



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

Pri.-ODO 11-02

**Comparación de recuento de *Streptococcus mutans*
en biofilm de placa bacteriana sobre restauraciones
oclusales de amalgama y resina compuesta, utilizando el
Método de la Cubeta.**

María de los Angeles Solari Truffy

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

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

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

**Santiago-Chile
2011.**

*A MIS PADRES:
Luid Pedro y Carmen Gloria*

*A MI FAMILIA:
Silvia, Jose, Maca.
Juan Luis que me acompaña desde el cielo.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Luis por darme siempre el apoyo que necesité y enseñarme a nunca rendirme, Carmen Gloria por consolarme cuando fue necesario y enseñarme a disfrutar cada momento.

A Silvia, mi primer paciente, la única valiente de la familia que me ayudó, con humor, siempre que pudo y más de lo que yo necesitaba.

A mis hermanas Josefina y Macarena, que juntas nos reímos, sufrimos y disfrutamos de la vida.

A Juan Eduardo, por su incondicional apoyo y fe, por darme siempre ánimo cuando lo necesité y llevarme a dar lo mejor de mí en esta etapa.

A mis tutores, Prof. Dr. Gustavo Moncada, Dr. Patricio Vildósola y Dra. Patricia Palma por guiarme en el último trayecto de mi vida universitaria, por la paciencia y la disposición para escuchar y aclarar mis dudas.

A los docentes de microbiología y operatoria que siempre estuvieron dispuestos ayudarme, a responder mis dudas, que no eran pocas, y a compartir sus conocimientos y experiencia.

A mis amigos por darme ánimo, saber escuchar y hacer de la universidad una increíble experiencia.

Por último a Dios por llenar mi vida de dichas y bendiciones

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
1.Caries Dental	4
1.1Etiología de la Caries Dental	4
1.2Microbiología de la Caries Dental	7
1.2.1Biofilm	9
1.2.2Grupo Streptococci mutans	10
1.2.2.1 <i>Streptococcus mutans</i>	11
1.2.2.2 <i>Streptococcus sobrinus</i>	13
2.Riesgo Cariogénico	14
2.2 COPD	15
2.1 Métodos de aislamiento y recuento de <i>Streptococcus mutans</i>	16
3.Materiales Dentales y su relación con microbiología	17
3.1 Amalgama	17
3.2 Resinas Compuestas	18
4.Caries Secundaria	19
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	21
MATERIALYMÉTODO	22
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIONES	41
SUGERENCIAS	42
REFERENCIAS BIBILOGRÁFICAS	44
ANEXOS	49

RESUMEN

Introducción: Determinar el riesgo cariogénico del paciente es un requisito fundamental al realizar un diagnóstico. Éste nos permitirá elaborar un plan de tratamiento que responda a las necesidades particulares de cada paciente.

La importancia de establecer el recuento de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) sobre restauraciones de amalgama versus resina compuesta, permitiría identificar el nivel de riesgo microbiológico en desarrollar caries secundaria, teniendo en conocimiento que esta es la principal causa de fallas de restauraciones, reduciendo en el futuro su recambio, con la consecuente pérdida de tejido sano que ocurre en cada reemplazo.

Conocer la colonización de microbiota cariogénica en restauraciones de amalgama y resina compuesta, podría ser un aspecto a considerar en las decisiones de tratamiento, eligiendo así 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 Dental de 4to año de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, durante el periodo de Septiembre a Diciembre del 2011. En cada uno de ellos se tomó una muestra de microbiota dental de una pieza dentaria restaurada con amalgama y con resina compuesta utilizando la técnica de la cubeta. Este método consiste en realizar una impresión directa sobre las superficies oclusales de restauraciones, mediante una cubetilla de flúor 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* de la superficie de restauraciones

oclusales de amalgama y resina compuesta en el 94,2% 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 restauraciones de amalgama.

Conclusiones: Existen diferencias significativas en el recuento de *Streptococcus mutans* en restauraciones de resina compuestas y en la superficie de restauraciones de amalgama, siendo mayor en restauraciones de resina compuestas a partir de muestras de placa bacteriana dental obtenidas mediante la técnica de la cubeta.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades bucales son las más comunes de las enfermedades crónicas y son un importante problema de Salud Pública por su alta prevalencia, impacto en los individuos, la sociedad, y el costo de su tratamiento⁽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 microorganismos cariogénicos presentes en la placa bacteriana dental, los que mediados por sus factores de virulencia, se adhieren a la superficie del diente produciendo ácidos por la fermentación de hidratos de carbono de la dieta, los que provocan la pérdida de minerales de su estructura⁽³⁾, siendo *Streptococcus mutans* (*S.mutans*), considerado uno de los principales agentes cariogénicos⁽⁴⁾.

Cuando se ha perdido parte de la estructura dentaria es necesario reconstruirla, para ello existe una gran variedad de materiales⁽²⁾. Sin embargo esto no mejora la salud bucal de las personas, sino que solo limita el daño ya producido. 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 del adecuado tratamiento restaurador⁽⁵⁾.

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⁾.

Conocer los patrones de colonización por microorganismos cariogénicos en la superficie de restauraciones de amalgama y resina compuesta, podría ser determinante en las decisiones de tratamiento, eligiendo así un material de restauraciones y medidas preventivas, ajustada al riesgo cariogénico local y propio de cada paciente.

MARCOTEÓRICO

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 microorganismos cariogénicos. Afecta a la estructura dura de las piezas dentarias y se caracteriza por la desintegración molecular, localizada y progresiva que lleva, en caso de no detener su avance natural, a una lesión irreversible ⁽⁷⁾.

Actualmente al tener un enfoque preventivo de tratamiento dental se considera que factores propios del medio bucal influenciarían el desarrollo de la caries dental, tales como, flujo salival, capacidad buffer de la saliva, dieta, microorganismos presentes en el biofilm, esto, también, se combina con factores propios del hospedero, clase social, nivel educacional, edad, actitudes y conocimiento que posea (Fig. N°1) ⁽⁷⁾.

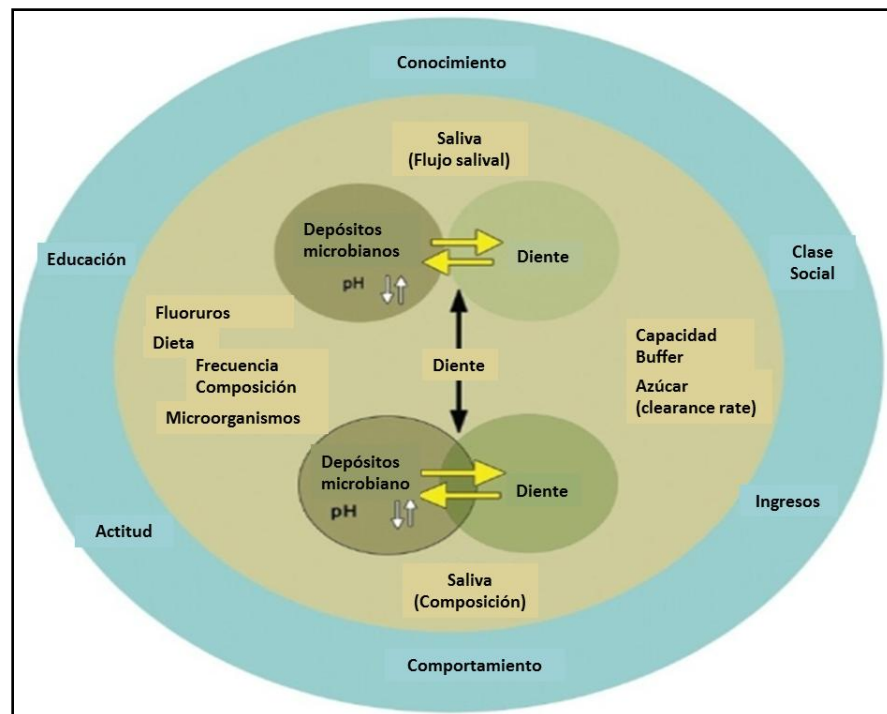


Fig. N°1:Esquema del concepto actual de caries dental. Modificado Fejerskov, O"Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral healthcare." *Caries Res* 2004

