas bebidas y se usó ecurina para evaluar sus efectos. Esto se llevó a cabo con el fin de desarrollar un ensayo para la erosión dental (e indirectamente, la hipersensibilidad) o un procedimiento de identificación de individuos susceptibles.

40 Se cepillaron ligeramente los dientes extraídos con agua purificada exenta de calcio y un cepillo de dientes, y se colocaron en una placa de Petri de 3 cm en una caja oscura. Se tomó una imagen a la luz del día usando una cámara CCD. Se aplicaron con una pipeta 5 ml de 1 mg/ml de solución de ecurina directamente sobre la superficie del diente. Se tomó una imagen de inmediato totalmente a oscuras, usando una exposición de 2 minutos, con binning de 2 x 2 píxeles.

45 A continuación, se enjuagaron los dientes con agua purificada exenta de calcio antes de sumergirlos en Cola, Irm Bru™ o ácido cítrico al 1 % durante 10 minutos. Luego se enjuagaron los dientes con agua purificada exenta de calcio antes de añadir 5 ml de solución de ecurina, y se fotografiaron los dientes como se ha explicado anteriormente. También se evaluó el pH de las soluciones (con un peachímetro Hydrus 300™). Todos eran ácidos: Cola: pH 2,38; Irm Bru™ pH 2,82; ácido cítrico pH 2,17. Los resultados se muestran en las Figuras 22a a 22c, 23a a 23c y 24a a 24c.

50 Las Figuras 22a a 22c ilustran el efecto de una inmersión de 10 minutos en Cola. La Figura 22a es una imagen tomada a la luz del día de un diente sin ecurina añadida; la Figura 22b es una imagen de un diente en la oscuridad tras la adición de ecurina, sin ningún otro tratamiento; y la Figura 22c es una imagen de un diente en la oscuridad tras la adición de ecurina y después de una incubación de 10 minutos en Cola.

Las Figuras 23a a 23c ilustran el efecto de una inmersión de 10 minutos en Irm Bru™. La Figura 23a es una imagen tomada a la luz del día de un diente sin ecurina añadida; la Figura 23b es una imagen de un diente en la oscuridad tras la adición de ecurina, sin ningún otro tratamiento; y la Figura 23c es una imagen de un diente en la oscuridad

tras la adición de ecurina y después de una incubación de 10 minutos en Irm Bru™.

Las Figuras 24a a 24c ilustran el efecto de una inmersión de 10 minutos en ácido cítrico al 1 %. La Figura 24a es una imagen tomada a la luz del día de un diente sin ecurina añadida; la Figura 24b es una imagen de un diente en la oscuridad tras la adición de ecurina, sin ningún otro tratamiento; y la Figura 24c es una imagen de un diente en la oscuridad tras la adición de ecurina y después de una incubación de 10 minutos en ácido cítrico al 1 %.

Se sabe que el consumo de bebidas carbonatadas provoca la erosión de los dientes. Los resultados del presente documento muestran que, tras la incubación con bebidas carbonatadas azucaradas o solución de ácido, el calcio libre se libera de los dientes, pudiéndose detectar con ecurina. Esto fue más pronunciado en la raíz. Por lo tanto, se pueden usar proteínas sensibles a los iones tales como la ecurina para indicar las zonas de liberación del calcio e indicar, por tanto, las zonas de desmineralización y, a su vez, el daño dental tal como la erosión o la probabilidad de sufrir hipersensibilidad.

En los dientes hipersensibles, la dentina tiene más túbulos abiertos en su superficie (hasta 8 veces más) y el diámetro de los túbulos es mayor. Esto proporciona una mayor superficie disponible para la desmineralización, por ejemplo, por bebidas ácidas, y también conducirá a la liberación de más calcio tras la aplicación de dichos productos. Esto se observará como una región más brillante, como se ve en las Figuras 22 a 24.

Experimento J: Dientes atacados con ácido

Se usa gel de ataque dental para arrugar la superficie del diente de manera que, por ejemplo, se puedan fijar selladores de fisuras firmemente. El gel de ataque es una preparación de ácido que ataca hasta una profundidad limitada en una zona localizada.

Se cepillaron ligeramente los dientes extraídos con agua purificada exenta de calcio y un cepillo de dientes. Se aplicó una etiqueta pequeña (4 x 4 mm) en el diente, y se fijó en su sitio pintando encima de toda la zona de la etiqueta y la superficie circundante del diente con laca de uñas. A continuación, se dejó que se secase y se despegó la etiqueta, dejando una superficie expuesta de 4 x 4 mm rodeada de laca de uñas. Esta delimitaba la zona en la que se iba a aplicar el gel de ataque dental (Ultradent Products Inc). Se dejó el gel de ataque durante 5 minutos antes de retirarlo con un hisopo de algodón, y enjuagarlo con hisopos de algodón húmedo.

Se aplicaron con una pipeta 5 ml de 1 mg/ml de solución de ecurina directamente sobre la superficie del diente. Se tomó una imagen de inmediato completamente a oscuras, usando una exposición de 2 minutos, con binning de 2 x 2 píxeles. Se tomó una segunda imagen inmediatamente después, usando una exposición de 2 minutos. Los resultados se muestran en las Figuras 25a a 25c.

Las Figuras 25a a 25c son una imagen a la luz del día, sin ecurina añadida; una imagen monocromática tras la adición de ecurina, con la exposición de 2 minutos; y una imagen monocromática tras la adición de ecurina, con la exposición secuencial de 2 minutos. La flecha a la izquierda indica el esmalte de uñas, el asterisco indica la zona en la que se aplicó el gel de ataque.

Al añadir ecurina a un diente que había sido atacado con gel de ataque dental, se produjo un destello de luz brillante, visible a simple vista. La segunda exposición dio lugar a la emisión de menos luz que la primera exposición. Esto indica que el gel solo libera el calcio de una zona localizada, estando este inmediatamente disponible para la reacción con la ecurina, siendo por tanto el destello liberado, con poco calcio subsuperficial, para que la producción de luz sea prolongada.

Esto se diferencia del efecto observado con el ácido cítrico, donde la producción de luz continuó durante algún tiempo. Como se muestra en las Figuras 26a a 26d, se llevó a cabo el procedimiento descrito en el Experimento E con una segunda imagen, exposición de 5 min y adquirida 15 minutos después de haberse añadido la ecurina. Parece que el ácido cítrico causa una desmineralización más extendida.

Las Figuras 26a a 26d ilustran el efecto de una inmersión de 10 minutos en ácido cítrico al 1 %. La Figura 26a es una imagen tomada a la luz del día, sin ecurina añadida; la Figura 26b es una imagen de un diente tomada a oscuras tras la adición de ecurina, sin ningún tratamiento adicional; la Figura 26c es una imagen de un diente tomada a oscuras tras la adición de ecurina y tras una incubación de 10 minutos en ácido cítrico al 1 %, y exposición de 2 minutos, tomada inmediatamente después de la adición de ecurina; la Figura 26d es una imagen de un diente tomada a oscuras tras la adición de ecurina y tras una incubación de 10 minutos en ácido cítrico al 1 %, y exposición de 5 minutos, tomada 15 minutos después de la adición de ecurina.

Experimento K: Evaluación de la susceptibilidad de un paciente a la erosión

Cada persona tiene una susceptibilidad diferente a la erosión y a la hipersensibilidad. Esto se sabe que se debe, en gran parte, a tratamientos tales como la fluorosis y al posicionamiento de los dientes, aunque, en general, se considera que el factor más importante que influye en la prevención de la erosión dental es la saliva (caudal, composición, y capacidad de tamponamiento y remineralización).

La composición de la divulgación se puede usar para identificar el nivel de desmineralización provocado por la erosión de los ácidos en los pacientes, enjuagando primero los dientes en una solución ácida. Esto aportará información sobre la susceptibilidad del propio diente a la erosión. Además, mediante la reevaluación de la producción de luz tras la adición de saliva a los dientes, se puede determinar el papel de la saliva de un determinado paciente. Los ensayos se pueden realizar en dientes extraídos o en la boca.

Para evaluar la desmineralización, se fotografió el diente con una cámara Sony HX9 usando un binning de 2 x 2 y un tiempo de captura de la imagen de 10 ms a la luz. Se transfirieron 0,2 cm³ de 1 mg/cm³ de ecurina en gel Akucell 3625 al 1 % (gel de la divulgación) preparado con EDTA 1 mM al diente con una pipeta automática. Se tomó una imagen de 1 min con binning de 2 x 2 inmediatamente a oscuras. Se usó ImageJ para determinar el brillo de las zonas de la corona y de la raíz. Se incluyó Glowell™ (azul G2, formato de 96 pocillos) para garantizar la uniformidad del equipo de medición de la luz. Es importante señalar que la ecurina no es sensible al pH y que la producción de luz es similar a lo largo de un amplio intervalo de pH. Se evaluaron los dientes extraídos como se ha explicado anteriormente (por triplicado). Se incubaron los dientes en ácido cítrico al 1 % durante 2 minutos, se retiraron, se enjuagaron en agua desionizada, se evaluaron, luego se incubaron bien en agua desionizada o en saliva durante 30 s y, a continuación, se volvieron a evaluar.

Las Figuras 27a y 27b muestran cómo la saliva tiene un mayor efecto protector sobre el esmalte tratado con ácido que el agua desionizada, generando una mayor reducción de la producción de luz. Se observó una menor diferencia en la superficie de la raíz. Junto con el Experimento L, que proporciona pruebas de la naturaleza cuantitativa del ensayo, esto sugiere que un ensayo similar, mediante el cual los dientes de un paciente se enjuagan con solución de ácido, se evalúa la producción de luz con una solución de desmineralización de la divulgación y se determina el efecto de la protección de la saliva volviendo a realizar la evaluación tras el contacto con la saliva, proporcionará un procedimiento para determinar la susceptibilidad de un paciente a la erosión. Esto ayudará en el diagnóstico clínico y en la decisión del tratamiento apropiado, y proporcionará pruebas de cómo afecta el estilo de vida a los dientes del paciente.

