



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA RESTAURADORA
ÁREA DE OPERATORIA CLÍNICA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA**

**“RECuento DE *Streptococcus mutans* SOBRE RESTAURACIONES DE
RESINA COMPUESTA REALIZADAS CON EL ADHESIVO PRIME&BOND
UNIVERSAL™, CON Y SIN CARGA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE
ZINC Y COBRE”**

Camila Francisca Alvarado Valenzuela

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANA DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Eduardo Fernández Godoy

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. Patricia Palma Fluxá

Prof. Dr. Patricio Vildósola Grez

**Adscrito a Proyecto Fondecyt 1170575
Santiago – Chile
2020**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLÓGÍA RESTAURADORA
ÁREA DE OPERATORIA CLÍNICA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
ÁREA DE MICROBIOLOGÍA**

**“RECuento de *Streptococcus mutans* SOBRE RESTAURACIONES DE
RESINA COMPUESTA REALIZADAS CON EL ADHESIVO PRIME&BOND
UNIVERSAL™, CON Y SIN CARGA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE
ZINC Y COBRE”**

Camila Francisca Alvarado Valenzuela

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANA DENTISTA**

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dr. Eduardo Fernández Godoy

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. Patricia Palma Fluxá

Prof. Dr. Patricio Vildósola Grez

**Adscrito a Proyecto Fondecyt 1170575
Santiago – Chile
2020**

A MI ABUELITA,
*Emilia Soto Jiménez, eres mi mayor
ejemplo de amor, paz y sabiduría.*

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Dr. Eduardo Fernández, Dra. Patricia Palma y Dr. Patricio Vildósola, por su constante orientación y entrega de conocimiento. Espero haber plasmado su sabiduría adecuadamente en este trabajo de investigación.

A todo el equipo del laboratorio de Microbiología Bucal de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, especialmente a Daniela y Darna, por su apoyo, paciencia y colaboración durante esta etapa.

A mi familia, sobre todo a mi madre, gracias por ser los principales promotores de mis sueños y por entregarme tranquilidad en cada paso de este complejo periodo.

A cada uno de mis amigos, presentes y pasados, quienes me entregaron palabras de aliento, me dedicaron una escucha constante e hicieron de esta etapa una experiencia mucho más grata. En especial a Macarena Castro, con quien compartí cada momento de felicidad y tristeza durante estos dos años; nuestra amistad y apoyo fue fundamental para lograr llevar a cabo esta tesis.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	9
MARCO TEÓRICO.....	11
I. Caries dental.....	11
Microbiología de la caries dental.....	12
<i>Streptococcus mutans</i>	14
Métodos de cultivo y aislamiento de <i>Streptococcus mutans</i>	15
II. Operatoria dental.....	16
Sistemas adhesivos.....	16
Incorporación de nanopartículas en los sistemas adhesivos.....	18
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
METODOLOGÍA.....	22
RESULTADOS.....	35
DISCUSIÓN.....	43
CONCLUSIÓN.....	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS.....	57

RESUMEN

Introducción: La caries dental es considerada una enfermedad multifactorial y por sus factores de virulencia y potencial cariogénico, la bacteria más estudiada es *Streptococcus mutans*. El objetivo del presente estudio es determinar si el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Streptococcus mutans* de la biopelícula de la superficie de restauraciones de composite pinceladas con adhesivo universal cargado con nanopartículas de óxido de zinc (5% ZnONP) y cobre (0,2% CuNP), es menor que al utilizar el adhesivo original.

Material y método: Se seleccionaron 25 pacientes entre marzo y octubre de 2019, de clínica de Ortodoncia, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. En cada diente se realizó una restauración oclusal de composite pincelada con adhesivo Prime&Bond Universal™, con (A) y sin (B) carga de 5% ZnONP/0,2% CuNP. Un operador tomó muestra de biopelícula de superficie oclusal de dos dientes premolares superiores contralaterales permanentes con indicación de extracción mediante “Técnica de cubeta” (impresión de cara oclusal del diente con cubeta para flúor, cargada con medio de cultivo selectivo para *Streptococcus mutans*). Se tomó una impresión previa de biopelícula (T0), a los siete días (T1) y 30 días después (T2) de realizadas las restauraciones. Las muestras fueron procesadas en laboratorio de Microbiología Bucal, Departamento de Patología y Medicina Oral, Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Un segundo operador realizó análisis estadístico.

Resultados: Se aislaron colonias de *Streptococcus mutans* desde muestras de biopelícula obtenidas mediante “Técnica de cubeta”. Las colonias se identificaron molecularmente mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y pruebas bioquímicas (hidrólisis de Esculina y fermentación de Rafinosa y Melobiosa). Se cuantificaron UFC de la superficie oclusal de restauraciones en T0, T1 y T2. Comparando los resultados mediante prueba U de Mann-Whitney, se determinó que no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) entre T0/A ($\bar{x}=2,52$ DS=5,67) y T0/B ($\bar{x}=3,56$ DS= 9,94), T1/A ($\bar{x}=4,24$ DS=12,20) y T1/B ($\bar{x}=2,44$ DS=4,22), T2/A ($\bar{x}=2,32$ DS=4,26) y T2/B ($\bar{x}=2,08$ DS=4,41).

Conclusión: No existe diferencia estadística en el recuento de UFC de *Streptococcus mutans* sobre restauraciones de composite pinceladas con un sistema adhesivo universal cargado con 5% ZnONP/0,2% CuNP y con sus componentes originales.

INTRODUCCIÓN

La caries dental se describe como una enfermedad crónica, de origen multifactorial y lento desarrollo que afecta al tejido dental (Banas, 2004; Núñez y García, 2010). Esta se produce por un desequilibrio entre la desmineralización y la remineralización dental, en donde el papel de la placa bacteriana cobra gran relevancia en cuanto a la etiología de la enfermedad (Loesche, 1976; Rosier, 2014). Dentro de los microorganismos que intervienen en el inicio y progresión de caries, la bacteria más estudiada ha sido *Streptococcus mutans* (Dourado y Reis, 2006; Vásquez y cols., 2014; Astorga y cols., 2015) por presentar factores de virulencia asociados con la cariogenicidad que incluyen adhesión, acidogenicidad, aciduricidad, acidofilicidad, entre otros (Banas, 2004; Núñez y García, 2010). Esta enfermedad bucodental es considerada la más frecuente en la especie humana, y en ausencia de un adecuado tratamiento, podría provocar la destrucción total del diente (Fejerskov, 2004; Carounanidy y Sathyanarayanan, 2009).

Para devolver la forma y función de la pieza dentaria, y debido a la creciente demanda por restauraciones estéticas, el material restaurador más utilizado hoy en día es la resina compuesta o composites (Lynch y cols., 2014; Moraschini y cols., 2015). Sin embargo, una de las causas más frecuentes de fracaso de la restauración, son las caries adyacentes al margen de esta (Demarco y cols., 2012), lo que generalmente ocurre por la biodegradación de la interfaz adhesiva diente/restauración (Liu y cols., 2014).

Se vuelve primordial el desarrollo de materiales con propiedades antibacterianas y de inhibición enzimática para aumentar la durabilidad de la interfaz entre adhesivo y dentina sin afectar negativamente las propiedades mecánicas de los materiales restauradores (Cocco y cols., 2015). En este sentido, se ha demostrado que las nanopartículas metálicas exhiben actividades biocidas a bajas concentraciones (Palza, 2015) y que la combinación de nanopartículas de óxido de zinc (ZnONP) y nanopartículas de cobre (CuNP) incorporadas en los adhesivos dentales podría tener un efecto antibacteriano sinérgico contra *S. mutans* (Gutiérrez y cols., 2019a).

En virtud de lo anterior, se realizó el presente trabajo de investigación *in vivo* que pretende obtener en distintos tiempos el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) de *Streptococcus mutans* sobre las restauraciones de resina compuesta pinceladas con el sistema adhesivo Prime&Bond universal™ (Dentsply Sirona) dopado con 5% ZnONP y 0,2% CuNP.

MARCO TEÓRICO

I. Caries dental

La caries dental es una enfermedad crónica, de origen multifactorial y de lento desarrollo, la cual afecta a los tejidos calcificados de los dientes erupcionados y se inicia tras la erupción dental (Banas, 2004; Núñez y García, 2010). Es una de las enfermedades más prevalentes a nivel mundial y la cuarta más costosa en cuanto a tratamiento (Glick y cols., 2012). En Chile, la prevalencia de caries aumenta significativamente desde la infancia hasta la adultez, alcanzando un 99,4% del total de la población entre los 65 a 74 años (Subsecretaría de Salud Pública, División de Prevención y Control de Enfermedades, Departamento de Salud Bucal, 2017).

