



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGÍA RESTAURADORA
DEPARTAMENTO PATOLOGÍA

**Recuento de *Streptococcus mutans* en muestras de
biofilm sobre dientes restaurados con resina
compuesta oclusal versus dientes sanos mediante el
método de cubeta**

Carolina Verónica Sieber Carrasco

**TRABAJO DE INVESTIGACION
REQUISITO PARA OPTAR AL
TITULO DE CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dr. Gustavo Moncada Cortés**

**TUTORES ASOCIADOS
Prof. Dra. Patricia Palma Fluxá
Dr. Patricio Vildósola Grez**

PRI-ODO 11-02

**Santiago - Chile
2012**

*A MI FAMILIA
Gracias por confiar en mí.*

*A MIS ÁNGELES:
Aquellos que tuvieron que partir,
pero cuya compañía y apoyo siento
día a día en mi corazón.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su amor y esfuerzo en la vida, gracias a ellos soy quien soy hoy en día.

A mi querida madre Soledad, por su constante entrega, comprensión y apoyo en todas las decisiones que he tomado, sin sus palabras de ánimo en los momentos difíciles se me habría hecho difícil llegar a esta instancia y estar tan cerca de realizar mi sueño.

Al Dr. Patricio Vildósola, por su constante dedicación y buena disposición durante todo el período en que se realizó este trabajo de investigación

A la Dra. Patricia Palma y al Dr. Gustavo Moncada, por dedicarme parte de su valioso tiempo al asesorarme, corregirme y orientarme cuando lo requerí. Gracias por compartir conmigo sus conocimientos.

Al equipo del Laboratorio de Microbiología Bucal, en especial a la Prof. Leyla Gómez, por la buena disposición que tuvo al aclararme dudas durante el procesamiento de las muestras.

A mis amigos y amigas que hicieron de mi paso por la universidad un camino alegre, lleno de buenos e inolvidables momentos.

A Nicolás, por su paciencia y amor incondicional.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	3
1. Caries Dental.....	5
1.1 Microbiología de la caries dental.....	8
1.1.1 Biofilm.....	10
1.1.2 Grupo <i>Streptococci mutans</i>	11
1.1.2.1 <i>Streptococcus mutans</i>	12
1.1.2.2 <i>Streptococcus sobrinus</i>	14
2. Riesgo cariogénico.....	15
2.1 COPD.....	17
2.2 Método de aislamiento y recuento de <i>S. mutans</i> en muestras de placa bacteriana dental.....	18
3. Tejidos duros de la cavidad oral y resina compuesta: aspectos microbiológicos.....	20
3.1 Resina compuesta.....	21
4. Caries secundaria.....	23
Hipótesis	26
Objetivos.....	26
Materiales y métodos	27
Resultados	35
Discusión	41
Conclusiones	45
Sugerencias.....	46
Referencias bibliográficas	48
Anexos	54

RESUMEN

Introducción: Determinar el riesgo cariogénico del paciente es un requisito fundamental para efectuar un adecuado diagnóstico de salud bucal.

Establecer el recuento de *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) sobre piezas dentarias puede permitir identificar el nivel de riesgo microbiológico en desarrollar caries, y en el caso de piezas restauradas, caries secundarias, principal causa de fallas de restauraciones, evitando el futuro recambio de ellas.

Conocer la colonización de microbiota cariogénica en restauraciones dentarias y dientes sanos, podría ser un aspecto a considerar en las decisiones de tratamiento, posibilitando la selección de un material de obturación y medidas preventivas, ajustada con el riesgo cariogénico local y propio de cada paciente.

Material y Método: Se seleccionaron 69 pacientes de la clínica de Operatoria 4to año de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile durante el período de septiembre a diciembre del año 2011. En cada uno de ellos se tomó una muestra de placa bacteriana dental de una pieza posterior sana y una restaurada por oclusal con resina compuesta utilizando la técnica de cubeta. Este método consiste en una impresión directa sobre las superficies oclusales de restauraciones, mediante una cubetilla de flúor gel modificada cargada con agar TYCSB. Las cubetas se incubaron en estufa a 37°C por 48 horas, para posteriormente proceder al recuento bacteriano.

Resultados: Mediante el método de la cubeta se logró aislar Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *S. mutans* en dientes con resina compuesta oclusal y en piezas sanas en un 95,6% de las muestras. Se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) donde las muestras de biofilm de placa bacteriana depositada sobre las restauraciones de resina presentaban mayor cantidad de UFC/cm² que las superficie de piezas sanas.

Conclusiones: A partir de muestras de placa bacteriana dental obtenidas mediante la técnica de cubeta existen diferencias significativas en el recuento de *S. mutans* entre dientes con resina compuesta oclusal y dientes permanentes sanos, siendo mayor en las que presentaban resina compuesta.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bucales, tales como caries dental y periodontitis, son las más comunes entre las enfermedades crónicas, además de ser un importante problema de salud pública por su alta prevalencia, impacto en los individuos, en la sociedad, y el costo de sus tratamientos ⁽¹⁾.

La caries dental se define como una enfermedad crónica, microbiológicamente inducida y multifactorial que afecta a la mayoría de la población mundial ⁽²⁾. Es producida por microbiota cariogénica (acidogénica) presentes en la placa bacteriana dental, las cuales por sus factores de virulencia, se adhieren a la superficie del diente produciendo ácidos, los que provocan la pérdida de minerales de su estructura ⁽³⁾, siendo *Streptococcus mutans* (*S.mutans*), considerado uno de los principales agentes etiológicos ⁽⁴⁾.

Cuando se ha perdido parte de la estructura dentaria, es necesario reconstruirla a través de una restauración para evitar que avance la destrucción, y para ello existe una gran variedad de materiales ⁽²⁾. Amalgamas, resinas compuestas, vidrios ionómeros son algunos ejemplos de los materiales dentales más usados en la actualidad, los cuales devuelven la anatomía y función perdidas. Sin embargo, esto no mejora la salud bucal de las personas, sino que solo limita el daño producido. Por esta razón se debe realizar el tratamiento de la caries dental como una enfermedad infecciosa, a través del control de los factores etiológicos involucrados en el proceso, además de un adecuado tratamiento restaurador ⁽⁵⁾.

Uno de los determinantes en el pronóstico del tratamiento rehabilitador es la interacción biológica entre los materiales de restauración y la microbiota oral. Las propiedades de la superficie de los materiales de restauración determinan la adhesión bacteriana y la colonización en las restauraciones ⁽⁶⁾.

Conocer la colonización de la microbiota cariogénica en dientes con restauraciones oclusales y dientes sanos, podría ser determinante en las decisiones de tratamiento, posibilitando la elección de un material de restauración y medidas preventivas, ajustada al riesgo cariogénico local y propio de cada paciente.

MARCO TEÓRICO

1. Caries Dental

La caries dental se define como una enfermedad crónica, microbiológicamente inducida y multifactorial, en la que un amplio grupo de factores biológicos, socioeconómicos y culturales interactúan, directa o indirectamente en el establecimiento y desarrollo de ésta. Los microorganismos presentes en ella afectan la estructura dura de las piezas dentarias y se caracteriza por la desintegración molecular, localizada y progresiva que lleva a una lesión irreversible ⁽⁷⁾.

La composición y metabolismo del biofilm (comunidad de microorganismos asociados entre sí y adheridos a una superficie) está determinado por una compleja interrelación entre los factores etiológicos, depósitos microbianos y superficie dental y por todos aquellos determinantes ecológicos como la dieta (frecuencia y composición), fluoruros, saliva (composición y flujo) y su capacidad buffer. Otros factores ambientales y socioeconómicos influenciarían también dicha relación ⁽⁷⁾ (Fig. N°1).

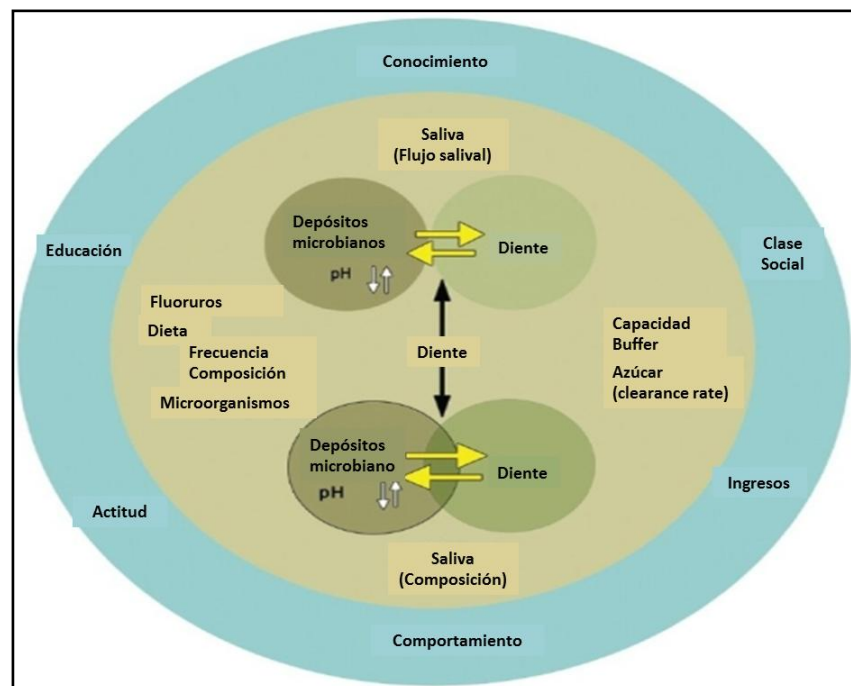


Fig. N°1: Esquema del concepto actual de caries dental

La caries se considera un proceso, que resulta de un desbalance del equilibrio fisiológico entre los minerales que componen la estructura dentaria y los productos bacterianos presentes en el biofilm de placa supragingival ⁽⁸⁾.

Para que se genere una lesión cariosa debe depositarse sobre la superficie dentaria un biofilm adherente formado por diversas y numerosas especies bacterianas ⁽³⁾. Dentro del biofilm existen microorganismos con “**potencial cariogénico**” y son aquellos capaces de fermentar carbohidratos y producir ácidos, provocando dos efectos: **(a) efecto directo** sobre el diente, generando desmineralización de los tejidos inorgánicos de esmalte y la dentina; **(b) efecto indirecto**, que activa las metaloproteinasas propias de la dentina, las cuales provocan la destrucción de la matriz orgánica del diente ⁽⁹⁾. La suma de ambos efectos lleva a la cavitación del esmalte y a la formación de la lesión de caries (Fig N° 2). ⁽²⁾

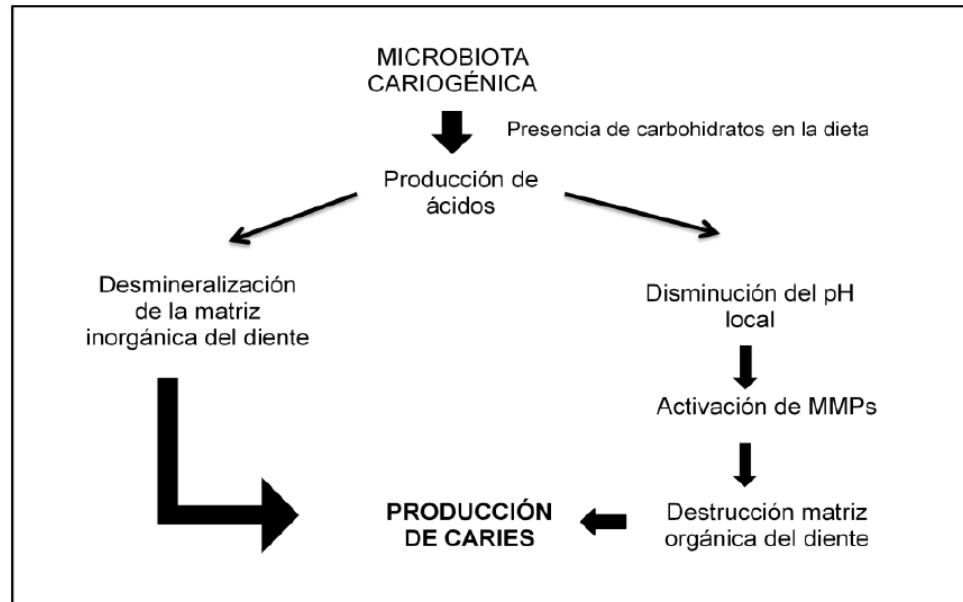


Fig N°2: Proceso de producción de caries

Las primeras bacterias adheridas a la película salival proveen el sustrato para que otros microorganismos también se adhieran a ella ⁽¹⁰⁾. A medida que el biofilm va madurando las especies que forman parte de ella cambian, dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno (potencial redox), nutrientes y productos metabólicos. De esta forma, el daño que la placa dental produzca se relacionará con las bacterias que la conforman ⁽³⁾.

La caries dental puede clasificarse de diversas maneras, una de ellas es en relación al sitio de la lesión. Según esta clasificación, se puede dividir en: caries de fosas y fisuras, caries de superficies lisas, caries radicular y caries secundaria o recurrente ⁽²⁾.

