



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

**Estudio clínico comparativo de recuento de
Streptococcus mutans antes y después de la
aplicación de sellante.**

Natalia Paz Acuña Zepeda

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dr. Patricio Vildósola Grez**

**TUTORES ASOCIADOS
Dra. Patricia Palma Fluxá
Prof. Dr. Gustavo Moncada Cortés**

**Santiago – Chile
2013**

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Eduardo y Cecilia, por su esfuerzo, dedicación, apoyo, paciencia, confianza y sobre todo, su amor incondicional. Por hacerme la persona feliz que soy hoy. Este logro es compartido, sin ustedes a mi lado no habría sido posible.

A mi hermano Matías por tocar la batería como yo siempre quise hacerlo y por ser el mejor músico del mundo. Te amo.

Al Doctor Patricio Vildósola por su ayuda y apoyo durante este proceso, por compartir sus conocimientos conmigo, ya que la mayor parte de las cosas que aprendí en esta carrera sobre Operatoria Dental, fue con usted.

A la Dra. Patricia Palma por entregarme su tiempo y conocimientos en el laboratorio de microbiología y por poner toda su dedicación en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Patricio Moncada por su buena disposición y ayuda cuando lo necesité.

A mis abuelos, que con toda su ternura y sabiduría me apoyaron y guiaron durante toda mi vida, pilar fundamental para llegar a conseguir hoy este nuevo logro.

A Javiera Antivilo por acompañarme durante estos 7 años, por todas las risas y llantos que compartimos, por las largas noches de estudio, por ser mi traductora inglés- español oficial, por ser mi amiga fiel y quererme tanto.

A todos los buenos amigos que conocí en esta facultad, en especial a Leonardo González, Sebastian Véliz, Karen Alfaro, Carmen meza, Nicolás Canales, Jorge Osores, Javiera Aguirre, Marcela Muñoz. Sin ustedes, no habría sido tan agradable y divertido este camino. Gracias por su apoyo y buenos deseos.

A Sergio por su paciencia, apoyo y enorme cariño.

ÍNDICE

Resumen.....	5
Introducción.....	7
Marco teórico.....	9
1. Caries dental.....	9
1.1 Etiología de la caries dental.....	11
1.2 Microbiología de la caries dental.....	13
1.2.1 Biofilm.....	16
1.2.2 Grupo Mutans Streptococci.....	17
1.2.2.1 <i>Streptococcus mutans</i>	18
1.2.2.1.1 Métodos de aislamiento y recuento de <i>Streptococcus mutans</i> en muestras de biofilm.....	20
1.3 Mecanismos de prevención de la enfermedad de caries: Sellantes de puntos y fisuras.....	22
Hipótesis.....	27
Objetivos.....	27
Materiales y métodos.....	28
Resultados.....	36
Discusión.....	45
Conclusión.....	48
Sugerencias.....	49
Referencias bibliográficas.....	50
Anexos.....	54

RESUMEN

Introducción

En el biofilm dental se encuentran diversas bacterias, de las cuales *Streptococcus mutans* se considera la de mayor potencial cariogénico. El objetivo del presente estudio es saber si la aplicación de sellante de resina en surcos profundos de dientes posteriores permanentes de pacientes adultos de alto riesgo cariogénico, disminuye el recuento de UFC/cm² de *Streptococcus mutans* sobre el área de surcos oclusales del diente.

Materiales y métodos

Se seleccionaron 38 pacientes (edad promedio 24 años) entre marzo y junio de 2013, de la clínica de Operatoria, Facultad de Odontología, Universidad de Chile,. En cada paciente, un operador tomó muestra de biofilm de la superficie oclusal de un diente posterior permanente con indicación de sellante, mediante técnica de cubeta (impresión de cara oclusal del diente usando cubetilla para flúor, cargada con medio de cultivo selectivo para *Streptococcus mutans*). Luego aplicó sellante en surcos del mismo diente. 30 días después tomó otra muestra con técnica de cubeta, sobre el sellante oclusal. Las muestras fueron procesadas en laboratorio de Microbiología Bucal, Departamento de Patología, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Un segundo operador realizó análisis estadístico.

Resultados

Se aislaron colonias de *Streptococcus mutans* desde muestras de biofilm obtenidas mediante la técnica de cubeta, según macromorfología y adherencia al agar. Se identificaron colonias haciendo pruebas bioquímicas (hidrólisis de Esculina y fermentación de Rafinosa y Melobiosa). Se cuantificaron UFC de *Streptococcus mutans* en área de surcos de superficies oclusales de dientes posteriores permanentes, antes (T0) y después (T1) de aplicar sellante. Usando programa ImageJ®, se sacó promedio del área oclusal de molares y premolares, y del área ocupada por sellante en dichos dientes: 10% de superficie oclusal de molares es ocupada por sellante, y 9% en premolares. Se convirtieron los datos, expresándolos

en cm². Comparando los resultados (test de Wilcoxon) se determinó que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre T0 ($X=197,76$ DS=199,42) y T1 ($X=68,2$ DS=102,54).

Conclusión

En adultos jóvenes con alto riesgo cariogénico, la aplicación de sellante de resina sin flúor en surcos de dientes posteriores permanentes sanos, contribuye a reducir la cantidad de UFC/cm² de *Streptococcus mutans* sobre el área de los surcos de los dientes tratados.

INTRODUCCIÓN

La caries dental es una de las enfermedades más comunes e importantes que afecta a la cavidad oral, la cual se ha descrito como una enfermedad crónica infecciosa que progresa lentamente en la mayoría de los individuos y prácticamente no es auto-limitante, ya que sin tratamiento puede progresar, llegando incluso hasta la destrucción total de los tejidos duros del diente. Además se debe mencionar que la lesión de caries es el signo o síntoma de la destrucción localizada de estos tejidos duros y que es producto de un proceso complejo de la enfermedad (1, 2).

En el proceso de caries actúan diversos factores, entre los cuales, desde el punto de vista infeccioso, encontramos las bacterias, las que están inmersas en el biofilm, y que debido a su virulencia se adhieren a la superficie del diente, produciendo ácidos como producto metabólico, provocando la pérdida de minerales de la estructura dentaria (3). Dentro de estas bacterias podemos encontrar el grupo Mutans Streptococci, del cual *Streptococcus mutans* ha sido considerado uno de los principales agentes etiológicos de la caries (4).

En la actualidad, la prevención primaria de caries incluye la administración de fluoruros, la aplicación de sellantes de puntos y fisuras, el control de placa bacteriana y el análisis de dieta para el control del consumo de carbohidratos fermentables. Los sellantes están indicados principalmente en las superficies oclusales de los dientes posteriores en puntos y fisuras profundos que podrían no alcanzar a ser higienizados adecuadamente ni protegidos por la acción de fluoruros por su difícil acceso (5), considerando el sellante como parte de un enfoque importante en la prevención de caries en los individuos, dirigido principalmente a poblaciones en riesgo (6).

Para la utilización de sellantes de puntos y fisuras existen dos tipos predominantes de materiales: sellantes en base a resina compuesta y de vidrio ionómero. Actualmente hay evidencia que indica que los sellantes en base a

resina son más eficientes al reducir las caries que los de vidrio ionómero en dientes permanentes de niños y adolescentes (7, 8), por lo que los sellantes en base a resina son actualmente la primera opción en la indicación de sellantes de puntos y fisuras en dientes completamente erupcionados (6).

El sellante es un material dental que se comporta como cualquier material restaurador. Se sabe que las propiedades de superficie de los materiales restauradores determinan la adhesión bacteriana y su colonización (9) y que estudios han mostrado que los materiales en base a resinas compuestas acumulan más bacterias y biofilm que la superficie del esmalte “in vitro” e “in vivo” (10, 11).

El único estudio clínico relacionado con este tema es un trabajo de Baca y cols. (12), el cual mostró una disminución de bacterias del grupo Mutans Streptococci en saliva después de la aplicación de sellante en niños sin caries, sin especificar en el estudio el tipo de sellante utilizado. Es por esto que se hace relevante conocer si el sellante de resina tiene un real beneficio, disminuyendo la cantidad de UFC de *Streptococcus mutans* en la zona de los surcos de la superficie oclusal de dientes posteriores permanentes en adultos jóvenes de alto riesgo cariogénico. El propósito de este estudio es aportar información relevante sobre el real beneficio de la aplicación de sellante en personas con las características mencionadas, información que puede ser considerada al momento de tomar decisiones clínicas.

MARCO TEÓRICO

1. Caries dental

La caries dental se ha descrito como una enfermedad crónica infecciosa que se desarrolla lentamente en la mayoría de los individuos. La enfermedad es rara vez auto-limitante y, en ausencia de tratamiento, podría progresar incluso hasta la destrucción total del diente (1, 2). La lesión de caries es el signo final de una enfermedad, resultado del metabolismo fermentador de las bacterias involucradas (1).

El proceso de caries ocurre en el tiempo como una interacción entre el biofilm supragingival y la superficie y subsuperficie del diente (13). Para que se genere la lesión de caries es necesario que se deposite sobre la superficie dentaria este biofilm adherente que se forma sobre tejidos duros y blandos (4). Las bacterias en el biofilm son metabólicamente activas, lo que causa fluctuaciones en el pH. Estas fluctuaciones pueden causar pérdida mineral del diente cuando los niveles de pH bajan, o una ganancia de mineral cuando los niveles de pH aumentan (14, 15) y ocurren porque en el biofilm se encuentran microorganismos con potencial cariogénico, los que son capaces de fermentar los carbohidratos consumidos en la dieta y producir ácidos, los que provocarán dos efectos: a) Efecto directo sobre el diente, generando la desmineralización de los tejidos inorgánicos de esmalte y dentina, y b) Efecto indirecto, activando las metaloproteinasas propias de la dentina, las que van a provocar la destrucción de la matriz orgánica del diente (16). La suma de ambos efectos lleva a la cavitación del esmalte y a la formación de la lesión de caries (Figura n° 1) (17).

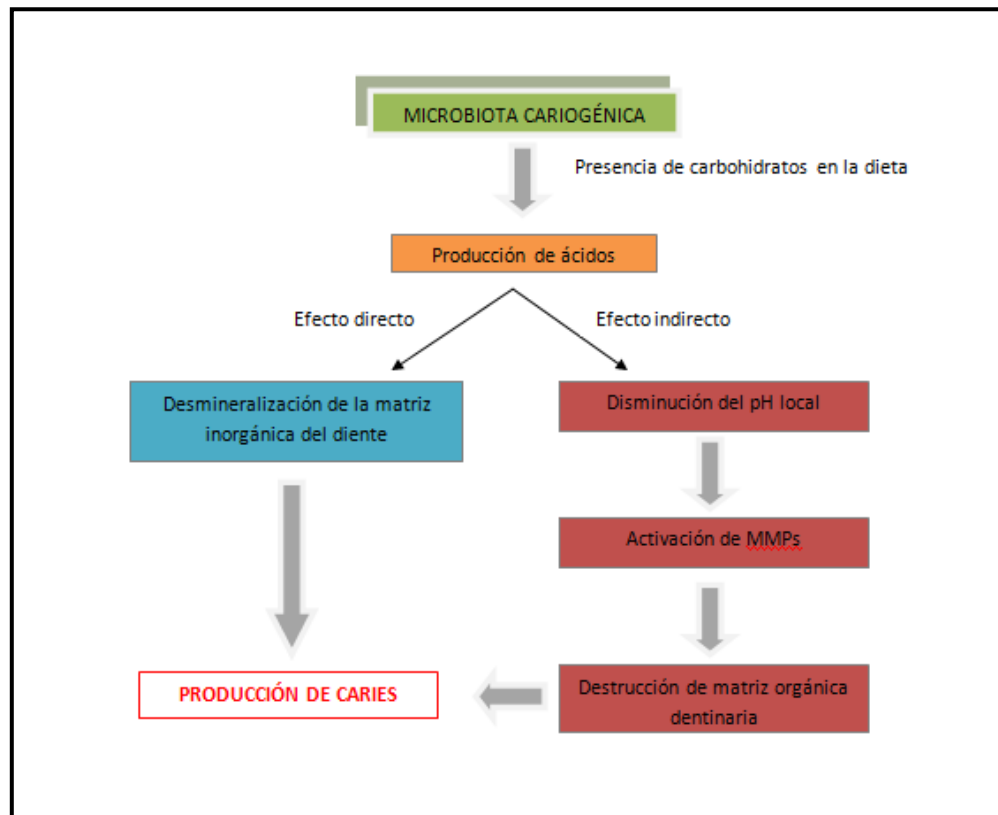


FIGURA N° 1: Proceso de producción de caries.