La etiología de la caries ha sido ampliamente discutida e investigada a lo largo del tiempo, puesto que, si bien las bacterias acidogénicas han sido aceptadas como el principal agente etiológico, actualmente esta enfermedad es considerada como multifactorial, resultado de una interacción compleja entre distintos factores (**Figura 1**) (Hurlbutt, 2010).

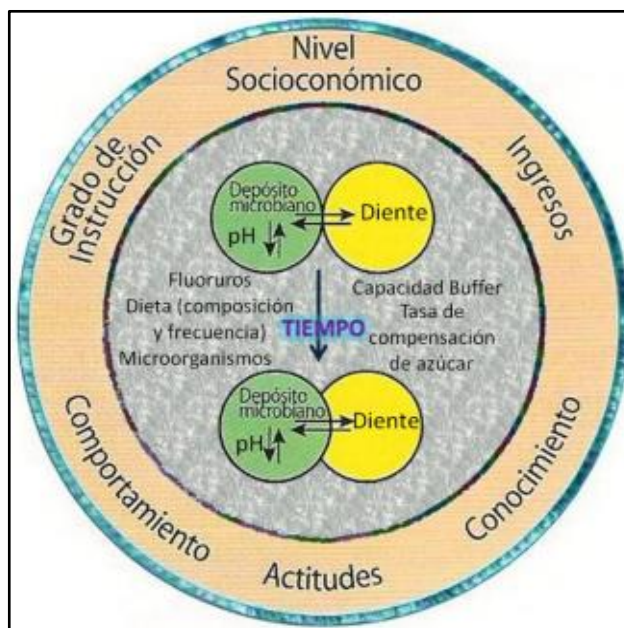


Figura 1. Esquema de la multifactorialidad etiológica de la caries (Adaptado de Fejerskov, 2004).

Para explicar el rol de la placa bacteriana sobre la caries dental, en 1976 Loesche propone la “Hipótesis de placa específica”, planteando que un número reducido de especies se encuentran involucradas activamente en la enfermedad (Loesche, 1976; Rosier, 2014). En el año 1986, Theilade propone la “Hipótesis de placa inespecífica”, la cual considera que la caries es producto de la interacción de todos los grupos bacterianos dentro de la biopelícula, sin considerar que las variaciones en la composición de la placa dental tengan implicancias en el potencial patogénico. Hoy en día, la “Hipótesis de placa ecológica” propuesta por Marsh en 1994 (**Figura 2**) es la más aceptada, en donde postula que la enfermedad se produce como una alteración en el balance de la microbiota residente, ocasionada por un cambio en las condiciones del ambiente (Balakrishnan y cols., 2000; Rosier, 2014).

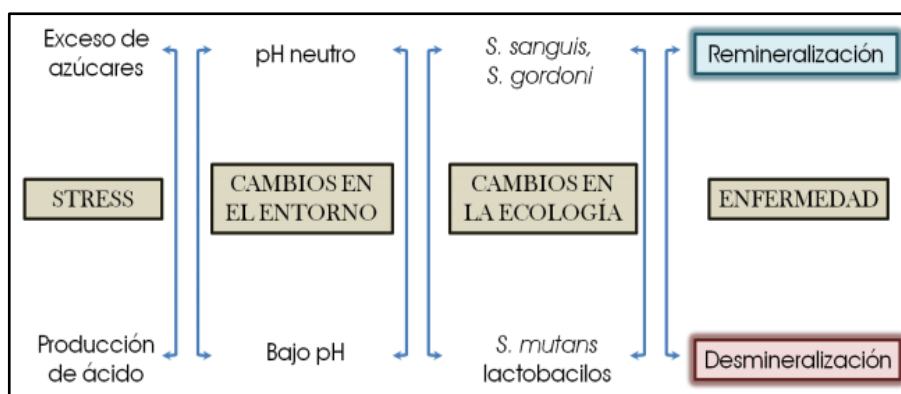


Figura 2. “Hipótesis de placa ecológica” propuesta por Marsh en 1994. El esquema muestra una relación dinámica, en donde un cambio ambiental en la biopelícula impulsa un cambio en el equilibrio de la microbiota, alterándose el equilibrio hacia la desmineralización del esmalte (Marsh, 2006).

Microbiología de la caries dental

Las comunidades de microorganismos pueden formar biopelículas, es decir, se adhieren a una superficie viva o inerte en una interfase líquido-sólido, organizada en una estructura tridimensional y formada por un exopolímero producido por las mismas células (Balakrishnan y cols., 2000; Kidd y Fejerskov, 2004).

Las complejas comunidades bacterianas se comunican entre sí mediante un mecanismo denominado “quórum sensing” que involucra la regulación y expresión

de genes específicos a través de moléculas de señalización. Esto, sumado a la protección que brinda el exopolímero y al estado metabólico reducido en que se encuentran las bacterias más profundas de la comunidad, hace que los anticuerpos, las células del sistema inmune y los antimicrobianos, se vean limitados en su acción (Serrano-Granger y Herrera, 2005).

La formación de la biopelícula comienza con la película salival adquirida, la cual se forma minutos después de limpiar una superficie dental, al cubrirse de una fina capa de glicoproteínas de origen salival, enzimas e inmunoglobulinas. Durante los días siguientes, la continua adhesión microbiana a la biopelícula permite el incremento en la diversidad de especies. Una semana después, se alcanza la madurez de la biopelícula (Anderson y cols., 1991).

La biopelícula supragingival contiene microbiota predominantemente Gram positivo asociada a microorganismos cariogénicos, mientras que la biopelícula subgingival está compuesta en mayor cantidad por microorganismos anaerobios Gram negativo, muchos de ellos potenciales patógenos periodontales (Astorga y cols., 2015).

Streptococcus orales son en su mayoría bacterias comensales, cocos Gram positivo agrupados en cadenas y en pares, catalasa negativo, anaerobios facultativos y generalmente son α hemolíticos. Crecen en presencia de 5-10% de CO₂ y su temperatura óptima de crecimiento es entre 35 °C y 37 °C. Metabolizan hidratos de carbono, originando ácido láctico, ácido acético y ácido fórmico (Núñez y García, 2010).

En lesiones cariosas de esmalte superficial, hay un aumento de bacterias metabolizadoras de azúcar y tolerantes al estrés ácido, como lo son *Streptococcus* no mutans y especies del género *Actinomyces* que producen un ambiente de acidificación leve. Por otro lado, bacterias como *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus gordonii* elevan el pH mediante la producción de amonio a partir de urea y arginina, lo que provee un mecanismo para equilibrar la producción de ácido desde el azúcar ingerido de la dieta, manteniendo así el equilibrio desmineralización/remineralización (Astorga y cols., 2015).

Bajo prolongadas condiciones ácidas promovidas por la frecuente ingesta de hidratos de carbono, las bacterias se vuelven más acidúricas, produciendo en el tiempo una mayor pérdida de minerales que conduce al inicio y progresión de la enfermedad de caries dental. En esta etapa, *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*, así como cepas acidúricas de *Streptococcus* no mutans, *Actinomyces*, *Bifidobacterias* y levaduras, pueden llegar a ser dominantes (Astorga y cols., 2015).

Las bacterias productoras de ácido son el vehículo para la entrada y penetración del esmalte en la enfermedad de caries, permitiendo que las bacterias proteolíticas degradadoras de dentina expandan la cavidad. De lo anterior se desprende que la diversidad bacteriana de la caries varía según su progresión, lo que indica que la microbiota bacteriana asociada a la enfermedad es altamente compleja (Astorga y cols., 2015).

Streptococcus mutans

Dentro del grupo mutans streptococci, se reconocen 7 especies diferentes: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus macacae* y *Streptococcus downei*; las que se pueden diferenciar mediante pruebas serológicas y bioquímicas (Coykendall, 1986).

La lesión de caries dental se asocia principalmente a las especies *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, y a pesar de que *S. mutans* no es obligatoriamente un indicador sobre el riesgo y desarrollo de la enfermedad de caries, es el microorganismo más estudiado en investigaciones sobre la caries dental y es un estándar para medir riesgo cariogénico en los individuos ya que es considerada una de las especies más importantes en cuánto a la progresión de la caries (Dourado y Reis 2006; Saravia, 2011; Astorga y cols., 2015), lo cual se debe a los siguientes factores de virulencia:

- a. Acidogenicidad: por su capacidad de metabolizar azúcares y producir principalmente ácido láctico como producto final.