Experimento L: Evaluación de la capacidad de erosión de los productos alimenticios

Se conocen diferentes productos alimenticios que causan diferentes niveles de erosión (por ejemplo, Hemingway *et al.*, *British Dental Journal* (2006); 201, 439). Esto es debido, en parte, al pH del producto alimenticio y, en parte, a la concentración de calcio. Por ejemplo, las bebidas gaseosas contienen altos niveles de ácido, y se sabe que provocan la erosión dental y pueden agravar la hipersensibilidad de la dentina.

La solución y el procedimiento de ensayo de la divulgación se pueden usar para desarrollar un ensayo para la erosión dental (e indirectamente, la hipersensibilidad). Este se puede usar para identificar el grado de desmineralización causado por los productos alimenticios, proporcionando así un factor de riesgo de los alimentos. Se puede usar para determinar la eficacia de productos clínicos y de consumo tales como pastas de dientes, enjuagues bucales, selladores y agentes de blanqueamiento. También se puede usar en el desarrollo y la identificación de los productos alimenticios que causan una menor desmineralización y son, por lo tanto, menos dañinos para los dientes.

En los dientes hipersensibles, la dentina tiene más túbulos abiertos en su superficie (hasta 8 veces más) y el diámetro de los túbulos es mayor. Esto proporciona una mayor superficie disponible para la desmineralización, por ejemplo, por bebidas ácidas, y también conducirá a la liberación de más calcio tras la aplicación de dichos productos. Esto se observará como una región más brillante.

Se trazaron líneas a través de dientes deciduos extraídos con esmalte de uñas para delimitar las superficies de la corona y de la raíz. Se incubaron los dientes extraídos en soluciones a diferente pH. Estas eran bien diversas diluciones de ácido cítrico, bicarbonato de sodio, solución salina tamponada con fosfato o agua desionizada. También se evaluó el pH de las soluciones (con un peachímetro Hydrus 300™). Se realizaron incubaciones durante 2 minutos, y tras la incubación se retiraron los dientes, se enjuagaron en agua desionizada y luego se ensayaron. Se fotografió el diente con una cámara Sony HX9 usando binning de 2 x 2 y un tiempo de captura de la imagen de 10 μs a la luz. Se transfirieron 0,2 cm³ de 1 mg/cm³ de ecurina en gel Akucell 3625 al 1 % (gel de la divulgación) preparado con EDTA 1 mM al diente con una pipeta automática. Se tomó una imagen de 1 min con binning de 2 x 2 inmediatamente a oscuras. Se usó ImageJ para determinar el brillo de las zonas de la corona y de la raíz. Se incluyó Glowell™ (azul G2, formato de 96 pocillos) para garantizar la uniformidad del equipo de medición de la luz. Los experimentos se realizaron por triplicado, y se muestran las medias.

La Figura 28 ilustra cómo las soluciones de diferente pH conducen a diferentes niveles de desmineralización, medida por el brillo, generando las soluciones de menor pH una mayor desmineralización (más brillo). Como se muestra, la raíz fue más susceptible que la corona, con una mayor desmineralización a pH 4, lo que coincide con la literatura disponible, que indica que esmalte se desmineraliza a un pH crítico de 5,5, mientras que el tejido de la raíz, que no está protegido por el esmalte, se desmineraliza a un pH crítico de 6,2. El presente experimento indica que el ensayo es cuantitativo y que se puede usar para evaluar la desmineralización producida como consecuencia de la erosión. Los geles o las soluciones de la divulgación, que identifican la desmineralización debida a la liberación de iones, se pueden usar para indicar el daño producido en los dientes, tal como la erosión o el aumento de la

probabilidad de padecer hipersensibilidad.

5 La Figura 29 ilustra cómo se puede determinar el efecto de los productos alimenticios en la desmineralización de los dientes usando la composición y el procedimiento de ensayo de la presente divulgación. El procedimiento de ensayo fue como se ha descrito. Los resultados indican que el pH del producto alimenticio tiene un gran efecto sobre los dientes. De nuevo, la superficie de la raíz parece ser más susceptible al pH. Los resultados no solo dependieron del pH de los alimentos, y parece que hay otros factores implicados. Por lo tanto, las bebidas de Coca-cola™ light y ribena really light™ producen menos luz de la que cabría esperar por su pH.

10 Los geles y las soluciones de la divulgación, que identifican la desmineralización debida a la liberación de iones cuando se usa en un ensayo como dicho ensayo, se pueden usar para determinar los factores de riesgo de diferentes productos alimenticios en los dientes o como una herramienta en el desarrollo de nuevos productos alimenticio, y productos clínicos y de consumo tales como pastas de dientes, enjuagues bucales, selladores, agentes de blanqueamiento. La adición de otras etapas tales como la incorporación de un lavado de saliva como se muestra en el Experimento G también puede ser útil para imitar las condiciones de la boca.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para su uso intraoral destinada a determinar las caries dentales activas y/o la desmineralización dental activa debida a la erosión, que comprende una proteína o un complejo proteico capaz de producir una señal óptica característica de la presencia de iones libres, en la que la proteína o el complejo proteico está seleccionado entre ecurina, obelina, clitina, mitrocomina, halistaurina, fialidina, mnemiopsina, simplectina, gr-bolinopsina, caseína, calsecuestrina, calexcitina, cisteína, proteasa de unión al calcio, calmodulina y otras proteínas de mano EF, berovina o mezclas de las mismas.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además un aditivo farmacéuticamente aceptable y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable.
3. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que la composición es una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable.
4. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que la composición comprende de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 10 mg/ml de complejo o una concentración que da una relación señal-ruido suficientemente elevada.
5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteína o el complejo proteico sufren un cambio de configuración al unirse a iones libres que conduce a la generación de una señal óptica.
6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteína o el complejo proteico comprende fusiones en tándem de una proteína fluorescente, calmodulina y un péptido de unión a la calmodulina (M13).
7. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el complejo emite fluorescencia a una longitud de onda característica que indica la presencia de iones, o la composición comprende un complejo secundario que emite fluorescencia a una longitud de onda característica que indica la presencia de iones libres además del complejo que produce una señal óptica al unirse a los iones libres.
8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteína o el complejo proteico es modificado para aumentar la señal o modificar su espectro de emisión.
9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la modificación 5 de la proteína o del complejo proteico se realiza mediante la alteración de la secuencia de ADN del gen, por acetilación, etoxicarbonilación, modificación con fluorescamina o marcaje con fluoresceína, o mediante la creación de proteínas quiméricas.
10. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteína o el complejo proteico comprende una proteína recombinante.
11. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que la composición es ópticamente transparente.
12. El uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones a 1 a 11 para la fabricación de un preparado para su uso en la detección de las caries dentales.
13. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 12 en la fabricación de un preparado para su uso en la diferenciación entre las caries dentales activas y las inactivas, o para la fabricación de un preparado para su uso en la detección de la desmineralización dental debida a la erosión o para la fabricación de un preparado para la detección de las zonas de desmineralización de la dentina relacionadas con la hipersensibilidad de la dentina.
14. Un kit para su uso en la detección de la desmineralización dental que comprende:
 - a) una composición que comprende un complejo sensible a los iones de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13;
 - b) medio de aplicación de la composición; y
 - c) un detector.
15. Un kit de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende además una solución sensibilizante ácida o azucarada.
16. Un kit de acuerdo con la reivindicación 14, que incluye además un marcador tal como una rejilla para marcar zonas de interés sobre un diente o un modelo dental.

FRET en indicadores de iones de calcio Cameleon

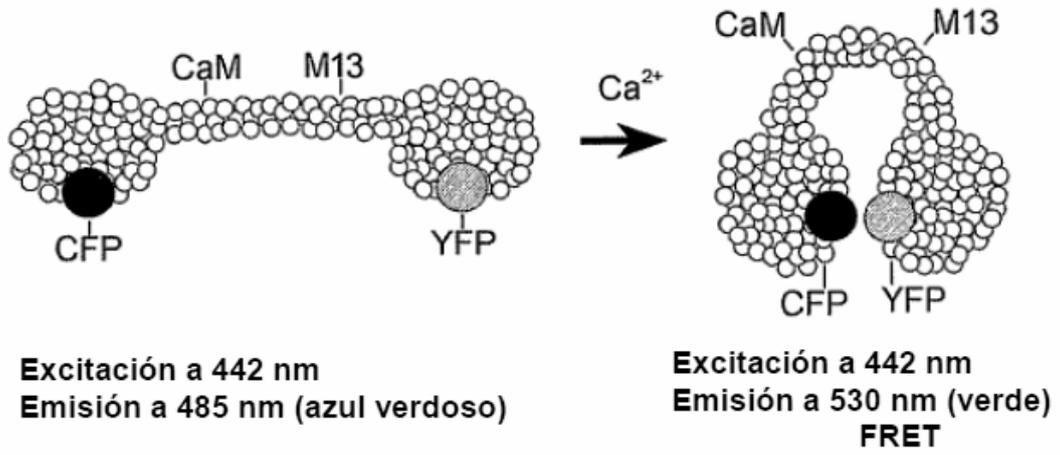


FIG. 1

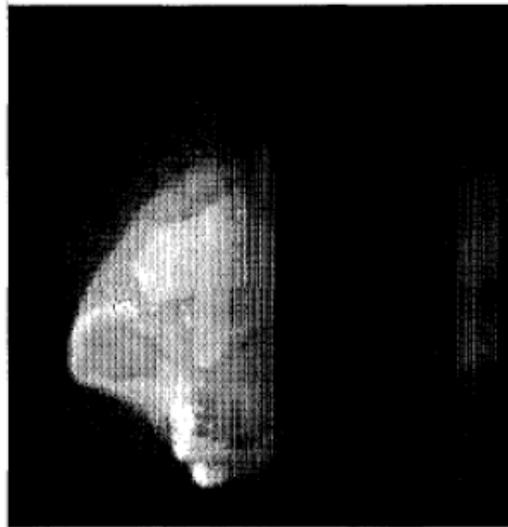


FIG. 2

La Figura 2 muestra una imagen de ejemplo de un diente con una "ventana" demarcada con esmalte de uñas y en la que se aplicó el gel. La imagen se ha tomado a la luz.