Las primeras bacterias adheridas al biofilm proveen el sustrato para que otros microorganismos también se adhieran a él (18). A medida que el biofilm va madurando las especies que forman parte de él cambian, dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno (potencial redox), nutrientes y productos metabólicos. De esta forma se producen sucesiones bacterianas, y el daño que el biofilm produzca se relacionará con las bacterias que lo conforman en ese momento (4).

La posibilidad de detener un proceso carioso está relacionada con un diagnóstico temprano y el factor de riesgo cariogénico individual que posea cada paciente. Si la enfermedad puede ser detectada antes de que se produzca la cavitación, el proceso puede ser revertido por una terapia de remineralización, sin necesidad de tratamiento restaurador. Por lo tanto, el tipo de lesión justificará la intervención a realizar, según las características individuales de cada paciente y de cada diente en particular (19).

1.1 Etiología de la caries dental

En 1882, Miller plantea que el factor más importante en el desarrollo de la caries dental es la capacidad de un gran número de bacterias bucales de producir ácidos a partir de los carbohidratos presentes en la dieta. Esta hipótesis fue sustentada al aislar varios grupos de microorganismos cariogénicos (20).

Casi un siglo después, en el año 1960, Keyes desarrolla un esquema explicativo del origen de la caries dental, basándose en la interacción simultánea de 3 factores principales: Los “microorganismos”, el “sustrato” (dieta) y el “hospedero”. Estos factores se relacionarían de manera que los “microorganismos” en presencia de un “sustrato” afectarían al “hospedero”. De estar ausente alguno de estos factores no sería posible el desarrollo de la enfermedad. Esto se conoce como “tríada de Keyes” (21).

Posteriormente, Newbrun modifica el esquema de Keyes agregando el factor “tiempo”, el cual debe estar presente de manera suficiente para que se desarrolle la enfermedad (Figura n° 2) (20).



FIGURA N° 2: Diagrama de Keyes modificado, que describe los factores que se interrelacionan en la producción de la caries dental.

Engel en 1977 plantea la necesidad de un nuevo modelo asistencial en salud: el modelo biopsicosocial, esto implica asistir al paciente como un ser humano en la integración de todas sus partes desde lo biológico, psicológico, sociológico y cultural y no sólo a través de la aplicación del método científico asumido dentro del paradigma biomédico. Al tomar este modelo biopsicosocial en Odontología, se comienza a considerar la cavidad bucal como un ecosistema, cambiando el enfoque de tratamiento de curativo a preventivo. En la Figura n° 3 podemos ver este nuevo enfoque claramente representado (1).

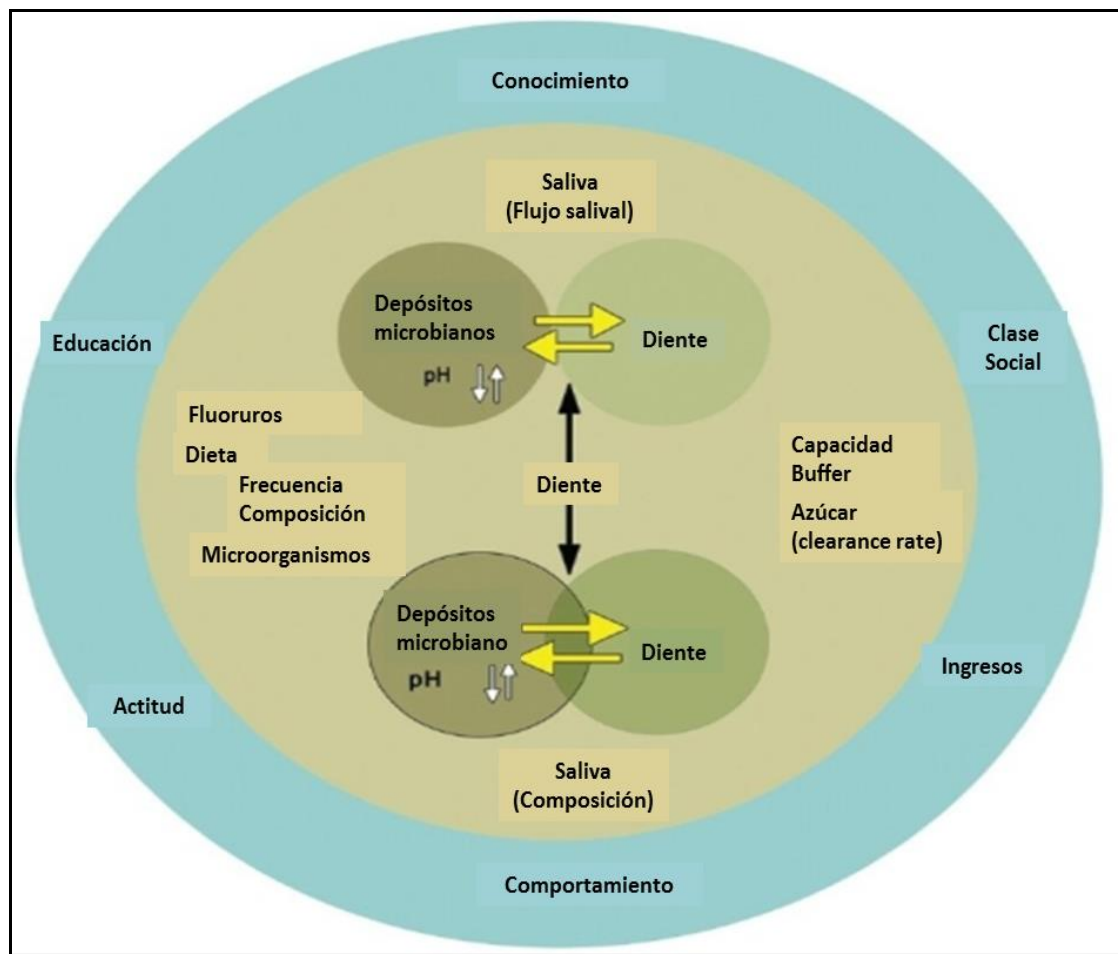


FIGURA N° 3: Esquema del modelo biopsicosocial en Odontología (Adaptado de Fejerskov y Manji, 1990).

1.2 Microbiología de la caries dental

A lo largo de la historia encontramos diversas teorías que tratan de explicar el origen de la caries. En el siglo XVI, Antonie Van Leeuwenhoek sugirió la posible relación entre microorganismos y caries al observar biofilm bajo el microscopio. A partir de esta observación inicial, otros investigadores comenzaron a sugerir la posibilidad de asociación causal entre bacterias y caries (20).

Miller, en el siglo XIX, propuso la “Teoría Quimioparasitaria” de la caries dental, según la cual esta enfermedad sería el resultado de la degradación de carbohidratos de la dieta debido a la acción de enzimas bacterianas productoras de ácidos conducentes a la desmineralización del diente (20).

Es así como nace la “Hipótesis de Placa Inespecífica”, la que propone que la caries, como enfermedad, es producto de la interacción de todos los grupos bacterianos que están dentro del biofilm (22).

En 1976, Loesche postula la “Hipótesis de Placa Específica”. Esta teoría plantea que para el desarrollo de la caries dental debe haber bacterias específicas inmersas en el biofilm, siendo éstas sólo un número limitado de especies. Además definió que un biofilm con potencial cariogénico debería estar formado por un predominio de bacterias Gram positivo, acidogénicas y acidúricas (22).

Se identificaron 3 microorganismos principales considerados cariogénicos: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus acidophilus*. Este último se encontró en un pequeño porcentaje del biofilm dental y con baja capacidad de adherencia a la película salival (20). En cambio, *Streptococcus mutans* se encontró en un alto porcentaje del biofilm dental, y por ello fue considerado causante de la enfermedad, dado que cumplía con los postulados de Koch, que se aplicaban para establecer las enfermedades infecciosas (23).

A pesar de que *Streptococcus mutans* está fuertemente asociado al desarrollo de la caries dental, esta relación no es única. Podemos observar producción de caries en ausencia aparente de esta especie, como también podemos encontrar *Streptococcus mutans* sin evidencia detectable de desmineralización de tejido dentario (24).

En 1997, Marsh propone la “Hipótesis de Placa Ecológica”, en la que 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 condicionan la enfermedad (25). Por lo tanto, considera la regulación del biofilm como un proceso dinámico, donde los factores externos pueden producir alteraciones en la expresión de genes requeridos para su formación, otorgando mayor o menor grado de virulencia o patogenicidad (Figura n° 4) (20).

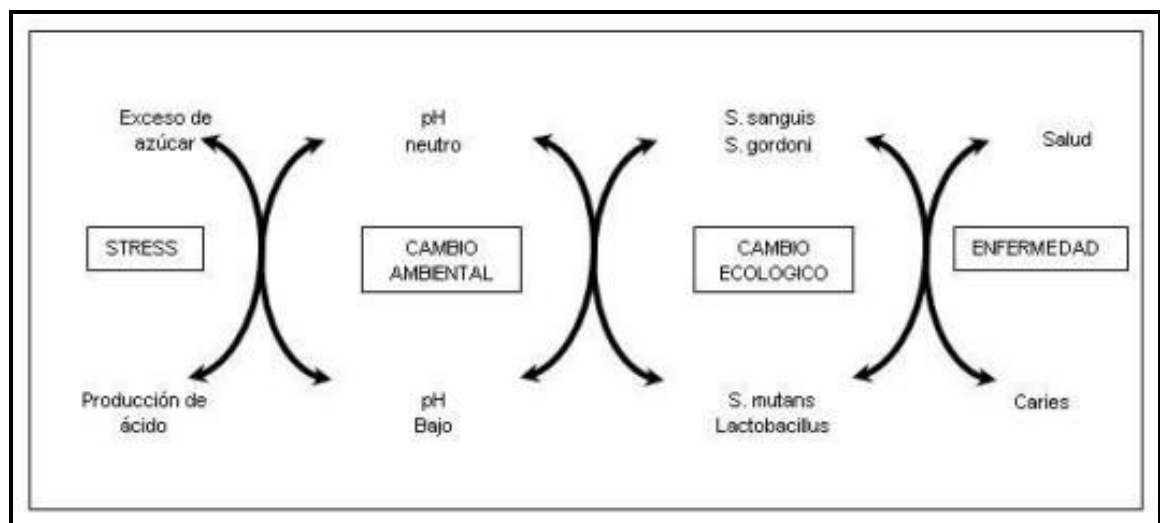


FIGURA N° 4: Representación gráfica de la “Hipótesis de Placa Ecológica” de Marsh.