La posibilidad de detener un proceso carioso, está relacionado con un diagnóstico temprano y el factor de riesgo cariogénico individual que posea cada paciente. Si la enfermedad puede ser detectada antes que se produzca la cavitación, una terapia de remineralización puede revertir el proceso sin la necesidad de un tratamiento restaurador. El tipo de lesión justifica el tipo de intervención a realizar ⁽¹¹⁾.

1.1 Microbiología de la Caries Dental.

A través de la historia han surgido diversas teorías que tratan de explicar el origen de la caries. El pionero fue Van Leeuwenhoek (siglo XVI), quien sugirió la posible relación entre microorganismos y caries ⁽¹²⁾.

Posteriormente, Miller (siglo XIX) propuso la “Teoría Quimioparasitaria”, según la cual esta enfermedad sería el resultado de la degradación de carbohidratos de la dieta por la acción de enzimas bacterianas productoras de ácidos, esto produciría la desmineralización del diente ⁽¹²⁾.

Loesche, en 1976, postuló la “Hipótesis de Placa Específica”. Plantea que para el desarrollo de caries debían estar presentes en la placa dental bacterias específicas, siendo éstas un número limitado de especies ⁽¹³⁾. Además definió que un biofilm con potencial cariogénico debería estar formado por un predominio de bacterias Gram positivo, acidogénicos y acidúricos.

Dentro de los microorganismos considerados cariogénicos se encuentran: *Streptococcus mutans* (*S.mutans*), *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*), *Lactobacillus acidophilus*, este último se encuentra en un pequeño porcentaje del biofilm dental y posee una baja capacidad de adherencia a la película salival ⁽¹²⁾, sin embargo, *S. mutans* se encontró en un alto porcentaje, el cual se consideró como causante de esta enfermedad, dado que cumplía con los postulados de Koch, que se aplicaban para establecer las enfermedades infecciosas ⁽¹⁴⁾.

A pesar de que *S. mutans* está fuertemente asociado al desarrollo de la caries, esta relación no es única. Se puede detectar lesiones de caries incluso con ausencia aparente de esta especie, así como se ha encontrado colonización de *S.mutans* sin evidencia detectable de desmineralización de los dientes ⁽¹⁵⁾.

En 1997, Marsh propone la “Hipótesis Ecológica”, donde postula que el balance entre las condiciones que brinda el hospedero con los microorganismos

de la cavidad bucal y aquellos que constituyen el biofilm dental condiciona la enfermedad ⁽¹⁶⁾. Por lo tanto, considera la regulación de biofilm como un proceso dinámico, donde factores externos pueden producir alteraciones en la expresión de genes requeridos para su formación, otorgando mayor o menor grado de virulencia o patogenicidad (Fig. N°3) ⁽¹⁷⁾

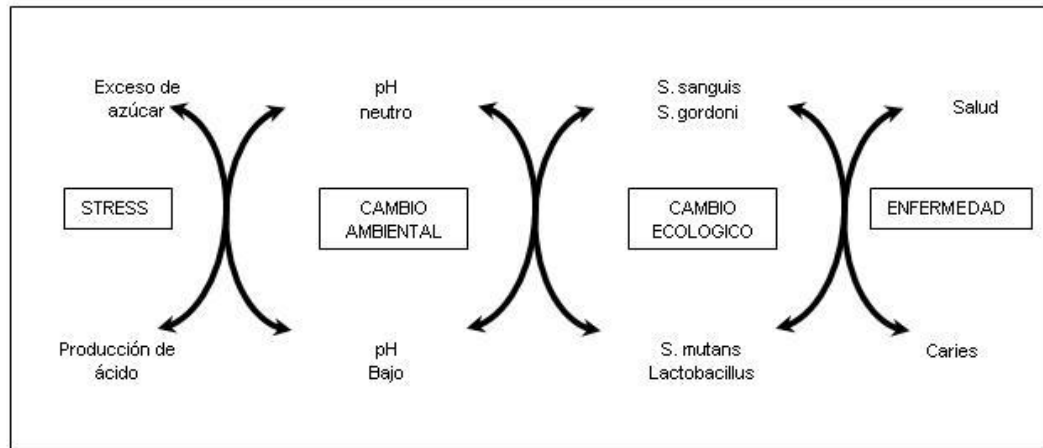


Fig. N°3: Representación de la "Hipótesis de Placa Ecológica" ⁽¹⁶⁾

Las características claves de la "Hipótesis Ecológica" son: **(a)** la selección de bacterias patógenas está directamente asociada a cambios ambientales; y **(b)** la enfermedad no necesita una etiología específica: cualquier especie con características relevantes puede contribuir al proceso de enfermedad. Sin embargo, *S. mutans* es quizás el organismo mejor adaptado para el ambiente cariogénico, caracterizado por altos niveles de azúcar y bajo pH, y es por tanto, el agente etiológico principal de la caries dental ⁽¹⁴⁾. Sin olvidar que especies como, *S. sobrinus* y *Lactobacilli spp.* también están involucrados en el desarrollo de esta patología ⁽¹⁸⁾.

1.1.1 Biofilm

Biofilm se describe como una comunidad compleja de microorganismos adheridos a una superficie; estos microorganismos están organizados espacialmente en una estructura tridimensional envueltos en una matriz extracelular que deriva de ellas mismas y del medio ambiente. Muestran además un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o expresión de sus genes ⁽¹⁷⁾. En un biofilm se exponen propiedades que no son expresadas en cultivos planctónicos, no son la suma de expresión de cada microorganismo constituyente, sino más bien, establece una comunidad microbiana organizada que crece sobre cualquier superficie ⁽¹⁹⁾.

Previo a la formación del biofilm se establece la llamada película dental adquirida, que consiste en el depósito de proteínas salivales, enzimas e inmunoglobulinas sobre la superficie del esmalte. Luego de la formación de la película adquirida, ciertos microorganismos se adhieren a ella, proliferan y forman colonias ⁽²⁾. Estos colonizadores primarios proveen el sustrato necesario para que nuevas especies se coagreguen ⁽¹⁰⁾. Una vez que se fijan los microorganismos pioneros éstos proliferan en sentido lateral para luego hacerlo en volumen. La cubierta mixta estreptocócica resultante permite que se adhieran otros microorganismos ⁽³⁾. Entre el 4° y 10° día ya se puede observar una placa bacteriana madura ⁽²⁰⁾.

La composición de la placa bacteriana o biofilm varía entre las distintas superficies anatómicas del diente debido a las propiedades físicas y biológicas que prevalecen en cada sitio, desarrollándose preferentemente en sitios retentivos que ofrecen protección a fuerzas físicas de la boca, como surcos y fisuras o la zona interproximal ⁽¹⁵⁾. Solamente algunas especies bacterianas, como *S. mutans*, son capaces de adherirse a las superficies orales y fuertemente entre sí ⁽²⁰⁾ por lo que posee una de las mayores capacidades de iniciar el proceso de formación de caries ⁽²¹⁾.

1.1.2 Grupo *Streptococci mutans*.

Especies del grupo *Streptococci Mutans* se encuentran en la placa bacteriana dental, y se consideran los patógenos más asociados con el inicio de la lesión de caries. Son anaerobios facultativos, capaces de fermentar hidratos de carbono, de cuyo metabolismo deriva la producción de ácidos y la síntesis de polisacáridos extra e intracelulares ⁽²²⁾.

Son un grupo de bacterias genéticamente heterogéneo, en el que se reconocen ocho serotipos distintos (a, b, c, d, e, f, g y h) y se han dividido en siete especies distintas; *Streptococcus mutans*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus macacae* y *Streptococcus downei* ⁽²³⁾. Estas especies son diferenciables mediante pruebas serológicas y bioquímicas, cuyas características se detallan en la Tabla N°1:

Tabla N°1: Características de los miembros del grupo *streptococci mutans* ⁽²³⁾

Especie	Serotipo	Hidrólisis de Arginina	Fermentación		Producción de H ₂ O	Crecimiento aeróbico	Susceptibilidad a la bacitracina	Hidrólisis de Esculina
			αRafinosa	Melobiosa				
<i>S.mutans</i>	c,e,f	-	+	+	-	+	-	+
<i>S. rattus</i>	b	+	+	+	-	+	-	-
<i>S. cricetus</i>	a	-	+	+	-	-	+	+
<i>S.sobrinus</i>	d,g	-	-	-	+	+	-	-
<i>S.ferus</i>	c	-	-	-	-	-	+	+
<i>S.macacae</i>	c	-	+	-	-	-	+	+
<i>S.downei</i>	h	-	-	-	-	-	+	-

Dentro de este grupo, las especies *S. mutans* y *S. sobrinus* son los más fuertemente asociados al inicio de la lesión de caries dental ⁽¹⁵⁾.

1.1.2.1 *Streptococcus mutans*

Fitzgerald y Keyes, en 1960 ⁽¹²⁾, identificaron a *S. mutans*, como la especie con mayor poder patogénico para iniciar la lesión de caries, en relación a otras especies acidogénicas de la placa supragingival, jugando un rol activo en el desarrollo de lesiones de caries, especialmente en las primeras etapas ⁽²⁴⁾.

S. mutans es una especie cocácea, Gram positivo, que se agrupa en cadenas. Para desarrollarse necesita medios enriquecidos y ambientes de microaerofilia o anaerobiosis, con una tensión de CO₂ al 10% ^(25,26). Posee los polisacáridos antigénicos definidos para los serotipos c, e y f, siendo el serotipo c la más predominante de la cavidad oral en humanos ⁽²⁷⁾.

Se puede aislar en medios enriquecidos como: agar Mitis Salivarius con bacitracina (MSB) y el agar Trypticase Yeast-extract Cystine Saccharose con bacitracina (TYCSB) ⁽²⁸⁾. Estos medios son selectivos para esta especie por la presencia de sacarosa y bacitracina en concentraciones críticas las cuales son toleradas por *S. mutans*, pero no por el resto de microorganismos orales ⁽²⁹⁾.

A diferencia del resto de los *Streptococcus* orales, *S. mutans* es capaz de fermentar diversos azúcares, particularmente manitol y sorbitol. Si la cantidad de hidratos de carbonos disponibles es limitada, los productos de la fermentación son formiato, acetato y etanol. En medios ricos en carbohidratos se genera ácido láctico, el que más se ha asociado con el origen de caries. Esta propiedad es conocida como **acidogénica** ⁽³⁰⁾. La velocidad con que *S. mutans* produce ácidos, testeada en rangos de pH entre 7.0 a 5.0, excede a la del resto de los estreptococos orales en la mayoría de las ocasiones, y produce cambios en la ecología de la microbiota bucal; estos incluyen el aumento en la proporción de *S. mutans* y de otras bacterias acidógenas y acidúricas. Esta microbiota cariogénica reduce el pH a niveles bajos, con lo que se aumenta el tiempo de recuperación

del pH neutro, luego de la ingestión de carbohidratos, manteniendo los valores de pH en la placa dental bajo 5.4, lo cual favorece la desmineralización del esmalte y la producción de caries ⁽³⁰⁾.

Otra propiedad que posee esta especie, es la de **aciduria** o tolerancia al ácido, permitiéndole mantener capacidad glicolíticas a niveles de pH donde el crecimiento de otras especies está inhibido (bajo pH 4.4) ⁽³⁰⁾.

A partir de la fermentación de hidratos de carbono, principalmente de la sacarosa, *S. mutans* puede sintetizar **polisacáridos extra celulares** (EPS) como glucanos (dextrán y leván) y fructanos, que promueven la adherencia selectiva y la acumulación de un amplio número de estreptococos cariogénicos en los dientes, además de aumentar la porosidad y dimensión de la matriz de la placa dental. Esto permite una mayor difusión de sustrato a través de la superficie del esmalte, se produce un descenso de los valores de pH en capas más profundas de la placa y se favorece el desarrollo de la caries ^(31,32).

Por otro lado, también sintetiza **polisacáridos intracelulares** (IPS) de reserva, que pueden ser degradados por dextranasas, fructanasas y glucógenofosforilasas, que son utilizados cuando no disponen de alimentos ^(7,32).

Sus cualidades para adherirse a la película adquirida radican en dos mecanismos: **(a) adherencia sacarosa dependiente**, sintetiza polisacáridos extracelulares a partir de hidratos de carbono, los cuales actúan como adhesivos extracelulares; **(b) adherencia sacarosa independiente**, adhesión de esta especie a componentes salivales de la película adquirida del esmalte ⁽³⁰⁾. Por lo tanto, *S. mutans* sintetiza su propia sustancia adhesiva que actuará para unir las bacterias entre sí y a la superficie del diente ⁽²⁰⁾.

1.1.2.2 *Streptococcus sobrinus*

S. sobrinus es una especie cocácea, Gram positivo, agrupada en cadena y que crece en ambientes capnófilicos (CO₂)⁽²⁵⁾. Contiene los polisacáridos definidos con los serotipos d y g⁽²⁷⁾.