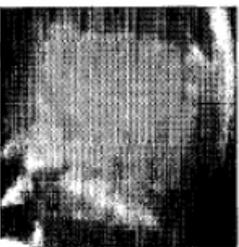
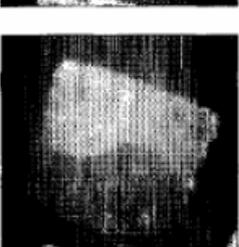
Imágenes de luz de la ventana tras la incubación en gel y la aplicación de ecurorina	Gel aplicado en el diente
	pH 4,7
	
	
	
	
	
	
	pH 6,1
	
	
	
	

FIG. 3

La Figura 3 representa imágenes que muestran la producción de luz desde la ventana, tras la incubación en gel (bien a pH 4,7 o pH 6,4), el enjuague y la adición del gel de la divulgación. Las superficies más brillantes indican regiones de más luz y corresponden a regiones en las que hay calcio libre.

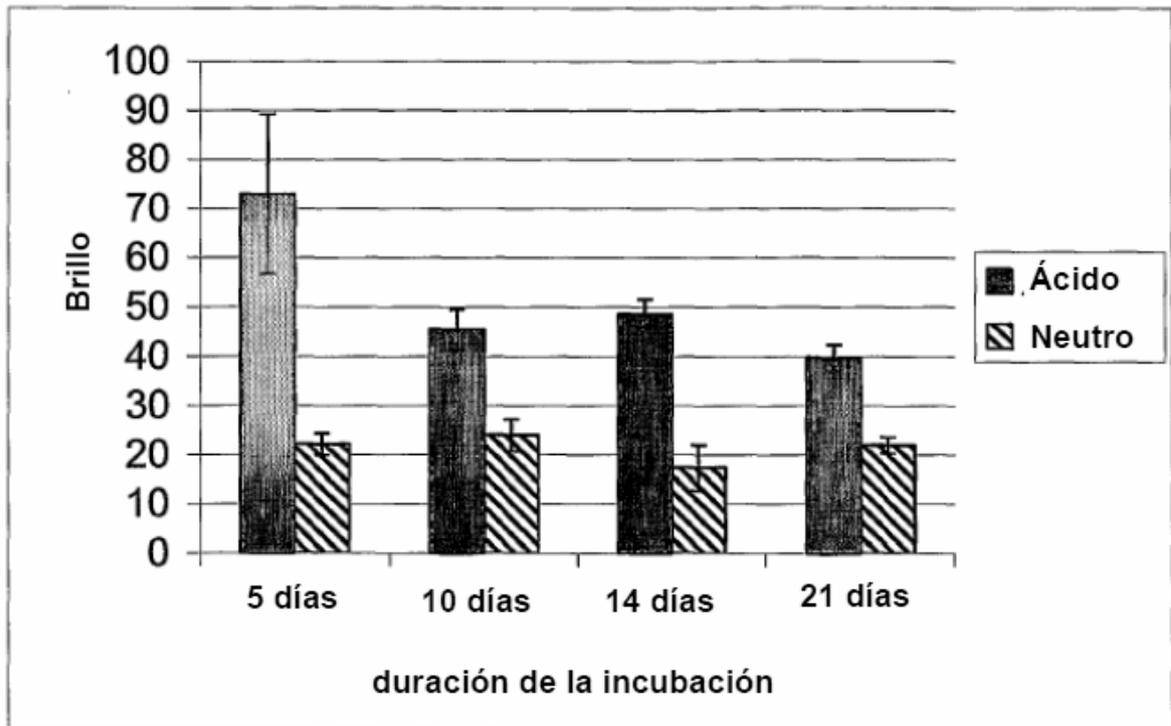


FIG. 4

La Figura 4 muestra un gráfico que representa la producción de luz desde los dientes tratados con gel ácido o neutro. pH del ácido = 4,67; pH del control = 6,4; el "brillo" se determinó usando la función de "perfil del gráfico" del programa ImageJ.

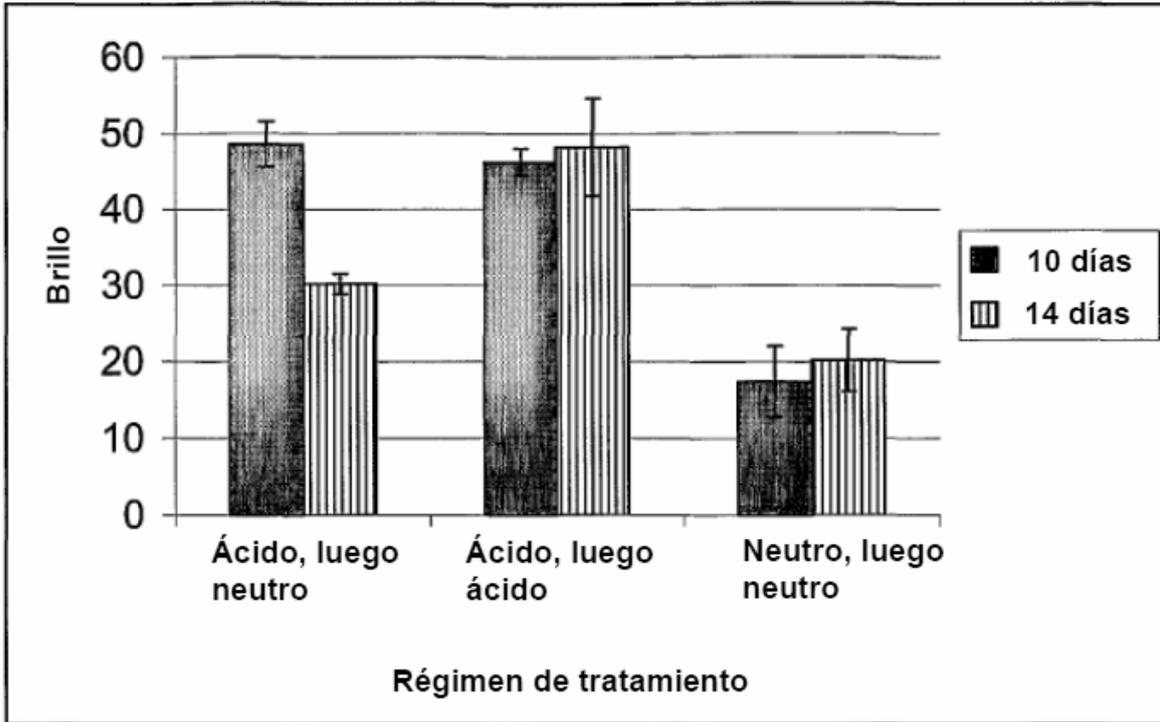


FIG. 5

La Figura 5 muestra un gráfico que representa la producción de luz desde los dientes tratados con gel ácido o neutro. Los dientes se incubaron primero en gel (ácido a pH 4,67 o neutro a pH 6,4) durante 14 días antes de evaluar el brillo, y los dientes se transfirieron a gel nuevo con pH 4,67 o pH 6,4. El "brillo" se determinó usando la función de "perfil del gráfico" del programa ImageJ.