Las características claves de la “Hipótesis de Placa 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, *Streptococcus mutans* es considerado el microorganismo con mayor potencial cariogénico, por presentar un conjunto de propiedades que son la acidogenia, la aciduria y la acidofilia y es, por tanto, el

agente etiológico principal de la caries dental (23). Sin olvidar que especies como *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacilli spp.* también están involucradas en el desarrollo de esta patología (26).

1.2.1 Biofilm

El biofilm dental se define como una comunidad bacteriana caracterizada por microorganismos que se encuentran unidos al diente, o unos con otros, y que están inmersos en una matriz extracelular producida por ellos mismos y por el hospedero, mostrando un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o expresión de sus genes (20).

Las propiedades del biofilm no constituyen la suma de expresión de cada microorganismo que la compone, sino más bien establece una comunidad microbiana organizada que crece sobre cualquier superficie o sustrato, orgánico e inorgánico (14).

Antes de la formación del biofilm es necesario que se establezca la denominada película salival adquirida, la que consiste en el depósito de proteínas salivales, enzimas e inmunoglobulinas sobre la superficie del esmalte. Posterior a la formación de esta película, ciertos microorganismos se adhieren a ella, proliferan y forman colonias (17). Existen microorganismos pioneros, denominados colonizadores primarios, que forman una cubierta mixta estreptocócica, resultante de su proliferación lateral y en volumen, permitiendo que luego se adhieran otros microorganismos. Entre el cuarto y décimo día se puede observar un biofilm maduro (4).

Es posible detectar variaciones del biofilm entre las distintas superficies anatómicas del diente debido a las propiedades físicas y biológicas que presenta cada sitio, desarrollándose preferentemente en sitios retentivos que ofrecen protección a fuerzas físicas de la boca, como surcos y fisuras o superficies proximales (24). Solo algunas especies bacterianas, como *Streptococcus mutans*, son capaces de adherirse fuertemente entre sí y a las superficies orales, por lo que poseen una de las mayores capacidades para iniciar el proceso de formación de caries (4).

1.2.2 Grupo Mutans Streptococci.

Es un grupo de bacterias genéticamente heterogéneo, en el que se reconocen 8 serotipos distintos (a, b, c, d, e, f, g y h) y 7 especies diferentes: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus macacae* y *Streptococcus downei*. Estas especies son diferenciables mediante pruebas serológicas y bioquímicas, cuyas características se detallan en la Tabla n° 1 (27).

TABLA N° 1: Características de los miembros del grupo Mutans Streptococci.

Especie	Serotipo	Hidrólisis de Arginina	Fermentación		Producción de H ₂ O	Crecimiento aeróbico	Susceptibilidad a la bacitracina	Hidrólisis de Esculina
			Rafinosa	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	-	-	-	-	-	+	-

Especies del grupo Mutans Streptococci se encuentran en el biofilm. 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 (3).

Dentro de este grupo, las especies *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* son las más fuertemente implicadas en el inicio de la lesión de caries dental (24).

1.2.2.1 *Streptococcus mutans*

Streptococcus 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 dióxido de carbono al 10%. Posee los polisacáridos antigénicos definidos para los serotipos c, e y f, siendo el serotipo c el más predominante de la cavidad oral en seres humanos (28).

Se puede aislar en medios enriquecidos como agar Mitis Salivarius con bacitracina (MSB) y el agar Trypticase Yeast-extract Cystine Saccharose con bacitracina (TYCSB) (29). Estos medios son selectivos para esta especie por la presencia de sacarosa y bacitracina en concentraciones críticas, las cuales son toleradas por *Streptococcus mutans*, pero no por los demás microorganismos orales (30).

A diferencia del resto de los *Streptococcus* orales, *Streptococcus mutans* es capaz de fermentar diversos azúcares, particularmente el manitol y el sorbitol. Si la cantidad de hidratos de carbono disponible es limitada, los productos de la fermentación serán formato, acetato y etanol. En medios ricos en carbohidratos se genera ácido láctico, éste es el que más ha sido asociado con el origen de la caries. Esta propiedad es conocida como **acidogenia (10)**. La velocidad con que *Streptococcus mutans* produce ácidos, testada en rangos de pH entre 7.0 a 5.0, excede a la de los *Streptococcus* orales en la mayoría de las ocasiones, produciendo cambios en la ecología de la microbiota bucal; éstos incluyen el aumento en la proporción de *Streptococcus mutans* y de otras bacterias acidógenas y acidúricas. Esta microbiota cariogénica reduce el pH a bajos niveles, con lo que se aumenta el tiempo de recuperación del pH neutro, luego de la ingestión de carbohidratos, manteniendo los valores de pH en el biofilm bajo 5.4, lo cual favorece la desmineralización del esmalte y la consiguiente producción de caries (10).

Otras de las propiedades que posee esta especie son la **aciduria** y la **acidofilia**. La aciduria es la capacidad de sobrevivir y seguir produciendo ácidos a pH bajo. Esta propiedad le permite mantener la capacidad glicolítica a niveles de pH donde el

crecimiento está inhibido (bajo pH 4.4); la acidofilia, por su parte, es la capacidad que posee para desarrollarse en medio ácido (10).

A partir de la fermentación de hidratos de carbono, principalmente de la sacarosa, *Streptococcus mutans* puede sintetizar **polisacáridos extracelulares (EPS)** como glucanos (dextrán y leván) y fructanos, que promueven la adherencia selectiva y la acumulación de un amplio número de *Streptococcus* cariogénicos en los dientes, además de aumentar la porosidad y dimensión de la matriz de la placa dental, permitiendo una mayor difusión de sustrato a través de la superficie del esmalte, produciendo descenso de los valores de pH en capas más profundas del biofilm, favoreciendo un incremento en el desarrollo de caries (31, 32). Estas sustancias se observan como gotitas de un líquido alrededor de una colonia. Por otro lado, también sintetiza **polisacáridos intracelulares (IPS)** de reserva que pueden ser degradados por dextranasas, fructanasas y glucógeno fosforilasas, los cuales utilizan cuando no disponen de alimentos (1, 32).

Sus cualidades tan extraordinarias para adherirse a la película salival adquirida radican en dos mecanismos: **a) Adherencia sacarosa dependiente**, que corresponde a su capacidad de sintetizar polisacáridos extracelulares a partir de los hidratos de carbono de la dieta, los cuales actúan como adhesivos extracelulares; **b) Adherencia sacarosa independiente**, la cual consiste en la adhesión de esta especie a componentes salivales de la película adquirida del esmalte (10). Por lo tanto, *Streptococcus mutans* sintetiza su propia sustancia adhesiva, que actuará para unir a las bacterias entre sí y a la superficie del diente (10).

En 1960, Fitzgerald y Keyes realizaron una serie de experimentos (20), identificando a *Streptococcus mutans* como la especie con mayor poder patogénico para producir caries, en relación a otras especies acidogénicas de la placa supragingival. Después de cincuenta años, esta especie sigue siendo considerada el microorganismo con mayor potencial cariogénico (33, 34).

1.2.2.1.1. Métodos de aislamiento y recuento de *Streptococcus mutans* en muestras de biofilm

El método más utilizado hasta hoy para obtener muestras de biofilm, y que es tomado como “gold standard”, es el propuesto por Wallman y Krasse, conocido como el método del “mondadientes”. Este es un método simple, económico y viable de recolección para realizar en la consulta dental, pero el inconveniente descrito por los mismos autores es la subestimación del recuento del microorganismo en zonas retentivas, las cuales pueden no ser alcanzadas por el instrumento debido a su forma y tamaño. Otra de sus desventajas es la dificultad en la toma de muestras de biofilm puro (35), y al igual que el método de aislamiento y recuento de *Streptococcus mutans* en muestras de saliva (36) requiere de un largo procesamiento en laboratorio y de conocimientos en microbiología para ser realizado.

En 2010, Zúñiga lleva a cabo un estudio en que desarrolla la técnica de la cubeta, un método que permite el aislamiento y recuento de UFC de *Streptococcus mutans* de muestras obtenidas de biofilm desde las superficies de piezas dentarias sanas y/o restauradas. El método consiste en realizar una impresión directamente sobre las superficies oclusales de los dientes a estudiar, con cubetillas para flúor gel cargadas con un medio de cultivo selectivo para *Streptococcus mutans* (medio TYCSB), lo cual permite una mayor exactitud en el recuento de microorganismos cariogénicos, con el beneficio de no ser invasivo para el seguimiento de lesiones de caries que radiográficamente son de difícil diagnóstico. Además puede utilizarse para monitorear restauraciones y lesiones de caries recurrente (37).

La principal ventaja de esta técnica, en comparación con las otras existentes, radica en que solo se necesita una toma directa de la muestra de biofilm sobre las superficies oclusales de los dientes a estudiar de manera conservadora, además de requerir un menor tiempo de procesamiento microbiológico, y éste puede ser realizado por personal clínico sin conocimientos elevados en aspectos de laboratorio, aplicándose principalmente para objetivos de investigación. Otra de sus

ventajas es que al tratarse de una impresión, permite la ubicación topográfica de las especies bacterianas, facilitando la aplicación de medidas preventivas ajustadas al riesgo individual de cada diente. Consiste por lo demás en un método simple, de bajo costo y no invasivo para el paciente. Asimismo está validado como método ya que posee una correlación positiva con el método del mondadientes y con el método de recuento de *Streptococcus mutans* en saliva (37).

Sin embargo, una desventaja que posee esta técnica radica en que se ve limitada a las caras libres y caras oclusales de los dientes, ya que al ser los espacios proximales zonas muy estrechas y retentivas, y el agar un material poco resistente a la tracción, tiende a desgarrarse en dichas zonas, lo que dificulta la realización del recuento en ellas (38).

1.3 Mecanismos de prevención de la enfermedad de caries: Sellantes de puntos y fisuras

La caries es una enfermedad oral infecciosa que puede detenerse en etapas tempranas. Puede ser prevenida y manejada de muchas formas. Los enfoques incluyen prevención primaria, definida como intervenciones provistas para evitar la iniciación de la caries, y prevención secundaria, definida como intervenciones para evitar el avance de lesiones tempranas a caries avanzadas (6).

Frente al problema de la caries dental han surgido diversos tipos de intervenciones. En la época de Black no existían métodos preventivos para las lesiones tempranas de caries y lo que se buscaba al restaurar lesiones incipientes era llevar los márgenes de las restauraciones a las zonas de autolimpieza, sacrificando estructura dentaria sana (39).

Según Henostroza, el primer intento de prevención de caries fue en el año 1895, cuando Wilson intentó rellenar defectos retentivos del esmalte con un cemento de Fosfato de Zinc (40).

Según Barrancos Mooney y Uribe Echeverri, en la década de 1920 ya se habían descrito tratamientos preventivos en los cuales se sellaban puntos y fisuras con diversos materiales para disminuir la incidencia de caries en estas superficies. En algunos casos, previamente se realizaba una ameloplastía profiláctica de surcos y fisuras profundas, los cuales muchas veces tenían que ser obturados posteriormente (41, 42).

Con el devenir de la Odontología adhesiva, permitida después de la introducción de la técnica de grabado ácido por Buonocore en 1955, surge la posibilidad de sellar los puntos y fisuras con materiales que se unan al diente (41-43).

Los primeros sellantes fueron desarrollados por Cueto y Buonocore en 1965, para prevenir la caries en la región de puntos y fisuras. En esa oportunidad se utilizó

ácido fosfórico al 50% con 7% de óxido de zinc y una mezcla de monómero de metil-metacrilato con polvo de cemento de silicato como material sellador (43).