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

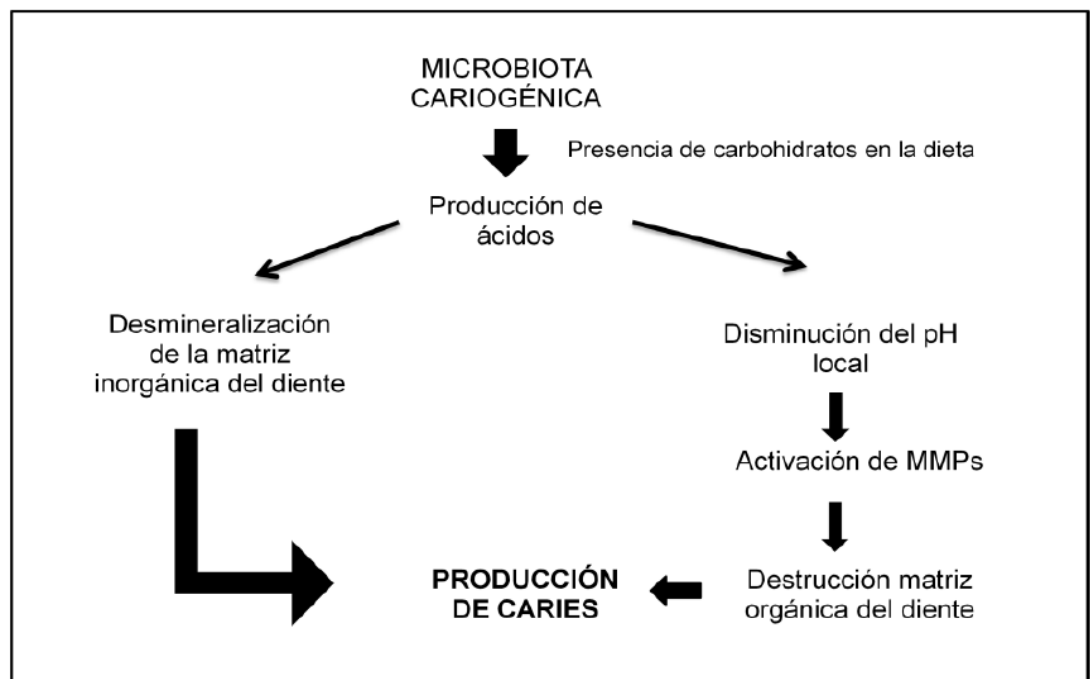


Fig. N°2: Proceso de producción de caries. Tomado de Anderson MH, et al. "Treating Dental Caries as an Infectious Disease." *Operative Dentistry*. 1991;

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 madura 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 con respecto al sitio de la lesión. Según esta clasificación se pueden 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 el 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 del tratamiento restaurador. El tipo de lesión primaria justifica el tipo de intervención a realizar ⁽¹¹⁾, así frente a una lesión incipiente se realizaría terapia de remineralización, en cambio en una lesión donde ya existe cavitación, se realizará la rehabilitación del diente con el material restaurador adecuado.

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 (sigloXVII), 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 conduciría a la desmineralización del diente ⁽¹²⁾.

Luego la “Hipótesis de Placa Inespecífica”, propone que caries, como enfermedad, es producto de la interacción de todos los grupos bacterianos que están dentro de la placa dental ⁽¹³⁾.

Loesche, en 1976, postuló la “Hipótesis de Placa Específica” desplazando la anterior. Plantea que para el desarrollo de caries debían estar presentes en la placa dental bacterias específicas, siendo estas 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.

Cabe mencionar que dentro de los microorganismos considerados cariogénicos encontramos *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), *Streptococcus 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⁾. *S. mutans*, en cambio, se encuentra en un alto porcentaje, por lo que 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 en el desarrollo de la caries, esta relación no es única. Se pueden detectar lesiones de caries incluso

en ausencia de esta especie (lesión de esmalte), así como puede existir colonización de *S.mutans* sin evidencia detectable de desmineralización de los dientes ⁽¹⁵⁾.

A partir de esto, 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⁾

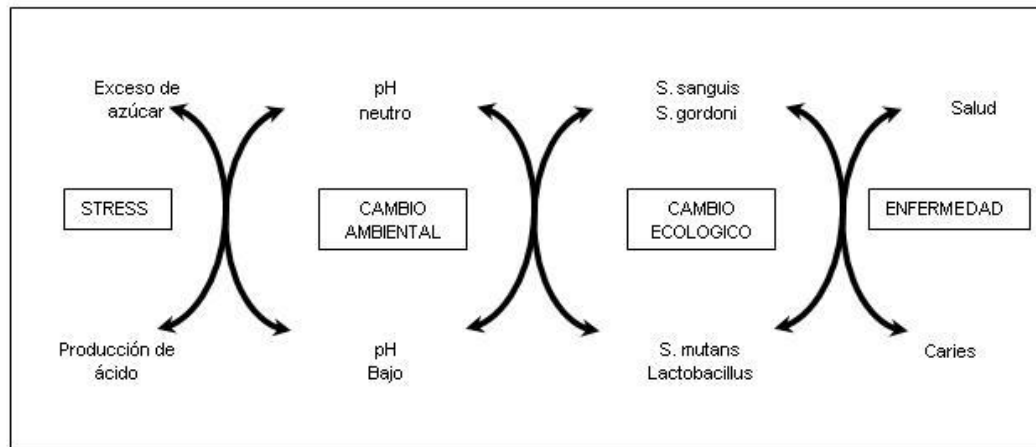


Fig. N°3: Representación de la “Hipótesis de Placa Ecológica” Marsh, P. “Dental plaque as a biofilm and microbial community implications for health and disease.” BMC Oral Health 2006

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 sus 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 *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacilli spp.* también están involucrados en el desarrollo de esta patología ⁽¹⁸⁾.

1.2.1 Biofilm.

Biofilm se describe como comunidad compleja de microorganismos adheridos a una superficie; estos microorganismos se encuentran organizados espacialmente en una estructura tridimensional, envueltos en una matriz extracelular que deriva de ellas mismas y el medio que las rodea; muestran 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 cultivo planctónicos, por ejemplo, un biofilm puede ser hasta 1000 veces más resistente frente a agentes antimicrobianos que lo que pueden llegar a ser las mismas células en cultivos líquidos. No son la suma de expresión de cada microorganismo constituyente, sino más bien, establece una comunidad microbiana organizada que crece sobre cualquier superficie y puede llegar a ser más patógena que cultivos puros de los microorganismos que lo constituyen⁽¹⁹⁾.

Luego de la formación de la película dental adquirida, ciertos microorganismos se adhieren a ella, proliferan y forman colonias⁽³⁾. 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 los 4 y 10 días ya se puede observar una placa bacteriana madura⁽²⁰⁾.

La composición de la placa bacteriana 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⁽¹⁵⁾.

Solamente algunas especies bacterianas, como *S. mutans*, son capaces de adherirse a todas las superficies orales y además adherirse fuertemente entre sí⁽²⁰⁾ por lo que posee una de las mayores capacidades de iniciar el proceso de formación de caries⁽²¹⁾.

1.2.2 Grupo Streptococci mutans.

Especies del grupo Mutans Streptococci se encuentran en la placa bacteriana dental, y se consideran los patógenos más asociados con 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 ₂	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	-	-	-	-	-	+	-

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

1.2.2.1 *Streptococcus mutans*

Fitzgerald y Keyes, en 1960, ⁽¹²⁾ identificaron a *Streptococcus 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 la cepa 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 Estreptococos orales, *S. mutans* es capaz de fermentar diversos azúcares, particularmente el 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 de los *estreptococos* orales en la mayoría de las ocasiones, produciendo 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 *streptococos* cariogénicos en los dientes, además de aumentar la porosidad y dimensión de la matriz de la placa dental, permitiendo mayor difusión del sustrato a través de la superficie del esmalte, produciendo descenso de los valores de pH en capas más profundas de la placa, favoreciendo un incremento en el desarrollo de caries^(31,32).

Adicionalmente, 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^(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⁾.

1.2.2.2 *Streptococcus sobrinus*

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

Produce glucanos solubles e insoluble y posee dextranasa para hidrolizarlos ⁽²⁵⁾. Sintetiza menos polisacáridos intracelulares que *S. mutans*, por eso toda la glucosa disponible es usada para producir ácidos, lo que 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 observado que produce ácidos a partir de glucosa más rápido que *S. mutans*, especialmente en valores de pH más bajos, por lo que una diferencia en el potencial cariogénico entre ambas bacterias es probable, 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% en muestras de placa dental, encontrándose en menor proporción que *S. mutans*, el cual alcanza un 43% ⁽²⁷⁾. Sin embargo, *S. sobrinus* puede inducir lesiones de caries en cualquier tipo de superficie dentaria, lisa, fosas y fisuras, interproximales y cemento, e intervenir en la progresión de la lesión cariosa ⁽¹⁾.

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

2. Riesgo cariogénico

Riesgo cariogénico se define como la “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 medio ambiental, conductual o biológico que al estar presente, directamente incrementa la probabilidad de que una enfermedad ocurra, y si está ausente o se remueve esta probabilidad disminuye ⁽³⁶⁾.

Los factores que inciden en la producción de caries pueden clasificarse en primarios, secundarios y terciarios ⁽²⁵⁾. 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 y el tiempo en que los tres factores anteriores interactúan ⁽²⁵⁾.

Como factores secundarios puede mencionarse la saliva, la exposición a fluoruros, la higiene oral y la condición sistémica del individuo, entre otros ^(1,25).

Los factores terciarios se relacionan con la clase social, la educación, ingresos económicos, conocimiento, actitudes y conductas ⁽²⁵⁾.

Es así como los pacientes se clasifican según riesgo de caries, para poder realizar un tratamiento dirigido según la necesidad del paciente.

Muchos de estos factores pueden ser reconocidos mediante la anamnesis exhaustiva y el examen clínico minucioso, en el cual podemos determinar el COPD del paciente, que nos indica el daño acumulativo producido por caries. 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 acumulativa 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 conducirá 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, tales como 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 del daño acumulativo y no del estado de actividad de la enfermedad. Otra desventaja es que se asume que los daño 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⁾.

Otra aspecto en contra es el hecho que entrega un valor que no llega a reflejar la verdadera distribución de la enfermedad, debido a la alta polarización que esta presenta en la población, la que 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 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 de el diente a estudiar. 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 de microorganismos, los cuales pueden no ser recolectadas por el instrumento debido a la dificultad para recoger muestras de biofilm de la totalidad de la superficie⁽⁴⁰⁾.