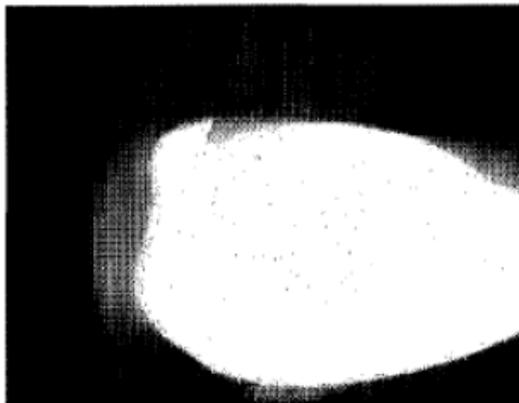


FIG. 6A

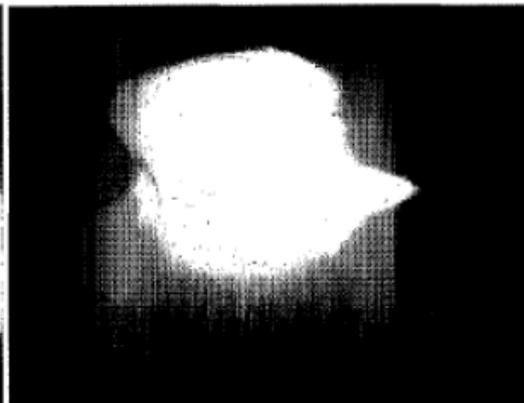


FIG. 6B

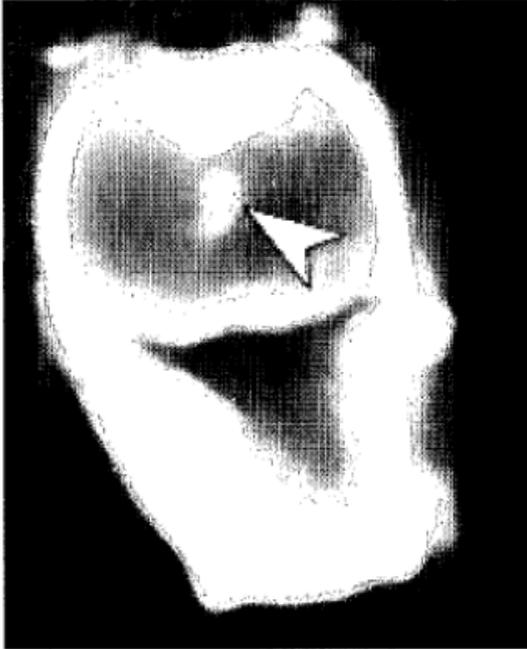


FIG. 7A



FIG. 7B

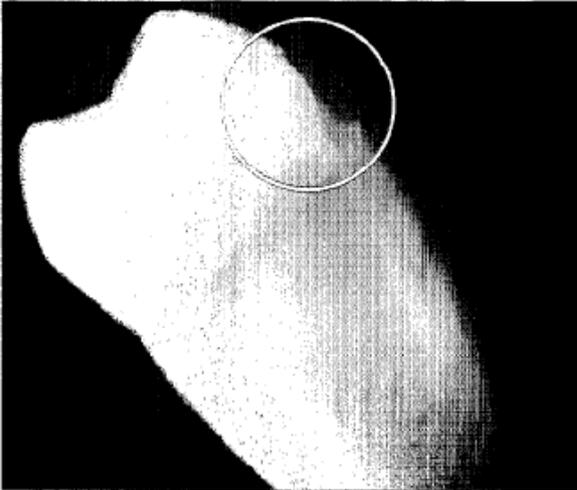


FIG. 8A

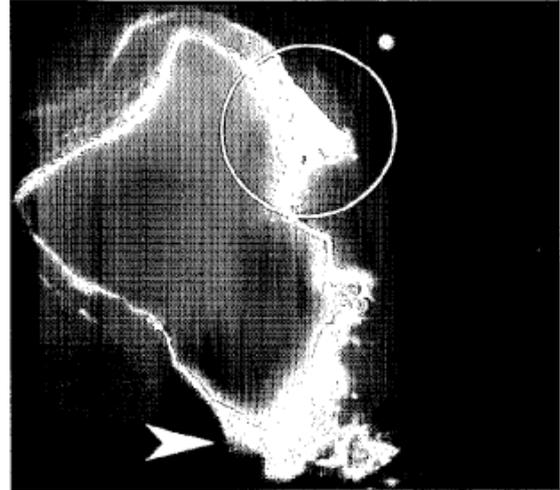


FIG. 8B

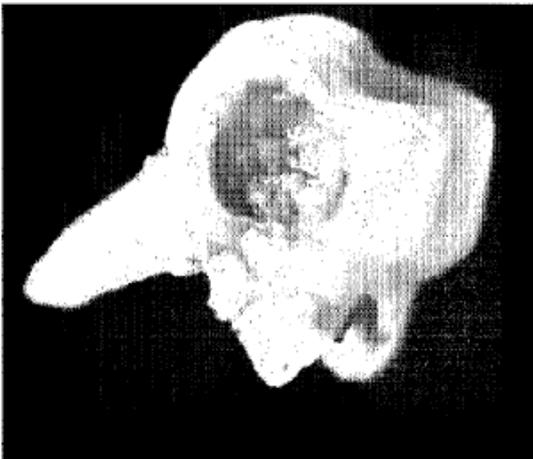


FIG. 9A

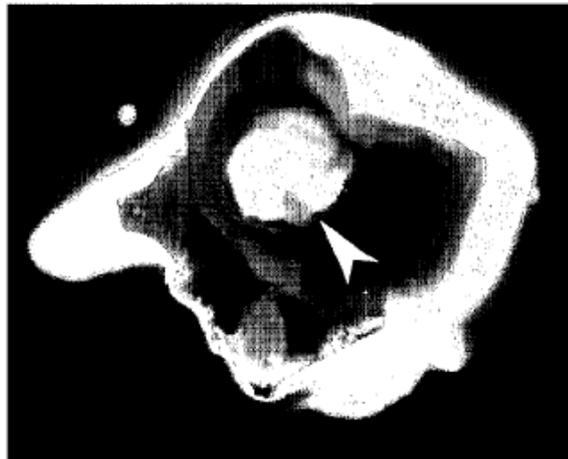


FIG. 9B



FIG. 10A

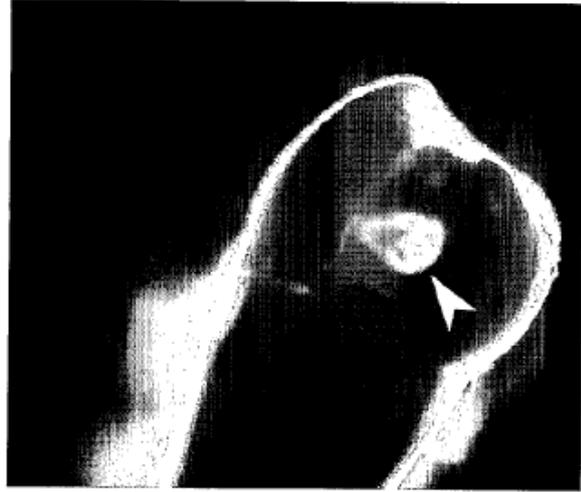


FIG. 10B

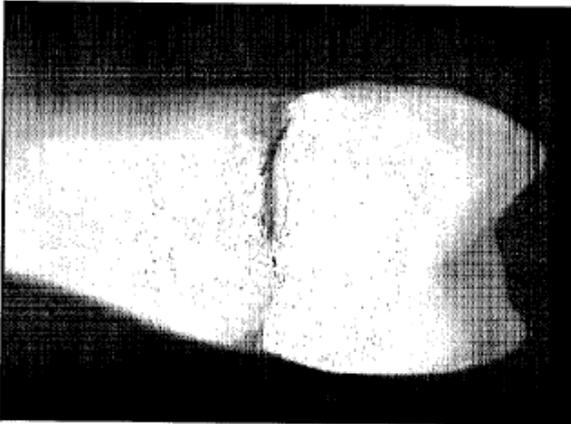


FIG. 11A

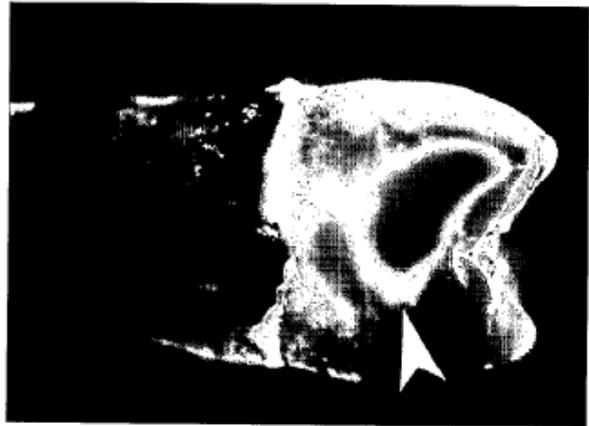


FIG. 11B

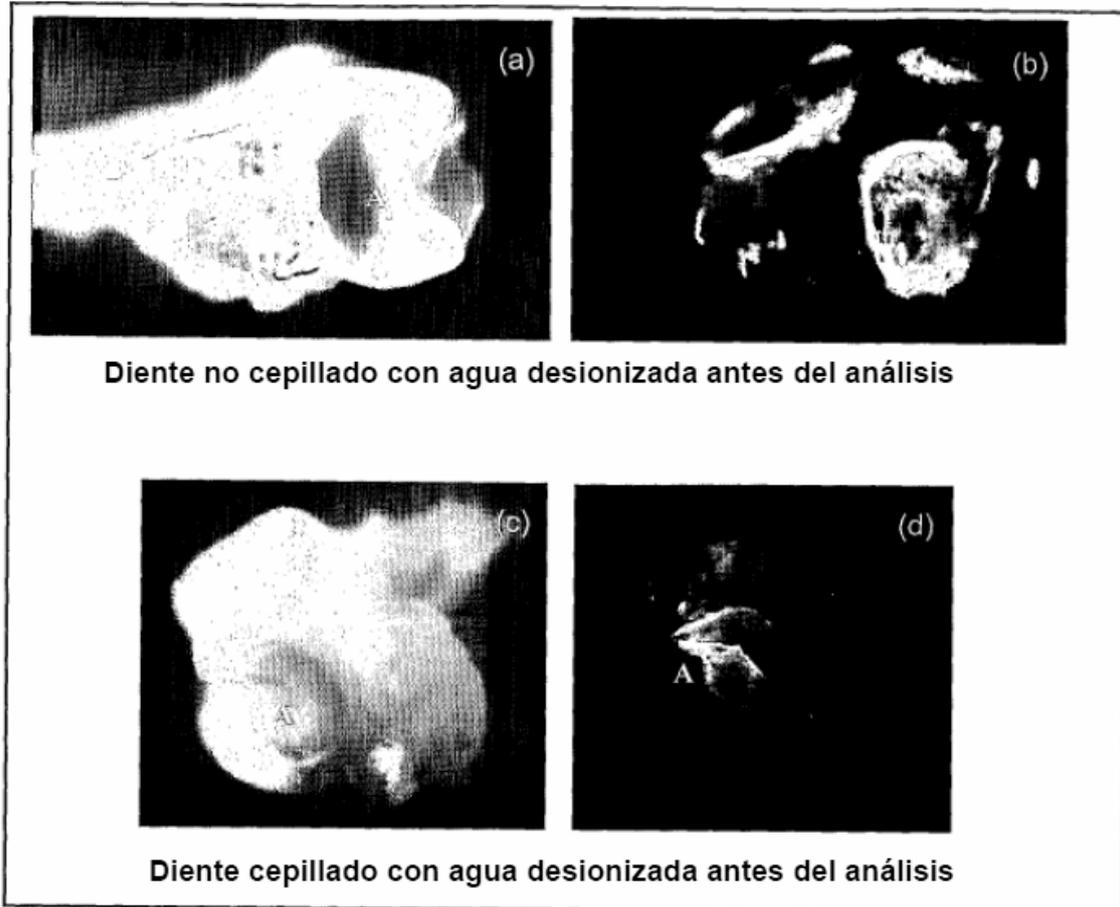


FIG. 12

La Figura 12 molares deciduos con lesiones de cavidad (A). (a y c) Imágenes de los dientes a la luz (b y d) imagen monocromática tras la aplicación del gel de la divulgación.