Produce glucanos solubles e insolubles y posee dextranasa para hidrolizarlos⁽²⁵⁾. Sintetiza menos polisacáridos intracelulares que *S. mutans*, por eso toda la glucosa disponible es usada para producir ácidos, esto lo hace más acidogénico que *S. mutans*⁽³³⁾. Posee proteínas superficiales fijadoras de glucanos y otras con carácter de adhesinas que median procesos de adhesión y agregación bacteriana⁽²⁵⁾.

Se ha visto que produce ácidos a partir de glucosa más rápido que *S. mutans*, especialmente en valores de pH más bajos, por lo que es probable una diferencia en el potencial cariogénico entre ambas bacterias, aunque algunos estudios señalan que no existirían diferencias⁽³³⁾.

Al igual que *S. mutans*, también coloniza superficies duras. En localizaciones supragingivales se ha aislado en un 9% de muestras de placa dental, encontrándose en menor proporción que *S. mutans*, que alcanza un 43%⁽²⁷⁾. Sin embargo, *S. sobrinus* puede inducir cualquier tipo de caries en superficies lisas, fosas y fisuras, interproximales y cemento, e intervenir en la progresión de la lesión cariosa⁽⁷⁾.

Existen estudios que han mostrado que la presencia de *S. sobrinus* asociado a *S. mutans* se relaciona con mayor incidencia de caries⁽³⁴⁾.

2. Riesgo cariogénico

Riesgo cariogénico se define como “probabilidad que un individuo desarrolle caries en un período específico de tiempo, siempre y cuando mantenga inalterables las condiciones del medio bucal” ⁽³⁵⁾.

Factor de riesgo se define como un factor medioambiental, conductual o biológico que al estar presente directamente incrementa la probabilidad de que una enfermedad ocurra, y si está ausente o se elimina, esta probabilidad disminuye ⁽³⁶⁾.

Los factores que inciden en la producción de caries pueden clasificarse en primarios, secundarios y terciarios ⁽²⁶⁾.

Los factores primarios son el hospedero, los microorganismos de la cavidad oral con potencial cariogénico (especialmente un elevado recuento de *S. mutans*), la dieta consumida (de consumo frecuente y alta en carbohidratos) y el tiempo en que los tres factores anteriores interactúan ⁽²⁶⁾.

Como factores secundarios puede mencionarse la saliva, la exposición a fluoruros, la higiene oral y la condición sistémica del individuo, entre otros ^(7,26).

Los factores terciarios se relacionan con la clase social, la educación, ingresos económicos, conocimiento, actitudes y conductas ⁽²⁶⁾.

Es así como los pacientes según su patología se pueden clasificar de acuerdo al riesgo de caries, para poder realizar un tratamiento dirigido según la necesidad del paciente.

Muchos de estos factores pueden ser reconocidos mediante una anamnesis exhaustiva y un examen clínico minucioso, en él podemos determinar el COPD del paciente, que da cuenta del daño acumulado producido

por las caries presentes. Sin embargo, el recuento de *S. mutans* es considerado como un factor crítico, ya sea, por su significancia clínica como por su dificultad diagnóstica ⁽³⁷⁾.

2.1 COPD

El COPD nace como una medida de experiencia acumulada de caries en dentición permanente. La sigla corresponde a C= cariada O=obturada P=perdida ⁽³⁸⁾.

Este índice es ampliamente utilizado tanto en el trabajo clínico como en investigaciones científicas ⁽³⁹⁾.

En el ámbito clínico, la experiencia de caries indicada en el COPD, es uno de los factores a considerar al momento de evaluar el riesgo cariogénico que presenta el paciente. Esto contribuye a establecer un plan de tratamiento específico para satisfacer las necesidades de cada paciente.

Sin embargo, pese a su amplio uso, este índice presenta algunas desventajas a considerar, como es la subestimación de la prevalencia de caries, ya que no considera los estados incipientes de la lesión. Genera además una sobreestimación ya que da cuenta de un daño acumulativo y no del estado actual de actividad de la enfermedad. Otra desventaja es que se asume que los daños producidos (obturaciones y piezas perdidas) se deben a lesiones de caries y no considera otras posibles causas, tales como trauma o pérdida de sustancia por causas no infecciosas ⁽³⁸⁾.

Otro punto en contra es el hecho en que entrega un valor que no llega a reflejar la verdadera distribución de la enfermedad, debido a la alta polarización del daño que se presenta en la población, y no se refleja en un promedio ⁽³⁹⁾.

2.2 Métodos de aislamiento y recuento de *S. mutans* en muestras de placa bacteriana dental.

Para monitorear *S. mutans* en dientes con restauraciones, el método más utilizado hasta hoy es el propuesto por Wallman y Krasse ⁽⁴⁰⁾ llamado “mondadientes”, con el cual se obtiene muestras de placa bacteriana del margen de la restauración. Es un método simple de recolección, económico y viable de realizar en la consulta dental, pero cuyo inconveniente, descrito por ellos mismos, es la existencia de una subestimación del microorganismo, los cuales pueden no ser recolectadas por el instrumento debido a la dificultad para recoger muestra de biofilm de la totalidad de la superficie ⁽⁴⁰⁾.

Un estudio realizado por Zúñiga ⁽⁴¹⁾ en el 2010, desarrolló la técnica de cubeta, un método que permite la aislación y recuento de UFC de *S. mutans* de muestras obtenidas de placa dental sobre las superficies de piezas dentarias sanas y/o restauradas. Consiste en realizar una impresión directamente sobre las superficies oclusales, lo cual da una mayor exactitud del recuento de microorganismos cariogénicos, con el beneficio de no ser invasivo para el seguimiento de caries en lesiones que radiográficamente son de difícil diagnóstico y además puede utilizarse para monitorear restauraciones y lesiones de caries recurrente ⁽⁴¹⁾.

Su principal ventaja, en comparación a técnicas como recuentos en saliva y la técnica de mondadientes utilizada como “gold standard”, radica en que sólo se necesita una toma directa de la muestra de placa dental sobre las superficies de restauraciones y/o dientes sanos de manera conservadora, además de requerir de un menor tiempo de procesamiento microbiológico, ya que elimina etapas como la dilución, siembra, y puede ser realizado por personal clínico sin conocimientos elevados en aspectos de laboratorio, aplicándose principalmente para objetivos de investigación y, además podría ser usado posteriormente para la clínica. Otra de sus ventajas es que al ser una impresión, permite la ubicación

topográfica de las especies bacterianas, facilitando la aplicación de medidas preventivas ajustadas al riesgo individual de cada pieza dentaria. Consiste por lo demás en un método simple, de bajo costo y no invasivo para el paciente. Asimismo esta validado como método ya que posee una correlación positiva con el método del mondadientes y con el método de recuento de *S. mutans* en saliva ⁽⁴¹⁾.

Sin embargo, una desventaja que posee esta técnica radica en que se ve limitada a la cara oclusal y vestibular de las piezas dentarias, ya que al ser los espacios interproximales zonas muy estrechas y retentivas, y el agar ser un material poco resistente a la tracción, éste tiende a desgarrarse en dicha zona, lo que haría muy dificultoso realizar un recuento en obturaciones proximales.

3. Tejidos duros de la cavidad oral y resina compuesta: aspectos microbiológicos

Existe un sinnúmero de factores que influyen en el riesgo de desarrollar caries en dientes sanos, siendo uno de los más relevantes la concentración de microorganismos cariogénicos en el biofilm dental que cubre la superficie dentaria⁽⁴¹⁾.

La examinación microscópica de formación de placa sobre la superficie dental ha mostrado la adhesión de bacterias colonizadoras iniciales a lo largo y ancho de surcos y grietas presentes en el esmalte, sugiriendo entonces la influencia de la estructura de la superficie en la adhesión bacteriana⁽⁴²⁾.

En un estudio, Lindquist y Emilson tomaron muestras de placa dental, recolectada de la superficie vestibular, lingual/palatino, proximal y oclusal de cada pieza de la arcada, con el método del mondadientes. Concluyeron que la prevalencia de *S. mutans* pareciera estar influenciada por el estado de la superficie. Si se considera la totalidad de los sitios examinados, las superficies dentales libres de caries o libre de obturaciones mostraron ambas tener la prevalencia y recuento más bajo de *S. mutans*. Sin embargo, para sitios individuales, las superficies oclusales sanas o con caries acumularon mayor cantidad de *S. mutans* que las superficies oclusales restauradas. Esta condición refleja el alto potencial de retención de *S. mutans* en el complejo sistema de puntos y fisuras, los cuales fueron removidos al realizar tratamientos restauradores⁽⁴³⁾. Además, probablemente fueron subestimadas las frecuencias de aislamiento total y los recuentos obtenidos en este estudio a través del método del mondadientes⁽⁴³⁾, ya que se demostró que el raspado de las fisuras oclusales, incluso si se hace con una aguja, falla en la recolección de ciertos organismos presentes en el fondo de las fisuras⁽⁴⁴⁾.

Esto es aún más significativo cuando se considera la superficie de restauraciones dentales, en donde la colonización por microbiota cariogénica juega un papel de gran relevancia en el desarrollo de caries secundarias, siendo una de las principales razones de fracaso de los tratamientos restauradores ^(45,46).

Las propiedades de las superficies de los materiales de restauración son determinantes en la adhesión bacteriana y en la colonización de las obturaciones ⁽⁴⁶⁾, ya que la adsorción de película salival y la formación del biofilm son influenciadas por características tales como, rugosidad, carga eléctrica y composición química que presentan estas superficies ^(47,48).

La adhesión del biofilm depende del tipo de material de restauración, ya que tanto sus propiedades físicas como químicas son determinantes en la interacción biológica entre la superficie de éste y la especie bacteriana que lo colonice ⁽⁸⁾.

3.1 Resina Compuesta

Las resinas compuestas, son por definición un material de restauración formado por cuatro componentes básicos: una *matriz de resina* en base a una partícula monomérica, denominada bis-GMA, un *agente de unión* de las partículas de la matriz conocido como silano, *partículas de relleno inorgánico* tales como dióxido de silicio, así también los borosilicatos y aluminosilicatos de litio que mejoran sus propiedades mecánicas y un *iniciador* como la canforoquinona que es el responsable de la reacción de polimerización. ⁽⁴⁹⁾

Estudios han señalado que las resinas compuestas acumulan más bacterias y placa bacteriana que la superficie del esmalte “*in vitro*” e “*in vivo*” ^(30,50), siendo mayor la superficie cubierta por placa que en amalgama ^(51,50). Es importante destacar que las bacterias encontradas en su superficie se encuentran vivas ⁽⁴⁷⁾, pues a diferencia de la amalgama, no posee actividad

antibacteriana ⁽⁴⁷⁾. Además se han encontrado específicamente *S.mutans* y *Lactobacilli* spp. en placa obtenida en márgenes de restauraciones de resina compuesta ⁽⁵¹⁾.

Sumado a lo anterior se ha señalado que co-monómeros liberados de materiales de resina pueden estimular el crecimiento bacteriano y contribuir a la irritación pulpar bajo las obturaciones de resina compuesta, así como también incrementar la formación de placa sobre la superficie o en desajustes marginales, situación común en este tipo de material por la contracción de polimerización, permitiendo la creación de micro nichos ecológicos que favorecen la acumulación de microorganismos ⁽⁵²⁾.

4. Caries Secundaria

La caries secundaria o recurrente, es aquella caries que se detecta en los márgenes de una restauración existente, es la razón más frecuente para reemplazar restauraciones ⁽⁵³⁾. En un estudio de prevalencia se mostró que este tipo de lesiones es más común en adultos que la caries primaria y es la principal responsable de la falla de los tratamientos restauradores ⁽⁴⁶⁾.

Los métodos diagnósticos más utilizados para su detección son la exploración clínica y las radiografías de aleta mordida ⁽⁵⁴⁾.

Histológicamente la lesión de caries secundaria es igual a la caries primaria pero adyacente a una restauración, con la diferencia que se distinguen dos sitios específicos, uno denominado “*wall lesion*” o lesión de pared, afectando el esmalte y/o dentina de la cavidad de la restauración y otro conocido como “*outer lesion*” o lesión externa, que involucra esmalte y/o cemento del diente, con una histología similar a la caries primaria ^(54,55).

No se han encontrado diferencias en la composición de la microbiota bacteriana en muestras de placa bacteriana tomadas desde caries primarias versus la encontrada en caries secundaria ⁽⁵³⁾. Varios estudios han demostrado que es común la infiltración bacteriana después de la inserción de restauraciones ⁽⁵⁶⁾ y que existe un predominio de bacterias aeróbicas facultativas, cocáceas y Gram positivo en espacios entre restauraciones y paredes de cavidad ⁽⁵⁵⁾, por lo que se sugiere que *S. mutans* es el principal agente etiológico de la caries secundaria ⁽⁴⁶⁾.

La presencia de caries secundaria no solo se relaciona con algún defecto marginal, sino que requiere de la formación de placa con potencial cariogénico ⁽⁵⁴⁾.

Actualmente el concepto de caries secundaria se encuentra en discusión debido a que corresponde a la misma entidad clínica e histológica que la caries primaria, por lo que hoy se sugiere denominarla “caries adyacentes a una restauración” ^(19,57).