Hoy en día, el término “sellante de puntos y fisuras” se utiliza para describir un material líquido en base a resina compuesta, químicamente activo, que se introduce en los puntos y fisuras oclusales de los dientes susceptibles de caries. Su polimerización puede ser iniciada por luz o químicamente, y después de ser aplicados forman una unión micromecánica con el diente, generando una capa protectora que previene la formación de caries en el área de la fisura, protegiendo a ésta del medio bucal, evitando la invasión de bacterias y al mismo tiempo privándolas de su fuente de nutrientes (44).

Los sellantes de puntos y fisuras pueden ser utilizados efectivamente como parte de un enfoque comprensivo de prevención de caries en un individuo, o como medida de salud pública para poblaciones en riesgo. Los sellantes son usados para prevenir el inicio de las caries y para detener el progreso de las caries al ser una barrera física que inhibe la acumulación de partículas de alimentos y microorganismos en puntos y fisuras. Es aceptado, en general, que la efectividad de los sellantes para la prevención de caries depende de la retención al largo plazo (5 años aproximadamente) (6).

Según Simonsen, Cueto y Denninson las propiedades ideales de un sellador debieran ser: biocompatibilidad, fácil manipulación, tiempo de fraguado que permita un manejo cómodo, capacidad de retención sin manipulación irreversible del esmalte, buena penetración en puntos y fisuras, estabilidad dimensional y propiedades cariostáticas (43, 45, 46).

En el afán de conseguir el deseable efecto cariostático se han desarrollado sellantes en base a resina compuesta que tienen incorporado flúor, el cual sería liberado a la saliva.

La adición de flúor al sellante, o quizás al esmalte previo a la aplicación de sellante, podría tener un beneficio potencial en la protección de caries. Sin

embargo, no hay estudios que documenten un beneficio clínico con sellantes de resina compuesta liberadores de flúor. La adición de flúor a los sellantes de resina compuesta parece ser beneficio del marketing más que un beneficio clínico (44).

Existen dos tipos predominantes de materiales para sellantes de puntos y fisuras: sellantes en base a resina compuesta y en base a cemento de vidrio ionómero. Los materiales de sellante disponibles que son hechos en base a resina compuesta pueden polimerizar iniciados por luz o químicamente, como también una combinación de ambos procesos (47).

Cementos de vidrio ionómero están disponibles en dos formas, ambas contienen fluoruro: los convencionales y los modificados por resina compuesta (48). Los cementos de vidrio ionómero no requieren de grabado ácido en la superficie del diente previo a su aplicación (33, 49).

Los sellantes de vidrio ionómero no son tan costo/efectivos como los sellantes en base a resina compuesta, cuando los gastos de colocación en el tiempo (costo) junto con las tasas de retención, son usados como base de eficacia. Sin embargo, existe una aplicación útil para los sellantes de vidrio ionómero en situaciones de molares parcialmente erupcionados, donde un sellante con un material en base a resina compuesta no es posible de colocar debido a los problemas de control de humedad. En esta situación está indicada la aplicación de sellante de vidrio ionómero como sellante temporal que liberará flúor (44).

Los materiales de los sellantes de puntos y fisuras pueden variar, como también las técnicas de aplicación. Las instrucciones del fabricante para la correcta postura y la retención al largo plazo de los sellantes en base a resina compuesta por lo general incluyen limpiar puntos y fisuras, hacer apropiadamente el grabado con ácido de las superficies y mantener un campo seco, no contaminado con saliva hasta que el sellante haya sido ubicado y polimerizado. Técnicas y recomendaciones complementarias pueden incluir usar agentes de unión; usar varias formas de preparación mecánica del esmalte, como abrasión por aire y

modificación con una fresa (esmaltoplastía), y usar la modalidad de trabajo clínico a cuatro manos, a modo de contribuir a evitar la contaminación por humedad. (33, 49).

En una revisión sistemática reciente de ensayos clínicos controlados que compara métodos de limpieza de superficies directos (superficies limpiadas con contraángulo y escobilla con pasta profiláctica, comparado con superficies limpiadas simplemente pasando una sonda a través de las fisuras y limpiando con jeringa triple) no se hallaron diferencias significativas en la retención del sellante. De manera similar, en una comparación de los efectos del lavado de dientes supervisado versus profilaxis con contraángulo en la retención de los sellantes, Gray mostró que una limpieza supervisada por el Odontólogo fue al menos tan eficiente en términos de retención del sellante como una profilaxis convencional con micromotor. Esto podría tener una implicancia en la reducción de costos en los programas de salud de aplicación de sellantes, ya sean públicos o en escuelas (44).

En cuanto a los métodos de preparación del diente previo a la aplicación del sellante, el panel de expertos de la ADA halló “evidencia limitada y conflictiva respecto a que la preparación mecánica con una fresa resulta en una tasa de retención mayor en niños”. En vista de estos hallazgos y de los beneficios aceptados de la aplicación mínimamente invasiva no es aconsejable utilizar la preparación dentaria previa a la aplicación de sellante, a menos que haya un diagnóstico de caries evidente en cuyo caso debe ser removida mecánicamente y se debe colocar una restauración preventiva de resina (44).

Con respecto al número de operadores necesario para la aplicación de un sellante, hay evidencia de que el uso de la técnica a cuatro manos cuando se usan sellantes en base a resina compuesta y vidrio ionómero está asociada a mejores tasas de retención (50).

Entonces, según la última evidencia disponible, se deben preferir los sellantes en base a resina compuesta, utilizando aislación absoluta con goma dique o buena aislación relativa con modalidad de trabajo clínico a cuatro manos, en superficies de esmalte previamente limpiadas, grabadas con ácido ortofosfórico al 35% durante 15 segundos, y lavadas con agua durante 30 segundos (6, 44).

En la gran mayoría de los estudios disponibles sobre sellantes se evalúa como principal criterio clínico la retención del sellante en relación a su longevidad, clasificando los resultados observados en retención total, parcial o pérdida total del sellante, o simplemente en retenidos o perdidos (51). La retención completa del sellante puede ser evaluada por el examinador por método visual y táctil. En caso de pérdida total o parcial del sellante puede ser reaplicado para asegurar su efectividad (6).

Además de la durabilidad, otros criterios utilizados son los criterios Ryge modificados, observándose tinción marginal, presencia de caries secundaria, integridad marginal y textura superficial (52) (ANEXO 3).

HIPÓTESIS

El recuento de UFC/cm² de *Streptococcus mutans* sobre el área de los surcos de la superficie oclusal de dientes posteriores permanentes es menor después de la aplicación de sellante de resina compuesta.

OBJETIVO GENERAL

Comparar el recuento de UFC/cm² de *Streptococcus mutans* sobre el área de los surcos de la superficie oclusal de dientes posteriores permanentes, antes y después de la aplicación de sellante de resina compuesta.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar e identificar aislados de *Streptococcus mutans* en el área de los surcos de la superficie oclusal de dientes posteriores permanentes, a partir de muestras de biofilm obtenidas mediante la técnica de la cubeta.
- Cuantificar las UFC/cm² de *Streptococcus mutans* en el área de los surcos de la superficie oclusal de dientes posteriores permanentes a partir de muestras de biofilm obtenidas mediante la técnica de la cubeta, antes y después de la aplicación de sellante de resina compuesta.
- Determinar, mediante test estadísticos, si existe diferencia significativa entre el recuento de UFC/cm² de *Streptococcus mutans* de las muestras obtenidas antes y después de la aplicación de sellante de resina compuesta.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente es un estudio clínico experimental comparativo.

La muestra consistió en 38 dientes posteriores permanentes (medidos en dos tiempos, T0 Y T1), uno por cada paciente seleccionado en forma aleatoria, que cumplió con los criterios de inclusión y exclusión. Todos, pacientes adultos jóvenes (promedio de edad 24 años) de la clínica de Operatoria cuarto año de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, durante los meses de marzo a junio de 2013.

El tamaño de la muestra se calculó utilizando el programa estadístico G*Power© Versión 3.1.3, con un nivel de confianza del 95%, un poder estadístico del 80% y efecto de tamaño de 0.5.

Criterios de Inclusión:

- Pacientes de ambos sexos, entre 18 y 30 años de edad, con al menos un diente posterior permanente con indicación de sellante de resina oclusal: La indicación del sellante es en caso de que el diente permanente del adulto presente fosas y fisuras profundas y/o teñidas (6).
- Pacientes de alto riesgo según cariograma (53).

Criterios de Exclusión:

- Pacientes que consumieran fármacos que probadamente produjeran alteraciones en el flujo salival, como antidepresivos, narcóticos, diuréticos, antihistamínicos, antihipertensivos y antieméticos.
- Pacientes bajo tratamiento con colutorios y/o geles de clorhexidina u otro antiséptico bucal (cuyo compuesto activo fuera 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 2.500 ppm de ion flúor durante los últimos tres meses.
- Pacientes bajo terapia antibiótica en los últimos tres meses.

- Pacientes en tratamiento de 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 de cualquier artefacto acrílico.
- Pacientes que consumieran goma de mascar cuatro o más días a la semana.
- Pacientes con dificultades motrices que les impidieran realizar su propia higiene dental.

Procedimiento

Un operador previamente calibrado en exámen clínico de fosas y fisuras, reclutó y seleccionó a los pacientes, les enseñó la técnica de higiene, tomó las muestras, aplicó los sellantes, tomó fotografías de todos los dientes estudiados para ser analizadas con el programa ImageJ® y realizó el procesamiento microbiológico (supervisado por académico del área de microbiología). Un segundo operador realizó el análisis estadístico.

1) Selección de Pacientes

Se revisaron 288 pacientes de la clínica de Operatoria Dental de cuarto año de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, a los cuales previo al exámen se les pidió un consentimiento informado. De estas 288 personas, 143 cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión definidos. Los datos de las 143 personas fueron ingresados a una planilla en el programa Microsoft office Excel (versión 2007), el cual mediante su función aleatoria seleccionó de la lista a 38 personas.

A las 38 personas seleccionadas se les enseñó una técnica de cepillado común, la que se reevaluó una semana antes de la toma de las muestras. La técnica de cepillado fue la técnica de Bass modificada, considerada la más efectiva, que consiste en situar el cepillo con una inclinación de 45° y realizar movimientos vibratorios anteroposteriores, pero sin desplazar el cepillo de su punto de apoyo. Los movimientos son muy cortos para que las cerdas se flexionen sobre sus propios ejes y las puntas no se desplacen de los puntos de apoyo (54).

Tanto la aplicación de los sellantes de resina oclusales como la enseñanza de la técnica de higiene fueron realizadas por un operador previamente calibrado bajo los criterios Ryge/USPHS (ANEXO 3) y con un coeficiente intraoperador obtenido de 0.85 de Cohen's Kappa.

2) Proceso de Consentimiento Informado

A cada persona, antes de ser examinada, se le hizo lectura del Consentimiento Informado (ANEXO 2), en el 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 su participación voluntaria, que podía 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 involucra la investigación
- III. Se les leyó y explicó en forma detallada el formulario de Consentimiento Informado
- IV. Se les entregó una copia en forma escrita para que el paciente pudiese revisarla y pensar en su decisión

En caso de aceptar, se firmó el documento por todas las partes involucradas.

3) Detección clínica de lesiones de fosas y fisuras no cariosas

Se realizó la examinación visual, luego de limpiar y secar los dientes, lo que es suficiente para detectar lesiones tempranas no cariosas en fosas y fisuras, y

corresponde a la realidad clínica indicada para el diagnóstico en un box dental. Se limpió la superficie dental con escobilla y flor de pómez para remover partículas de alimentos y biofilm, y luego se examinó en busca de áreas de desmineralización blanca o decoloración amarillo-café claro alrededor del área de la fosa o fisura, para descartar los dientes con estas características y solo seleccionar los dientes sanos con surcos profundos.