La técnica de la cubeta es un método simple, de bajo costo y no invasivo para la aislación y recuento de UFC/cm² de *S. mutans* de muestras obtenidas de placa dental sobre las superficies de piezas dentarias sanas y/o restauradas. Esta técnica se basa en impresiones microbiológicas, utilizando como medio de cultivo agar TYCSB que se colocan sobre las superficies oclusales de los dientes a estudiar. Se realiza una toma directa de la muestras de biofilm de placa dental sobre las superficies de restauraciones y/o dientes sanos de manera conservadora, que nos asegura cubrir toda la superficie a estudiar. Dentro de las ventajas de esta técnica encontramos que es simple, de bajo costo y no invasivo. Además requiere menor tiempo de procesamiento microbiológico, ya que elimina etapas como la dilución, siembra, y puede ser realizado por personal clínico sin profundos conocimientos de microbiología.

El objetivo principal de esta técnica es su uso en trabajos de investigación⁽⁴¹⁾. Un estudio realizado por Zuñiga el 2010⁽⁴¹⁾ demuestra que la técnica de la cubeta es capaz de aislar y recuperar *S. mutans* a partir de muestras de placa bacteriana dental en la superficie del tejido dentario y restauraciones. Además posee una correlación positiva con el método del mondadientes y con el método de recuento de *S. mutans* en saliva⁽⁴¹⁾. Por estos motivos se utilizará este método en esta investigación.

3. Materiales dentales y su relación con microbiología.

Cuando ya existe pérdida de tejido dentario, por diversos motivos, es necesario reconstruirlas. Para ello se han creado una gran variedad de materiales ⁽²⁾. La interacción biológica entre los materiales de restauración y la microbiota oral es un factor a tomar en cuenta para el pronóstico del tratamiento restaurador ⁽⁴²⁾. Las propiedades de la superficie de los materiales de restauración son determinantes en la adhesión bacteriana y en la colonización de las obturaciones ⁽⁴³⁾, 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 ^(43, 44).

Esto nos lleva a asumir que los diferentes materiales de restauración presentan diferentes interacciones con las bacterias cariogénicas que los colonizan ⁽⁴⁵⁾.

3.1 Amalgama.

La amalgama dental es un tipo especial de aleación de mercurio, plata, cobre y estaño, puede contener paladio, zinc y otros elementos para mejorar sus características clínicas de manejo ⁽⁴⁶⁾.

Con el tiempo el uso de la amalgama, como material restaurador, ha disminuido dando paso a restauraciones más estéticas. Sin embargo, sigue siendo una opción de tratamiento de uso masivo, especialmente en el sector posterior. Su relativo bajo costo y alta relación costo beneficio a largo plazo, favorece su uso en la práctica odontológica ⁽⁴⁷⁾.

Dentro de las ventajas que presenta este material podemos mencionar es poco sensible a la técnica y más durable, si lo comparamos con resinas compuestas. Además, presenta un mecanismo propio para resistir la

microfiltración y la invasión bacteriana mediante la corrosión de sus márgenes ⁽⁴⁶⁾.

Se ha publicado que la amalgama acumula menor cantidad de placa bacteriana que las resinas compuestas ⁽⁴⁸⁾. En algunas investigaciones se ha visto que la amalgama posee una actividad antibacteriana debido a la liberación de iones metálicos ⁽⁴⁹⁾. Esto conduciría a un menor acumulo de placa bacteriana, presentando menor recuento de UFC/cm² de *S. mutans* en los márgenes de las restauraciones ⁽⁵⁰⁾.

3.2 Resina Compuesta.

Es un material de restauración formado por tres componentes básicos: una *matriz de resina* en base a una partícula monomérica, denominada bis-GMA, *partículas de relleno inorgánico*, dióxido de silicio borosilicatos, aluminosilicatos de Bario, Cuarzo, que mejoran sus propiedades mecánicas y un *complejo iniciador activador* ⁽⁵¹⁾.

Su uso ha aumentado considerablemente en los últimos años debido a la creciente demanda estética. Dentro de sus propiedades destaca por ser un material insoluble, insensible a la deshidratación y con buenas propiedades mecánicas ⁽⁴⁶⁾

Estudios, "*in vitro*" e "*in vivo*", señalan que las resinas compuestas acumulan una mayor cantidad de bacterias y placa bacteriana que la superficie del esmalte ⁽³⁰⁾. A su vez se ha descrito que la superficie cubierta por placa en resinas es mayor que en amalgama, siendo encontradas en los márgenes de estas las especies *S. mutans* y *Lactobacilli spp* ⁽⁵⁰⁾.

4. Caries Secundaria

La caries secundaria o recurrente, es aquella que se detecta en los márgenes de una restauración existente,^(53, 54) siendo la razón más frecuente de reemplazo de restauraciones⁽⁵⁴⁾. En un estudio de prevalencia se mostró que este tipo de lesiones son más comunes en adultos que las lesiones de caries primaria⁽⁵⁵⁾ y es la mayor responsable de la falla de obturaciones^(53, 55).

Los métodos diagnósticos más usados son la exploración clínica y las radiografías de aleta mordida⁽⁵³⁾.

Histológicamente la lesión de caries secundaria es igual a la caries primaria pero adyacente a una restauración. Podemos distinguir en 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 el tejido coronario y/o radicular del diente, con una histología similar a la caries primaria⁽⁵³⁾.

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⁽⁵⁵⁾. 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⁽⁵³⁾, por lo que se sugiere que *S. mutans* es el principal agente etiológico de la caries secundaria^(53, 54).

La presencia de caries secundaria no solo se relaciona con algún defecto marginal, sino que requiere de la formación de placa con potencial cariogénico⁽⁵³⁾.

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 adyacente a una restauración”⁽¹⁹⁾.

La cantidad y calidad 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^(53,54).

Se ha identificado a *S. mutans* como la especie bacteriana con mayor poder patogénico para desarrollar caries^(14,15), es por esto que identificarlo y cuantificarlo es fundamental para predecir el éxito de los tratamientos restauradores y evitar futuras lesiones⁽¹⁵⁾.

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, esta relación puede ser un factor a considerar a la hora de tomar decisiones y decidir el plan de tratamiento del paciente.

Se ha escogido la amalgama y resina compuesta como materiales de estudio debido a su amplio uso en la clínica odontológica actual y ambos pueden ser encontrados en restauraciones posteriores.

Conocer la colonización de flora cariogénica sobre restauraciones de amalgama y resina compuesta, podría ser determinante en las decisiones de tratamiento, eligiendo así un material de restauraciones y medidas preventivas, ajustada con el riesgo cariogénico local y propio de cada paciente.

Es por las razones expuestas y la problemática que representa en la integridad y longevidad de los tratamientos restauradores la caries secundaria que se ha decidido realizar una comparación de recuento bacteriano, a través del método de la cubeta, de restauraciones de resina compuesta y amalgama.

HIPÓTESIS

Existen diferencias estadísticamente significativas en el recuento de UFC/cm² de *Streptococcus mutans* a partir de muestras de placa dental de restauraciones oclusales de amalgama y resina compuesta, utilizando el método de la cubeta.

OBJETIVO GENERAL

Comparar la cantidad de UFC/cm² de *Streptococcus mutans* de muestras de placa dental presentes en la superficie oclusal de restauraciones de amalgama y resina compuesta obtenidas mediante la Técnica de Cubeta

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener muestras de placa dental en restauraciones oclusales de amalgama y resina compuesta mediante técnica de cubeta.
- Aislar, identificar y cuantificar la cantidad de UFC/cm² de *S. mutans* a partir de muestras obtenidas mediante técnica de cubeta.

MATERIAL Y MÉTODO

La muestra consistió en 69 pacientes (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 estudio y la metodología fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, previo a la toma de muestras.

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 con los siguientes antecedentes:

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

Esto arrojó como resultado el número de 64 pacientes, pero para compensar posibles inasistencias de pacientes se aumentó el número de muestras a 69 pacientes.

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

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 y Diciembre del 2011, que poseían una obturación oclusal de

amalgama y resina compuesta en dientes homólogos y cumplían con los criterios de inclusión y exclusión definidos.

Criterios de Inclusión:

- Pacientes mayores de edad, de ambos sexos, entre 18 a 45 años que poseían piezas dentarias homólogas restauradas con amalgama y resina compuesta.
- Los materiales de restauración que se incluyeron en la muestra fueron resinas compuestas y amalgamas.
- Restauraciones que cumplían las condiciones alfa según los Criterios Ryge modificados, ⁽⁵⁷⁾ United State Public health Service (USPHS), (ver anexo 3) evaluadas por operador calibrado con Índice Kappa de Cohen 0,75.
- Las restauraciones a estudiar fueron oclusales de piezas posteriores, superiores e inferiores, que no excedían más de un tercio de la distancia intercuspídea.
- Longevidad de las restauraciones de dos años mínimo.
- Pacientes de alto riesgo, definido a través de un cariograma.

Criterios de Exclusión:

- Restauraciones que se clasificaron como bravo o charlie según los Criterios Ryge modificados (USPHS) ⁽⁵⁷⁾ (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. Mediante

declaración del paciente.