La cantidad de microorganismos en la placa dental, es uno de los factores más importantes en el riesgo de desarrollar caries dental. Si además, agregamos la presencia de restauraciones dentarias es aún más crítico, siendo la caries secundaria la principal causa de fracaso de éstas ^(46, 6, 47, 54,55).

Estudios “*in vivo*” e “*in vitro*” muestran que *S. mutans* es la principal bacteria aislada de muestras obtenidas de placa dental de superficies biológicas ^(58,59) y con mayor potencial cariogénico ⁽²⁴⁾. Los niveles de éste en placa están asociados directamente con el desarrollo de caries ⁽⁴⁾, es por esto que identificarlo y cuantificarlo es fundamental para predecir el éxito de los tratamientos restauradores y evitar futuras lesiones.

Uno de los determinantes en el pronóstico del tratamiento restaurador es la interacción biológica entre los materiales de restauración y la microbiota oral, por lo que las propiedades de la superficie de los materiales de restauración determinan la adhesión bacteriana y la colonización en las restauraciones ⁽⁶⁾. Esto incluso puede afectar el pronóstico del tratamiento restaurador. La interacción de los materiales de restauración con *S. mutans* puede ser un factor a considerar a la hora de tomar decisiones y decidir el plan de tratamiento del paciente.

El propósito de la siguiente investigación radica en conocer la concentración de *S. mutans* sobre dientes con restauraciones versus piezas sanas, lo que permitiría identificar el nivel de riesgo en desarrollar caries secundaria, teniendo en conocimiento que esta es la principal causa de fallas de restauraciones ⁽⁴⁶⁾, evitando en un futuro el recambio de ellas, con la consecuente pérdida de tejido sano que ocurre en cada reemplazo. Esto permitiría seleccionar

un material de restauración que tenga menores posibilidades de ser colonizado por *S. mutans*, para evitar la formación de caries secundaria.

Conocer la colonización de la microbiota cariogénica en restauraciones dentarias y piezas sanas, podría ser determinante en las decisiones de tratamiento, permitiendo la selección de materiales de restauración y medidas preventivas acordes al riesgo cariogénico local y propio de cada paciente.

HIPÓTESIS

Existen diferencias significativas en el recuento de Unidades Formadoras de Colonias por cm^2 de *Streptococcus mutans* de muestras de placa dental entre la zona topográfica de dientes con restauraciones oclusales de resina compuesta y dientes permanentes sanos, utilizando el método de cubeta.

OBJETIVO GENERAL

Comparar la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias por cm^2 de *Streptococcus mutans* de muestras de placa dental presentes en la superficie oclusal de dientes restaurados con resina compuesta y dientes sanos obtenidas mediante la técnica de cubeta

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener muestras de placa dental en restauraciones oclusales de resina compuesta y piezas sanas mediante técnica de cubeta.
2. Aislar, identificar y cuantificar la cantidad de Unidades Formadoras de Colonias por cm^2 de *Streptococcus mutans* en muestras obtenidas mediante técnica de cubeta.
3. Determinar la relación entre el recuento de *Streptococcus mutans* de las muestras obtenidas mediante la técnica de cubeta y el COPD del paciente.

MATERIAL Y MÉTODO

La muestra consistió en 69 pacientes entre 18 y 45 años (total de 138 muestras, 2 por cada paciente) seleccionados en forma aleatoria, que asistieron a la Clínica de Operatoria Clínica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, durante los meses de septiembre a diciembre de 2011.

El tamaño de la muestra se calculó utilizando el programa estadístico G*Power© Versión 3.1.3 basándonos en la comparación de promedios de una variable entre dos muestras independientes de la siguiente manera:

- 1) Con un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$)
- 2) Con un poder estadístico o riesgo de cometer un error tipo II ($1-\beta$), del 80%, con $\beta=0,2$.
- 3) El efecto de tamaño (ρ) de 0.5 (medio).

El programa determinó un $n=64$ pacientes, sin embargo, se agregaron 5 pacientes más en caso de deserción.

Además se confeccionó una lista de todos los pacientes atendidos durante el período de tiempo señalado que cumplieran con los criterios de inclusión. Estos datos fueron ingresados a una planilla en Microsoft Office Excel (Versión 2007), de la cual se seleccionaron 69 pacientes.

1) Selección de Pacientes

Se seleccionaron pacientes de la clínica de Operatoria Dental de 4^a año, de ambos sexos, de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, entre los meses de septiembre a diciembre del año 2011, que poseían una obturación oclusal de resina compuesta efectuadas hace 2 años como mínimo, piezas sanas y que cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión definidos.

Criterios de Inclusión:

- Pacientes de ambos sexos, entre 18 a 45 años, que poseían piezas posteriores homólogas sanas y restauradas con resina compuesta en el mismo paciente.
- El material de obturación que se incluyó en la muestra fue resina compuesta.
- Restauraciones que cumplieran las condiciones alfa según los Criterios Ryge modificados ⁽⁶⁰⁾ (ver anexo 3) evaluadas por operador calibrado con Índice Kappa de Cohen.
- Las restauraciones de resina compuesta debían haber sido realizadas en la Clínica de Operatoria 4to año, de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, confeccionadas hasta el año 2009, asegurando una longevidad de 2 años como mínimo.
- Las restauraciones a estudiar fueron caras oclusales de piezas posteriores, que no excedan más de un tercio de la distancia intercuspídea.

Criterios de Exclusión:

- Restauraciones que se clasificaron como Bravo o Charlie según los Criterios Ryge modificados ⁽⁶⁰⁾ (ver anexo 3).
- Pacientes que consumían fármacos que probadamente producen alteraciones en el flujo salival, como antidepresivos, narcóticos, diuréticos, antihistamínicos, antihipertensivos, antieméticos y diuréticos ⁽¹⁹⁾.
- Pacientes bajo tratamiento con colutorios y/o geles de clorhexidina u otro antiséptico bucal (cuyo compuesto activo sea cloruro de cetilpiridino, triclosán, hexetidina, xilitol y sales de zinc como cloruro de zinc, citrato de zinc y sulfato de zinc) y/o pastas dentales con concentraciones de flúor mayor o igual a 2500 ppm de ión flúor durante los últimos tres meses, mediante declaración del paciente.
- Pacientes bajo terapia antibiótica en los últimos tres meses.
- Pacientes en tratamiento con fármacos inmunosupresores (corticoides).
- Pacientes clasificados según la American Society of Anesthesiologic como

ASA III, los cuales son pacientes con enfermedad sistémica grave, pero no incapacitante, como por ejemplo cardiopatía severa, diabetes mellitus no compensada acompañada de alteraciones orgánicas vasculares sistémicas, insuficiencia respiratoria de moderada a severa , angor pectoris, infarto agudo al miocardio antiguo, etc.

- Pacientes portadores de aparatos protésicos removibles o fijos.
- Pacientes portadores de aparatos ortodóncicos fijos o removibles, planos de relajación o cualquier artefacto acrílico.
- Pacientes que consumían goma de mascar cuatro o más días a la semana⁽⁶¹⁾.
- Pacientes con dificultades motrices que les impidiera realizar su propia higiene dental.

2) Proceso de Consentimiento Informado

A cada paciente seleccionado se efectuó lectura del Consentimiento Informado (ver anexo 2), en cual se explicó el propósito del estudio, el procedimiento a realizar, duración del mismo, los riesgos y beneficios de participar en el proyecto, dejando en claro que su participación es voluntaria, que puede rehusar o retirarse en cualquier momento sin perjuicio alguno.

Pasos en la toma de Consentimiento Informado

- I. Se invitó a los pacientes seleccionados a ser parte de la investigación clínica.
- II. Se les explicó lo que involucraba la investigación.
- III. Se leyó y explicó en forma detallada el formulario de Consentimiento Informado
- IV. Se entregó una copia en forma escrita para que el paciente pudiera revisarla y pensar en su decisión.
- V. En caso de aceptar se firmó el documento por todas las partes involucradas: paciente, testigo e investigador.

3) Procedimiento

El procedimiento fue realizado por dos operadores. El operador N°1 seleccionó a los pacientes, completó las ficha clínica y el consentimiento informado. El operador N°2 realizó la toma de muestras.

A cada paciente se le realizó un Cariograma utilizando el programa Cariogram Versión 2.01. para determinar su riesgo cariogénico. Se seleccionaron aquellos que poseían un alto riesgo.

Se realizó un examen bucal después de las 11 AM y las 13:00 hrs, para dar tiempo a la reorganización del biofilm después del cepillado matutino y se les enseñó una técnica de cepillado común para todos. La técnica de cepillado fue la técnica de Bass modificada ⁽⁶²⁾.

Tanto la selección de las restauraciones como la enseñanza de la técnica de higiene fue realizado por un operador, previamente calibrado bajo los criterios Ryge y con un mínimo obtenido de 0.75 de Cohen's Kappa.

4) Toma de muestras

En una pieza posterior restaurada con resina compuesta y en la pieza sana homóloga se tomó muestras de placa dental utilizando la técnica de cubeta.

1) Toma de muestra microbiológica

Una vez seleccionado el paciente, el operador N°2 procedió a tomar la muestra microbiológica.

La placa dental depositada sobre la superficie de las restauraciones seleccionadas fueron recogidas mediante cubetas usadas para la aplicación de flúor gel tópico, las cuales se esterilizaron manteniendo las cubetas en una campana de flujo laminar y luz UV durante 30 minutos, y se cargaron con 7,5 ml con agar TYCSB(L-cistina 0,2 g/L, Bacto. Casitona 15 g/L, Extracto de levadura 5 g/L,

Sulfito de sodio 0,1 g/L, Cloruro de sodio 1g/L, Fosfato disódico 2 g/L, Acetato de sodio 20 g/L, Sacarosa 50g/L, agar 15 g/L y bacitracina 100 U/L) medio selectivo para *S. mutans* que ha sido descrito como el medio más sensible y selectivo para cultivar esta especie bacteriana ⁽²⁶⁾. Posteriormente se recortaron de manera de individualizarlas para no más de 4 piezas dentarias, inmediatamente después las cubetas fueron colocadas en placas de Petri estériles y guardadas en bolsas plásticas selladas en el refrigerador hasta su utilización. Las bolsas plásticas utilizadas también fueron esterilizadas previamente en una campana de flujo laminar y luz UV durante 30 minutos.



Fotografía N°1: Imagen de cubeta de flúor cargada con medio de cultivo TYCSB ya recortada.

Previo a la utilización de las cubetas cargadas, éstas fueron llevadas a estufa de incubación por 24 horas a 37°C para efectuar un control de calidad.



Fotografía N°2: Se observa toma de muestra de biofilm de placa bacteriana mediante la técnica de cubeta.

La toma de muestra se realizó presionando suavemente la cubeta por un minuto sobre la superficie oclusal en estudio.

2) Procesamiento Microbiológico

Luego de la toma de muestra las cubetas se depositaron en placas de Petri estériles y fueron transportadas a 4°C antes de 3 hrs. y llevadas a estufa de incubación a 37°C en microaerofilia (jarra con vela CO₂ 10%) durante 48 hrs., en el laboratorio de Microbiología Bucal del Departamento de Patología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

3) Recuento, aislamiento e identificación de *S. mutans*.

Luego de incubar durante 48 hrs se realizó el recuento de colonias compatibles con *S. mutans* según su macromorfología colonial observadas bajo lupa estereoscópica (Stemi 2000-C, Zeiss) y fuente luminosa (Schott KL1500, Zeiss). Posteriormente se realizó tinción de Gram para determinar la micromorfología celular.

El recuento de *S. mutans*, expresado en Unidades Formadoras de Colonias por cm² (UFC/cm²) se obtuvo de las cubetillas con TYCSB, según la metodología descrita por Zúñiga (2010)⁽⁴¹⁾.

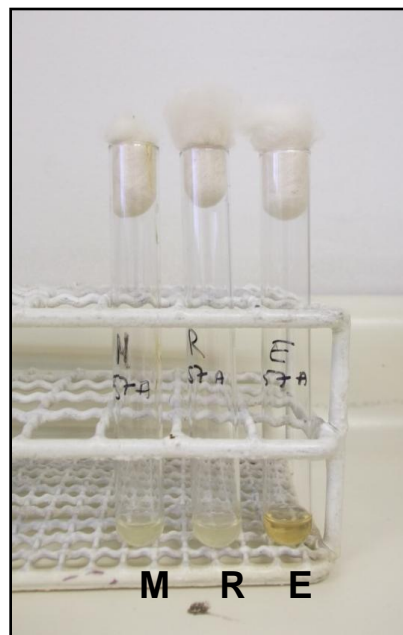
Luego del recuento, se seleccionaron tres colonias compatibles con *S. mutans*, las que fueron resembradas en placas con agar TYCSB e incubadas en jarra con vela a 37°C por 48 horas. De estas placas se seleccionaron colonias de *S. mutans* que fueron resembradas en caldo Todd- Hetwitt (Difco) e incubadas a 37°C por 48 horas, para luego someterlas a pruebas bioquímicas que permitieron identificar especies del grupo Streptococci Mutans, principalmente dirigidas a diferenciar *S. mutans* de *S. sobrinus*, pues no basta con la macromorfología para distinguir entre una y otra.