- b. Aciduricidad: por su capacidad de generar ácidos en medios con $\text{pH} < 4.4$.
- c. Acidofilicidad: debido a que puede resistir la acidez del medio bombeando protones (H^+) fuera de la célula.
- d. Síntesis de glucanos y fructanos: a partir de la metabolización de la sacarosa, *S. mutans* sintetiza polisacáridos extracelulares (EPS) como glucanos y fructanos por medio de enzimas como glucosil y fructosiltransferasas (GTF y FTF). Los glucanos insolubles pueden ayudar a la bacteria a adherirse al diente y ser usados como reserva de nutrientes.
- e. Producción de dextranasa: la bacteria sintetiza y libera enzimas como la dextranasa y la mutanasa hacia la superficie celular, en donde al entrar en contacto con el glucano, lo hidrolizan y facilitan así el paso de los productos de la hidrólisis hacia el interior de esta, sintetizando polisacáridos intracelulares (IPS) que utilizan como fuente de energía (Banas, 2004; Núñez y García, 2010).

Métodos de cultivo y aislamiento de *Streptococcus mutans*

Para el cultivo (crecimiento y multiplicación) y aislamiento de microorganismos en un laboratorio, se requiere de preparados nutritivos para este fin, denominados medios de cultivo. Un medio especial selectivo para *Streptococcus mutans* es el llamado Trypticase Yeast-Extract Cystine Sacarosa Bacitracin (TYCSB), que tiene la capacidad de estimular el desarrollo de esta bacteria e inhibir el crecimiento de otras (Schaecken, 1986; HiMedia Laboratories, 2014).

Un método que permite el aislamiento y recuento de UFC de *Streptococcus mutans* de muestras de biopelícula desde las superficies dentarias es la “Técnica de cubeta”, la que consiste en realizar una impresión sobre las superficies oclusales de los dientes a estudiar con cubetas para flúor gel cargadas con agar TYCSB. Esta técnica es de bajo costo, no invasivo para el paciente, requiere solo una toma directa de la muestra de biopelícula y permite la ubicación topográfica de las especies bacterianas; pero se ve limitada a las caras libres y oclusales de los dientes, ya que al ser los espacios proximales zonas estrechas y retentivas, y el agar un material

poco resistente a la tracción, tiende a desgarrarse en dichas zonas (Zúñiga, 2010; Sieber, 2012; Vildósola y cols., 2013).

II. Operatoria dental

La Operatoria dental es la rama de la Odontología que se ocupa de la reconstrucción de los dientes afectados por enfermedades, traumatismos, defectos congénitos u otras problemáticas, procurando devolver la forma, estética y función dental (Mooney y Barrancos, 2006; Macchi, 2007).

Actualmente, el tratamiento restaurador de elección son las resinas compuestas o composites, material que cuenta con buenas propiedades estéticas y de adhesión (Vildósola y cols., 2015). Sin embargo, estas presentan una vida útil limitada en el tiempo, ya que la principal causa de fracaso de las restauraciones de resinas compuestas se debe a la presencia de lesiones de caries en sus márgenes, estimándose que sobre el 60% del tiempo clínico, el odontólogo lo ocupa en reemplazar estas restauraciones fracasadas (Moncada y cols., 2015).

Sistemas adhesivos

Para lograr la unión de las resinas compuestas al diente se utilizan sistemas adhesivos que confieren una unión química entre ambos (Collins y cols., 1998; De Munck y cols., 2005). Estos son un grupo de biomateriales que constituyen uno de los puntos críticos dentro de los protocolos clínicos de restauraciones estéticas. Los objetivos de los adhesivos siguen siendo los mismos que perseguía Buonocuore en los años 50, los que pretenden conseguir una unión resistente y duradera del material restaurador al diente y conseguir un sellado eficiente en la interfase diente-restauración (Valenzuela y cols., 2012).

De acuerdo con las técnicas de acondicionamiento del tejido dentario, los adhesivos dentales se pueden clasificar en:

- a) Sistemas adhesivos de grabado ácido total: se utiliza un gel de ácido fosfórico para eliminar el barro dentinario y disolver la hidroxiapatita, posteriormente se aplica un sistema adhesivo compuesto de un agente imprimante y un monómero adhesivo propiamente tal, los que se unen micro mecánicamente a las porosidades del esmalte y a las fibras colágenas de la dentina conformando una traba mecánica denominada capa híbrida (Demirci, 2013).
- b) Sistemas adhesivos autograbantes: prescinden del grabado ácido previo, y se reemplaza por una solución acuosa que contiene al agente imprimante ácido y una resina adhesiva, acondicionando la dentina y esmalte, sin remover el barro dentinario (Mandri y cols., 2015).

Al realizar una correcta técnica adhesiva, el componente mineral de la superficie y subsuperficie dentinaria es removido (de forma total por el acondicionamiento ácido en los sistemas adhesivos convencionales y de forma parcial por los primers ácidos en los sistemas adhesivos autograbantes) y las fibras de colágeno expuestas son penetradas por los monómeros de resina que al polimerizar quedan atrapadas en ella, conformando una estructura mixta denominada capa híbrida. Esta estructura posee un rol fundamental para lograr los objetivos antes mencionados (Valenzuela y cols., 2012).

La adhesión al esmalte es predecible, sin embargo, la adhesión a la dentina no lo es, debido a su alto contenido orgánico (presenta una fase orgánica que corresponde al 20% del total de su composición, de la cual el 90% es colágeno tipo I y el 10% restante lo constituyen proteínas no colágenas), por lo que se estima que durará solo unos pocos años (De Munck y cols., 2005; Torres y Torres, 2014). La degradación de la interfaz adhesiva diente/restauración puede llevar a una pérdida de retención del material y a la consecuente formación de caries adyacentes a las restauraciones (Palotie y Vehkalahti, 2012; Lynch y cols., 2014).

La biodegradación de la interfaz adhesiva comienza con la extracción de los monómeros resinosos infiltrados en la matriz dentinaria a través de espacios vacíos nanométricos llenos de agua, seguido por el ataque enzimático de las

metaloproteinasas (MMPs) de la matriz de dentina a las fibras de colágeno desmineralizadas (Valenzuela y cols., 2012; Gutiérrez y cols., 2019a).

Para controlar y prevenir la biodegradación de la interfaz adhesiva, se ha explorado en tecnologías que aumenten la estabilidad del enlace adhesivo utilizando materiales que controlen tanto la actividad de las MMPs, como el crecimiento bacteriano (Reis, 2013). Por esto, la aplicación de la nanotecnología en Odontología ha tomado fuerza en la actualidad, prometiendo el mantenimiento de la salud oral integral mediante el empleo de nanomateriales (Cantín y cols., 2010).

Incorporación de nanopartículas en los sistemas adhesivos

Las nanopartículas o partículas nanométricas son estructuras con una dimensión del orden de 100 nanómetros. Estas, al aumentar dramáticamente el área de contacto (en la relación área de contacto/volumen) logran interacciones más eficientes y rápidas en los materiales con componentes a escala nanométrica (Van Tassel, 2013). Lo anterior permite que la actividad antimicrobiana de las nanopartículas metálicas sea mayor al haber más interacciones con bacterias, moléculas orgánicas e inorgánicas (Zhang y cols., 2010; Chen y cols., 2014).

Se ha demostrado que las nanopartículas metálicas exhiben actividades biocidas a bajas concentraciones (Palza, 2015). Además, la incorporación de ZnONP y CuNP de forma combinada en un sistema adhesivo, generaría efectos antibacterianos sinérgicos contra la bacteria *S. mutans*. La teoría del “efecto del caballo de Troya” se ha propuesto como un mecanismo por el cual las ZnONP y CuNP ejercerían su efecto antimicrobiano; el ambiente lisosómico ácido promovería la corrosión de nanopartículas, convirtiendo los metales centrales en iones y por lo tanto en sustancias tóxicas para las bacterias (Sabella y cols., 2014). Además, las nanopartículas pueden cambiar los microambientes cercanos a las bacterias y producir especies reactivas de oxígeno (ROS); de esta forma se inducirían las interacciones con grupos –SH de enzimas microbianas, cambio en la replicación del

ADN de los microorganismos, desnaturalización de proteínas bacterianas y daño en el ADN (Swetha y cols., 2019; Gutiérrez y cols., 2019a).