- 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.
- Pacientes que consumían goma de mascar cuatro o más días a la semana ⁽⁵⁹⁾. Mediante declaración del paciente.
- Pacientes con dificultades motrices que les impedía realizar su propia higiene dental.

2) Proceso de Consentimiento Informado

A cada paciente seleccionado se le hizo lectura del Consentimiento Informado (ver anexo 2), explicándole 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, y se podía rehusar o retirar 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 leyó y explicó en forma detallada el formulario de Consentimiento Informado
- IV. Se entregó una copia escrita para que el paciente revisara en casa y pensara en su decisión.
- V. En caso de aceptar firmaron el documento todas las partes involucradas.

3) Procedimiento

El procedimiento fue realizado por dos operadores. El Operador N°1 seleccionó a los pacientes, llenó las ficha clínica y el consentimiento informado. El Operador N°2 (María de los Ángeles Solari) realizó la toma de muestras.

Para cada paciente se determinó su riesgo cariogénico utilizando el programa Cariogram Versión 2.01. Se seleccionaron aquellos que poseían un alto riesgo. Ellos fueron sometidos a reforzamiento de técnicas de higiene y a la aplicación de flúor barniz sobre sus piezas dentarias, junto con la indicación de uso de pasta dental con concentración de ión flúor igual o superior a 2500ppm, posterior a la toma de la muestra. Además de generar 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.

El examen bucal se realizó después de las 11 AM y antes de las 13 PM, para dar tiempo a la reorganización del biofilm después del cepillado matutino y se les enseñó una técnica de cepillado común para todos la que fue re-evaluado, la segunda sesión. La técnica de cepillado fue la técnica de Bass modificada⁽⁵⁹⁾.

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 dos piezas posteriores restauradas, una con amalgama y otra con resina compuesta se tomaron muestras de placa dental utilizando la técnica de cubeta, según metodología descrita por Zúñiga 2010⁽⁴¹⁾.

a) 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 fue recogida 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, y se cargaron con 7,5 ml de 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 200 U/L) medio selectivo para *S. mutans* que ha sido descrito como el medio más sensible y selectivo para cultivar esta especie bacteriana ⁽³³⁾. Posteriormente se recortaron de manera de individualizarlas para no más de 4 piezas dentarias (Fotografía N°1), inmediatamente después las cubetas fueron colocadas en placas de Petri estériles y guardadas en bolsas plásticas selladas en el refrigerador hasta su utilización.



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 se llevaron a estufa de incubación por 24 horas a 37°C para evaluar el proceso de carga y corte de cubetas, así al pasar las 24hrs. y no evidenciar crecimiento de microorganismos se consideraron listas para su uso.

La toma de muestras se realizó presionando suavemente la cubeta en la arcada por un minuto (Fotografía N°2).



Fotografía N°2: Se observa toma de muestra de biofilm de placa bacteriana dental mediante la Técnica de Cubeta.

5) Procesamiento Microbiológico

Luego de la toma de muestras, las cubetas fueron depositadas en placas de Petri estériles, transportadas a 4°C antes de 3hrs y llevadas a estufa de incubación a 37°C en microaerofilia (jarra 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.

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

Luego de incubar durante 48hrs, se realizó el recuento de colonias compatibles con *S. mutans* según macromorfología y adherencia de las colonias al agar, observadas bajo lupa estereoscópica (Stemi2000-C, Zeiss) y fuente luminosa (SchottKL1500,Zeiss). Posteriormente se realizó la tinción Gram para determinar la micromorfología celular.

El recuento de *S. mutans*, expresado en Unidades Formadoras de colonias (UFC) se obtuvo de las cubetillas con TYCSB.

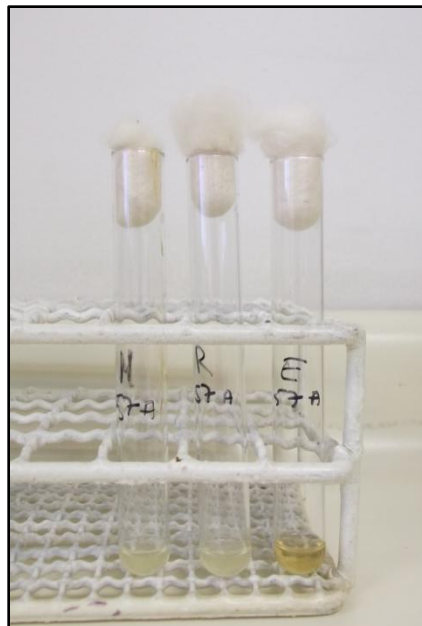
Posteriormente, se seleccionaron tres colonias compatibles con *S. mutans*, estas fueron resembradas en placas con agar TYCSB e incubadas en jarra con vela a 37°C por 48 horas.

De estas placas se seleccionaron colonias de *S. mutans* para ser sembradas en caldo Todd- Hetwitt (Difco) e incubadas a 37°C por 48 horas, para someterlas a pruebas bioquímicas que permitan identificar especies del grupo Streptococci Mutans, principalmente dirigidas a diferenciar *S. mutans* de *S. sobrinus*, los que macromorfológicamente son similares pero no tienen los mismos resultados en estas pruebas.

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*⁽²³⁾.

Posterior a las 48 horas, cada caldo incubado fue centrifugado (Serofuge-centrifuge, Clay Adams) por cinco minutos a 1500rpm aproximadamente, con el propósito de obtener un pellet. Éste se resuspendió en 400µl de buffer fosfato pH 7.2 hasta obtener un M^oFarland= 5 , luego de esta suspensión se inocularon 100µl en Esculina (Brain Heart Infusion, 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 24hrs a 37°C (Fotografía N°3).



Fotografía N°3:(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. Los tres tubos fueron inoculados con muestras obtenidas de las cubetillas.

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

En el caso de la hidrólisis de la Esculina, es positiva si rápidamente el caldo obtiene coloración negra y para la fermentación de Rafinosa y Melobiosa la aparición de color amarillo intenso indican la positividad de la prueba. Ambas situaciones confirman el diagnóstico de *S. mutans*.

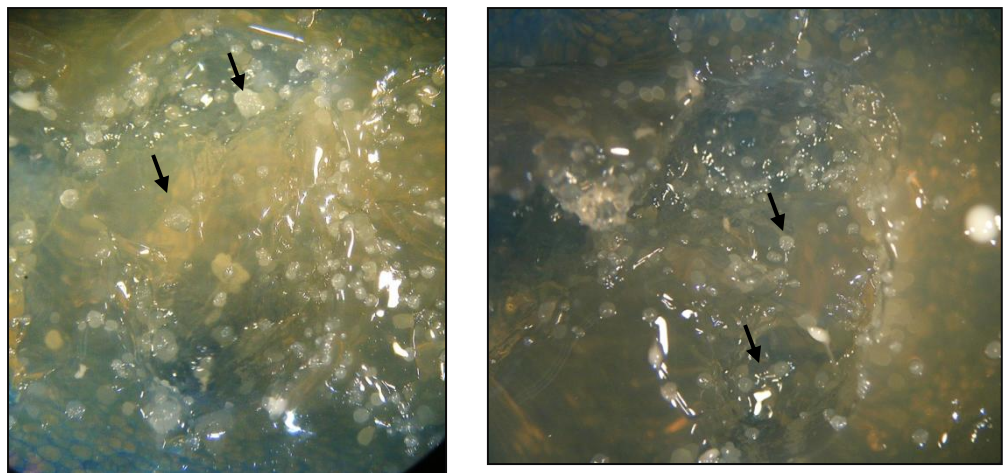
6) Análisis de los resultados

Para el análisis estadístico se empleó el software Systat v. 13. La forma en que se distribuyen los datos se ejecutó utilizando el test Shapiro Wilk, a través del cual se obtuvo que la distribución no era normal por lo que el análisis de los resultados se realizó aplicando el test de Wilcoxon, un test no paramétrico.

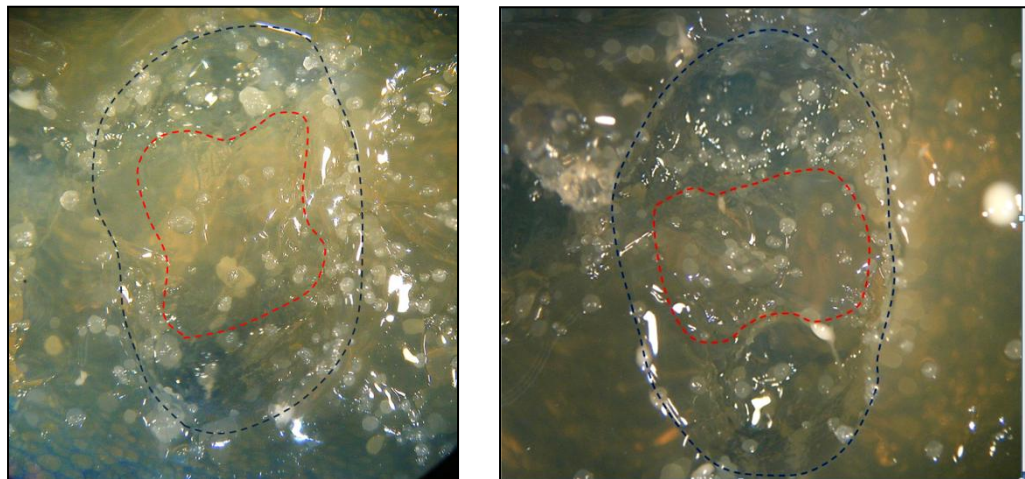
RESULTADOS

1. Identificación y aislamiento de *Streptococcus mutans*.

Luego de 24hrs. en la estufa de incubación se obtuvieron colonias bacterianas con características correspondientes a *Streptococcus mutans* en las zonas donde el agar TYCSB tuvo contacto con las estructuras de la cavidad oral, en las cubetas con que se tomaron las muestras.