Las pruebas bioquímicas realizadas fueron la fermentación de la Rafinosa y Melobiosa y la hidrólisis de la Esculina, las tres positivas sólo para *S.mutans*.

Posterior a las 48 horas, cada caldo incubado fue centrifugado (Serofuge-centrifuge, ClayAdams) por cinco minutos a 1500 rpm, con el propósito de obtener un pellet. Éste se resuspendió en 400 µl de buffer fosfato pH 7.2 hasta obtener un M^c Farland = 5, luego de esta suspensión se inocularon 100 µl en Esculina (Brain Heart Infussion, Difco; 1% de Esculina), en Rafinosa (Tioglicolato sin dextrosa y sin indicador, Difco; 1% de Rafinosa) y en Melobiosa (Tioglicolato sin dextrosa y sin indicador, Difco; 1% de Melobiosa).

Los tubos así sembrados fueron llevados a estufa de incubación por 24 horas a 37°C.

Después de este tiempo, se agregó dos a tres gotitas de citrato férrico amoniacal al caldo con Esculina y se adicionó dos a tres gotitas de rojo fenol a los caldos con Melobiosa y con Rafinosa respectivamente.



Fotografía N°9: (M) Tubo de ensayo con medio de cultivo Tioglicolato con 1% de Melobiosa. (R) Tubo de ensayo con medio de cultivo Tioglicolato con 1% de Rafinosa. (E) Tubo de ensayo con medio de cultivo BHI con 1% de Esculina.

En el caso de la hidrólisis de la Esculina, fue positiva al tornarse el caldo rápidamente a una coloración negra y para la fermentación de Rafinosa y Melobiosa la aparición de un amarillo intenso indicaron la positividad de la prueba. Ambas situaciones confirmaron el diagnóstico de *S. mutans*.

4) Análisis de los resultados

Para el análisis estadístico se utilizó el software Systat v. 13. Para determinar la distribución de los datos se empleó el test de Shapiro Wilk. Se utilizó el test de Wilcoxon para analizar las variables.

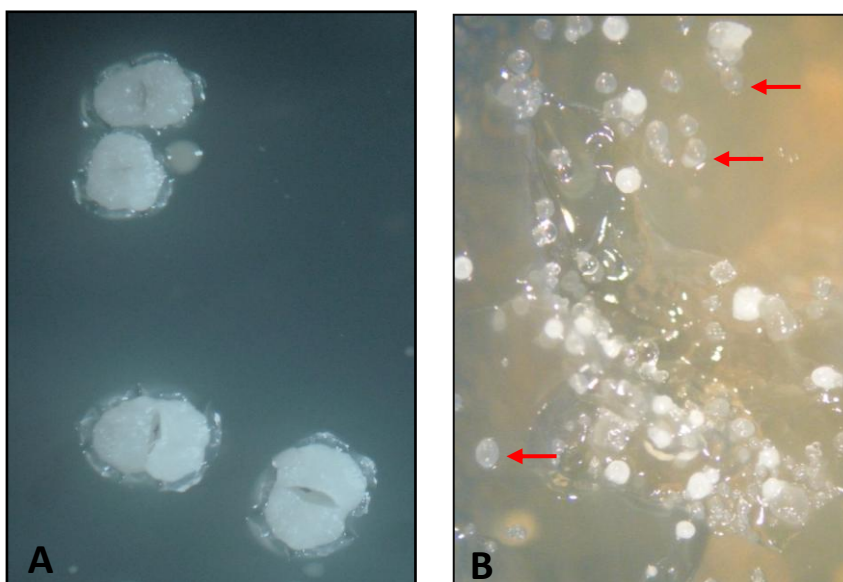
5) Información y medidas preventivas para el paciente

Una vez realizados los recuentos, se informó a cada paciente de su resultado. Ellos fueron sometidos a reforzamiento de técnicas de higiene y a la aplicación de flúor barniz cada tres meses sobre sus piezas dentarias, junto con la indicación de uso de pasta dental con concentración de ión flúor igual o superior a 2500ppm. Además de fomentar en ellos hábitos saludables, haciendo énfasis con la importancia de las visitas periódicas (cada tres meses) a la Clínica de Operatoria de 4to año, al programa de mantención de pacientes.

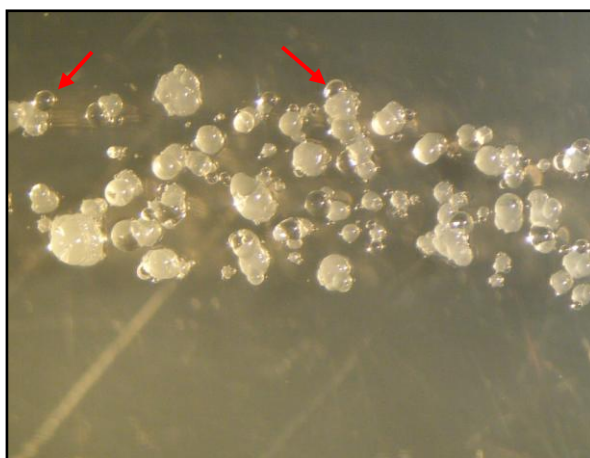
RESULTADOS

1. Identificación y aislamiento de *Streptococcus mutans*.

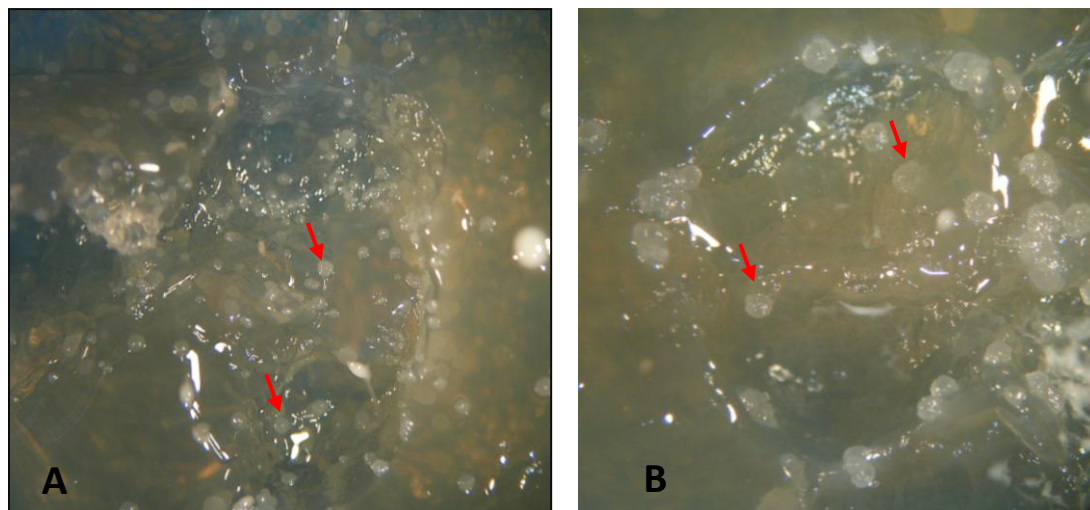
A partir del cultivo y aislamiento bacteriano, de muestras de placa bacteriana dental mediante la técnica de cubeta, se obtuvo colonias aisladas con características macroscópicas y de adherencia compatibles con *S. mutans*. En relación a la macromorfología de colonias de *S. mutans*, se observó en algunos individuos un solo tipo de morfología, mientras que en otros una mayor diversidad, encontrándose hasta 3 tipos diferentes de colonias.



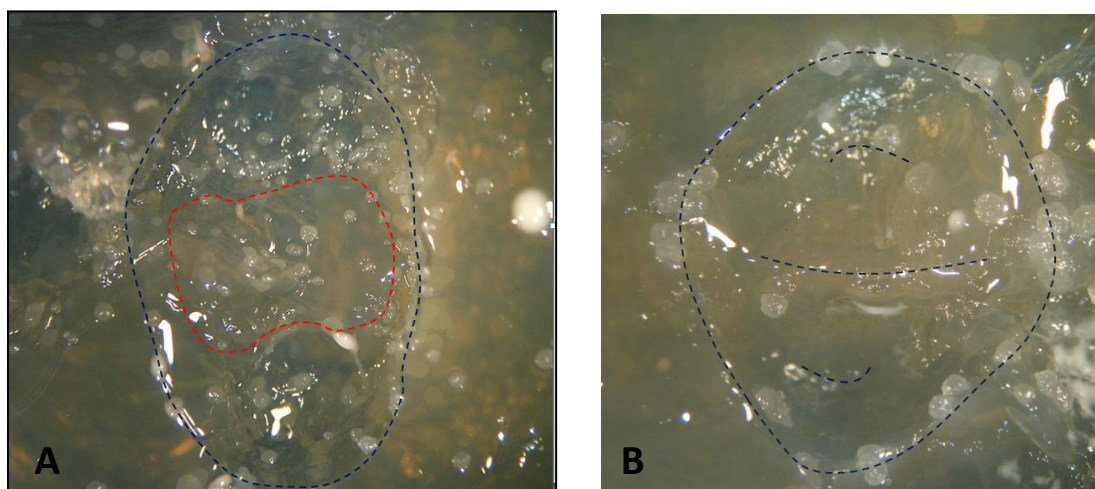
Fotografía N°5: Colonias de *S. mutans* en agar TYCSB. **(A)** Colonias blanquecinas y de superficie rugosa, nótese como rompen el agar al que se adhieren. **(B)** Obsérvese el polimorfismo colonial. Las flechas apuntan a tres colonias de diferente morfología, todas adherentes.



Fotografía N°6: Pequeñas colonias de *S. mutans* lisas, cristalinas y adherentes. Las flechas rojas indican el polisacárido dextrán depositado sobre las colonias



Fotografía N°4: Aislamiento bacteriano de muestras de placa dental mediante técnica de cubeta. **(A)** Las flechas indican colonias de *S. mutans* redondas, lisas, cristalinas y adherentes sobre la impronta de la cara oclusal de un diente 2.5 restaurado con resina compuesta. **(B)** Aislamiento bacteriano de muestras de placa dental mediante técnica de cubeta. Las flechas indican colonias de *S. mutans* en una pieza 1.4 sana



Fotografía N° 5: Esquema demostrativo, donde las líneas punteadas semejan el contorno de la cara oclusal del diente 2.5 y su restauración de resina compuesta. **(B)** Esquema demostrativo, donde las líneas punteadas semejan el contorno de la cara oclusal del diente 1.4

2. Cuantificación de *Streptococcus mutans*.

La tabla N° 2 presenta la cantidad y porcentaje de pacientes examinados con presencia y ausencia de *S. mutans*, obtenidas mediante la técnica de cubeta.

	Cantidad	Porcentaje
Total de pacientes	69	100,00 %
Pacientes con presencia de <i>S. mutans</i>	66	95,65 %
Pacientes sin presencia de <i>S. mutans</i>	3	4,34 %

Tabla N°2: Número total de pacientes examinados, pacientes con presencia de *S. mutans* y pacientes sin la presencia de éste y sus respectivos porcentajes.

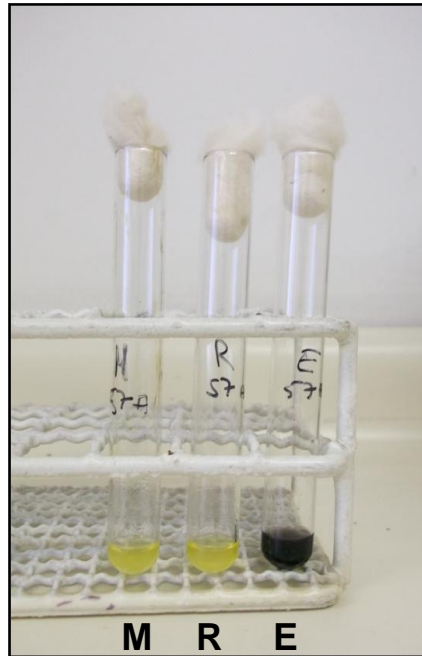
En la tabla N°3 se describe la cantidad de UFC/cm² de *S. mutans* a partir de muestras placa bacteriana de restauraciones oclusales de resina compuesta y piezas sanas obtenidas mediante la técnica de cubeta.