La incorporación de nanopartículas de cobre en los adhesivos dentales contribuye a mantener la integridad de la capa híbrida después de dos años. Al parecer estas nanopartículas estimulan inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs), disminuyendo la degradación de la interfaz adhesiva (Gutiérrez y cols., 2019a).

Las ZnONP pueden unirse a los lugares de clivaje de la colagenasa, protegiendo al colágeno tipo I de la degradación mediada por MMPs (Toledano y cols., 2013; Altinci y cols., 2017). La incorporación de zinc en adhesivos comerciales también promueve la formación de cristales de apatita en las fibrillas de colágeno, favoreciendo la mineralización de la dentina (Toledano y cols., 2012).

Si bien las nanopartículas pueden ser tóxicas para los tejidos orales, existen varios enfoques para mejorar su biocompatibilidad cambiando sus características superficiales, mediante aplicaciones de revestimiento superficial o alterando su estado oxidativo (Méndez-Vilas, 2011). En un estudio realizado por Gutiérrez y cols. (2019a), se señaló que la adición de ZnONP y CuNP a los sistemas adhesivos universales en concentraciones de hasta 5/0,2% en peso confiere propiedades antimicrobianas, estabiliza y mejora la interfaz resina/dentina, sin suponer un daño significativo sobre células humanas.

Actualmente no existen de manera comercial sistemas adhesivos adicionados con nanopartículas metálicas que posean propiedades antimicrobianas, lo que supone gran interés científico para la búsqueda de métodos que mejoren la adhesión de restauraciones de composite al tejido dentinario, preservando la estructura dental libre de caries adyacentes al margen de la restauración (Welch, 2010).

En este trabajo de investigación se utilizó el adhesivo Prime&Bond universal™ cargado de forma experimental con 5% ZnONP y 0,2% CuNP. Este es un adhesivo universal que se puede utilizar con una técnica de grabado ácido total, autograbado o grabado selectivo (Dentsply Sirona, 2019).

Investigaciones futuras podrían orientar sus estudios a la permanencia a largo plazo del adhesivo cargado con nanopartículas de óxido de zinc y cobre sobre la superficie e interfase de la restauración por adhesión química covalente, determinando su aporte como posible reservorio de iones antimicrobianos. En tanto, el presente estudio, pretende evaluar el comportamiento en el corto plazo de un adhesivo universal cargado con nanopartículas metálicas, pincelado sobre la superficie de una restauración de resina compuesta.

HIPÓTESIS

La incorporación de nanopartículas de óxido de zinc y cobre a un sistema adhesivo universal pincelado sobre restauraciones de resina compuesta comparado con un adhesivo universal con sus componentes originales confiere propiedades antimicrobianas *in vivo*, que disminuyen el recuento de las unidades formadoras de colonias de *Streptococcus mutans*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar que el recuento de las UFC de *S. mutans* proveniente de la biopelícula de la superficie de restauraciones de resina compuesta pinceladas con un adhesivo universal cargado con 5% ZnONP y 0,2% CuNP, es menor que al pincelar un adhesivo universal con sus componentes originales sobre restauraciones de resina compuesta.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar, cuantificar e identificar las UFC de *S. mutans* provenientes de la biopelícula de la superficie oclusal de restauraciones de resina compuesta pinceladas con adhesivo universal con y sin 5% ZnONP y 0,2% CuNP, de forma previa a la restauración, y a los siete y 30 días luego de realizar la restauración.
2. Comparar mediante test estadísticos si existe diferencia entre el recuento de UFC de *S. mutans* provenientes de la biopelícula de la superficie oclusal de restauraciones de resina compuesta pinceladas con adhesivo universal cargado con 5% ZnONP y 0,2% CuNP, con el recuento de UFC de *S. mutans* provenientes de la superficie oclusal de restauraciones de resina compuesta pinceladas con adhesivo universal no cargado; de forma previa a la restauración, y a los siete y 30 días luego de realizar la restauración.

METODOLOGÍA

El presente trabajo de investigación es un estudio clínico split mouth comparativo experimental doble ciego (para operador y paciente), parte del FONDECYT 1170575, aprobado por el Comité de Ética Científico (CEC) de la Universidad de Chile (**Anexo 1**).

El tamaño muestral se calculó a priori utilizando el programa estadístico G*Power®, versión 3.1.9.2, con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$), un poder estadístico del 80% y efecto del tamaño de 0.5. El análisis indicó que se requerirán al menos 25 pacientes para lograr resultados significativos.

La muestra consistió en 25 pacientes de la clínica de Ortodoncia de segundo año de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile reclutados entre los meses de marzo y octubre del año 2019, previa autorización del alumno tratante. Cada paciente presentó dos dientes premolares superiores contralaterales con indicación de extracción por ortodoncia, teniendo los siguientes grupos:

- Grupo experimental: 25 dientes premolares a los que se les realizaron restauraciones oclusales de composite pinceladas con el sistema adhesivo Prime&Bond universal™ dopado con 5% ZnONP y 0,2% CuNP.
- Grupo control: 25 dientes premolares a los que se les realizaron restauraciones oclusales de composite pinceladas con el sistema adhesivo Prime&Bond universal™ con sus componentes originales.

Criterios de inclusión:

1. Pacientes con dos dientes premolares superiores contralaterales sanos con indicación de extracción por ortodoncia.
2. Muestras de saliva inicial positivas a la presencia de la bacteria *Streptococcus mutans*.
3. Pacientes clasificados como ASA I o II según la American Society of Anesthesiologic.

Criterios de exclusión:

1. Pacientes portadores de aparatos protésicos removibles o fijos, planos de relajación o cualquier artefacto acrílico presente en la cavidad oral.
2. Pacientes en tratamiento con enjuagues y/o pasta dental con concentraciones de fluoruro igual o mayor a 2500 ppm de iones fluoruro en el momento del estudio o en los últimos tres meses.
3. Pacientes con alguna dificultad motriz que les impida ser responsables de su propia higiene oral.
4. Pacientes que mastican chicle por lo menos cuatro días por semana.
5. Pacientes en tratamiento con fármacos que disminuyan el flujo salival, tales como antidepresivos, narcóticos, antihistamínicos, antihipertensivos, antieméticos y diuréticos.
6. Pacientes bajo terapia antibiótica en el momento del estudio o en los últimos 3 meses.
7. Pacientes en tratamiento con fármacos inmunosupresores (corticoides).

Procedimiento:**I. Selección de Pacientes**

Se realizó un examen clínico oral a pacientes de la clínica de Ortodoncia de segundo año en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Se ingresaron al estudio 25 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión previamente definidos, asignándoles un número de ingreso al estudio según una secuencia de aleatorización en una hoja de cálculo en Microsoft® Office Excel.

II. Consentimiento Informado

Se invitó a los voluntarios a participar del presente estudio, parte del FONDECYT 1170575. Se leyó el Documento de Consentimiento Informado (**Anexo 2**). Se

explicó la importancia para el ámbito odontológico, objetivos, procedimiento a realizar, cantidad y duración de sesiones, y riesgos y beneficios de participar en el proyecto. Se entregó el Consentimiento Informado, el cual se firmó posteriormente.

III. Examen clínico intraoral

Se realizó un examen clínico intraoral para confirmar y detectar los dientes premolares superiores con indicación de extracción por ortodoncia que fueron incluidos en el estudio. A cada paciente se le realizó una ficha clínica (**Anexo 3**), la cual incluyó antecedentes sistémicos y de higiene bucal, el examen intraoral y el diagnóstico clínico de cada diente, entre otros.

IV. Control positivo de la presencia de *Streptococcus mutans* en saliva

Mediante la estimulación de saliva con una lámina de papel Parafilm se obtuvo 1 mL (1000 μ L) aproximadamente de saliva estimulada en tubos de ensayo estériles. Los tubos fueron transportados en una gravilla dentro de un bolso térmico junto a un ice pack que mantuvo las condiciones de frío necesarias para la muestra (a 4 °C).

El procesamiento de la muestra de saliva se realizó mediante la dilución, siembra, incubación, recuento e identificación de *Streptococcus mutans* desde las muestras.