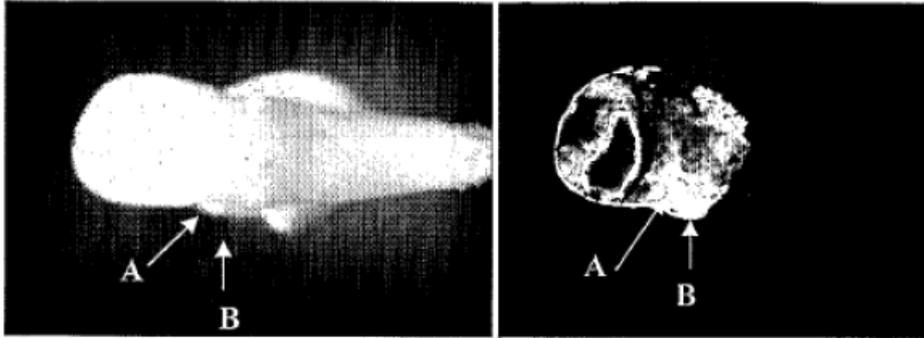


FIG. 13A

FIG. 13B

La Figura 13 muestra un incisivo (deciduo) con una gran lesión de caries (conocida como síndrome del biberón). (a) Imagen del diente a la luz; (b) imagen monocromática tras la aplicación del gel de la divulgación. La región esperada de actividad estaba alrededor del borde de la lesión, donde la desmineralización es probable. Esto fue corroborado por las regiones de mayor luz desde el borde de la lesión. También se observa un alto nivel de luz en la mancha A, donde el dentista provocó la interrupción de la superficie dental durante la extracción. También se observa cierto fondo procedente del material de montaje (B).

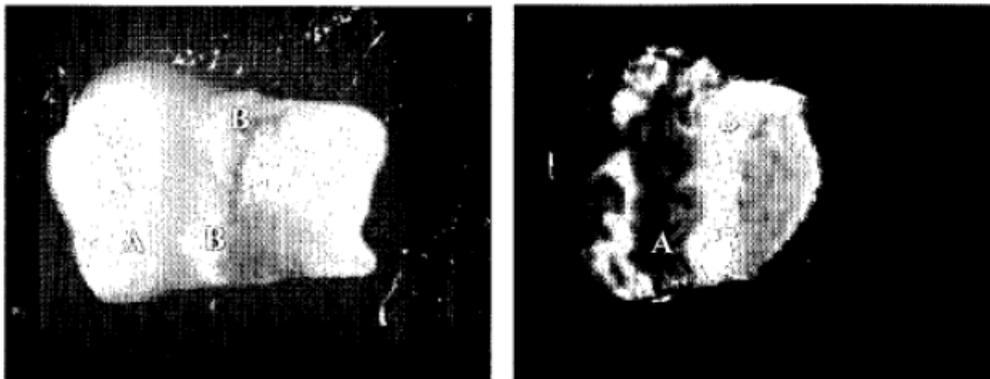


FIG. 14A

FIG. 14B

Figura 14. Imagen que muestra la superficie uniforme de un molar (deciduo). (a) Imagen del diente a la luz; (b) imagen monocromática tras la aplicación del gel de la divulgación. Se puede ver una lesión manchada de blanco (A) como tejido gingival residual (B). El ensayo muestra un patrón característico, similar al de la lesión manchada de blanco.

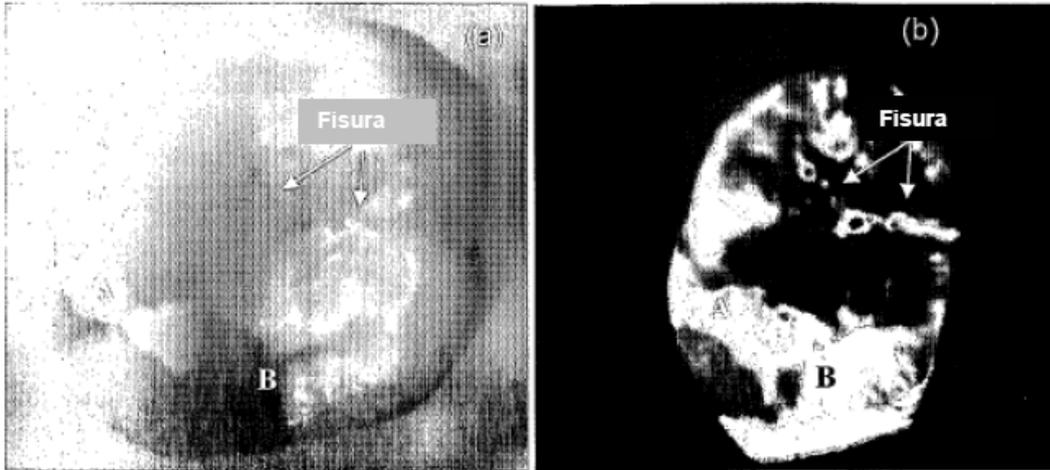


FIG. 15A

FIG. 15B

La Figura 15 muestra imágenes de la superficie oclusal de un molar (permanente). (a) Imagen del diente a la luz; (b) imagen monocromática tras la aplicación del gel de la divulgación. Se ve claramente un relleno de resina en la posición A. Antes de la adición del gel de la divulgación, el dentista predijo caries activas en la posición B y sugirió que también podía haber lesiones de caries activas en las fisuras del diente. El ensayo de la invención indica grandes cantidades de luz y, por tanto, desmineralización activa desde la posición B, así como luz capturada desde las fisuras. Cabe señalar las diferencias de tamaño de las imágenes 9a y 9b, que indican que el gel de la divulgación no cubrió toda la superficie oclusal.

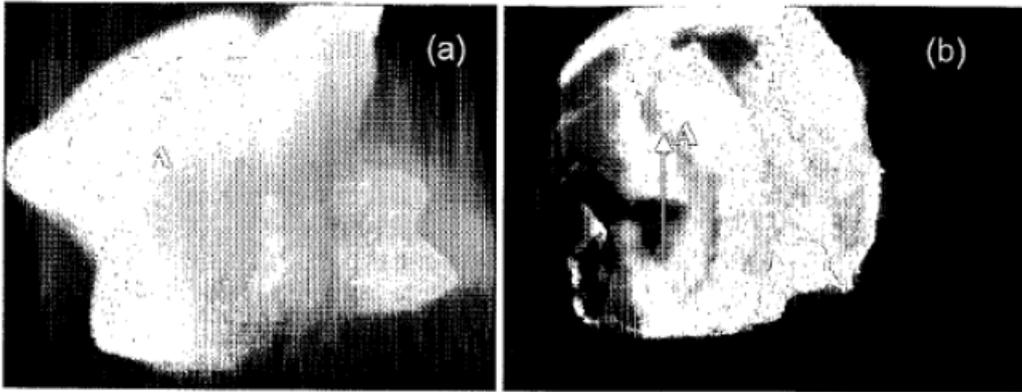


FIG. 16A

FIG. 16B

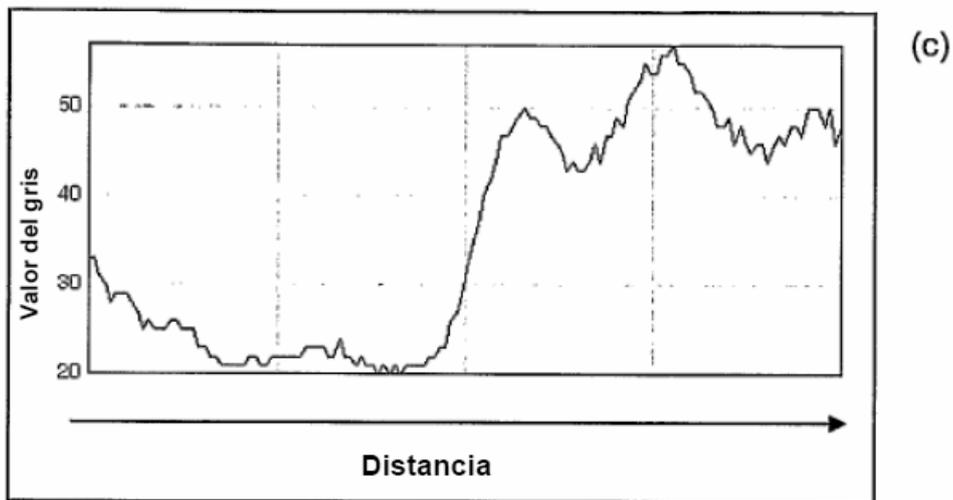


FIG. 16C

La Figura 16 muestra un molar (deciduo). (a) Imagen del diente a la luz; (b) imagen monocromática tras la aplicación del gel de la divulgación. (c) representación gráfica de la luz generada a través de la lesión (→). Se puede ver una lesión manchada de blanco (A). Antes de la adición del gel de la divulgación, el dentista predijo que la mancha blanca a través de la superficie, con remineralización en la región inferior. Los presentes inventores observaron un patrón característico desde la lesión facetada con una potente señal procedente de la superficie superior de la lesión manchada de blanco y menos luz procedente de la región remineralizada inferior del diente. Esto aporta pruebas de que el ensayo se puede usar para evaluar la actividad de una lesión de caries y que puede diferenciar entre lesiones activas e inactivas.