El uso de exploradores no es necesario para la detección de lesiones tempranas, y el uso forzoso de un explorador filoso puede dañar la superficie dental (6, 55).

4) Toma de muestra microbiológica

Se realizó una semana después de la reevaluación de la técnica de higiene y de la lectura del Consentimiento Informado.

En un molar o premolar permanente con indicación de sellante oclusal un operador tomó muestras de biofilm, en duplicado, utilizando la Técnica de Cubeta. Luego procedió a la aplicación del sellante de resina oclusal en el mismo diente. Cuatro semanas después, se tomó otra muestra de biofilm, también en duplicado, utilizando la técnica de la cubeta en el diente sellado, verificando antes que el sellante cumpliera con las condiciones alfa según los Criterios Ryge modificados (ANEXO 3). Posterior a la toma de la segunda muestra se procedió a sellar todas las otras piezas en boca con indicación de sellante.

Técnica de Cubeta

El biofilm depositado sobre la superficie de los dientes seleccionados fue recogido mediante cubetas usadas para la aplicación de flúor tópico, las cuales se esterilizaron manteniendo las cubetas en una campana de flujo laminar de luz UV durante 30 minutos. Las cubetas se llenaron 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 *Streptococcus mutans* que ha sido descrito como el medio más sensible y selectivo para cultivar esta especie bacteriana (29).

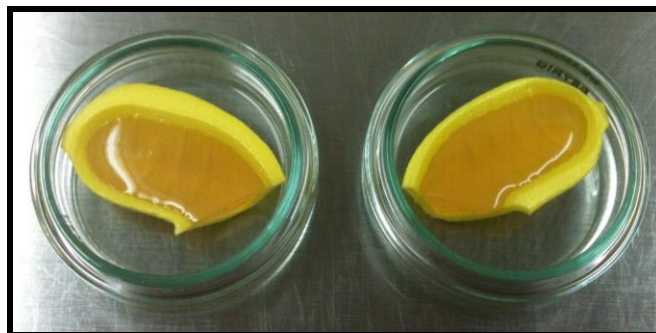
Posteriormente se recortaron en condiciones de esterilidad, individualizándolas para no más de 4 dientes. Inmediatamente después, las cubetas fueron colocadas en placas de Petri estériles y guardadas en bolsas plásticas selladas en el refrigerador hasta su utilización.

Previo a la utilización de las cubetas cargadas, éstas se llevaron a estufa de incubación por 24 horas a 37°C para comprobar que los medios de cultivo no se encontraran contaminados, de modo de efectuar un control de calidad.

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



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



FOTOGRAFÍA N°2:
Imagen de cubeta de flúor cargada con medio de cultivo TYCSB, recortada y en placas de Petri estériles.

5) Aplicación de sellante

La aplicación del sellante se realizó en cada diente según la técnica descrita por la última evidencia disponible (6, 44). Se aplicó el sellante en base a resina, sin flúor Concise de 3M, en superficies de esmalte previamente limpiadas con escobilla y

flor de pómez, grabadas con ácido ortofosfórico al 35% durante 15 segundos, y posteriormente lavadas durante 30 segundos, utilizando una efectiva técnica de aislación relativa.



FOTOGRAFÍA N° 3:
Se observan piezas 4.6 y 4.7 con surcos profundos.



FOTOGRAFÍA N° 4:
Se observan piezas 4.6 y 4.7 con surcos sellados.

6) Toma de registros fotográficos y análisis con programa ImageJ®

Se tomaron fotografías de todas las piezas selladas. Todas estas fotografías fueron analizadas con el programa ImageJ® para medir las áreas oclusales de molares y premolares y sacar un promedio de éstas. Además, se calcularon porcentajes promedio del área ocupada por el sellante oclusal en molares y premolares. Este programa permitió analizar las fotografías y obtener estos datos usando un elemento de medida conocida en la fotografía, que en este caso fue una sonda periodontal Carolina del Norte. Se tomaron dos puntos en la imagen de distancia conocida y el programa nos indicó la cantidad de pixeles que había entre esos dos puntos, así obtuvimos una equivalencia y pudimos medir cualquier objeto dentro de la misma imagen, según la cantidad de pixeles que había entre dos puntos. Finalmente se hizo la conversión a mm o cm.

Esto lo utilizamos para expresar en cm^2 la cantidad de unidades formadoras de colonias que contamos en los surcos de los molares y premolares estudiados.

7) Procesamiento microbiológico

Luego de la toma de muestras, las cubetas fueron depositadas en placas de Petri estériles y llevadas a estufa de incubación a 37°C en jarra con vela para lograr condiciones de microaerofilia ($5\% \text{CO}_2$) durante 48 h, en el laboratorio de

Microbiología Bucal del Departamento de Patología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

8) Aislamiento e identificación de colonias de *Streptococcus mutans*

A partir de las muestras se identificaron colonias de *Streptococcus mutans* en base a la morfología colonial (macroscópica) y adherencia de las colonias al agar, observadas bajo lupa estereoscópica (Stemi 2000-C, Zeiss) y fuente luminosa (Schott KL1500, Zeiss).

El recuento de unidades formadoras de colonias de *Streptococcus mutans* sobre los surcos de molares y premolares se obtuvo a partir de las cubetillas cargadas con el medio TYCSB. Las muestras realizadas en duplicado fueron contadas por 2 operadores previamente calibrados, uno de ellos experto en microbiología, y el resultado se estableció mediante la obtención del promedio de los recuentos realizados para cada diente evaluado.

Luego del recuento de UFC de *Streptococcus mutans* en la zona de los surcos de molares y premolares, colonias seleccionadas por adherencia y morfología compatible con la descrita para *Streptococcus mutans* fueron resembradas en caldo Todd-Hetwitt (Difco) e incubadas a 37°C por 48 h para someterlas a pruebas bioquímicas que permitieron identificar especies del grupo Mutans Streptococci principalmente dirigidas a diferenciar *Streptococcus mutans* de *Streptococcus sobrinus*.

Las pruebas bioquímicas realizadas fueron la fermentación de la Rafinosa y Melobiosa y la hidrólisis de la Esculina, las tres positivas sólo para *Streptococcus mutans* (27).

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 - 450µl de buffer fosfato pH 7.2 hasta obtener una suspensión ajustada a M^c Farland 5. De esta suspensión se sembraron 100 µl, en 500 µl de Esculina (Brain Heart Infussion, Difco; 1% de

Esculina), en 500 µl de Rafinosa (Tioglicolato sin resazurina y sin indicador, Difco; 1% de Rafinosa) y en 500 µl de Melobiosa (Tioglicolato sin resazurina y sin indicador, Difco; 1% de Melobiosa). Los tubos fueron llevados a estufa de incubación por 24 h a 37°C.

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

En caso de que la hidrólisis de la Esculina fuera positiva, rápidamente el caldo toma una coloración negra, y para la fermentación de la Rafinosa y la Melobiosa la aparición de un amarillo intenso indican la positividad de la prueba. Ambas situaciones confirman el diagnóstico de *Streptococcus mutans*.

9) Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado por un segundo operador. A éste se le entregaron los recuentos de *Streptococcus mutans* en T0 (antes de la aplicación del sellante) y T1 (después de la aplicación del sellante). Se utilizó el test de Shapiro-Wilk ($p \leq 0.05$) para determinar si la distribución de los datos fue normal.

Como los datos no se distribuyeron de forma normal, se utilizó el test de Wilcoxon para la comparación de los resultados en T0 y T1, con un nivel de confianza de 95%.

10) Información y medidas preventivas para el paciente

Una vez realizados los recuentos se informó a cada paciente sobre sus resultados. Luego fueron sometidos a reforzamiento de técnicas de higiene.

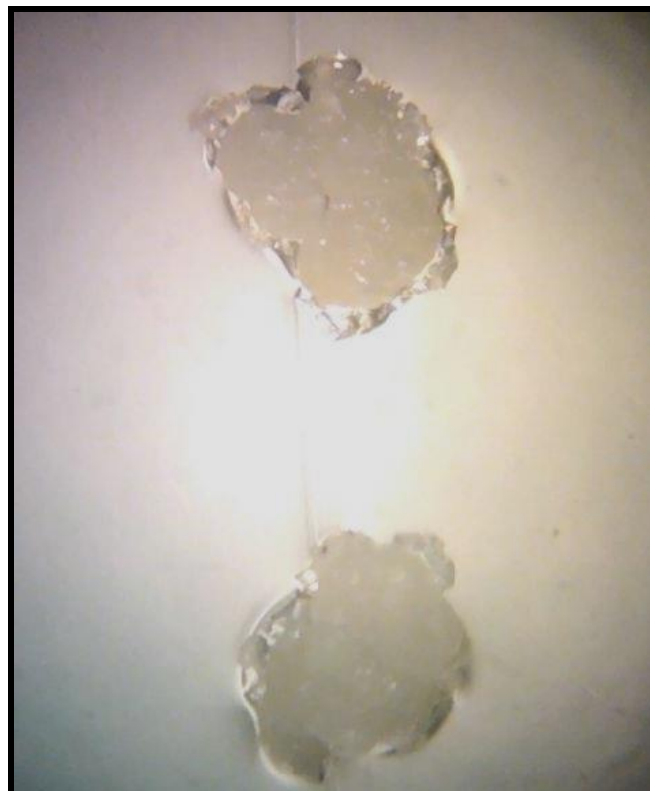
Además de la aplicación de sellantes en todos los otros dientes con indicación de sellante (no usados para el estudio) en cada paciente, se les motivó a seguir hábitos saludables, poniendo énfasis en la importancia de las visitas periódicas (cada 3 meses) a la clínica de Operatoria de 4° año, al programa de mantención de pacientes.

RESULTADOS

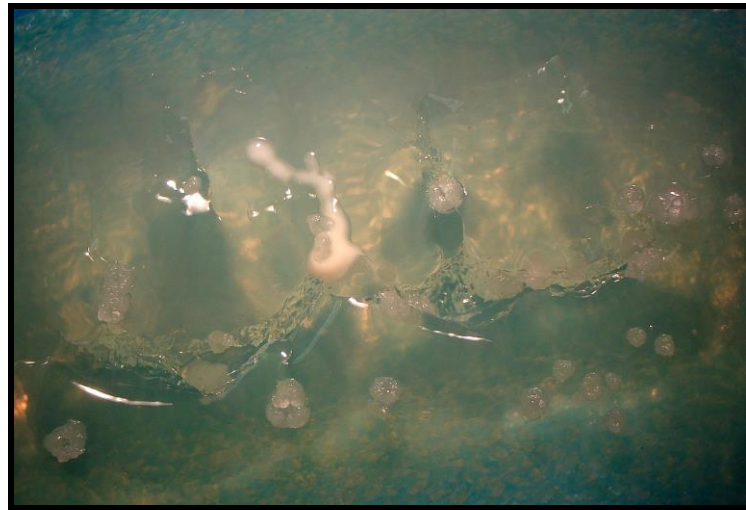
En total se incluyeron en el estudio 38 pacientes (un diente por cada paciente), con un promedio de edad de 24 años, no existiendo pérdida de pacientes ni de muestras.