La dilución se llevó a cabo utilizando una micropipeta (Biopette™ Plus, Labnet International, Inc. Global) con la cual se tomaron 100 μ L de la muestra, previa agitación por 45 segundos en un vórtex (Vórtex mixer NLD/XH-C, EDLAB), se agregó a un primer tubo con 900 μ L de buffer fosfato pH 7.2 0.1 M. La muestra se agitó por 15 segundos, obteniendo una dilución de saliva estimulada de 1:10. Se tomaron 100 μ L de la primera dilución y se agregaron a un segundo tubo con 900 μ L de buffer fosfato repitiendo el proceso anterior, con lo que se obtuvo una dilución de saliva estimulada de 1:100. De esta última dilución se tomaron 100 μ L que fueron sembrados con rastrillo estéril en placas de Petri con medio TYCSB. La composición

del medio TYCSB fue de L-cistina 0,2 g/L, triptona 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 (Schaeken, 1986). Los procesos de dilución y siembra se realizaron bajo condiciones de esterilidad, en una campana de bioseguridad tipo II (Dwyer Mark II, Filtro Met). Posteriormente, las placas de Petri se incubaron en una jarra con vela para lograr condiciones de microaerofilia, y se llevaron a estufa durante 48 horas a 37 °C. El recuento de UFC se realizó al sacar las placas de la estufa, luego de verificar las colonias bajo una lupa estereoscópica (Stemi 2000-C, Zeiss) y una fuente luminosa (Schott KL1500, Zeiss). Para el recuento de UFC en saliva, se consideraron aquellas colonias adherentes, blanco-grisáceas, con apariencia de vidrio esmerilado, superficie rugosa, de consistencia dura, y que no pudieron ser disgregadas cuando se manipulaban con un asa bacteriológica.

De acuerdo con la clasificación de riesgo cariogénico, propuesta por Linossier (Linossier y cols., 2003), basada en el recuento de estreptococos del grupo mutans en saliva, los recuentos bacterianos de saliva se agruparon en riesgo bajo (10.000-50.000 UFC/mL), moderado (100.000-250.000 UFC/mL) y alto (500.000-1.000.000 UFC/mL).

Luego del recuento de UFC de *S. mutans*, con un asa bacteriológica se tomaron al menos dos colonias para aislarlas y sembrarlas en placas de Petri con medio TYCSB, estas se incubaron en una jarra con vela durante 48 horas a 37 °C. Posteriormente, con un asa bacteriológica se tomó una colonia bacteriana y se inoculó en un tubo estéril con caldo Todd Hewitt (Todd y Hewitt, 1932), los tubos se incubaron en jarra por 48 horas a 37 °C en una estufa de cultivo (**Figura 3**).



Figura 3. Tubo con 3 mL de caldo Todd Hewitt incubado en jarra por 48 horas a 37 °C. Presenta crecimiento bacteriano, apto para la criopreservación de la muestra.

Para la criopreservación de las muestras, se mezclaron 500 μ L de glicerol estéril con 500 μ L del caldo bacteriano en un tubo de microcentrífuga (tubo “eppendorf”). Estas muestras se llevaron a un congelador a -80 °C para su posterior análisis molecular.

V. Toma de muestra microbiológica inicial (T0)

Mediante la “Técnica de cubeta” se recogió la biopelícula depositada sobre la superficie de los dientes.

Las cubetas de flúor gel fueron previamente esterilizadas en una campana de bioseguridad tipo II, durante 20 minutos. Las cubetas colocadas en placas de Petri estériles se llenaron con 5 mL de agar TYCSB (**Figura 4**) y se guardaron en un refrigerador hasta su posterior utilización. Previo a la utilización de las cubetas cargadas con agar TYCSB, se llevaron a una estufa de incubación por 24 horas a 37 °C para comprobar que los medios de cultivo no se encontrasen contaminados, como control de calidad.



Figura 4. Cubeta de flúor gel en placa de Petri, cargada con medio TYCSB.

La toma de muestras se realizó presionando suavemente la cubeta por un minuto sobre la superficie oclusal de los dientes en estudio, luego las cubetas se depositaron nuevamente en las placas de Petri estériles para su posterior procesamiento microbiológico.

VI. Confección de las restauraciones de resina compuesta y aplicación del adhesivo Prime&Bond universal™ con y sin carga de 5% ZnONP y 0,2% CuNP

Un operador previamente calibrado en la confección de las restauraciones oclusales de resina compuesta realizó el siguiente procedimiento:

Utilizando la técnica anestésica infiltrativa se infiltró un tubo de Mepivacaína 2% con Epinefrina 1:100.000 en cada zona a anestesiarse. Se realizó una preparación biológica oclusal de medidas 3 × 3 × 2 mm (alto × ancho × profundidad) en cada premolar, con la ayuda de una sonda periodontal para precisar las medidas. Para acondicionar el tejido dentario se utilizó ácido ortofosfórico gel al 37% (FGM), realizando una técnica de grabado total. Según el número y letra de aleatorización asignado a cada paciente al ingresar al estudio se indicó la aplicación del sistema

adhesivo Prime&Bond universal™ dopado de 5% ZnONP y 0,2% CuNP (adhesivo **A**) en una cavidad y en la contralateral se aplicó el adhesivo universal con sus componentes originales (adhesivo **B**) (**Figura 5**), el procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Mediante la técnica incremental se restauró con resina compuesta (composite Opallis EA3, FGM), se comprobó la oclusión y se pulieron las restauraciones. Se realizó nuevamente grabado ácido de la superficie de las restauraciones y se aplicó el respectivo sistema adhesivo.



Figura 5. A la izquierda el adhesivo Prime&Bond universal™ dopado de 5% ZnONP y 0,2% CuNP (adhesivo **A**) y a la derecha el adhesivo Prime&Bond universal™ con sus componentes originales (adhesivo **B**).

El procedimiento fue doble ciego, debido a que paciente y operador no tuvieron conocimiento sobre cual restauración fue pincelada con el adhesivo dopado de nanopartículas.

La incorporación de nanopartículas al sistema adhesivo fue realizada en una habitación oscura con un agitador motorizado, llevada a cabo por un operador externo y previamente entrenado.

VII. Toma de muestra microbiológica siete días después (T1) de la confección de restauraciones y la aplicación del adhesivo A y B

Siete días después de la realización de las restauraciones oclusales, se tomaron las muestras de biopelícula mediante la “Técnica de cubeta” descrita previamente. Las

cubetas se depositaron en las placas de Petri estériles, para su posterior procesamiento microbiológico.

VIII. **Toma de muestra microbiológica 30 días después (T2) de la confección de restauraciones y la aplicación del adhesivo A y B**

30 días después de la realización de las restauraciones oclusales, se tomaron las muestras de biopelícula mediante la “Técnica de cubeta” descrita previamente. Las cubetas se depositaron en las placas de Petri estériles, para su posterior procesamiento microbiológico.

IX. **Procesamiento microbiológico de muestras**

En el laboratorio de Microbiología Bucal del Departamento de Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, las placas de Petri con cubetas en su interior se llevaron a una estufa de incubación durante 48 horas a 37 °C en jarra con vela.

X. **Registros fotográficos**

Se realizó registro fotográfico de las impresiones tomadas mediante la “Técnica de cubeta” en T0, T1 y T2 bajo lupa estereoscópica (aumento de 5×) y fuente luminosa.

XI. **Identificación y aislamiento de colonias de *Streptococcus mutans***

De las muestras microbiológicas se identificaron colonias de *Streptococcus mutans* en base a la morfología macroscópica de las colonias y la adherencia al agar TYCSB observadas bajo una lupa estereoscópica y una fuente luminosa.

Se realizó el recuento de UFC de *S. mutans* sobre la superficie oclusal de las restauraciones en premolares. Las colonias compatibles con la adhesión y las

características morfológicas de *S. mutans* se tomaron con un asa bacteriológica, se sembraron en una placa de Petri con agar TYCSB y fueron incubadas en una jarra con vela durante 48 horas a 37 °C. Posteriormente, con un asa bacteriológica se tomó una colonia bacteriana y se inoculó en un tubo estéril con 3 mL de caldo Todd Hewitt, siendo incubadas por 48 horas a 37 °C en estufa de cultivo.

Para la criopreservación de las muestras, se mezclaron 500 µL de glicerol con 500 µL del caldo bacteriano en un tubo de microcentrifuga (tubo “eppendorf”) y se congelaron a -80 °C.