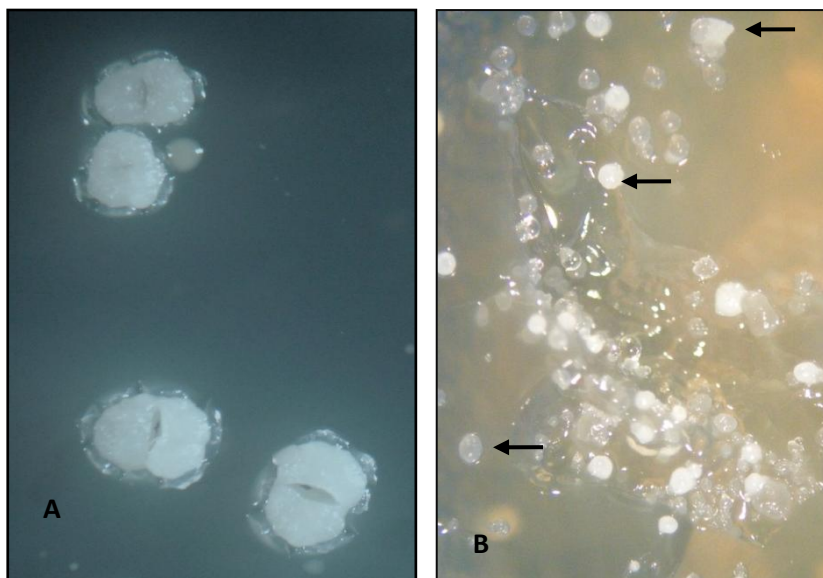


Fotografía N°4: Aislamiento bacteriano de muestras de placa dental mediante técnica de cubeta. **(A)** Las flechas indican colonias de *Streptococcus mutans* redondas, lisas, cristalina y adherentes sobre la impronta de la cara oclusal de un diente 3.5 restaurado con Amalgama. **(B)** Aislamiento bacteriano de muestras de placa dental mediante técnica de cubeta. Las flechas indican colonias de *Streptococcus mutans* 2.5 restaurado con resina compuesta.

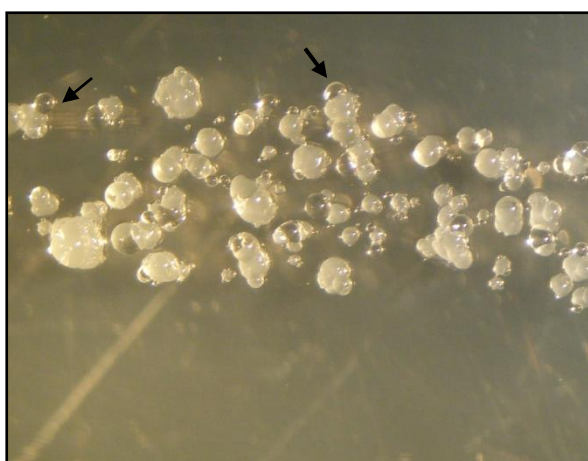


Fotografía N° 5 : **(A)** Esquema demostrativo, donde las líneas punteadas semejan el contorno de la cara oclusal del diente 3.5 y su restauración de Amalgama. **(B)** Esquema demostrativo, donde las líneas punteadas semejan el contorno de la cara oclusal del diente 3.5 y su restauración de resina compuesta.

A partir del cultivo y aislamiento bacteriano, de muestras de placa bacteriana dental mediante la técnica de la cubeta, se obtuvieron colonias aisladas con características macroscópicas y de adherencia correspondientes a *Streptococcus mutans*.



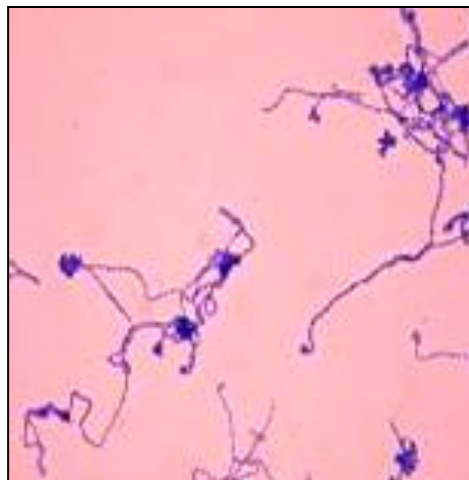
Fotografía N°6: Colonias de *Streptococcus mutans* en agar TYCSB. **(A)** Colonias blanquecinas y de superficie rugosa, en placa Petri con TYCSB, nótase como rompen el agar al que se adhiere. **(B)** Cubeta cargada con agar TYCSB. Obsérvese el polimorfismo colonial. Las flechas apuntan a colonias de diferente morfología, todas adherentes.



Fotografía N°7: Pequeñas colonias de *Streptococcus mutans* lisas, cristalinas y adherentes. Las flechas indican el polisacárido dextrán depositado sobre las colonias

El frotis de las colonias seleccionas teñido con Gram mostró formas cocacéas, Gram positivo y dispuestas 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 *Streptococcus mutans* teñido con tinción de Gram.



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°9)



Fotografía N°9:.(M) Tubo de ensayo con medio de cultivo Tioglicolato con 1% de Melobiosa luego de la adición de rojo fenol.(R)Tubo de ensayo con medio de cultivo Tioglicolato con 1%de Rafinosa luego de la adición de rojo fenol.(E) Tubo de ensayo con medio de cultivo BHI con 1% de Esculina luego de la adición de citrato férrico amoniacal. La aparición rápida de coloración negra y amarillo intenso indicó positividad de la prueba y confirmó diagnóstico de *Streptococcus mutans*.

2. Cuantificación de *Streptococcus mutans*.

La Tabla N°2 presenta los porcentajes de pacientes examinados con presencia de *Streptococcus mutans* obtenidas a partir de la técnica de la cubeta.

	Cantidad	Porcentaje
Total de pacientes	69	100 %
Pacientes con presencia de S. Mutans	65	94,20 %
Pacientes sin presencia de S. Mutans	4	5,79 %

Tabla N°2: Porcentaje de pacientes con presencia de *Streptococcus mutans* en muestras de placa bacteriana obtenidas mediante Técnica de Cubeta.

En la Tabla N°3 se describen la cantidad de UFC/cm² de *Streptococcus mutans* a partir de muestras placa bacteriana de restauraciones oclusales amalgama y de resina.

N° de muestra	UFC/cm ² en amalgama oclusal	UFC/cm ² en resina oclusal
1	0	1
2	1	2
3	1	8
4	1	1
5	7	17
6	1	0
7	0	1
8	0	1
9	4	10
10	1	2
11	5	10
12	0	0
13	1	4
14	0	4
15	0	1
16	3	6
17	1	1
18	13	15
19	1	7
20	5	7
21	0	0
22	1	2
23	0	3
24	2	8
25	3	0
26	4	12
27	3	3
28	1	3
29	4	12
30	2	2
31	0	2
32	0	0
33	8	17
34	13	8
35	2	2
36	22	10
37	4	8

38	5	1
39	33	26
40	0	4
41	8	8
42	0	4
43	11	32
44	27	16
45	8	0
46	2	2
47	7	0
48	7	18
49	4	4
50	13	16
51	9	8
52	2	3
53	8	6
54	1	3
55	3	5
56	2	2
57	0	0
58	1	2
59	6	3
60	3	5
61	4	5
62	2	3
63	1	0
64	3	8
65	1	2
66	0	3
67	8	5
68	9	3
69	0	20
	X=4,27	X=5,89
	D.S=6,09	D.S=6,47

Tabla N°3: UFC/cm² de *S. mutans* en muestras de placa bacteriana en restauraciones clase I de amalgama y resina mediante la Técnica de Cubeta, **X** es el promedio y **D.S** la desviación estándar.

3. Recuento de *Streptococcus mutans* en restauraciones de amalgama versus de resina compuesta.

Al aplicar el Test Shapiro-Wilk se obtuvo un $p < 0,05$, por lo que se utilizó el Test de Wilcoxon, un test no paramétrico.

El promedio de recuento de *Streptococcus mutans* (UFC/cm²) en el grupo de resina compuesta mediante la técnica de cubeta fue mayor que en el grupo Amalgama. Con un $p = 0,004$, lo que indica que existe una diferencia estadísticamente significativa entre los recuentos de amalgama y resina compuesta.

A continuación se observa en el gráfico tipo caja n° 1 las UFC/cm² en restauraciones de resina compuesta, la línea negra representa la mediana cuyo valor es 3 UFC/cm². Esta línea se extiende al gráfico tipo caja n° 2, en donde se puede comparar con la mediana del grupo amalgama cuyo valor es de 2 UFC/cm².