FIG. 17A

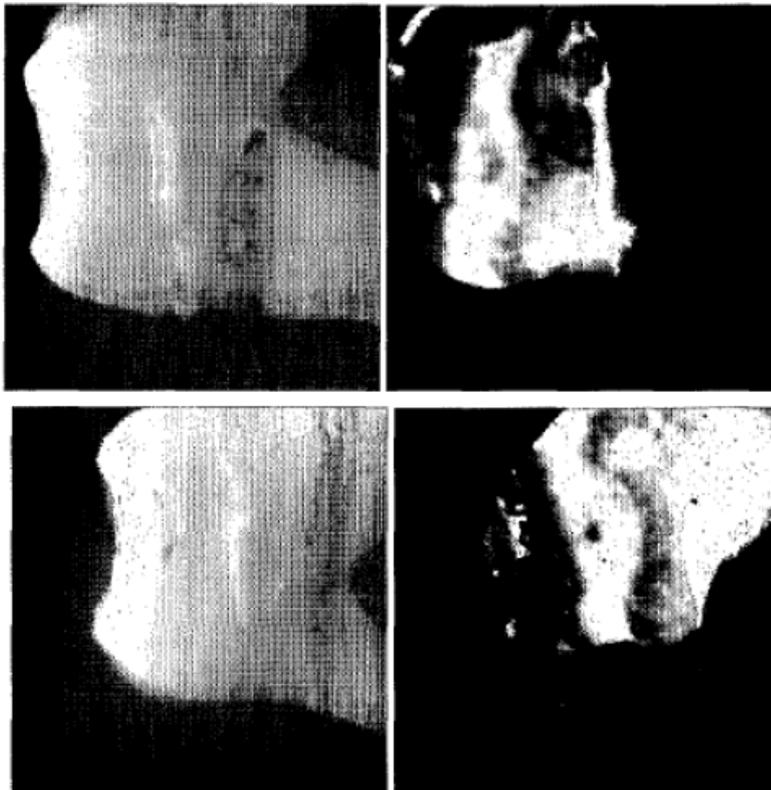


FIG. 17B

La Figura 17a muestra una radiografía de molares permanentes cuya superficie mesial también se examinó con el gel de la divulgación (17b). Las superficies mesiales de los dientes están a la izquierda de la radiografía. Es obvio que hay desmineralización, que se vería como una sombra oscura, en ninguno de los molares permanentes, aunque se observaron regiones de desmineralización activa usando el gel de la divulgación (17 b, las imágenes de la izquierda se tomaron a la luz y las imágenes monocromáticas de la derecha, tras la adición de la composición de la divulgación). Por lo tanto, la metodología es capaz de identificar una lesión activa mucho antes de lo que una radiografía es capaz de detectar la desmineralización en estas zonas.

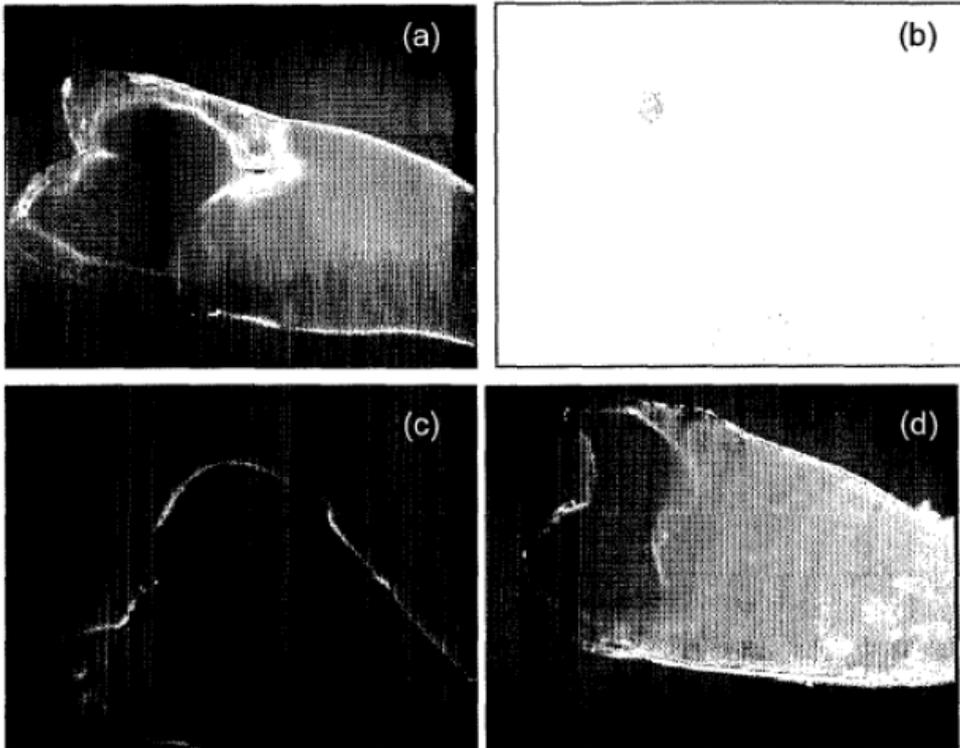


FIG. 18

La Figura 18 (a) muestra una imagen de un diente que ha sido enjuagado en agua desionizada y retirado de la misma antes de su evaluación; (b) muestra un diente que ha sido enjuagado y evaluado en saliva; (c) muestra un diente que ha sido enjuagado en saliva, pero que se ha retirado antes de su evaluación; (d) muestra un diente que ha sido incubado en saliva, retirado y enjuagado en agua desionizada antes de su evaluación.

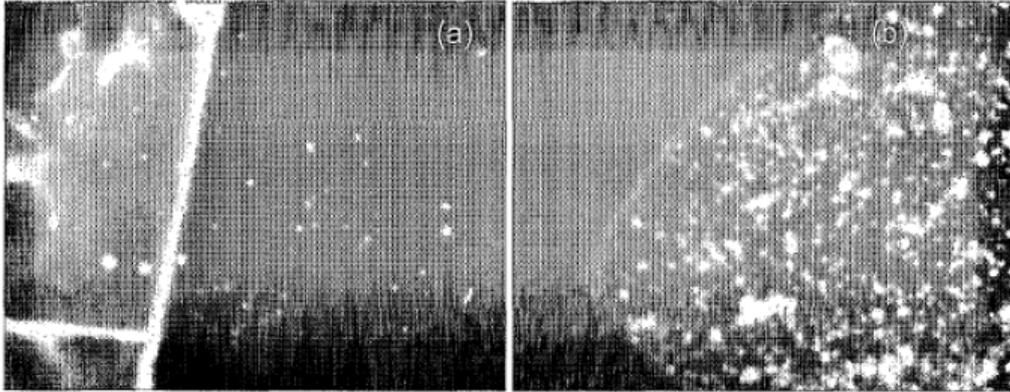


FIG. 19

La Figura 19 muestra (a) cálculo supragingival y (b) cálculo subgingival; y se fotografiaron tras la adición de la solución de la divulgación.

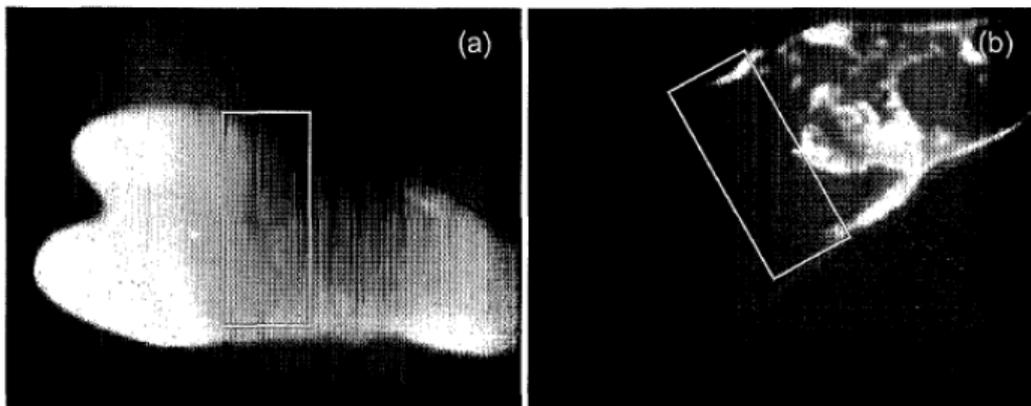


FIG. 20

La Figura 20 muestra (a) la imagen del diente a la luz; y (b) la imagen monocromática tras la aplicación del gel de la divulgación. El recuadro indica la superficie del cálculo.