XII. Extracción de ADN bacteriano desde las muestras criopreservadas

Las muestras criopreservadas de *S. mutans* fueron sembradas en placas de Petri con agar TYCSB utilizando un asa bacteriológica, y se incubaron en una jarra con vela durante 48 horas a 37 °C. Se tomó una UFC de cada siembra y se inocularon en 3 mL de caldo Todd Hewitt, se incubaron durante 48 horas a 37 °C en ambiente microaerofílico.

Para la obtención del ADN genómico, se utilizó el kit MasterPure™ DNA Purification Kit (epicentre®) siguiendo el siguiente protocolo:

- a. Lisis bacteriana: cada cultivo bacteriano en caldo Todd Hewitt se agitó en un vórtex durante 15 segundos, se traspasó a un tubo de microcentrifuga y se centrifugó por 4 minutos a 4 °C a 10.000 rpm. Los precipitados se suspendieron en 150 µL de TE buffer y se agitaron las mezclas en un vórtex. Se agregaron 5 µL de Ready-Lyse Lysozyme 20 mg/mL. Las muestras fueron incubadas durante toda la noche a 37 °C. Posteriormente, se agregaron 150 µL de 2XT&C Lysis Solution. Se agregó 1 µL de Proteinase K 10 mg/mL. Se incubó por 45 minutos a 65 °C en baño maría, llevando las muestras a un vórtex cada 5 minutos. Se enfriaron las muestras durante 10 minutos a 37 °C.
- b. Limpieza del ADN: se colocaron las muestras en hielo durante 5 minutos. Se agregaron 175 µL de MPC Protein a los 300 µL de las muestras lisadas. Se

centrifugó por 10 minutos a 4 °C a 10.000 rpm. Se dejó en hielo durante 10 minutos. Los sobrenadantes se transportaron a un nuevo tubo de microcentrífuga. Se agregaron 500 µL de isopropanol al sobrenadante recuperado. Se invirtió cada tubo 40 veces. Se dejó enfriar en hielo durante 10 minutos. Se centrifugaron las muestras por 10 minutos a 4 °C a 10.000 rpm en una microcentrífuga. Se eliminó cada sobrenadante. Se agregaron 500 µL de etanol al 75% al pellet y se centrifugó por 10 minutos a 4 °C a 10.000 rpm. Se removió el etanol residual. Se rehidrató el DNA en 25 µL de H₂O libre de nucleasas (agua nano pura) tibia. Se mezcló en un vórtex y los tubos con el ADN se mantuvieron a -20 °C hasta la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction).

XIII. **Detección del gen *spaP* mediante PCR convencional**

La identificación molecular de la especie *S. mutans* se realizó mediante la reacción de PCR, amplificando un fragmento de 192 pb del gen *spaP*. Este gen codifica para el antígeno I/II, el cual es un polipéptido involucrado en la adherencia al esmalte, independiente de la sacarosa (Vásquez y cols., 2014).

La mezcla para la PCR del gen *spaP* se realizó en una campana de bioseguridad tipo II, utilizando los reactivos mostrados en la **Tabla 1**.

La PCR realizada en un termociclador (Axygen Therm-1000 Thermocycler) fue llevada a cabo de la siguiente manera: Desnaturalización inicial de 4 minutos a 94 °C; 30 ciclos con las siguientes condiciones: desnaturalización 1 minuto a 94 °C, apareamiento 30 segundos a 50 °C y elongación 1 minuto a 72 °C; con una extensión final de 5 minutos a 72 °C. La mezcla se mantuvo a 4 °C hasta completar el tiempo de la PCR.

Tabla 1. Mezcla para PCR del gen *spaP*.

Reactivo	Cantidad
Buffer 10 X	5.0 μ L
MgCl ₂ 25 Mm	4.0 μ L
dNTP 1 mM	1.0 μ L
Partidor Forward 20 pmoles	1.0 μ L
Partidor Reverse 20 pmoles	1.0 μ L
Taq DNA Polimerasa 5 U/ μ L	0.2 μ L
DNA blanco	4.0 μ L
H ₂ O destilada	33.8 μ L
Volumen final	50.0 μL

Los productos de la amplificación por PCR fueron analizados por electroforesis en una cámara (Gel XL Plus, Mini Gel Electrophoresis System, Labnet International Inc.) en gel de agarosa al 2% en amortiguador TAE IX (buffer Tris, acetato y EDTA) a 80 miliamperes. Mediante el programa Carestream MI, utilizando un transiluminador UV (Gel Logic™ 112) se fotografiaron los productos de la amplificación.

XIV. Pruebas bioquímicas para la identificación de *Streptococcus mutans*

Luego de analizar mediante electroforesis los productos de la amplificación por PCR, las muestras que no amplificaron para el gen *spaP* fueron sometidas a pruebas bioquímicas para diferenciar especies del grupo mutans streptococci.

Las muestras criopreservadas de *S. mutans* fueron sembradas en placas de Petri con agar TYCSB utilizando un asa bacteriológica y se incubaron durante 48 horas a 37 °C manteniendo las condiciones de microaerofilia. Se tomó la siembra y se inoculó en 3 mL de caldo Todd Hewitt, incubándose en jarra durante 48 horas a 37 °C.

Posterior a las 48 horas, se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: hidrólisis de la Esculina y fermentación de la Rafinosa y Melobiosa, las tres positivas sólo para la especie *Streptococcus mutans* (Coykendall, 1986).

Los caldos incubados fueron centrifugados (Thermo Scientific, Heraeus Megafuge 8R centrifuge) por 5 minutos a 1500 rpm., con el fin de obtener un pellet y eliminar el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 400 μ L de buffer fosfato pH 7.2 hasta obtener una suspensión ajustada a Mc Farland 5. Se sembraron 100 μ L de la suspensión en 500 μ L de Esculina (Brain Heart Infusion, Difco; 1% de Esculina), en 500 μ L de Rafinosa (Tioglicolato sin resazurina y sin indicador, Difco; 1% de Rafinosa) y en 500 μ L de Melobiosa (Tioglicolato sin resazurina y sin indicador, Difco; 1% de Melobiosa). Posteriormente los tubos fueron llevados a una estufa de incubación por 24 horas a 37 °C. Luego, se agregaron tres gotitas de citrato férrico amoniacal (1%) al caldo Esculina y tres gotitas de rojo fenol (0,025%) a los caldos Melobiosa y Rafinosa respectivamente.

Cuando la hidrólisis de la Esculina fue positiva, el caldo tomó una coloración negra. En el caso de la fermentación de la Rafinosa y la Melobiosa, la aparición de una coloración amarillo intenso indicó la positividad de la prueba. Lo anterior confirmó el diagnóstico de la especie *Streptococcus mutans*.

XV. **Análisis de los datos**

La información recolectada fue tabulada en una planilla Excel y analizada con el software estadístico SPSS versión 22.0 para Windows®. Mediante el test de Shapiro-Wilk se verificó la normalidad de la distribución de datos. El nivel de significancia se estableció en 5%. Posteriormente se utilizó la prueba U de Mann-Whitney (test no paramétrico) para la comparación de los resultados en T0, T1 y T2, con un nivel de confianza de 95%.

XVI. **Posterior tratamiento y análisis en relación con el trabajo de investigación parte del FONDECYT 1170575**

Luego de la obtención de los recuentos microbiológicos, se informó a cada paciente sobre sus resultados. Se realizaron las extracciones de aquellos dientes con

indicación de extracción por ortodoncia, de los cuales se obtendrá la pulpa dental para continuar con los estudios asociados al Fondecyt 1170575.

RESULTADOS

I. Control positivo de la presencia de *Streptococcus mutans* en saliva

A partir del cultivo de muestras de saliva, se obtuvieron colonias aisladas con características macroscópicas y de adherencia compatibles con *Streptococcus mutans*, observándose distintos tipos de morfología en las colonias (**Figura 6**).

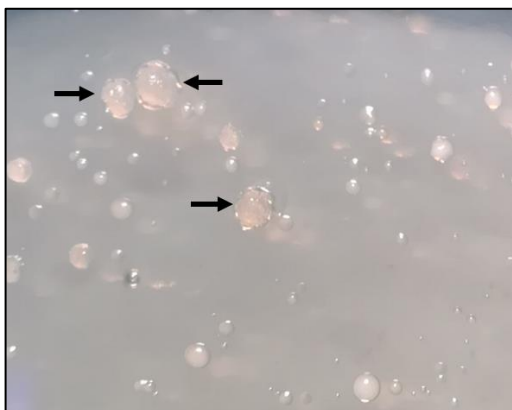


Figura 6. Cultivo de saliva positivo a la presencia de *S. mutans*. Las flechas indican las UFC de *Streptococcus mutans*. (Aumento 5x).