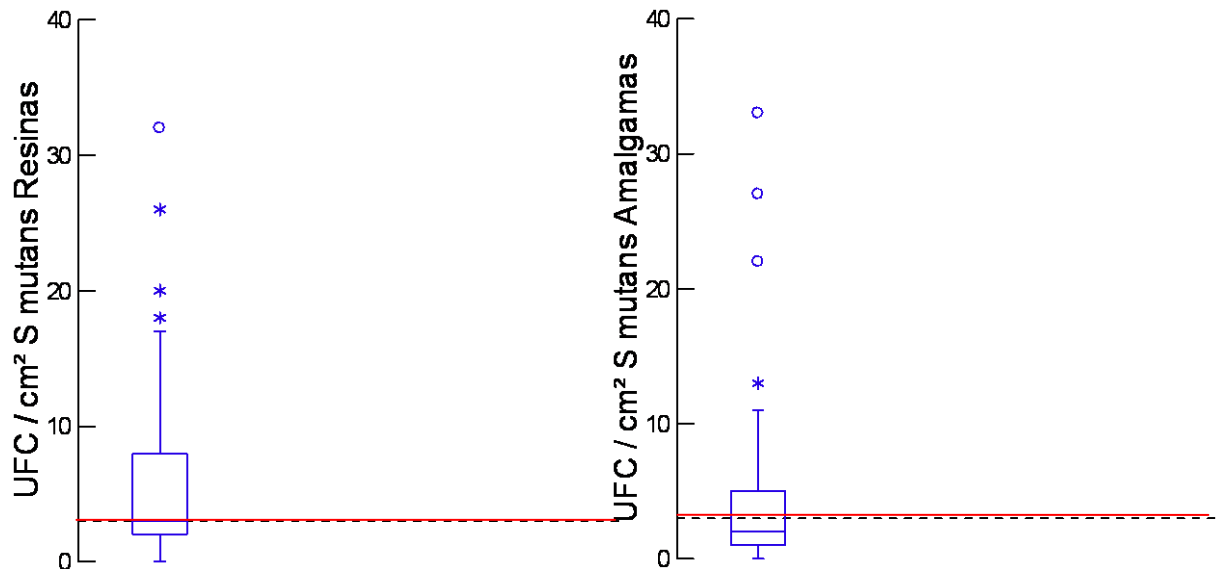


Gráfico N°1: gráfico tipo caja donde se presentan las UFC/cm² en el grupo resina compuesta. La línea roja representa el valor de la mediana de la muestra. Los círculos y asteriscos representan todos aquellos valores extremos, siendo los círculos los más alejados de la mediana.

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

DISCUSIÓN

Al comparar la cantidad de UFC/cm² de *Streptococcus mutans* en restauraciones de amalgama y resina compuesta mediante la técnica de la cubeta, se encontraron diferencias significativas, siendo los resultados para el grupo resina mayor que para el grupo amalgama. Este resultado sustenta la hipótesis de esta investigación, donde se esperaba encontrar una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de muestra. Además coincide con la literatura que señala que restauraciones de resina compuesta poseen mayor recuento de *S. mutans* que obturaciones de amalgama^(50,45).

Las muestras de amalgama y resina se tomaron en un mismo paciente. De esta manera nos aseguramos que al momento de tomar las muestras de placa depositada sobre las restauraciones, estas forman parte de un ecosistema bucal modificado por determinantes ecológicos similares. Además debemos considerar que todas las obturaciones de las cuales se tomaron las muestras se podían catalogar como Alfa según los criterios de Ryge modificados (USPHS). Esto significa que las restauraciones estudiadas se encontraban en condiciones similares, por lo que la diferencia encontrada no se puede adjudicar a cambios en el ecosistema o en diferencias en el estado de estas, esto nos indicaría que cualquier discrepancia se puede deber a las características propias de cada material⁽⁴³⁾. 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 el crecimiento de los microorganismos⁽⁴³⁾.

Estas cualidades podrían ser un factor importante a considerar al observar los resultados de este estudio, ya que nos habla de las propiedades biológicas del material que estamos estudiando. Con el paso del tiempo las capacidades mecánicas, estéticas de los materiales de restauración han mejorado notablemente, sin embargo en las propiedades biológicas no pareciera que ocurriera.

Se ha aislado *S. mutans* de biofilm de placa asociada a lesiones de caries⁽¹⁴⁾ y se conoce que su adhesión está relacionada con la composición del material de restauración. Por eso la capacidad que posea el material dental de inhibir el crecimiento bacteriano y la formación del biofilm se considera un factor importante asociado al pronóstico de la restauración⁽⁶⁾.

Se sabe que la amalgama libera componentes antimicrobianos, como la plata⁽⁴⁹⁾, cobre y zinc⁽⁶⁰⁾ los cuales han demostrado poseer actividad inhibitoria bacteriana⁽⁶¹⁾ y que además muchas de las bacterias depositadas sobre estas no se encuentran viables⁽⁴³⁾. Esto conduciría a menor cantidad de colonias encontradas en superficies, lo que explicaría el menor recuento encontrado en su superficie. Se han realizado estudios que afirman que la capacidad antimicrobiana de estos componentes de la amalgama llevaría a disminuir la posibilidad de formación de caries secundarias, y que una vez que exista una lesión adyacente a una amalgama esta progresaría a menor velocidad que una lesión secundaria a una obturación de resina compuesta^(63, 64, 73).

La resina compuesta no posee actividad antimicrobiana⁽⁴³⁾, aun más presenta comonomeros 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 el de la amalgama. Por lo demás las obturaciones de resina compuesta presentan mayor microfiltración que las de amalgama, lo que contribuiría a la menor longevidad que presentan las resinas^(62,65). Estos datos explicarían el mayor recuento encontrado en este tipo de restauraciones.

Todos los pacientes que se incluyeron al estudio presentaban un alto riesgo de caries. Se ha observado que el riesgo cariogénico del paciente juega un rol significativo en la longevidad de la restauración⁽⁷⁰⁾. Un paciente con riesgo cariogénico alto se traducirá en un medio que actuará de forma negativa sobre las restauraciones en boca. También, se ha visto, existen diferencias de longevidad

en los tratamientos en pacientes sobre riesgo alto y bajo, siendo mayor en los primeros ⁽⁷⁰⁾. Estudios demuestran que la amalgama presenta mayor longevidad que la resina compuesta en pacientes de alto riesgo, siendo la principal causa de fracaso, la caries secundaria ⁽⁷¹⁾. Dentro de los microorganismos aislados en lesiones de caries secundarias encontramos *S. mutans* y *S. sobrinus*, quienes participan activamente en el inicio de la lesión de caries ^(19, 33,52). Esto reafirmaría lo encontrado, ya que, restauraciones con un mayor recuento de *S. mutans* nos podría llevar a pensar que en el futuro, estas, pueden desarrollar con mayor rapidez lesiones de caries secundarias, disminuyendo su longevidad con respecto a restauraciones con menor recuento bacteriano. Sin embargo, en pacientes de riesgo cariogénico bajo, las restauraciones de amalgama y de resina compuesta se comportaban de similar manera en cuanto a su longevidad ⁽⁷⁰⁾.

En pacientes con bajo riesgo cariogénico la restauración de resina compuesta se encuentra en buenas condiciones luego de 12 años de realizada la obturación ⁽⁷⁰⁾. Este estudio deja abierta las puertas para realizar comparaciones de restauraciones entre pacientes que presente niveles de riesgo cariogénico diferente para así evaluar en recuento de *S. mutans* depositado sobre restauraciones. También, se propone hacer comparación de recuento de distintos tipos de resinas compuestas, ya que se ha observado que sus diferentes composiciones, cantidad de material de relleno, tamaño de sus partículas, presencia de flúor, afecta tanto a sus propiedades mecánicas como a sus propiedades biológicas, y por lo tanto, su interacción con el biofilm de placa dental.

Otra línea interesante a estudiar podría ser realizar recuento de *S. mutans* en pacientes con piezas sanas y piezas selladas. De esta manera podríamos evaluar realmente la necesidad de colocar sellantes en los pacientes, especialmente si evaluamos la profundidad del surco. Debemos tener en cuenta que los sellantes pueden fracasar y presentar irregularidades que podrían propiciar el desarrollo de biofilm cariogénico con mayor facilidad que un surco de poca profundidad.

A pesar del amplio uso de estos materiales de restauración existe polémica sobre algunos componentes que presentan en su composición, en el caso de la amalgama es controversial el mercurio que forma parte en su composición y en el caso de la resina el BPA ^(66, 67, 69). Si bien, esto no afectaría su interacción con los microorganismos orales, por lo que no afectarían el recuento de *S. mutans*, es importante tenerlo en cuenta ya que puede afectar nuestra decisión de usarlos y la de los pacientes para aceptar un tratamiento.

Respecto a la metodología, a partir de las muestras tomadas con la técnica de la cubeta se logró identificar, de acuerdo a morfología y adherencia al agar, *S. mutans* en un 94,20% de los pacientes a los cuales se les tomaron muestras. Lo cual fue confirmado posteriormente con las pruebas bioquímicas que se realizaron. Esto que concuerda con estudios realizados con anterioridad, como Zúñiga y colaboradores el 2011⁽⁴¹⁾.