1. Aislamiento e identificación de *Streptococcus mutans*

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

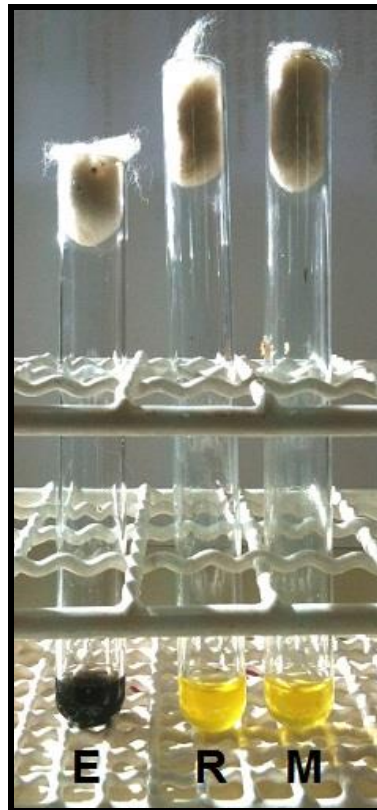


FOTOGRAFÍA N°5:
Colonias de *Streptococcus mutans* en agar TYCSB. Colonias blanquecinas y de superficie rugosa, nótese como rompen el agar al que se adhieren. (Aumento 5x)



FOTOGRAFÍA N°6:
Colonias de *Streptococcus mutans* en agar TYCSB. Obsérvese el polimorfismo colonial. Diferentes formas de colonias y todas adherentes. (Aumento 3x)

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 *Streptococcus sobrinus*.



FOTOGRAFÍA N°7:
(E) Tubo con Esculina luego de la adición de citrato férrico amoniacal. (R) Tubo con Rafinosa luego de la adición de rojo fenol. (M) Tubo con Melobiosa luego de la adición de rojo fenol.

El frotis de subcultivo líquido a partir de una colonia de *Streptococcus mutans* teñido con Gram, mostró formas cocáceas, Gram positivo y agrupadas en cadenas, característico de bacterias del grupo Mutans Streptococci.



FOTOGRAFÍA N° 8:
Frotis de un subcultivo líquido a partir de colonia de *Streptococcus mutans* (seleccionada por su macromorfología colonial), teñido con tinción Gram.

2. Cuantificación de *Streptococcus mutans*

En la Tabla n° 2 se describe la cantidad de UFC de *Streptococcus mutans* contadas en la zona de los surcos de molares y premolares a partir de muestras de placa bacteriana obtenidas de la superficie oclusal de un mismo diente antes (primera muestra=T0) y después de un mes (segunda muestra=T1) de la aplicación de sellante de resina oclusal, mediante la técnica de cubeta.

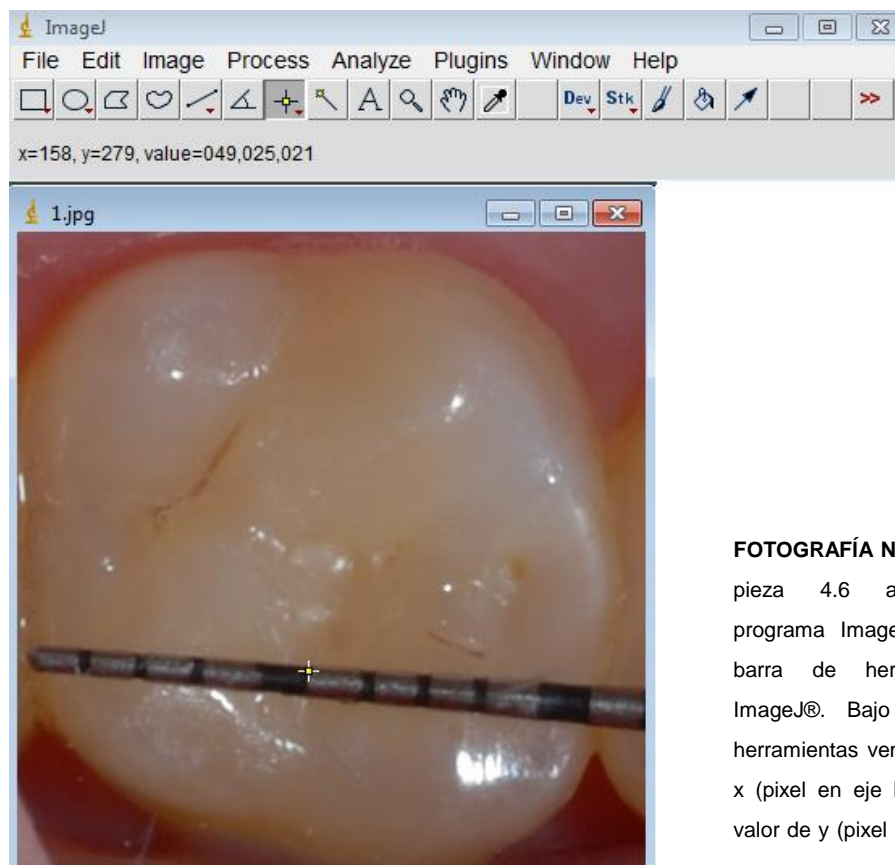
TABLA N°2: Recuento de UFC de *Streptococcus mutans* en el área de los surcos de molares y premolares, en muestras de biofilm obtenidas de la superficie oclusal de un mismo diente en T0 y T1, mediante la Técnica de Cubeta.

N° Paciente	Diente	T0	T1
1	2.6	8	1
2	3.5	11	4
3	1.5	4	2
4	2.4	5	5
5	3.7	23	13
6	1.6	10	1
7	3.6	46	9
8	2.6	8	4
9	1.7	20	10
10	2.7	40	35
11	3.5	8	1
12	1.7	60	40
13	1.5	11	1
14	1.6	20	2
15	2.6	8	1
16	1.6	6	0
17	1.6	28	10
18	3.6	4	0
19	2.5	45	10
20	1.7	32	4
21	1.6	2	0
22	1.5	3	0
23	1.6	3	0
24	1.6	2	0
25	2.7	2	0
26	1.7	3	15
27	1.6	10	0
28	2.5	2	2
29	1.6	4	9
30	1.6	23	1
31	1.6	10	0
32	1.6	5	1
33	4.4	8	0
34	1.7	4	1
35	3.6	4	1
36	2.5	6	4
37	3.7	14	0
38	1.6	10	17

Del análisis con el programa ImageJ® se obtienen los siguientes datos:

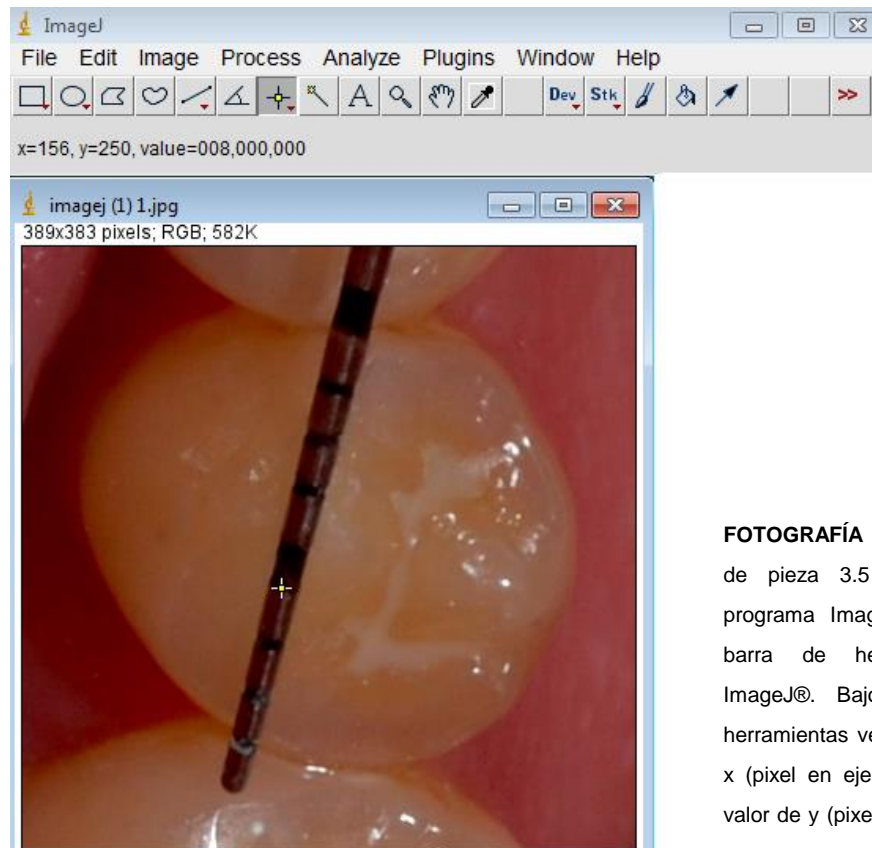
- **Molares:**

- El promedio del área oclusal de molares fue de 0,9 cm².
- El promedio del área que ocupan los sellantes en la superficie oclusal de molares fue de 0,09 cm².
- Es decir, el 10% de la superficie oclusal de molares está ocupada por el sellante.



- **Premolares:**

- El promedio del área oclusal de premolares fue de 0,5 cm².
- El promedio del área que ocupan los sellantes en la superficie oclusal de premolares fue de 0,045 cm²
- Es decir, el 9% de la superficie oclusal de premolares está ocupada por el sellante.



FOTOGRAFÍA N° 10: Imagen de pieza 3.5 analizada por programa ImageJ®. Arriba, la barra de herramientas de ImageJ®. Bajo la barra de herramientas vemos el valor de x (pixel en eje horizontal) y el valor de y (pixel en eje vertical).

En la Tabla n° 3 se describe la cantidad de UFC/cm² de *Streptococcus mutans*. Se hace la conversión a cm² según los datos calculados usando el programa ImageJ®.

TABLA N°3: UFC/cm² de *Streptococcus mutans* sobre la zona de surcos de molares y premolares en muestras de biofilm obtenidas de la superficie oclusal de un mismo diente en T0 y T1, mediante la Técnica de Cubeta. Se observa la **Mediana**, **X** (promedio) **D.S.** (desviación estándar)

N° Paciente	Diente	T0	T1
1	2.6	89	11
2	3.5	244	89
3	1.5	89	44
4	2.4	111	111
5	3.7	256	144
6	1.6	111	11
7	3.6	511	100
8	2.6	89	44
9	1.7	222	111
10	2.7	444	389
11	3.5	178	22
12	1.7	667	444
13	1.5	244	22
14	1.6	222	22
15	2.6	89	11
16	1.6	67	0
17	1.6	311	111
18	3.6	44	0
19	2.5	1000	222
20	1.7	356	44
21	1.6	22	0
22	1.5	67	0
23	1.6	33	0
24	1.6	22	0
25	2.7	22	0
26	1.7	33	167
27	1.6	111	0
28	2.5	44	44
29	1.6	44	100
30	1.6	256	11
31	1.6	111	0
32	1.6	56	11
33	4.4	178	0
34	1.7	44	11
35	3.6	44	11
36	2.5	133	89
37	3.7	156	0
38	1.6	111	189
		X= 179,76	X= 68,02
		D.S.= 199,42	D.S.= 102,54
		Mediana: 111,0	Mediana: 22,0

3. Diferencias en el recuento de UFC/cm² de *Streptococcus mutans* antes y después de la aplicación de sellante.

El Test de Shapiro-Wilk, para determinar la forma en que se distribuyen los datos de la muestra, mostró que la distribución de los valores no es normal ($p < 0.05$), tal como se observa en la Tabla n° 4.

TABLA N°4: Tabla comparativa donde se observan los resultados del test de Shapiro-Wilk ($p < 0.05$) para T0 y T1.

	T0	T1
Número de casos	38	38
Shapiro-Wilk p-Value	0,000	0,000

A continuación se observa en el Gráfico n° 1 la distribución de los datos en T0 y T1.