II. Caracterización de pacientes

A partir de los 25 pacientes, no existiendo pérdida de pacientes ni de muestras, se obtuvieron los datos presentados en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Caracterización de pacientes. Se describe género, edad, UFC/mL de *Streptococcus mutans* en saliva, riesgo cariogénico e índice CPOD por cada paciente. Se observa el promedio (\bar{x}) y la desviación estándar (*DS*).

N.º paciente	Género	Edad	UFC/mL de <i>Streptococcus mutans</i> en saliva	Riesgo cariogénico	Índice CPOD
1	M	15	$2,64 \times 10^5$	Moderado	0
2	M	14	$1,70 \times 10^5$	Moderado	2
3	M	21	$7,00 \times 10^3$	Bajo	10
4	F	13	$7,40 \times 10^4$	Moderado	1
5	F	41	$1,46 \times 10^5$	Moderado	15

6	M	25	$3,90 \times 10^4$	Moderado	4
7	F	25	$1,00 \times 10^6$	Alto	14
8	F	26	$1,00 \times 10^6$	Alto	16
9	M	26	$1,00 \times 10^6$	Alto	14
10	M	25	$1,00 \times 10^6$	Alto	6
11	M	30	$1,20 \times 10^4$	Moderado	15
12	F	27	$1,94 \times 10^5$	Moderado	9
13	F	23	$1,38 \times 10^5$	Moderado	8
14	F	25	$1,00 \times 10^4$	Moderado	11
15	F	28	$4,00 \times 10^3$	Bajo	6
16	M	15	$2,60 \times 10^4$	Moderado	1
17	F	17	$8,80 \times 10^4$	Moderado	2
18	F	24	$3,00 \times 10^3$	Bajo	10
19	F	22	$3,10 \times 10^4$	Moderado	7
20	F	25	$2,50 \times 10^4$	Moderado	10
21	F	15	$1,00 \times 10^6$	Alto	0
22	F	22	$7,10 \times 10^4$	Moderado	5
23	F	11	$1,22 \times 10^5$	Moderado	0
24	M	21	$2,70 \times 10^4$	Moderado	4
25	M	24	$2,68 \times 10^5$	Moderado	10
\bar{x}	-	22	$2,69 \times 10^5$	-	7,2
DS	-	6,48	$3,81 \times 10^5$	-	5,23

Del total de participantes en el proyecto de investigación, el 60% corresponde al género femenino y el 40% al masculino. El promedio de edad fue de 22 años. El promedio de UFC/mL de *S. mutans* en saliva fue de $2,69 \times 10^5$, siendo de moderado riesgo y el promedio del índice CPOD fue de 7,2, siendo este muy alto.

III. Aislamiento e identificación de *Streptococcus mutans*

A partir del cultivo bacteriano de muestras de la biopelícula dental recogido mediante la "Técnica de cubeta", se obtuvieron colonias aisladas con características macroscópicas y de adherencia compatibles con las colonias de la especie bacteriana *Streptococcus mutans* (Figura 7).

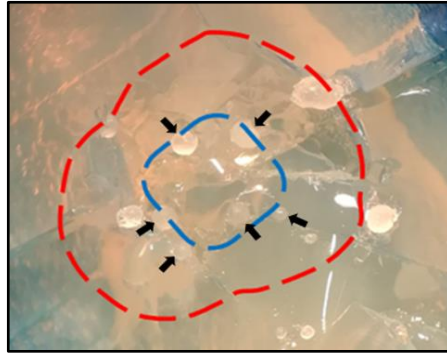


Figura 7. Aislamiento bacteriano de biopelícula desde la superficie de la restauración, recogida mediante la “Técnica de cubeta”. La línea roja discontinua representa el contorno del diente, y la línea azul discontinua representa el contorno de la restauración de la superficie oclusal. Las flechas indican las UFC de *Streptococcus mutans* adheridas al agar TYCSB. (Aumento 5x).

El frotis de cultivo de caldo Todd Hewitt a partir de una colonia de *Streptococcus mutans* teñido con Gram, mostró formas cocáceas, Gram positivo y agrupadas en cadenas, característico de las especies del grupo mutans streptococci (**Figura 8**).

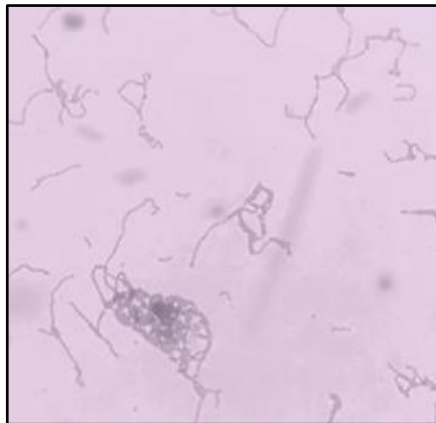


Figura 8. Frotis de un cultivo de caldo Todd Hewitt a partir de una colonia de *Streptococcus mutans*, teñido con tinción Gram.

En la **Figura 9** se observan los productos de PCR para la detección del gen de virulencia *spaP*. El tamaño esperado del producto de PCR fue de 192 pb.

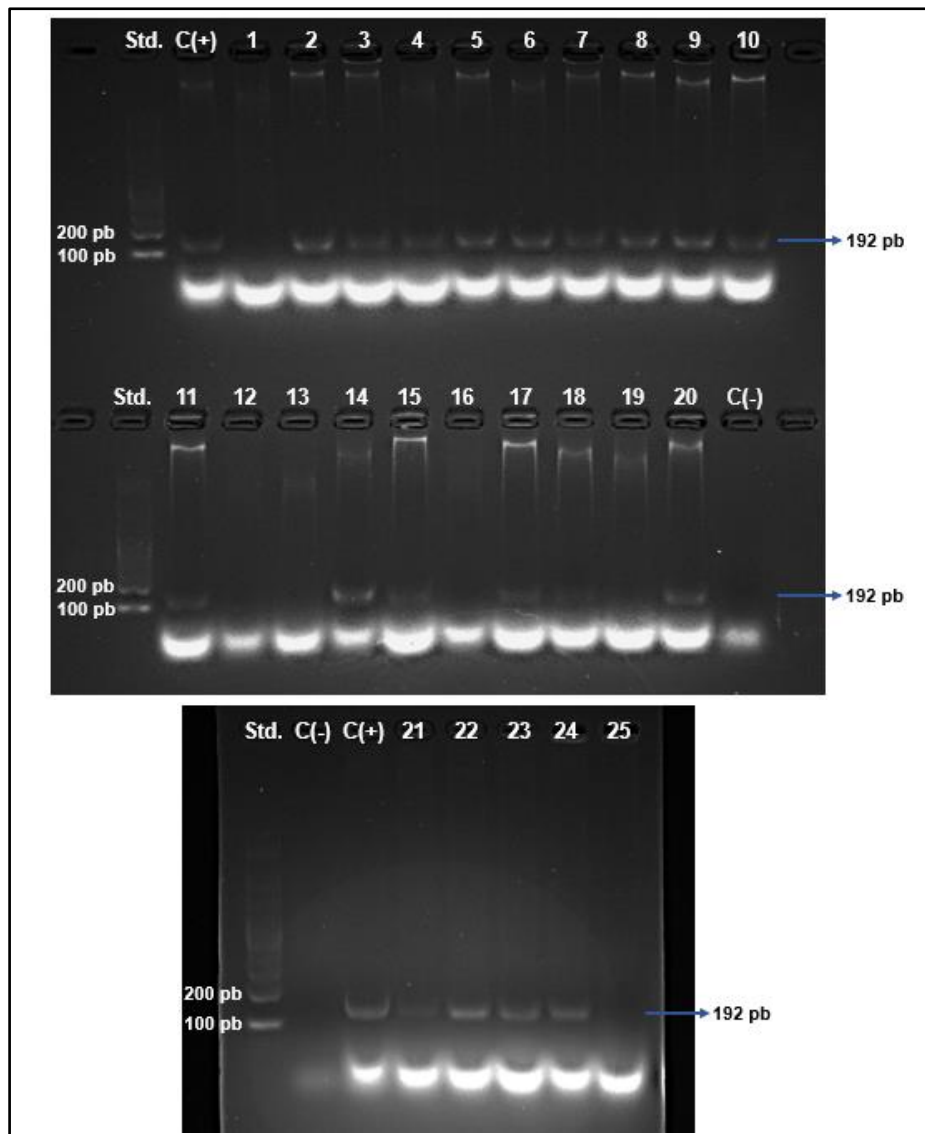


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa para los productos de PCR para gen *spaP* de *S. mutans*: carril **Std.** marcador de tamaño molecular (100 pb); carril **C(+)** control positivo (ATCC); carril **C(-)** control negativo; carriles **2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 22, 23 y 24** bandas de ADN correspondientes a la amplificación de un fragmento del gen *spaP* en cepas de *S. mutans* provenientes de las diferentes muestras analizadas.