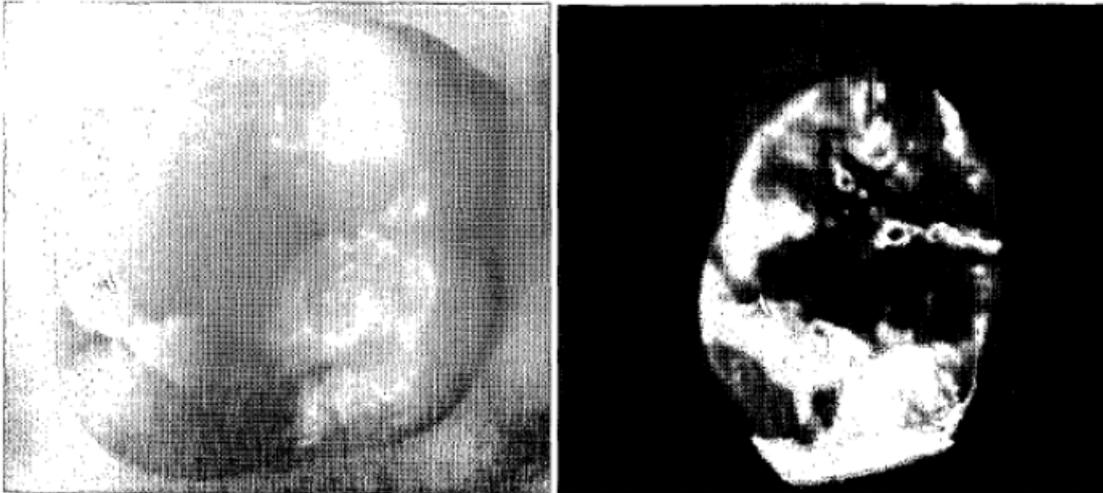


FIG. 21

Figura 21. Imágenes que muestran la superficie oclusal de un molar (permanente). (a) Imagen del diente a la luz; (b) imagen monocromática tras la aplicación del gel de la divulgación. Se hace evidente un relleno de resina en la posición A. Se emitieron cantidades limitadas de luz desde la resina (A), lo que sugiere que se espera que las interferencias desde rellenos de resina similares sean mínimas. Cabe destacar las diferencias de tamaño de las imágenes 21a y 21b, lo que indica que el gel de la divulgación no cubrió toda la superficie oclusal.