Una de las desventajas de esta técnica radica en que se ve limitada sólo a la cara oclusal de las piezas dentarias, ya que el agar se desgarrar en los espacios interproximales, lo que haría imposible realizar un recuento de obturaciones que comprometan esa zona. La técnica de la cubeta no permite conocer el riesgo bucal cariogénico general del paciente, esta entrega un valor de una zona en particular y para determinarlo debería medir la cantidad de *S. mutans* en la boca completa, en donde el recuento en saliva sigue siendo el único método validado ⁽⁷²⁾.

Las Caries Secundaria es la responsable del 60% de fracasos de restauraciones en la práctica del odontólogo general ⁽⁴³⁾. *S. mutans* y *S. sobrinus*, son considerados los agentes etiológicos de caries ^(19, 33,53). Debido al concepto actual de placa ecológica se discute la importancia de ambas especies en la etiología de la enfermedad. Conforme a este concepto, cualquier especie que presente ciertas características específicas podría llevar a desarrollar la enfermedad ⁽¹⁴⁾.

La importancia de medir la presencia de estas especies en placa bacteriana de restauraciones radicaría en tener la capacidad de observar en estudios longitudinales aquellas restauraciones con alto recuento de *S. mutans* y *S. sobrinus*, para finalmente observar el porcentaje de ellas que desarrolla caries secundaria en el tiempo. Para así, de este modo tomar medidas preventivas adecuadas al riesgo de cada de paciente.

Cuando nos encontramos frente a un paciente con un alto recuento de *S. mutans* al realizar un plan de tratamiento preventivo debemos enfocar nuestros esfuerzos en controlar el medio bucal, específicamente a aquellos factores que favorezcan el crecimiento de un biofilm cariogénico y así disminuir el riesgo cariogénico del paciente y evitar la formación de lesiones de caries.

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 al evaluarlo clínicamente con los criterios de Ryge, como asimismo establecer un régimen regular de citas al odontólogo para evaluar la efectividad de dichas medidas en el tiempo. Esto junto con una buena técnica de cepillado, aplicaciones de flúor tópico y uso de colutorios nos ayudan a controlar el biofilm bucal y favorecer la remineralización de los dientes. Un asesoramiento en la dieta, en cuanto a calidad y frecuencia de ingesta de hidratos de carbono, nos ayudarán a obtener los resultados esperados. Si logramos controlar el medio bucal, lograremos mantener el equilibrio del ecosistema, lo que nos llevaría a prevenir el desarrollo de lesiones de caries.

Por último debemos recordar que si bien el recuento de *S. mutans* es uno de los factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad, la caries es un proceso complejo donde interactúan un amplio número de factores, debemos considerar los resultados hallados en este estudio, especialmente en pacientes de alto riesgo, para poder realizar un buen plan de tratamiento de acuerdo a sus necesidades especiales. Es importante tener claro que si bien las propiedades biológicas del material de restauración son importantes existen otros factores

como, adhesión, sellado marginal, propiedades mecánicas y estéticas que debemos analizar a la hora de elegir el material a usar.

CONCLUSIONES

Al finalizar esta investigación se puede concluir que:

1. Existen diferencias entre el recuento de *Streptococcus mutans* entre restauraciones oclusales de resina compuesta y amalgama, siendo menor en las últimas.
2. A través de la Técnica de Cubeta es posible aislar y recuperar *Streptococcus mutans* a partir de muestras de placa bacteriana dental de superficie de restauraciones oclusales.

SUGERENCIAS

- Realizar este estudio controlando variables de rango etario, sexo, nivel socioeconómico
- Utilizar esta técnica para comparar recuento de *S. mutans* en pacientes con diferente riesgo cariogénico.
- Se podría utilizar la técnica de la cubeta para comparar restauraciones de un mismo material que posean distinto criterio Ryge.
- La técnica de cubeta podría utilizarse como un método para el recuento y aislamiento de *S. mutans* en placa bacteriana dental en otros tipos de restauración, tales como, vidrio ionómero, incrustaciones metálicas, estéticas, sellantes.
- Utilizar esta técnica para hacer comparación entre distintos tipos de restauraciones y dientes sanos, como, sellantes y dientes sanos, amalgamas e incrustaciones, amalgama y piezas sanas, etc.
- Efectuar recuento en saliva *S. mutans* y evaluar la relación que presenta con el COPD.
- Realizar un estudio de recuento de *S. mutans* donde se compare la arcada superior con la inferior. Asimismo efectuar un análisis comparativo de los recuentos encontrados en cada pieza dentaria.
- 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 *Streptococcus 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.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- (1) [www.minsal.cl,http://www.redsalud.gov.cl/archivos/salud_bucal/perfilepidemiologico.pdf](http://www.minsal.cl/http://www.redsalud.gov.cl/archivos/salud_bucal/perfilepidemiologico.pdf), consultado el 3 de Diciembre del 2011.
- (2) Anderson MH, Molvar MP, Powel LV (1991). "Treating Dental Caries as an Infectious Disease." *Operative Dentistry*. 16: 21-28.
- (3) Bernimuolin, JP (2003). "Recent concepts in plaque formation." *J Clin Periodont*. 30:7-9.
- (4) Emilson C G, Krass B (1993). "Support for and implications of the specific plaque hypothesis." *J Dent Res*. 93:96-104
- (5) Moncada, C. Urzúa, I "Cariología Clínica .Bases Preventivas y Restauradoras" Santiago, Chile, 2008. Intro, p 15.
- (6) Matalon S, Slutzky H, Weiss EI. (2004) "Surface antibacterial properties packable resin composites: Part I". *Quintessence Int*. 35:189-193
- (7) Fejerskov, O (2004). "Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral healthcare." *Caries Res*. 38:182-191
- (8) Fejerskov, O (1997). "Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease." *Community Dent Oral Epidemiol*. 25:5-12.
- (9) Chaussain-Miller, C. Fioretti, F. Goldberg, M. Menashi, S. (2006) "The Role of Matrix Metaloproteinases (MMPs) in human caries". *J Dent Res*. 85:22-32
- (10) Li, J. Helmerhost, E. Leone, C. Troxler, R. Yaskell, T. Haffajee, A. Socransky, S. Oppenheim F (2004). "Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm." *J of Applied Microbiol*. 97: 1311-1318.
- (11) Kidd, E. (1984) "The diagnosis and management of the "early" carious lesion in permanent teeth." *Dent Update*. 11: 69-70
- (12) Balakrishnan, M. Simmonds, R. Tagg, J. (2000). "Dental Caries is a preventable e infectious disease." *Australian Dental Journal* 45:235-245
- (13) Loesche, W J. (1976) "Chemotherapy on dental plaque infections." *Oral Sciences Reviews*; 9:63-107.
- (14) Marsh, P. (2003) "Are Dental disease examples of ecological catastrophes?." *Oral Microbiol*; 149: 279-294.
- (15) Marsh, P. (2006) "Dental plaque as a biofilm and microbial community implications for health and disease." *BMC Oral Health*; 1: 14-21
- (16) Marsh, P. Branshaw, D. (1997) "Physiological approaches to the control oral biofilms". *Adv Dent Res* ; 11:176-185
- (17) Negroni "Microbiología Estomatológica Panamericana" (eds), 2009, pp.235-245

- (18) Yoshida, K. Tanagawa, M. Matsumoto, S. Yamada, S. Astuta, M. (1999) "Antibacterial activity on resin composites with silver-containing materials." *Eur J Oral Sci*;107: 290-296.
- (19) Fejerskov, O. Kidd, A. (2003). "Dental Caries. The disease and its clinical management". Blackwell Munksgaard
- (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. (1980). "Biology, Immunology, and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*." *Microbiol Rev*;44:331-384
- (23) Coykendall, A. (1989) "Classification and Identification of the Viridans Streptococci." *Clin Microbiol Rev*;2:315-328.
- (24) García, F. Strohmenger, L. (2000) "Principles of diagnosis and treatment on high caries risk subjects." *Pediatr Dent*;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*. 2001. Cap. 2, pp. 16-30.
- (27) Seki, M. Yamahita, Y. Torigoe, H. Tsuda, H. Maeno, M. (2006) "Effect of mixed *mutans streptococci* colonization on caries development." *Oral Microbiol Immunol*;21:47-52.
- (28) Schaecken, M. Van Der Hoeven, J. Franken, H. (1986). "Comparative recovery of *Streptococcus Mutans* on Five Isolation Media, including a New Simple Selective Medium." *J Dent Res*;65(6):906-908
- (29) Jordan, H. Laraway, R. Snirch, R. Marmel, M. (1987) "A simplified diagnostic system for cultural detection and enumeration of *Streptococcus Mutans*." *J Dent Res*;66:57-61.
- (30) Banas, J. (2004) "Virulence factors of *Streptococcus mutans*." *Frontiers in Bioscience*; 9:1267-1277.
- (31) Shahal, Y. Steinberg, D. Hirschfeld, Z. Bronshtyn, M. Kopolovic, K. (1998) "In vitro bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restorative materials." *J Oral Rehabil*; 25:52-58.
- (32) Paes Leme, A. Koo, H. Bellato, C. Bedi, G. Cury, J. (2006) "The role of sucrose in cariogenic dental biofilms formation - New insight." *J Dent Res*;85: 878-887
- (33) De Soet, J. J. Val Loveren, C. Lammens, A. J. Pavicic, M. Homburg, C. H. Cate, J. M. De Graaff, J. (1991) "Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*." *Caries Res*;25:116-122
- (34) Okada, M. Soda, Y. Hayashi, F. Doi, T. Suzuki, J. Miura, K. Kozai, K.