N° de muestra	UFC/cm ² en Resina clase 1	UFC/cm ² en Piezas sanas	COPD
1	1	2	10
2	2	28	7
3	8	4	17
4	1	0	7
5	17	6	14
6	0	5	6
7	1	0	19
8	1	1	12
9	10	9	11
10	10	3	6
11	0	0	24
12	4	2	7
13	4	1	5
14	1	2	15
15	6	1	18
16	15	10	9
17	7	2	11
18	7	4	6
19	0	0	9
20	2	4	22
21	2	5	9
22	2	2	4
23	0	3	19
24	6	2	6
25	16	3	4
26	2	1	14
27	3	1	11
28	3	1	20
29	7	3	5
30	16	5	1
31	12	10	19
32	2	6	6
33	0	0	12
34	5	2	1
35	11	0	8
36	8	8	8

37	2	2	17
38	10	16	12
39	8	5	11
40	1	3	12
41	26	19	18
42	8	5	19
43	4	2	11
44	32	7	4
45	16	43	19
46	4	1	18
47	2	2	14
48	0	4	10
49	18	12	8
50	4	3	14
51	16	3	11
52	8	2	21
53	3	2	16
54	6	6	19
55	29	24	5
56	8	11	4
57	3	1	28
58	5	1	7
59	2	2	4
60	2	0	5
61	3	3	22
62	5	2	11
63	5	1	18
64	3	3	22
65	0	1	12
66	8	4	20
67	3	0	15
68	5	3	17
69	20	15	4
	X=6,68	X=4,98	X=12,02
	D.S=6,97	D.S=7,13	D.S=6,25

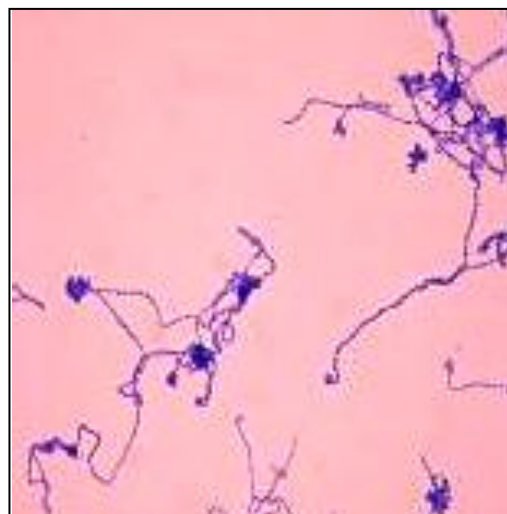
Tabla N°3: UFC/cm² de *S. mutans* en muestras de placa bacteriana en restauraciones oclusales de resina compuesta y piezas sanas, con el respectivo COPD de la muestra mediante la técnica de cubeta, X es el promedio y D.S la desviación estándar.

Las pruebas de hidrólisis de Esculina y fermentación de Rafinosa y Melobiosa, fueron positivas para todos los aislados, por lo tanto no se detectó presencia de *S. sobrinus*.



Fotografía N°10: (M) Tubo con Melobiosa luego de la adición de rojo fenol. (R) Tubo con Rafinosa luego de la adición de rojo fenol. (E) Tubo con Esculina luego de la adición de citrato férrico amoniacal.

El frotis de las colonias seleccionadas teñido con Gram mostró formas cocáceas, Gram positivo y agrupadas en cadenas, típico de bacterias del grupo *Mutans Streptococci*. (Fotografía N°8)



Fotografía N°8: Frotis de colonia seleccionada por su morfología colonial macroscópica como *S. mutans* teñido con tinción de Gram.

3. Diferencias en el recuento de *Streptococcus mutans* en restauraciones de resina compuestas y piezas sanas.

El Test Shapiro-Wilk, para determinar la forma en que se distribuyen los datos de la muestra, mostró que la distribución de los valores no era normal, ya que se obtuvo un $p < 0,05$ tal como se observa en la tabla 4.

	RESINA	SANA
N de Casos	69	69
Mínimo	0,00	0,00
Máximo	32,00	43,00
Shapiro-Wilk Statistic	0,81	0,62
Shapiro-Wilk p-Value	0,000	0,000

Tabla N°4: Tabla comparativa donde se observan, para cada variable (resina, diente sano) número de casos, mínimo, máximo y los resultados del test de Shapiro-Wilk

Se aplicó el Test de Wilcoxon, un test no paramétrico, para establecer las diferencias entre las dos muestras independientes, debido a que las variables que se comparaban no se distribuían de forma normal. El test arrojó un valor de $p < 0,0005$ lo que indica que la diferencia es estadísticamente significativa (tabla N° 5).

	RESINA	SANA
RESINA	1,000	
SANA	0,000	1,000

Tabla N° 5: resultados del test de Wilcoxon

El promedio de recuento de UFC/cm² de *S. mutans* en el grupo resina compuesta mediante la técnica de cubeta fue mayor que en el grupo piezas sanas.

A continuación se observa en el gráfico tipo caja n° 1 las UFC/cm² en restauraciones de resina compuesta. La línea negra horizontal representa la mediana cuyo valor es 4 UFC/cm². Esta línea se extiende hacia gráfico tipo caja N° 2, en donde se puede comparar con la mediana del grupo piezas sanas, representada por la línea horizontal azul, cuyo valor es de 3 UFC/cm².

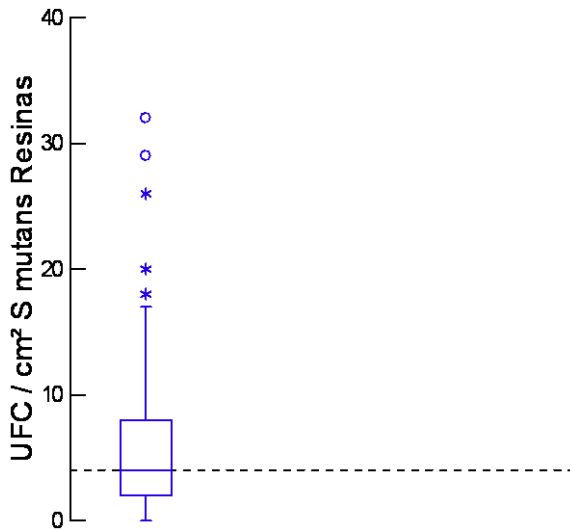


Gráfico N°1: gráfico tipo caja donde se presentan las UFC/cm² en el grupo resina compuesta. La línea continua negra representa el valor de la mediana de la muestra. Los círculos y asteriscos representan todos aquellos valores extremos, siendo los círculos los más alejados de la mediana.

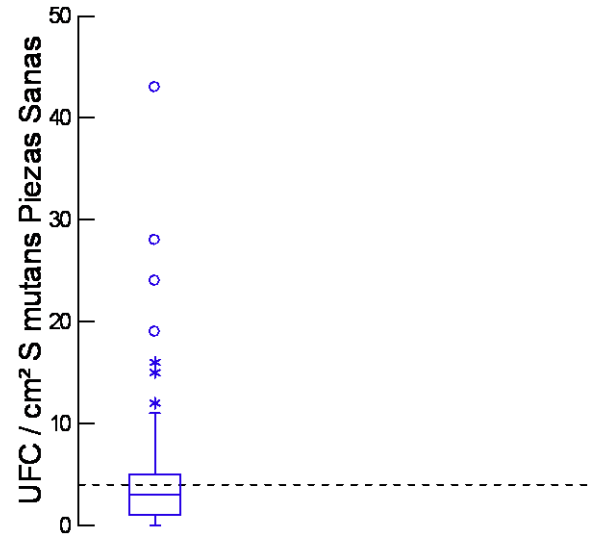


Gráfico N°2: Gráfico tipo caja donde se presentan las UFC/cm² en el grupo piezas sanas. La línea continua negra representa el valor de la mediana de la muestra. Los círculos y asteriscos representan todos aquellos valores extremos, siendo los círculos los más alejados de la mediana.

Para analizar la fuerza de la relación presente entre los recuentos de *S. mutans* y el COPD de cada paciente, se realizaron tests para obtener el valor de correlación de Pearson (r). Donde cualquier valor menor a 0,4 representa una deficiente relación.

Para el grupo resina compuesta y COPD $r = -0,22$, lo que indica que la fuerza de la relación era deficiente entre ambas variables. Entre el grupo piezas sanas y COPD se obtuvo un $r = -0,06$, indicando nuevamente una mala relación. Estos resultados se obtuvieron con un $p < 0,0005$.

DISCUSIÓN

La técnica de cubeta fue capaz de aislar *S. mutans* en un 96,65% de los pacientes a los cuales se les tomó muestras. Esto concuerda con investigaciones realizadas anteriormente, en los cuales mediante la misma técnica se logró aislar y permitió el recuento del microorganismo en estudio ⁽⁴¹⁾.

Al comparar la cantidad de UFC/cm² de *S. mutans* en restauraciones de resina compuesta y piezas sanas mediante la técnica de la cubeta, se encontraron diferencias significativas, siendo los resultados para el grupo “resina” mayor que para el grupo “diente sano”. Este resultado concuerda con la literatura que señala que restauraciones de resina compuesta acumulan más bacterias y placa bacteriana que la superficie del esmalte, “*in vitro*” e “*in vivo*” ^(30,50).

En el presente estudio las muestras de dientes con resina compuesta y diente sano fueron obtenidas de un mismo individuo, por lo que ambas muestras a comparar forman parte de un ecosistema bucal modificado por determinantes ecológicos similares. Esto se traduce en que cualquier diferencia hallada entre los recuentos microbiológicos se debe más bien a las características propias del material de obturación, que en el caso de la resina compuesta, está documentada su influencia en la colonización bacteriana y formación de biofilm sobre su superficie ^(30,47,50-52).

Es importante considerar que todas las obturaciones de las cuales se obtuvo las muestras se clasificaron como alfa según los criterios Ryge. Por lo que al considerar “óptimos” todos sus parámetros cualquier diferencia entre ambos recuentos podría asociarse a las propiedades del material de restauración.

La composición química de la superficie de las restauraciones es importante para la colonización bacteriana, particularmente cuando la superficie posee componentes que pueden resultar beneficiosos o perjudiciales para los

microorganismos ⁽⁴⁷⁾, ya que si el control de placa del paciente no es adecuado esto lo llevará a una mayor o menor propensión a formación de caries secundaria, según el tipo de restauración que éste posea.

Si bien los materiales de restauración son foco de constantes mejoras, como lo son sus capacidades mecánicas, se hace necesario poner más énfasis en el desarrollo de sus propiedades antimicrobianas, ya que éstas son muy limitadas o poco estudiadas y valoradas ⁽⁶³⁾. Incluso la resina compuesta no posee acción antimicrobiana ⁽⁴⁷⁾. Además contiene dentro de sus componentes co-monomeros que pueden llegar a estimular el crecimiento de especies bacterianas cariogénicas ⁽⁵²⁾. Las bacterias encontradas en la superficie de resinas compuestas son viables, lo que puede explicar que el recuento de este material sea mayor que en el de dientes sanos. Por otro lado con el tiempo, la contracción de polimerización y la presión producto de la carga masticatoria pueden resultar a menudo en microfiltración y fisuras de los composites la cual podría ser un nicho ecológico para microorganismos, especialmente debido a su ausencia de propiedades antibacterianas ⁽⁵³⁾.

En cuanto a la relación con el riesgo cariogénico, todos los pacientes incluídos en este estudio presentaban un alto riesgo de caries. Artículos señalan que la longevidad de la restauración se ve influenciada por el riesgo cariogénico propio del paciente, por lo que un alto riesgo de caries influirá negativamente en el desempeño de la restauración a lo largo del tiempo ⁽⁶⁴⁾. Los estudios indican también que en pacientes de alto riesgo, la resina compuesta presenta una menor longevidad en comparación con otro tipo de obturación como la amalgama. Se demostró además una mayor cantidad de caries secundarias en restauraciones de resina compuesta, todo en pacientes de alto riesgo ⁽⁶⁴⁾. Sin embargo, en pacientes con bajo riesgo cariogénico la resina compuesta presenta mejores condiciones luego de 12 años de realizada la obturación ⁽⁶⁴⁾.

Estos hallazgos podrían dar paso a posteriores investigaciones en donde se podría comparar restauraciones entre pacientes que presenten niveles de

riesgo cariogénico diferente, para así evaluar en recuento de *S. mutans* depositado sobre restauraciones y/o superficies dentales.

En este estudio se encontró que no existe relación entre el COPD y el recuento de *S. mutans* de placa dental depositada sobre restauraciones de resina compuesta y piezas sanas.

El COPD es un índice que nos permite tener una visión global del daño acumulado que posee el paciente ⁽³⁹⁾ y son diversos los factores que en conjunto provocan dicho daño, tales como factores propios del hospedero, así como también factores ambientales y socioeconómicos ⁽⁷⁾. Es por esto que la sola presencia de bacterias no determinará un COPD alto, sino que los determinantes en su conjunto. Esto explicaría el por qué no existe una relación entre el recuento de *S. mutans* a través de este método y el COPD del paciente.

La caries secundaria la responsable del 60% de fracasos de restauraciones en la práctica odontológica común ⁽⁴⁷⁾. En el estudio, al presentar todos los pacientes obturaciones de resinas oclusales clasificadas alfa según los criterios Ryge y presentar éstas un alto recuento de UFC/cm², se podría extrapolar que si tuvieran algún tipo de defecto este recuento sería mayor. Sin embargo surge la necesidad de realizar estudios longitudinales a largo plazo en donde se realicen recuentos de *S. mutans* y *S. sobrinus* en distintos tipos de restauraciones, para así determinar qué porcentaje de ellas desarrollan caries secundaria en el futuro.