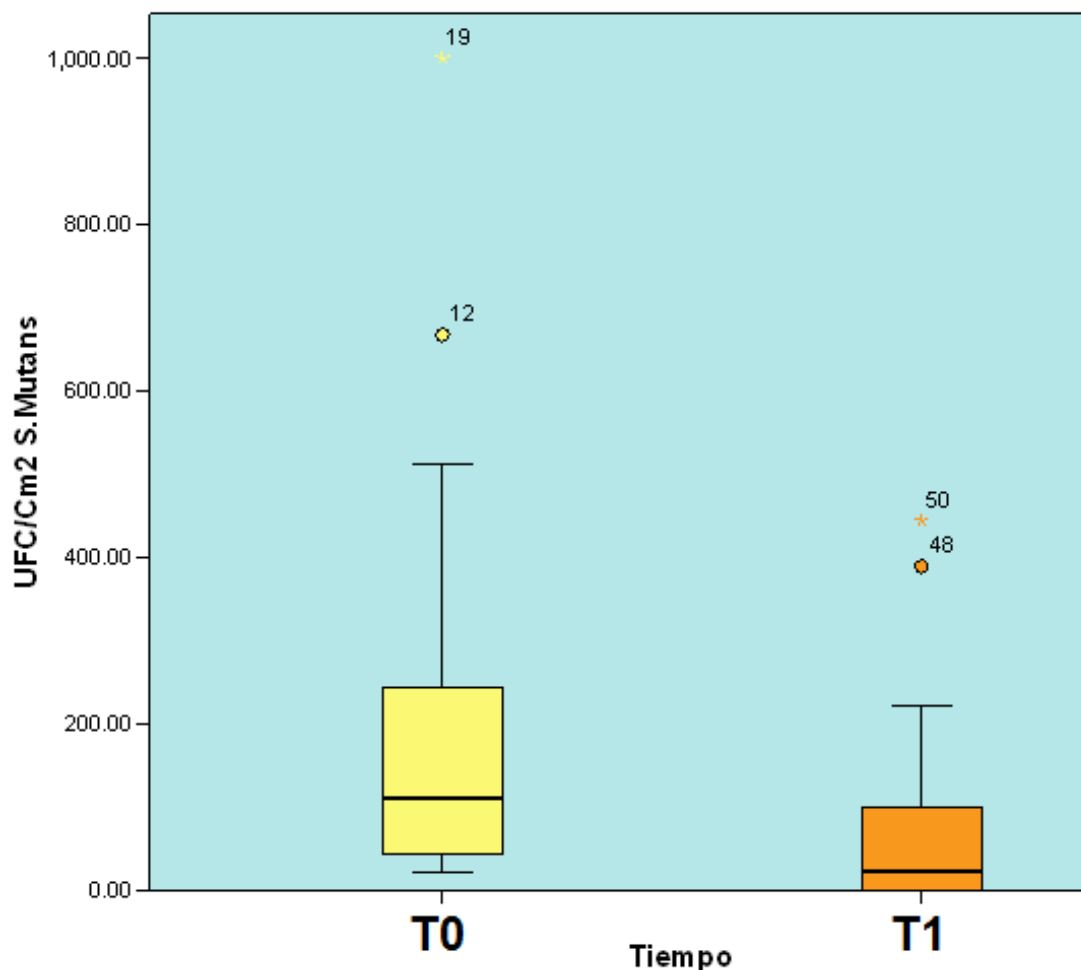


GRÁFICO N°1: Gráfico tipo caja donde se presentan las UFC/cm² de *Streptococcus mutans* en T0 y T1.

Al comparar los resultados mediante el test de Wilcoxon, se determinó que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el promedio del recuento de UFC/cm² de *Streptococcus mutans* en T0 y T1 (Tabla n° 5).

TABLA N°5: Se observan los resultados del Test de Wilcoxon, donde $p < 0.05$

	T1 – T0
Z	-4,385(a)
Sig. asintót. (bilateral)	,000

El promedio del recuento de UFC/cm² de *Streptococcus mutans* en el grupo T0 fue mayor que en el grupo T1.

DISCUSIÓN

Reconociendo que la caries es una enfermedad multifactorial, donde una serie de factores interactúan para que esta se instaure, el recuento de *Streptococcus mutans* solo es uno de los diversos factores que favorecen el desarrollo de la caries dental y por sí solo no es predictor de futuras lesiones. Además debemos saber que algunos autores han cuestionado el rol de *Streptococcus mutans* como principal bacteria productora de la caries (3), pero se le sigue reconociendo actualmente como el microorganismo presente en los inicios de la enfermedad, que mediante su metabolismo productor de ácidos, genera la desmineralización del esmalte dental. Desde esta perspectiva, cualquier barrera (mecánica o química) que se pueda interponer en la acción de *Streptococcus mutans*, favorecería su disminución, lo que lógicamente significaría disminuir el riesgo local. En el caso del sellante de resina, éste corresponde a una barrera mecánica que suprime el hábitat de los microorganismos que se encuentran en puntos y fisuras profundas, aislándolos del medio bucal, siendo privados de nutrientes (3).

Existe evidencia científica concluyente sobre lo que pasa bajo el sellante (3), pero existe insuficiente evidencia con respecto a lo que sucede sobre la superficie de este material dental.

Se ha mencionado en algunos estudios que la composición química de los materiales en base a resina puede aumentar la colonización bacteriana en su superficie por diversos mecanismos descritos por algunos autores como Khalichi (56). Sería interesante saber cómo las condiciones orales van modificando la superficie del sellante en base a resina compuesta en el largo plazo, debido a que se ha descrito que la acción de enzimas de la saliva del ser humano, como las esterasas, van degradando a nivel molecular la matriz orgánica de las resinas lo cual podría influir en la generación de zonas retentivas microscópicas o rugosidades que aumenten la agregación bacteriana sobre el material en base a resina (56, 57).

Considerando lo anterior, una posible solución al problema del sellante en el largo plazo es el desarrollo de nuevos sellantes con contenido de moléculas o partículas antibacterianas, como el órgano selenio o quitosán (58, 59), las que tuviesen una sostenida liberación en el tiempo frente a las bacterias cariogénicas, en especial a *Streptococcus mutans*. Esto está siendo evaluado actualmente en diversos estudios para contrarrestar el efecto de deterioro del sellante al largo plazo y evitar el posible aumento de bacterias cariogénicas (58, 59).

En el presente estudio, al comparar la cantidad de UFC/cm² de *Streptococcus mutans* en la zona de los surcos de la superficie oclusal de dientes posteriores, antes y después de la aplicación de sellante de resina compuesta, se encontró diferencia significativa, siendo menor la cantidad de UFC/cm² de *Streptococcus mutans* en la toma de muestra posterior a la aplicación del sellante (T1). La posible explicación de este resultado confirma la idea de que el sellante actúa como una barrera mecánica frente a los microorganismos, por la reducción de la adhesión bacteriana y colonización de bacterias cariogénicas, eliminando zonas retentivas del diente como son los surcos profundos, es decir, eliminando el nicho ecológico de las bacterias.

La revisión de la literatura no revela mayores trabajos que evalúen riesgo cariogénico basado principalmente en estudios clínicos – microbiológicos, siendo el único estudio clínico similar al nuestro el realizado por Baca y cols. (12) en el año 2002, el cual tiene resultados parecidos al presente estudio. En el estudio de Baca se tomaron muestras de saliva en dos grupos de niños: “con caries” y “sin caries”, observándose menor cantidad de bacterias del grupo Mutans Streptococci solo en el grupo “sin caries” después de la aplicación de sellante. A pesar de lo anterior, el estudio de Baca posee deficiencias, como por ejemplo, que sólo se consideró la toma de muestras de saliva, fue realizado solo en niños, y no se especificó qué tipo de sellante fue utilizado (con o sin flúor); a diferencia de nuestro estudio, el cual se realizó con una metodología con datos más definidos y objetivos como que todos los pacientes fueron clasificados con riesgo cariogénico alto según el programa Cariogram (53), fueron adultos con un promedio de edad

de 24 años y a todos se les aplicó el mismo tipo sellante en base a resina compuesta sin flúor, los cuales fueron evaluados antes de la toma de muestra de *Streptococcus mutans* (T1) con criterios Ryge Alfa, dejando de lado cualquier imperfección. Esto se traduce en que la existencia de diferencias halladas entre los recuentos microbiológicos de *Streptococcus mutans* se debe más bien a las características propias del material utilizado.

Los hallazgos del presente estudio aportan información clínica del real alcance sobre la importancia en la aplicación de sellantes en pacientes adultos jóvenes de alto riesgo, ya que a pesar de que existe evidencia de que el sellante es efectivo en niños con alto riesgo cariogénico, la investigación es escasa en lo que a adultos se refiere, por lo que se hace necesario aumentar y mejorar los estudios con respecto a este tema.

.

CONCLUSIÓN

Al finalizar esta investigación se puede concluir que:

En adultos jóvenes con alto riesgo cariogénico, la aplicación de sellante de resina sin flúor en surcos de dientes posteriores permanentes sanos, contribuye a reducir la cantidad de UFC/cm² de *Streptococcus mutans* sobre el área de los surcos de los dientes tratados.

SUGERENCIAS

- Realizar este estudio para medir otras bacterias implicadas en el proceso de caries.
- Realizar este estudio tomando muestras de saliva, paralelamente a la toma de muestras con la técnica de la cubeta y establecer una posible relación.
- Realizar este estudio comparando sellantes de resina y sellantes de vidrio ionómero.
- Hacer un seguimiento de los pacientes de este estudio a los 6 y 12 meses de la aplicación del sellante, evaluando criterios ryge y recuento de UFC/cm² de *Streptococcus mutans*.
- Comparar la cuantificación de UFC/cm² de *Streptococcus mutans* en el área de los surcos de las superficies oclusales de dientes posteriores de pacientes con alto, mediano y bajo riesgo cariogénico, mediante la técnica de la cubeta, que pueda servir como guía en la indicación de sellantes en pacientes de mayor riesgo cariogénico .
- Comparar el recuento de UFC/cm² *Streptococcus mutans* en superficies de sellantes con diferentes valoraciones de criterios Ryge, mediante la técnica de la cubeta.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res.* 2004;38(3):182-91.
2. Carounanidy U, Sathyanarayanan R. Dental caries: A complete changeover (Part II)-Changeover in the diagnosis and prognosis. *J Conserv Dent.* 2009;12(3):87-100.
3. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 2011;90(3):294-303.
4. Bernimoulin JP. Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontol.* 2003;30 Suppl 5:7-9.
5. Kitchens DH. The economics of pit and fissure sealants in preventive dentistry: a review. *J Contemp Dent Pract.* 2005;6(3):95-103.
6. Beauchamp J, Caufield PW, Crall JJ, Donly KJ, Feigal R, Gooch B, et al. Evidence-based clinical recommendations for the use of pit-and-fissure sealants: a report of the American Dental Association Council on Scientific Affairs. *Dent Clin North Am.* 2009;53(1):131-47, x.
7. Poulsen S, Beiruti N, Sadat N. A comparison of retention and the effect on caries of fissure sealing with a glass-ionomer and a resin-based sealant. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2001;29(4):298-301.
8. Ahovuo-Saloranta A, Forss H, Walsh T, Hiiri A, Nordblad A, Mäkelä M, et al. Sealants for preventing dental decay in the permanent teeth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;3:CD001830.
9. Matalon S, Slutzky H, Weiss EI. Surface antibacterial properties of packable resin composites: part I. *Quintessence Int.* 2004;35(3):189-93.
10. Banas JA. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci.* 2004;9:1267-77.
11. Skjærland KK, Sønju T. Effect of sucrose rinses on bacterial colonization on amalgam and composite. *Acta Odontol Scand.* 1982;40(4):193-6.
12. Baca P, Castillo AM, Bravo M, Junco P, Baca AP, Llodra JC. Mutans streptococci and lactobacilli in saliva after the application of fissure sealants. *Oper Dent.* 2002;27(2):107-11.
13. Pitts NB, Stamm JW. International Consensus Workshop on Caries Clinical Trials (ICW-CCT)--final consensus statements: agreeing where the evidence leads. *J Dent Res.* 2004;83 Spec No C:C125-8.
14. Kidd EA, Fejerskov O. What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res.* 2004;83 Spec No C:C35-8.
15. Manji F, Fejerskov O, Nagelkerke NJ, Baelum V. A random effects model for some epidemiological features of dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1991;19(6):324-8.
16. Chaussain-Miller C, Fioretti F, Goldberg M, Menashi S. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in human caries. *J Dent Res.* 2006;85(1):22-32.
17. Anderson MH, Molvar MP, Powell LV. Treating dental caries as an infectious disease. *Oper Dent.* 1991;16(1):21-8.
18. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, et al. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol.* 2004;97(6):1311-8.
19. Kidd EA. The diagnosis and management of the 'early' carious lesion in permanent teeth. *Dent Update.* 1984;11(2):69-70, 2-4, 6-8 passim.
20. Balakrishnan M, Simmonds RS, Tagg JR. Dental caries is a preventable infectious disease. *Aust Dent J.* 2000;45(4):235-45.
21. KEYES PH. The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. Findings and implications. *Arch Oral Biol.* 1960;1:304-20.
22. Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev.* 1976;9:65-107.
23. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 2003;149(Pt 2):279-94.
24. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health.* 2006;6 Suppl 1:S14.
25. Marsh PD, Bradshaw DJ. Physiological approaches to the control of oral biofilms. *Adv Dent Res.* 1997;11(1):176-85.
26. Yoshida K, Tanagawa M, Matsumoto S, Yamada T, Atsuta M.