- (2006)"Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children." *J of Med Microbiol*; 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. (2005)"Concepts of risk in dental public health." *Community Dent Oral Epidemiol*; 33:240-247.
- (37) Levertt, D. Featherstone, J. Proskin, H. Adair, S. Eisenberg, A. Mundorffshrestha, S. Shields, C. Shaffer, C. Billings, R. (1993)"Caries Risk Assessment a Cross-sectional Discrimination Model." *J Dent Res*;72:529-537.
- (38) Moncada, C. Urzúa, I. *Cariología Clínica. Bases Preventivas y Restauradoras. Santiago, Chile, 2008. Cap. 1, pp. 51-72.*
- (39) Ditmyer Marcia, Dounis Georgia, Mobley Connie, Schwarz Eli, (2011)"Inequalities of caries experience in Nevada youth expressed by DMFT index vs. Significant Caries Index (SiC) over time" *BMC Oral Health*, 11:12
- (40) Wallman C, Krasse B (1993)."A simple method for monitoring mutans streptococci in margins of restorations." *J Dent*;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." Trabajo de investigación requisito para optar al título de cirujano-dentista. Santiago, Chile: Universidad de Chile, Facultad de Odontología; 2010.
- (42) Mjor I, Moorhead J. (2000)"Reasons for replacement of restorations in permanent teeth in general dental practice." *Int Dent J*;50:361-366
- (43) Auschill, TM. Arweiler, NB. Breex, M. Reich, E. Sculean, A. N etuschil, L (2002)."The effect of dental restorative materials on dental biofilm." *Eur Oral Sci*;110:48-53.
- (44) Kawai, K. Takaoka, T. (2001)"Inhibition of bacterial and glucan adherence to various light-cured fluoride-releasing restorative materials." *J Dent*;29:119-122.
- (45) Brambilla, E. Cagetti, MG. Gagliani, M. Fadini, L. García-Godoy, F. Strohmenger, L. (2005)"Influence of different adhesive restorative materials on mutans streptococci colonization." *Am J Dent*;18:173-176
- (46) Anusavice, K. *Ciencia de los materiales dentales. McGrawHill (eds), 1998. Cap. 12, pp. 283-312. Cap. 17, pp. 375-405.*
- (47) Gordan, V. Riley, J. Blaser, O. Mjor, I. (2006)"2-year clinical evaluation of alternative treatment to replacement of defective amalgam restorations." *Operative Dentistry*;31(4):418-425.
- (48) Skjorland, K. Sonju, T. (1986)"Effect of sucrose in seson bacterial colonization on amalgam and composite." *Acta Odontol Scand*;40:193-196.
- (49) Friedl, K. Schmalz, G. Hiller, K. Shams, M. (1997)"Resin-modified glassionormer cements: fluoride release and influence on *Streptococcus mutans* growth-." *Eur J Oral Sci*;105:81-85.

- (50) Svanberg M, Mjorl, Ostavik D. (1990)"Mutans Streptococci in Plaque from Margins of Amalgam, Composite and Glassionomer Restorations." *J Dent Res*;69:861-864
- (51) Zimmerli, B. Strub, M. Jeger, F. Stadler, O. Lussi, A. "Composite materials: Composition, properties and clinical applications A Literature Review" *Schweiz Monatsschr Zahnmed* Vol. 120 11/2010.
- (52) Hansel, C. Leyhausen, G. Mai, E. Geurtsen, W. (1998)"Effects of various resin composite (co)monomers and extract on two caries associated microorganisms in vitro." *J Dent Re*;77:60-67.
- (53) Kidd, E. (2001)"Diagnosis of Secondary Caries." *J DentEduc*;65:997-1000.
- (54) Mjorl, Moorhead J. (2000)"Reasons for replacement of restorations in permanent teeth in general dental practice." *Int Dent J*;50:361-366.
- (55) Charbenau, G. Klausner, H. Green, T. (1986)"The placement and replacement of amalgam restorations." *J Dent Res*: 65:219-224.
- (56) Karinka-Kouma, A. Dionysopoulos, P. Koliniotou-Koubia, E. Kolokotronis, A. (2001)"Antibacterial properties of denting bonding systems, polyacid-modified composite resins and composite resin." *J Oral Rehabil*;28:157-160.
- (57) Ryge G, Jendresen M, Glantz P, Mjor I. (1981) "Standardization of Clinical Investigators for Studies of restorative Materials". *Swed Dent J*:5:235.239
- (58) Zibell S, Mandansky E (2009)." Impact of gun chewing on stress levels: on line self –perceptions research study." *Curr Med Res Opin*;25:1491-1500.
- (59) Poyato F, Segura E, Bullon F. (2003) "Comparison of modify Bass technique with normal toothbrushing practices for efficacy in supragingival plaque removal. *Int J Dent Hyg*;1:110-117.
- (60) Goma, A .Lorenzetti, M .Nagib, S .Pita, M Cerqueira, M. (2007)"Streptococcus mutans induced secondary carie adjacent to glass ionomer cement, composite resin and amalgam restorations invitro." *Braz Oral Res*;21:368-274.
- (61) Hotta, M. Nakajima, H. Yamamoto, K. Aono, M. (1998)"Antibacterial temporary filling materials: the effect of adding various ratios of Ag-Zn-Zeolite." *J Oral Rehabilitation*; 25: 485-489.
- (62) Uçar Y, Brantley WA (2011) "Biocompatibility of dental amalgams" *Int J Dent*;2011:981595.
- (63) Yurdanur U, William A., Brantley Hindawi (2011) "Biocompatibility of Dental Amalgams" *Int J Dent* ID 981595.
- (64) www.ada.org, <http://www.ada.org/1741.aspx>, Statement on Dental Amalgam, Revised: August 2009; consultado Enero 2012.
- (65) Alptekin T, Ozer F, Unlu N, Cobanoglu N, Blatz MB. (2010) "In vivo and in vitro evaluations of microleakage around Class I amalgam and composite restorations". *Oper Dent*;35(6):641-8

- (66) www.fda.gov, <http://www.fda.gov/NewsEvents/PublicHealthFocus/ucm197739.htm>
 "Update on Bisphenol A for Use in Food Contact Applications: January 2010". U.S. Food and Drug Administration (15 de Enero, 2010). Consultado el 10 Enero 2012.
- (67) Landrigan Abby F, Fleisch, Perry E, Sheffield, Courtney Chinn, Burton L, Edelstein and Philip J. (2010) "Bisphenol A and Related Compounds in Dental Materials" DOI: 10.1542/peds.2009-2693 *Pediatrics*;126;760; originally published online September 6, 2010; <http://pediatrics.aappublications.org/content/126/4/760.full.html>
- (68) Van Landuyt KL, Nawrot T, Geebelen B, De Munck J, Snauwaert J, Yoshihara K, Scheers H, Godderis L, Hoet P, Van Meerbeek B. (2011) "How much do resin-based dental materials release? A meta-analytical approach", *Dent Mater.* Aug;27(8):723-47.
- (69) A. Kang JH, Kondo F, Katayama Y. (2006) "Human exposure to bisphenol" *Toxicology* Sep 21;226(2-3):79-89
- (70) N.J.M. Opdam, E.M. Bronkhorst, B.A.C. Loomans, and M.-C.D.N.J.M. Huysmans. (2010) "12-year Survival of Composite vs. Amalgam Restorations" *J Dent Res* ;89(10):1063-1067.
- (71) Plasmansl P.J.J.M , Creugers N.H.J. ', Mulder J. (1998) "Long-term Survival of Extensive Amalgam Restorations" *J Dent Res*; 77(3): 453-460
- (72) Newbrun ,E. Matsukubo, T. Hoover ,Cl. Graves, RC .Brown, AT .Disney, JA .Bohannan, HM. (1984)"Comparison of two screening test for *Streptococcus mutans* and evaluation of their suitability for mass screenings and private practice." *Community Dent Oral Epidemiol*; 12: 325-331
- (73) Gama-Teixeira, Adriana. Lorenzetti. Maria. Nagib, Silvia. Pita, Maria. Alves, Maria. "Streptococcus mutans-induced secondary caries adjacent to glass ionomer cement, composite resin and amalgam restorations in vitro" *Braz Oral Res* 368 2007;21(4):368-74

ANEXOS

Departamento Patología.
 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
 b) Uso de otros elementos ___ Seda o hilo dental ___ Colutorios ___ No usa
 c) Hora Último Cepillado _____
 d) COPD _____

3. Examen Bucal

de za	Nº Pie	AMALGAMA	RESINACOMPU	A	Brav	Charl
		ESTA		lfa	o	ie
	1.8					
	1.7					
	1.6					
	2.8					
	2.7					
	2.6					
	4.8					
	4.7					
	4.6					
	3.6					
	3.7					
	3.8					

4

a) Hora _____ Fecha _____

Consentimiento Informado

Título del Protocolo: Comparación de recuento de *Streptococcus mutans* de biofilm de placa bacteriana de sobre restauraciones de amalgama y resina compuesta, utilizando el Método de la Cubeta.

Investigador Principal: Prof. Dr. Gustavo Moncada C

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 obturadas con resina compuesta y amalgama 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.

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 11 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 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 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, Tutor o Representante Legal: _____

• 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.

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

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." *SwedDentJ* 1981; 5:235-239.