Finalmente es importante recordar que la caries es una enfermedad multifactorial, en donde una serie de determinantes intervienen en el desarrollo de ésta, por lo que el recuento de *S. mutans* sólo es uno de los tantos y diversos factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad y por sí solo no es capaz de predecir futuras lesiones. Los hallazgos del presente estudio permitirán abarcar el riesgo cariogénico desde una perspectiva más local, permitiendo tomar

medidas preventivas ajustadas al diente en particular, en especial realizar un buen acabado y pulido del material de restauración, como asimismo establecer un régimen regular de citas al odontólogo para evaluar la efectividad de dichas medidas en el tiempo. Esto sin dejar de lado otras medidas locales como la realización de terapias remineralizantes cotidianas, terapias antibacterianas (clorhexidina) cuando las condiciones del medio bucal lo indiquen, de modo de atender las necesidades particulares del paciente en cada etapa de su vida.

CONCLUSIONES

Al finalizar esta investigación se puede concluir que:

1. Se aislaron y recuperaron *Streptococcus mutans* a partir de muestras de placa bacteriana dental en dientes con restauraciones oclusales de resina compuesta y dientes permanentes sanos con la técnica de cubeta
2. No existe relación entre los recuentos de *Streptococcus mutans* de placa dental depositada sobre dientes con restauraciones oclusales de resina compuesta, diente sano y el COPD del paciente.
3. Existen diferencias significativas en el recuento de *Streptococcus mutans* en restauraciones oclusales de resina compuesta y en piezas permanentes sanas, siendo mayor en restauraciones de resina compuestas a partir de muestras de placa bacteriana dental obtenidas mediante la técnica de cubeta.

SUGERENCIAS

- Realizar este estudio controlando variables de rango etario, sexo, nivel socioeconómico.
- Comparar recuento de *S. mutans* en pacientes con diferente riesgo cariogénico según cariograma, utilizando esta técnica
- Comparar restauraciones de un mismo material que posean distinto criterio Ryge mediante la técnica de la cubeta.
- Aislar y realizar recuento de *S. mutans* a partir de placa bacteriana dental en otros tipos de restauración, tales como vidrio ionómero, incrustaciones metálicas y estéticas, usando la técnica de cubeta.
- Estudiar otro tipo de materiales también de tipo adhesivo como los sellantes, ya que la adhesión de microorganismos a éstos no ha sido muy investigada. Al comparar recuentos “*in vivo*” de microorganismos entre sellantes y piezas sanas, se podría evaluar la verdadera utilidad del sellante como medida preventiva, ya que sus componentes y/o estado en que se encuentren podrían favorecer el crecimiento bacteriano.
- Esta investigación deja abierta la posibilidad de utilizar la técnica de cubeta como un método de aislamiento y recuento bacteriano de otras especies bacterianas encontradas en la placa dental como *S. sobrinus* modificando el medio de cultivo que se utiliza en las cubetillas.
- Realizar un estudio longitudinal para comparar la muestra obtenida sobre una restauración en más de una ocasión y así poder establecer la reproductibilidad de la técnica de cubeta.

- Realizar un estudio prospectivo y reevaluar las restauraciones con alto porcentajes de *S. mutans* encontradas en este estudio, para poder observar cuál de ellas desarrolló caries secundarias y así determinar el valor predictivo de la técnica.
- Comparar recuentos entre restauraciones de resinas que posean en su composición distintos tipos de monómeros o tamaño de partículas de relleno mediante el método de cubeta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- (1) <http://www.minsal.gob.cl/portal/url/item/9c81093d17385cafe04001011e017763.pdf>
Revisada el 27/12/2011
- (2) Anderson MH, Molvar MP, Powel LV. "Treating Dental Caries as an Infectious Disease." Operative Dentistry. 1991; 16: 21-28.
- (3) Bernimuolin, JP. "Recent concepts in plaque formation." J Clin Periodont 2003; 30:7-9.
- (4) EmilsonCG, KrasseB. "Support for and implications of the specific plaque hypothesis." J Dent Res 1993;93:96-104
- (5) Moncada, C. Urzúa, I. Cariología Clínica .Bases Preventivas y Restauradoras. Santiago, Chile, 2008. Intro., pp. 15.
- (6) Matalon S, Slutzky H, Weiss EI. Surface antibacterial properties packable resin composites: Part I. Quintessence Int 2004;35:189-193
- (7) Fejerskov, O. "Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral healthcare." Caries Res 2004;38:182-191
- (8) Fejerskov, O. "Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease." Communty Dent Oral Epidemiol 1997; 25:5-12.
- (9) Chaussain-Miller, C. Fioretti, F. Goldberg, M. Menashi, S. " The Role of Matrix Metaloproteinases (MMPs) in human caries". J Dent Res 2006; 85:22-32.
- (10) Li, J. Helmerhost, E. Leone, C. Troxler, R. Yaskell, T. Haffajee, A. Socransky, S. Oppenheim F. "Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm." Jof Applied Microbiol 2004; 97: 1311-1318.
- (11) Kidd, E. "The diagnosis and management of the "early" carious lesion in permanent teeth." Dent Update 1984; 11: 69-70
- (12) Balakrishnan, M. Simmonds, R. Tagg, J. (2000). "Dental Caries is a preventable infectious disease." Australian Dental Journal 45:235-245.

- (13) Loesche, WJ. "Chemotherapy on dental plaque infections." Oral Sciences Reviews 1976; 9:63-107.
- (14) Marsh, P. "Are Dental disease examples of ecological catastrophes?." Oral Microbiol 2003; 149: 279-294.
- (15) Marsh, P. "Dental plaque as a biofilm and microbial community implications for health and disease." BMC Oral Health 2006; 1: 14-21.
- (16) Marsh, P. Branshaw, D. Physiological approaches to the control oral biofilms. Adv Dent Res 1997; 11:176-185,
- (17) Negroni. Microbiología Estomatológica. Panamericana (eds), 2009, pp. 235-245
- (18) Yoshida, K. Tanagawa, M. Matsumoto, S. Yamada, S. Astuta, M. "Antibacterial activity on resin composites with silver-containing materials." Eur J Oral Sci 1999; 107: 290-296.
- (19) Fejerskov, O. Kidd, A. Dental Caries: The disease and its clinical management. Blackwell. 2003
- (20) Huerta, J. Gajardo, M. Silva, N. Gómez, L. Palma, P. Zillmann, G. Manual de Laboratorio Microbiológico Clínico en Odontología. Santiago, Chile, 2010. Cap. 9, pp. 103-113. Cap. 10, pp. 168-193
- (21) Moncada, C. Urzúa, I. Cariología Clínica. Bases Preventivas y Restauradoras. Santiago, Chile, 2008. Cap. 3, pp. 51-72
- (22) Hamada, S. Slade, H. "Biology, Immunology, and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*." Microbiol Rev 1980; 44:331-384
- (23) Coykendall, A. "Classification and Identification of the Viridans Streptococci." Clin Microbiol Rev 1989; 2:315-328.
- (24) Brambilla, E. García, F. Strohmenger, L. "Principles of diagnosis and treatment of high caries risk subjects." Pediatr Dent 2000; 44(3):507-539.
- (25) Liébana, J. Microbiología Oral. McGraw-Hill (eds), 1995. Cap. 15, pp. 220-239.

- (26) Stanke, F. Urzúa, I. Marine, A. Nuevas Estrategias en Cariología. 2° Edición. Universidad de Chile. 2001. Cap.2, pp. 16-30.
- (27) Seki, M. Yamahita, Y. Torigoe, H. Tsuda, H. Maeno, M. "Effect of mixed mutans streptococci colonization on caries developmet." Oral Microbiol Inmunol 2006; 21:47-52.
- (28) Schaeken, M. Van Der Hoeven, J. Franken, H. "Comparative recovery of Streptococcus Mutans on Five Isolation Media, including a New Simple Selective Medium." J Dent Res 1986 ; 65(6): 906-908
- (29) Jordan, H. Laraway, R. Snirch, R. Marmel, M. "A simplified diagnostic sytem for cultural detection and enumeration of Streptococcus Mutans." J Dent Res 1987; 66:57-61.
- (30) Banas, J. "Virulence factors of Streptococcus mutans." Frontiers in Bioscience 2004;9:1267-1277
- (31) Shahal, Y. Steinberg, D. Hirschfeld, Z. Bronshtyn, M. Kopolovic, K. "In vitro bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restotarative materials". J Oral Rehabil 1998;25:52-58.
- (32) Paes Leme, A. Koo, H. Bellato, C. Bedi, G. Cury, J. "The role of sucrose in cariogenic dental biofilms formation- New insight." J Dent Res 2006; 85: 878-887
- (33) De Soet, JJ. Val Loveren, C. Lammens, AJ. Pavicic, M. Homburg, CH. Cate, JM. De Graaff, J. "Differences in cariogenicity between fresh isolates of Streptococcus sobrinus and Streptococcus mutans." Caries Res 1991;25:116-122.
- (34) Okada, M. Soda, Y. Hayashi, F. Doi, T. Suzuki, J. Miura, K. Kozai, K. "Longitudinal study of dental caries incidence associated with Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus in pre-school children." J of Med Microbiol 2006; 54:661-665
- (35) Margherita Fontana, Domenick T. Zero Assessing Patients' caries risk, journal of the american dental association september 1, 2006, vol 137, NO 9;1231-1239
- (36) Burt, B. "Concepts of risk in dental public health. " Community Dent Oral Epidemiol 2005;33:240-247.
- (37) Levertt, D. Featherstone, J. Proskin, H. Adair, S. Eisenberg, A. Mundorffshrestha, S. Shields, C. Shaffer, C. Billings, R. "Caries Risk Assessment a Cross-sectional Discrimination Model." J Dent Res 1993; 72:529-537.

- (38) *Moncada, C. Urzúa, I. Cariología Clínica .Bases Preventivas y Restauradoras. Santiago, Chile, 2008. Cap. 1, pp. 17-20.*
- (39) *Ditmyer Marcia, Dounis Georgia, Mobley Connie, Schwarz Eli, "Inequalities of caries experience in Nevada youth expressed by DMFT index vs. Significant Caries Index (SiC) over time" BMC Oral Health 2011, 11:12*
- (40) *Wallman C, Krasse B. A simple method for monitoring mutans streptococci in margins of restorations. J Dent 1993;21:216-219.*
- (41) *Zúñiga P. Evaluación de la Técnica de Cubeta como un método para el aislamiento y recuento de Streptococcus mutans a partir de muestras de placa dental en restauraciones de resina compuesta y amalgama. Santiago, Chile: Universidad de Chile, Facultad de Odontología; 2010.*
- (42) *Ono M, Nikaido T, Ikeda M, Imai S, Hanada N, Tagami J, Matin K. Surface properties of resin composite materials relative to biofilm formation. Dent Mater J. 2007 Sep;26(5):613-22.*
- (43) *Lindquist B, Emilson CG, Distribution and Prevalence of Mutans Streptococci in the Human Dentition. J Dent Res 1990;69:1160*
- (44) *Meiers, J.C., Schachtele, C.F Fissure Removal and Needle Scraping for Evaluation of the Bacteria in Oclussal Fissures of Human Teeth, J Dent Res 63:1051-1055*
- (45) *Dijkman GE, Arends J. Secondary caries in situ around fluoride-releasing light-curing composites: A quantitative model investigation on four materials with a fluoride content between 0 and 26 vol%. Caries Res 1992;26:351-257*
- (46) *Mjor I, Moorhead J. Reasons for replacement of restorations in permanent teeth in general dental practice. Int Dent J 2000;50:361-366*
- (47) *Auschill, TM. Arweiler, NB. Breex, M. Reich, E. Sculean, A. N etuschil, L. "The effect of dental restoratives materiales on dental biofilm." Eur Oral Sci 2002; 110:48-53.*
- (48) *Kawai ,K. Takaoka, T. "Inhibition of bacterial and glucan adherence to various light-cured fluoride-releasing restorative materials." J Dent 2001;29:119-122.*

- (49) Hervás-García A, Martínez-Lozano MA, Cabanes-Vila J, Barjau-Escribano A, FosGalve P. Composite resins. A review of the materials and clinical indications. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2006;11:E215-20
- (50) Skjorland, K. Sonju, T. "Effect of sucrose rinses on bacterial colonization on amalgam and composite." *Acta Odontol Scand* 1986; 40:193-196.
- (51) Svanberg M, Mjor I, Ostavik D. Mutans Streptococci in Plaque from Margins of Amalgam, Composite and Glass ionomer Restorations. *J Dent Res* 1990;69:861-864
- (52) Hansel, C. Leyhausen, G. Mai, E. Geurtsen, W. "Effects of various resin composite (co)monomers and extract on two caries associated microorganisms in vitro." *J Dent Res* 1998; 77: 60-67.
- (53) Mo SS, Bao W, Lai GY, Wang J, Li MY. The microfloral analysis of secondary caries biofilm around Class I and Class II composite and amalgam fillings. *BMC Infect Dis.* 2010 Aug 17;10:241.
- (54) Kidd, E. "Secondary Caries." *Int Dent J* 1992; 42: 127-138.
- (55) Gonzales C, Li Y, Noblin T, Gregory R, Kafrawy A, Stookey G. "Detection of Mutans Streptococci in Secondary Carious Lesions Using Immunofluorescent Techniques and Confocal Laser Scanning Microscopy." *Caries Res* 1995; 29:198-203.
- (56) Karinka-Kouma, A. Dionysopoulos, P. Koliniotou-Koubia, E. Kolokotronis, A. "Antibacterial properties of denting bonding systems, polyacid-modified composite resins and composite resin." *J Oral Rehabil* 2001; 28:157-160.
- (57) Thomas, R. van der Mei, H. van der Veen, M. De Soet, J. Huysmans, M. "Bacterial composition and red fluorescence of plaque in relation to primary and secondary caries next to composite: an in situ study." *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23:7-13.
- (58) Gratthal D, Hoszek A, Zhao X. Evaluation of a simplified method for site-specific determination of mutans streptococci levels. *Swedish Dental Journal* 1996;20:15-20