FIG. 22A



FIG. 22B

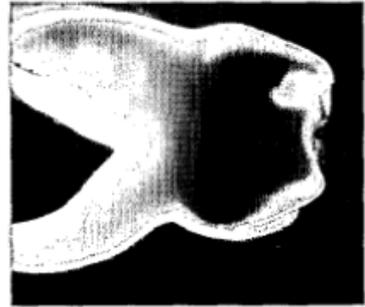


FIG. 22C

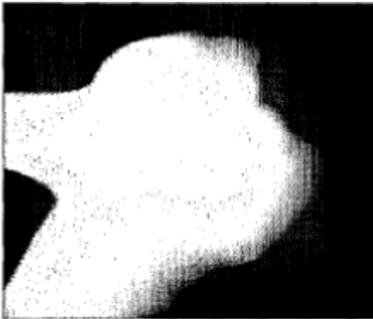


FIG. 23A

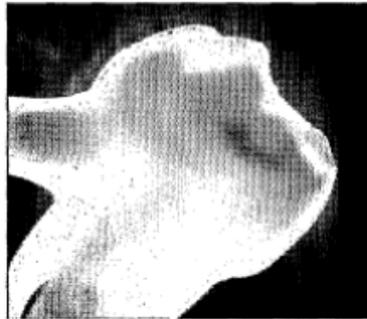


FIG. 23B

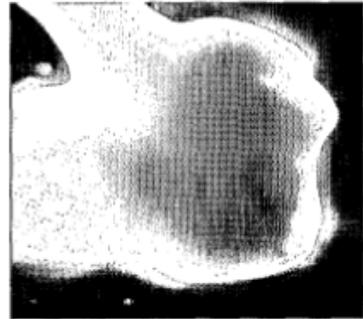


FIG. 23C



FIG. 24A

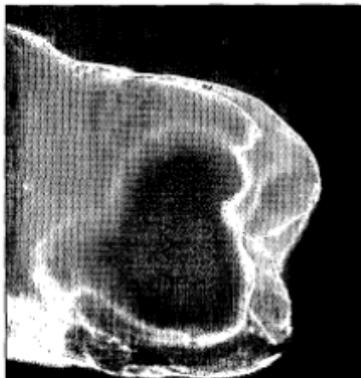


FIG. 24B

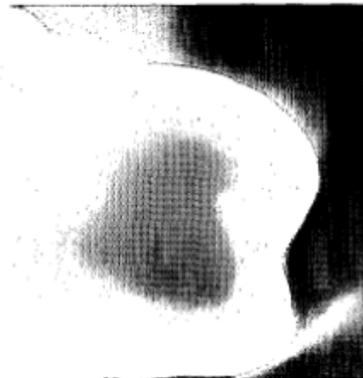


FIG. 24C

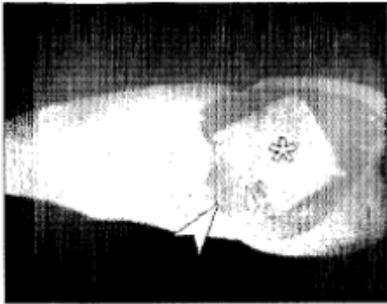


FIG. 25A

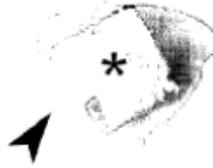


FIG. 25B

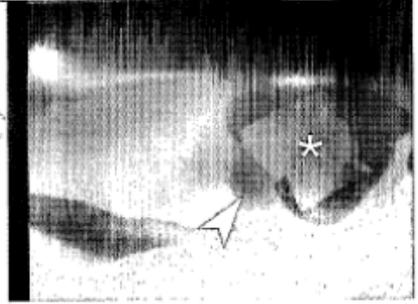


FIG. 25C

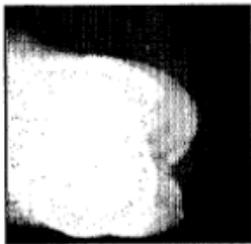


FIG. 26A

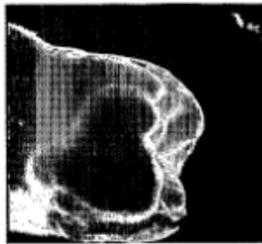


FIG. 26B

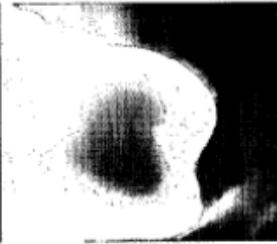


FIG. 26C



FIG. 26D

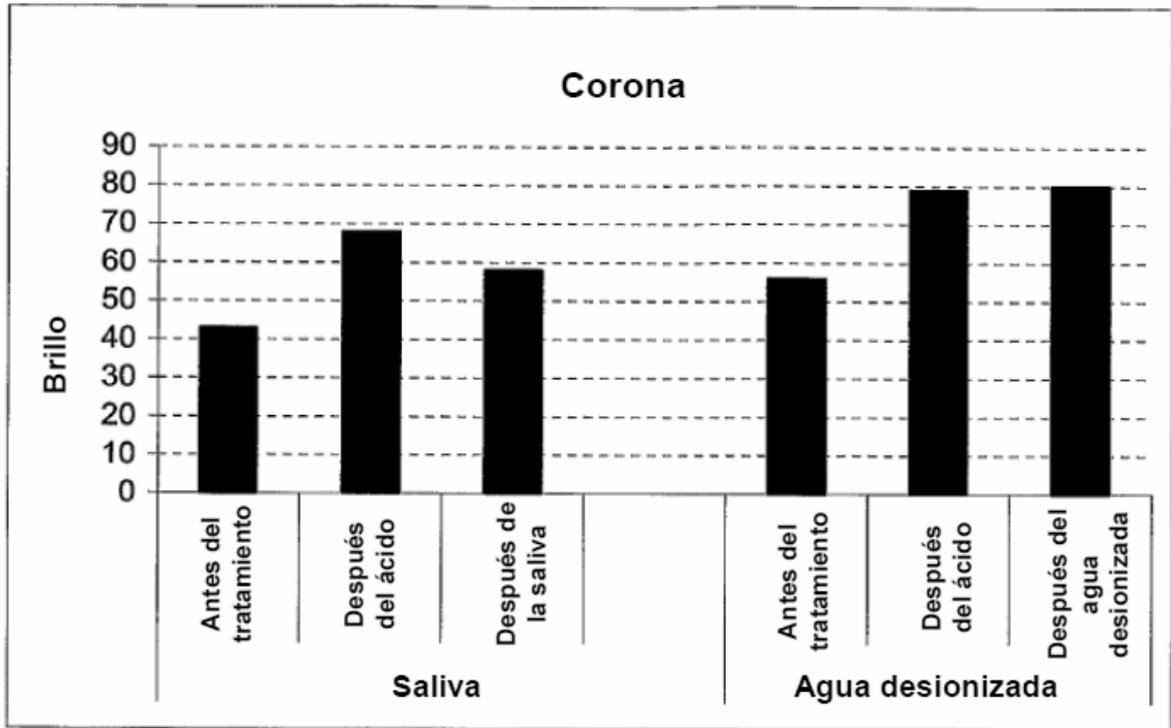


FIG. 27A

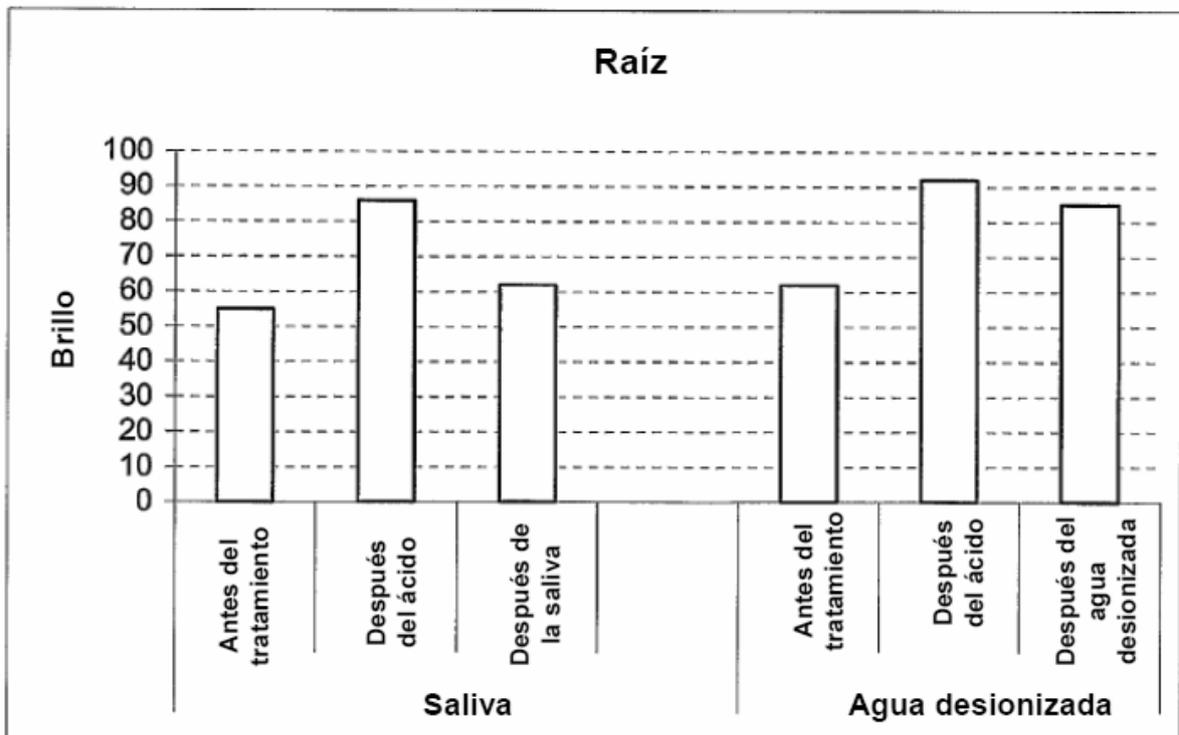


FIG. 27B

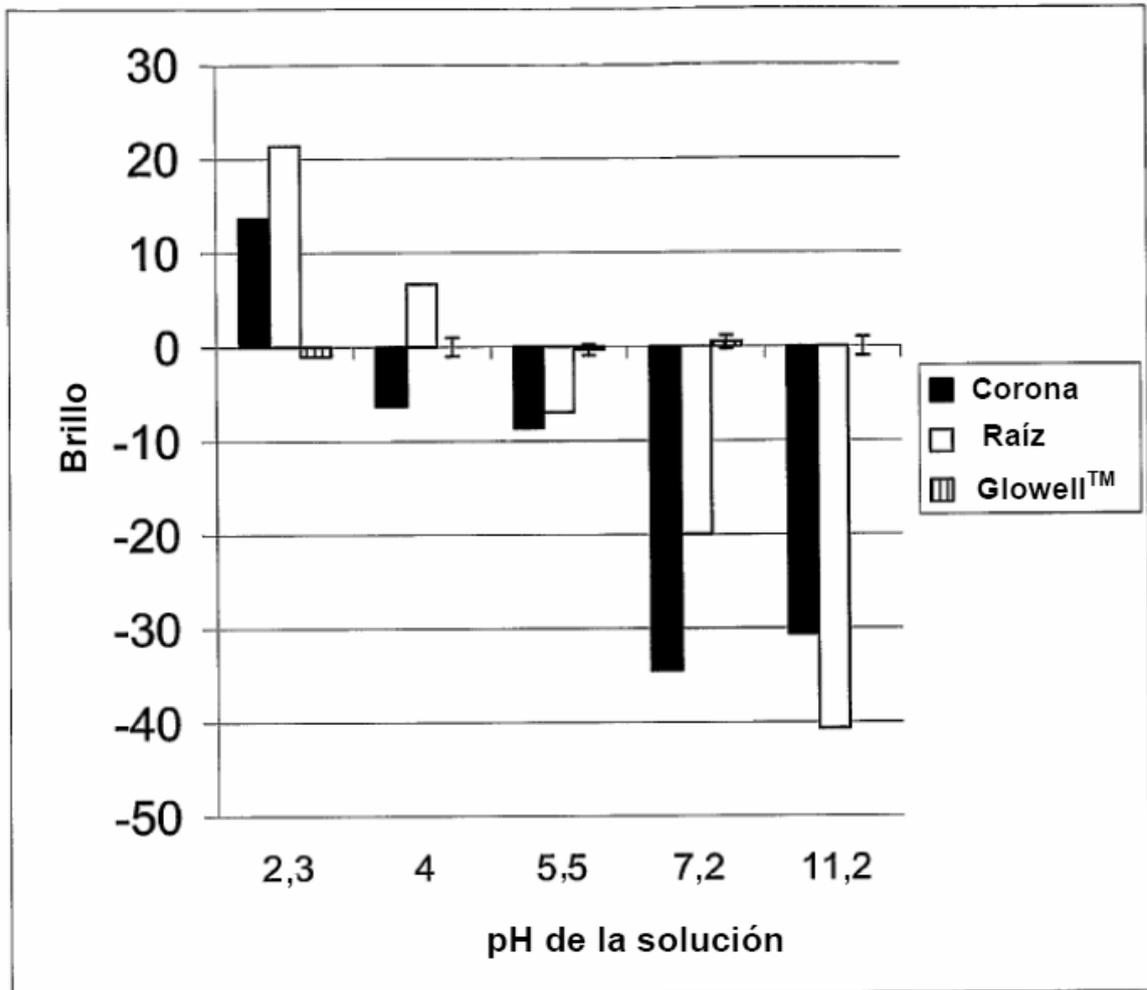


FIG. 28

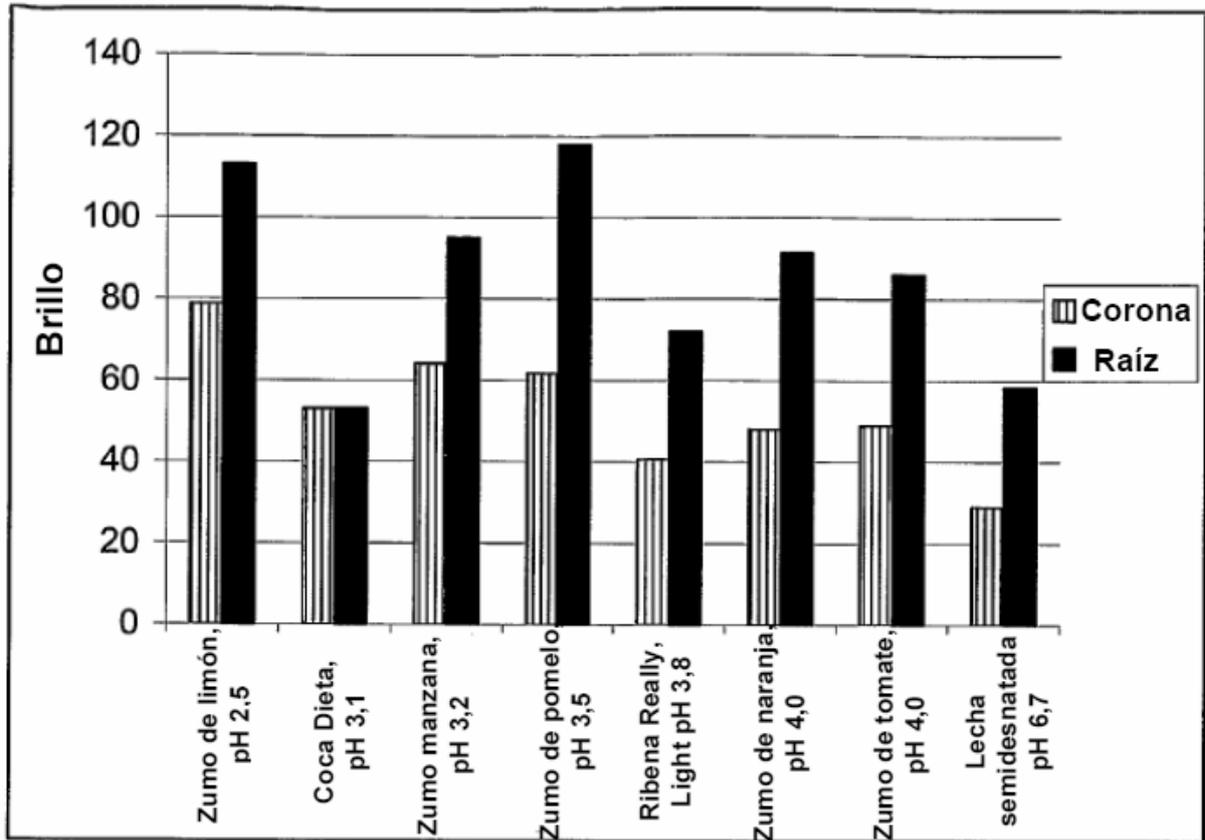


FIG. 29