- Antibacterial activity of resin composites with silver-containing materials. *Eur J Oral Sci.* 1999;107(4):290-6.
27. Coykendall AL. Classification and identification of the viridans streptococci. *Clin Microbiol Rev.* 1989;2(3):315-28.
 28. Seki M, Yamashita Y, Shibata Y, Torigoe H, Tsuda H, Maeno M. Effect of mixed mutans streptococci colonization on caries development. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21(1):47-52.
 29. Schaeken MJ, van der Hoeven JS, Franken HC. Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on five isolation media, including a new simple selective medium. *J Dent Res.* 1986;65(6):906-8.
 30. Jordan HV, Laraway R, Snirch R, Marmel M. A simplified diagnostic system for cultural detection and enumeration of *Streptococcus mutans*. *J Dent Res.* 1987;66(1):57-61.
 31. Shahal Y, Steinberg D, Hirschfeld Z, Bronshteyn M, Kopolovic K. In vitro bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restorative materials. *J Oral Rehabil.* 1998;25(1):52-8.
 32. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res.* 2006;85(10):878-87.
 33. Donly KJ, Segura A. Fluoride release and caries inhibition associated with a resin-modified glass-ionomer cement at varying fluoride loading doses. *Am J Dent.* 2002;15(1):8-10.
 34. de Soet JJ, van Loveren C, Lammens AJ, Pavicić MJ, Homburg CH, ten Cate JM, et al. Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* 1991;25(2):116-22.
 35. Wallman C, Krasse B. A simple method for monitoring mutans streptococci in margins of restorations. *J Dent.* 1993;21(4):216-9.
 36. Park JH, Tanabe Y, Tinanoff N, Turng BF, Lilli H, Minah GE. Evaluation of microbiological screening systems using dental plaque specimens from young children aged 6-36 months. *Caries Res.* 2006;40(3):277-80.
 37. Zúñiga Saavedra PA, Moncada Cortés G, Palma Fluxá P, Vildósola Grez 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.: Universidad de Chile; 2010.
 38. Sieber Carrasco CA, Moncada Cortés G, Palma Fluxá P, Vildósola Grez P. Recuento de *Streptococcus mutans* en muestras de biofilm sobre dientes restaurados con resina compuesta oclusal versus dientes sanos mediante el método de la cubeta.: Universidad de Chile; 2012.
 39. Baratieri LN. *Operatoria dental. Procedimientos preventivos y restauradores.* 1993. p. 147-66 Cap. 5 p.
 40. Henostroza G. *Adhesión en Odontología restauradora.* 1° edición. ed2003. 454 p. p.
 41. Barrancos Mooney J. *Operatoria dental.* 4° edición. ed2006. 1306 p. p. 373 - 393, 652 - 664. Cap. 20 y 30. p.
 42. Uribe Echeverri J. *Operatoria dental. Ciencia y práctica.* 1990. 385 p. p.71 - 89. Cap. 4. p.
 43. Cueto EI, Buonocore MG. Sealing of pits and fissures with an adhesive resin: its use in caries prevention. *J Am Dent Assoc.* 1967;75(1):121-8.
 44. Simonsen RJ, Neal RC. A review of the clinical application and performance of pit and fissure sealants. *Aust Dent J.* 2011;56 Suppl 1:45-58.
 45. Simonsen RJ. Fissure sealants and the preventive resin restoration on the NHS. *Br Dent J.* 1988;165(7):238-9.
 46. Dennison JB, Powers JM. Physical properties of pit and fissure sealants. *J Dent Res.* 1979;58(4):1430.
 47. Ripa LW. Sealants revisited: an update of the effectiveness of pit-and-fissure sealants. *Caries Res.* 1993;27 Suppl 1:77-82.
 48. Pardi V, Pereira AC, Mialhe FL, Meneghim MeC, Ambrosano GM. A 5-year evaluation of two glass-ionomer cements used as fissure sealants. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003;31(5):386-91.
 49. Wiegand A, Buchalla W, Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials--fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater.* 2007;23(3):343-62.

50. Griffin SO, Jones K, Gray SK, Malvitz DM, Gooch BF. Exploring four-handed delivery and retention of resin-based sealants. *J Am Dent Assoc.* 2008;139(3):281-9; quiz 358.
51. Muller-Bolla M, Lupi-Pégurier L, Tardieu C, Velly AM, Antomarchi C. Retention of resin-based pit and fissure sealants: A systematic review. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2006;34(5):321-36.
52. Rix AM, Sams DR, Dickinson GL, Adair SM, Russell CM, Hoyle SL. Pit and fissure sealant application using a drying agent. *Am J Dent.* 1994;7(3):131-3.
53. Hänsel Petersson G, Twetman S, Bratthall D. Evaluation of a computer program for caries risk assessment in schoolchildren. *Caries Res.* 2002;36(5):327-40.
54. Poyato-Ferrera M, Segura-Egea JJ, Bullón-Fernández P. Comparison of modified Bass technique with normal toothbrushing practices for efficacy in supragingival plaque removal. *Int J Dent Hyg.* 2003;1(2):110-4.
55. Zandoná AF, Zero DT. Diagnostic tools for early caries detection. *J Am Dent Assoc.* 2006;137(12):1675-84; quiz 730.
56. Khalichi P, Singh J, Cvitkovitch DG, Santerre JP. The influence of triethylene glycol derived from dental composite resins on the regulation of *Streptococcus mutans* gene expression. *Biomaterials.* 2009;30(4):452-9.
57. Bürgers R, Cariaga T, Müller R, Rosentritt M, Reischl U, Handel G, et al. Effects of aging on surface properties and adhesion of *Streptococcus mutans* on various fissure sealants. *Clin Oral Investig.* 2009;13(4):419-26.
58. Mahapoka E, Arirachakaran P, Watthanaphanit A, Rujiravanit R, Poolthong S. Chitosan whiskers from shrimp shells incorporated into dimethacrylate-based dental resin sealant. *Dent Mater J.* 2012;31(2):273-9.
59. Tran P, Hamood A, Mosley T, Gray T, Jarvis C, Webster D, et al. Organo-selenium-containing dental sealant inhibits bacterial biofilm. *J Dent Res.* 2013;92(5):461-6.

ANEXO N°1

Universidad de Chile

Facultad de Odontología

Departamento de Odontología Restauradora, Operatoria Clínica 4º año.

Departamento Patología Área de Microbiología Bucal

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 veces en el día

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

c) Hora Último Cepillado _____

3. Examen Bucal

Nº de Pieza Dentaria	Diagnóstico de la pieza	Indicación de Sellante de resina
1.8		
1.7		
1.6		
1.5		
1.4		
2.8		
2.7		
2.6		
2.5		
2.4		
3.8		
3.7		
3.6		
3.5		
3.4		
4.8		
4.7		
4.6		
4.5		
4.4		

4. Toma de muestra antes de aplicación de sellante de resina

a) Hora _____

b) Fecha _____

5. Toma de muestra después de aplicación de sellante de resina

b) Hora _____

b) Fecha _____



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

ANEXO N°2

Fecha de Edición: 20 de Agosto de 2012

Consentimiento Informado

Título del Protocolo: “Estudio clínico comparativo de recuento de *Streptococcus mutans* antes y después de la aplicación de sellante.”

Investigador Principal: Prof. Dr. Patricio Vildósola Grez
Sede de Estudio: Facultad de Odontología, Universidad de Chile – Olivos 943 – Santiago.
Nombre del Paciente:

Yo Patricio Vildósola Grez 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. Le proporcionaré información y lo invitaré a ser parte de ella. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. Antes de hacerlo puede 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 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 antes de ser sellados, como después de la aplicación del sellante. 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 determinar si existe diferencia significativa en el recuento de UFC/cm² de *Streptococcus mutans* sobre el área de los surcos de la superficie oclusal de dientes posteriores permanentes, antes y después de la aplicación de sellante de resina.

Beneficio de la Investigación.

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

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

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

Tipo de Intervención y Procedimiento.

Si usted decide participar se le realizará en una primera sesión un examen bucal y se le enseñará una técnica de higiene, la que se reevaluará una semana después, antes de tomar las muestras.

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 llevará a cabo presionando suavemente por un minuto esta cubetilla sobre sus piezas dentarias. Se tomarán dos muestras con esta cubetilla, una en la pieza sana, antes de la aplicación del sellante, y otra 4 semanas después de la aplicación del sellante. Para la aplicación del sellante se realizará una limpieza en el diente a estudiar con una escobilla y flor de pómez, luego se grabará la superficie oclusal del diente con ácido ortofosfórico al 37% para luego proceder a la aplicación del sellante de resina.

Luego de la toma de muestra final, serán selladas todas las otras piezas en boca que tengan indicación de sellante.

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 a 13 horas y los miércoles de 14 a 17 horas.

Riesgo de la Investigación.

Usted no correrá ningún riesgo durante 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 sufrirá 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 lo 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 los colaboradores, a realizar el procedimiento diagnóstico pertinente, PUESTO QUE SE QUE ES POR MI PROPIO BENEFICIO

- Nombre del Paciente: _____
- 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.

- Nombre del Investigador Principal: _____
- Firma: _____
- Fecha: _____

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 Natalia Acuña al números 51690180

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	Bravo	Charlie
Color	La restauración concuerda en color y translucidez con la estructura dentaria adyacente.	La diferencia en color y translucidez entre restauración y diente están dentro de un rango aceptable.	La diferencia en color y translucidez entre restauración y diente están fuera de un rango aceptable.
Adaptación Marginal	La sonda no se retiene al pasarla a través de la interfase diente-restauración.	La sonda penetra en un surco cuando pasa por la interfase diente-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 contorno del diente.	La restauración presenta sobre contorno 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.