- (59) Kleimberg I. *A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causations: An alternative to Streptococcus mutans and the specific-plaque hypothesis.* *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:108-125
- (60) Ryge G, Jendresen M, Glantz P, Mjor I. "Standardization of Clinical Investigators for Studies of restorative Materials". *Swed Dent J* 1981;5:235-239
- (61) Zibell S, Mandansky E." *Impact of gum chewing on stress levels: on line self – perceptions research study.*" *Curr Med Res Opin* 2009;25:1491-1500.
- (62) Poyato F, Segura E, Bullon F. "Comparison of modify Bass technique with normal toothbrushing practices for efficacy in supragingival plaque removal. *Int J Dent Hyg* 2003;1:110-117.
- (63) Gama-Teixeira A, Simionato MR, Elian SN, Sobral MA, Luz MA. *Streptococcus mutans-induced secondary caries adjacent to glass ionomer cement, composite resin and amalgam restorations in vitro.* *Braz Oral Res.* 2007 Oct-Dec;21(4):368-74.
- (64) N.J.M. Opdam*, E.M. Bronkhorst, B.A.C. Loomans, and M.-C.D.N.J.M. Huysmans. "12-year Survival of Composite vs. Amalgam Restorations" *J Dent Res* 2010;89(10):1063-1067.

ANEXOS

ANEXO N°1

Universidad de Chile
Facultad de Odontología
Departamento de Odontología Restauradora.
Departamento Patología.

N°MUESTRA _____

FICHA CLINICA

Nombre _____

RUT _____

Edad _____ Género _____

Teléfono _____ Celular _____ Otro _____

1. Antecedentes Sistémicos generales y farmacológicos

2. Higiene Bucal

a) Frecuencia de cepillado ___ Nunca ___ 1 ___ 2 ___ 3 o más

b) Uso de otros elementos ___ Seda o hilo dental ___ Colutorios ___ No

usa c) Hora Último Cepillado _____

d) COPD _____

3. Examen Bucal

N° de Pieza Dentaria	RESINA COMPUESTA	SANA	AMALGAMA	alfa	Bravo	Charlie
1.8						
1.7						
1.6						
1.5						
1.4						
2.8						
2.7						
2.6						
2.5						
2.4						
4.8						
4.7						
4.6						
4.5						
4.4						
3.8						
3.7						
3.6						
3.5						
3.4						

4. Toma de muestra

a) Hora _____

b) Fecha _____

ANEXO N°2

Universidad de Chile
 Facultad de Odontología
 Departamento de Odontología Restauradora, Operatoria Clínica 4º año.
 Departamento Patología Área de Microbiología Bucal

Consentimiento Informado

Título del Protocolo: Comparación de recuento de *Streptococcus mutans* en restauraciones de resina compuesta y piezas permanentes sanas utilizando el método de cubeta.

Investigador Principal: Prof. Dr. Gustavo Moncada C / Dr. Patricio Vildósola Grez

Sede de Estudio: Facultad de Odontología, Universidad de Chile – Olivos 943 – Santiago.

Nombre del Paciente:

Yo Gustavo Moncada Cortés docente de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación acerca la bacteria que produce la *caries*, la cual es una de las enfermedades de mayor frecuencia en la población humana. Les proporcionaré información y los invitaré a ser parte de ella. No tiene que decidir hoy si lo harán o no. Antes de hacerlo pueden hablar acerca de la investigación con cualquier persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido la Investigación y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme este formulario.

Los aspectos de este formulario tratan los siguientes temas: Justificación de la Investigación, Objetivo de la Investigación, Tipo de Intervención y procedimiento, Beneficios y Riesgos Asociados a la Investigación y Aclaraciones.

Justificación de la Investigación

La caries dental es uno de los principales problemas de salud bucal a nivel mundial, afectando entre el 60% a 90% de la población escolar y a la gran mayoría de los adultos. Su origen es infeccioso y se asocia con la presencia de altas poblaciones de bacterias adheridas sobre los dientes. La bacteria más relacionada con esta enfermedad es el *Streptococcus mutans*, la cual tiene la capacidad de los transformar los azúcares que comemos en ácidos que debilitan nuestros dientes, facilitando a que la caries se instale sobre ellos. Es importante considerar que esta bacteria no solo produce caries en dientes sanos sino también en dientes con obturaciones (“tapaduras”), siendo la principal causa de los fracasos de estos tratamientos.

Para el estudio de esta bacteria se recogen muestras tanto de la superficie de los dientes y sus obturaciones como de saliva. Esta información en conjunto con el conocimiento de hábitos de higiene y de alimentación, sirve para predecir el riesgo de contraer futuras caries como de asegurar el éxito de futuros tratamientos odontológicos.

Objetivo de la Investigación

La presente investigación tiene por objetivo comparar el recuento de *Streptococcus mutans* sobre piezas sanas y obturadas con resina compuesta mediante un innovador método.

Beneficio de la Investigación.

Usted tendrá el beneficio de poder someterse a un examen de salud bucal donde podrá conocer el estado actual de boca, y evaluar así la necesidad de posibles tratamientos.

Aprenderá una correcta técnica de higiene en relación a su edad y condición psicomotora.

Conocer la cantidad *Streptococcus mutans* que usted posee, nos permitirá dirigir terapias preventivas y futuros tratamientos según su riesgo individual, permitiendo así un menor porcentajes de fracasos.

Una vez obtenidos los resultados y si su recuento de bacterias es superior o igual 10^5 Unidades Formadoras de Colonia / cm^2 (unidad de medida que determina la cantidad de bacterias), será considerado una paciente de alto riesgo, por lo que debería someterse:

1. A una terapia de control de higiene, mediante la enseñanza de una correcta técnica de cepillado y una profilaxis (limpieza dentaria)
2. Aplicación de barniz de flúor cada tres meses e indicación de pasta dental con concentración mayor o igual a 2500 ppm de ión flúor para uso diario.
3. Controles cada 3 meses.

Todo esto sin ningún costo para Usted. Además se le obsequiara una pasta fluorada, una seda dental y un cepillo para su correcta higiene personal.

Tipo de Intervención y Procedimiento.

Si usted decide participar se le realizará en una primera sesión un examen bucal y se le enseñara una técnica de higiene.

Para la toma de muestras de placa dental, se utilizará una cubetilla, que es una especie de receptáculo pequeño, del ancho y largo de una pieza dentaria, que en su interior contiene una gelatina que permite la adherencia y crecimiento de la bacteria en estudio.

La obtención de la muestra se llevara a cabo presionando suavemente por un minuto esta cubetilla sobre sus piezas dentarias.

Lugar donde se realizará la intervención.

El Procedimiento se llevará a cabo durante Operatoria Clínica de 4to año, ubicada en la Clínica Odontológica de la Facultad de Chile, cuya dirección es Av. La Paz 750, comuna de Independencia. Durante los lunes de 8 horas a 13 horas y los miércoles de 14 horas a 17 horas.

Riesgo de la Investigación.

Usted no correrá ningún riesgo mediante y posterior al procedimiento de la investigación debido a que el material gelatinoso de la cubetilla sólo entrará en contacto con su pieza dentaria, la cual tampoco sufría daño alguno debido a que la presión ejercida es mínima y el material no es perjudicial para la misma.

Aclaraciones

- La participación es completamente voluntaria
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la intervención
- Si usted decide puede retirarse cuando lo desee.
- Las muestras obtenidas serán de exclusiva utilización para este estudio.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable.
- La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de pacientes, será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores, para esto, no se utilizará sus nombres sino un sistema de código que enumerará las muestras.

Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, puede si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa al documento.

Carta de Consentimiento Informado

A través de la presente, declaro y manifiesto, libre y espontáneamente y en consecuencia acepto que:

1. He leído y comprendido la información anteriormente entregada y que mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. He sido informado /a y comprendo la necesidad y fines de ser atendido.
3. Tengo conocimiento del procedimiento a realizar.
4. Conozco los beneficios de participar en la Investigación
5. El procedimiento no tiene riesgo alguno para mi salud.
6. Además de esta información que he recibido, seré informado/a en cada momento y al requerimiento de la evolución de mi proceso, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria y al criterio del investigador.
7. Autorizo a usar mi caso para investigación y para ser usado como material audiovisual en clases, protegiendo mi identidad

Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento diagnóstico pertinente, PUESTO QUE SE QUE ES POR MI PROPIO BENEFICIO

- Nombre del Paciente: _____
- RUT: _____
- Firma: _____
- Fecha: _____

- Nombre Testigo : _____
- RUT: _____
- Firma: _____
- Fecha: _____

Sección a llenar por el Investigador Principal

He explicado al Sr(a) _____ la naturaleza de la investigación, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para la realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

En caso de cualquier duda puede acudir a Av. La Paz 571, Facultad de Odontología de Universidad de Chile, Área de Operatoria Dental los días Lunes de 8 a 13 horas o Miércoles de 14 a 19 horas o comunicarse con Patricio Vildósola a los números 3152281 o 07-8873845

En caso que Usted tenga cualquier otro tipo de duda con respecto al proyecto en el cual participara puede dirigirse al Señor Presidente del Comité de Etica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile Dr. Juan Cortés con dirección en Sergio Livingstone 943 comuna Independencia.

ANEXO N°3

Criterios Clínicos Generales Ryge/USPHS

Alfa	La restauración presenta excelente condición y se espera que proteja al diente y los tejidos adyacentes
Bravo	La restauración es aceptable pero muestra uno o más parámetros defectuosos. Será necesario su reemplazo en el futuro
Charlie	La restauración es inaceptable y necesita reemplazo

Criterios Clínicos Ryge/USPHS Específicos por Parámetro

	Alfa	Brav	Charlie
Color	La restauración concuerda en color y traslucidez con la estructura dentaria adyacente.	La diferencia en color y traslucidez entre restauración y diente están dentro de un rango aceptable.	La diferencia en color y traslucidez entre restauración y diente están fuera de un rango aceptable.
Adaptación Marginal	La sonda no se retiene al pasarla a través de la interfasediente- restauración.	La sonda penetra en un surco cuando pasa por la interfasediente- restauración.	Se observa dentina o material de base expuesto en el margen de la restauración.
Anatomía	El contorno de la restauración sigue el contorno del diente.	El contorno de la restauración no sigue el	La restauración presenta sobrecontorno en proximal.
Rugosidad	La superficie de la restauración no presenta defectos.	La superficie de la restauración presenta Defectos superficiales leves.	La superficie de la restauración presenta Defectos superficiales severos.
Tinción Marginal	No hay tinción en el margen.	Hay tinción de menos del 50% del margen.	Hay tinción de más del 50% del margen.
Tinción del Material	No hay tinción del material o la tinción es igual en el diente y la restauración.	Hay mas tinción en la restauración que en el tejido dentario circundante	La tinción no puede ser eliminada mediante pulido (tinción de la masa de material)
Contacto	Normal	Suave	Sin contacto
Sensibilidad	No hay sensibilidad cuando se sopla con la jeringa triple por 2 seg. a 1 cm de distancia de la restauración, con la superficie vestibular de los dientes vecinos cubiertos con una gasa.	Hay sensibilidad cuando se sopla con la jeringa triple por 2 seg. a 1 cm. de distancia de la restauración, con la superficie vestibular de los dientes vecinos cubiertos con una gasa, y termina al retirar el estímulo.	Hay sensibilidad cuando se sopla con la jeringa triple por 2 seg. a 1 cm. de distancia de la restauración, con la superficie vestibular de los dientes vecinos cubiertos con una gasa, y no termina al retirar el estímulo.
Caries Secundaria	No hay caries secundaria.		Hay caries secundaria.
Brillo	La superficie de la Restauración es brillante.	La superficie de la restauración es opaca.	La superficie de la restauración es opaca y estéticamente desagradable.

- Ryge, G. "Evaluating the clinical quality of restorations." *J Am Dent Assoc* 1972; 87:369-377.
- Ryge, G. Jendresen, M. Glantz, P. Mjor, I.. Standardization of Clinical Investigators for Studies of restorative Materials." *Swed Dent J* 1981; 5:235-239.