Se determinó que, de las 25 colonias aisladas a partir de las muestras de los 25 pacientes (en donde se tomó una colonia por cada muestra de paciente), 19 mostraron amplificación correspondiente al gen *spaP*; es decir, el 76% de las cepas

aisladas de *S. mutans*, presentaban el gen de virulencia *spaP*.

Las pruebas de hidrólisis de la Esculina y fermentación de la Rafinosa y Melobiosa, fueron positivas para *S. mutans* en tres de las seis muestras restantes (12% del total) que no fueron positivas para el gen *spaP* mediante la detección por PCR (**Figura 10**).

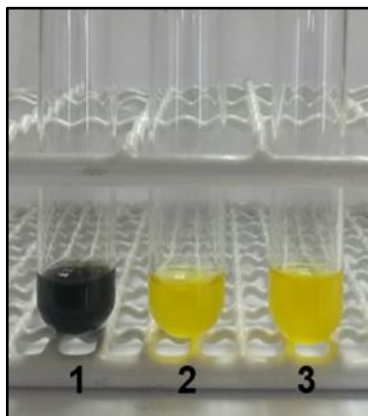


Figura 10. De izquierda a derecha: tubo con Esculina (1) luego de la adición de citrato férrico amoniacal; tubo con Rafinosa (2) luego de la adición de rojo fenol; tubo con Melobiosa (3) luego de la adición de rojo fenol.

Del total de 25 pacientes, tres muestras no dieron resultados positivos para la amplificación del gen *spaP* mediante PCR ni para las pruebas de hidrólisis de la Esculina y fermentación de la Rafinosa y Melobiosa, por tanto, estas muestras eran compatibles con la bacteria *S. mutans* solo por sus características macroscópicas y de adherencia. El frotis de cultivo de estas colonias teñido con Gram mostró formas cocáceas, Gram positivo y agrupadas en cadenas, característico de bacterias del grupo mutans streptococci.

IV. Cuantificación de UFC de *Streptococcus mutans*

A partir del cultivo bacteriano de muestras de biopelícula obtenidas mediante la

“Técnica de cubeta”, se obtuvieron los recuentos de UFC de *S. mutans* descritos en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Recuento de UFC de *Streptococcus mutans* de la superficie oclusal de los dientes premolares restaurados con resina compuesta, pincelados con el adhesivo Prime&Bond universal™ cargado con 5% ZnONP y 0,2% CuNP (A) y con el adhesivo Prime&Bond universal™ con sus componentes originales (B); de forma previa a la restauración (T0), a los siete días (T1) y 30 días (T2) luego de realizar la restauración. Se observa el promedio (\bar{x}) y la desviación estándar (**DS**).

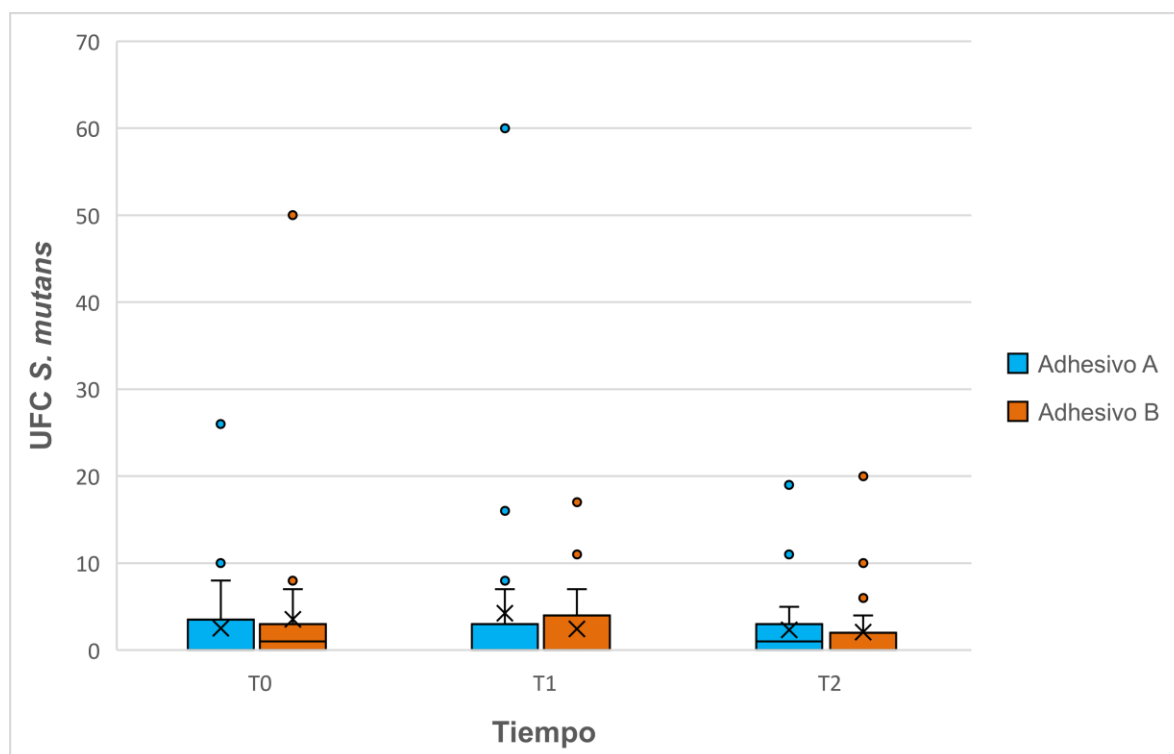
N.º paciente	UFC T0		UFC T1		UFC T2	
	Adhesivo	Adhesivo	Adhesivo	Adhesivo	Adhesivo	Adhesivo
	A	B	A	B	A	B
1	0	0	0	1	0	0
2	2	1	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	5	8	4	7	4	3
6	0	0	0	0	0	1
7	0	7	0	0	0	0
8	1	1	2	3	11	1
9	0	0	0	0	0	0
10	8	4	60	17	4	10
11	0	0	2	1	1	2
12	0	5	0	0	5	6
13	0	0	0	0	2	0
14	6	3	8	5	1	0
15	0	0	0	0	1	0
16	5	2	1	0	1	0
17	10	50	7	11	1	20
18	0	0	0	0	0	1
19	0	3	0	1	0	0
20	0	0	0	0	2	1
21	0	0	0	0	0	0
22	0	1	1	6	0	0
23	26	2	16	3	19	2
24	0	2	5	6	3	1
25	0	0	0	0	3	4
\bar{x}	2,52	3,56	4,24	2,44	2,32	2,08
DS	5,67	9,94	12,20	4,22	4,26	4,41

V. Análisis estadístico

Mediante el test de Shapiro-Wilk, utilizado para observar la forma en que se distribuyen los datos de la muestra, se determinó que la distribución de los valores no es normal ($p < 0.05$).

En la **Figura 11** se observa la distribución de datos en el gráfico de cajas y bigotes, en donde se muestra el número de UFC en la superficie de las restauraciones de resina compuesta con y sin 5% ZnONP y 0,2% CuNP en T0, T1 y T2.

Figura 11. Gráfico de cajas y bigotes que muestra la distribución de UFC de *S. mutans* en la superficie oclusal de los dientes restaurados con el adhesivo A y B, en los tiempos T0, T1, T2.



Debido a que los valores no se distribuyen de forma normal, se aplicó un test no paramétrico, la prueba U de Mann-Whitney para los valores de las muestras en los tres tiempos. Los resultados se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Prueba U de Mann-Whitney. Se observa la significancia arrojada entre el recuento de las UFC de *S. mutans* en los adhesivos A y B, para los tiempos T0, T1 y T2.

Tiempo	Sig. asintót. (bilateral)
T0 (adhesivo A – adhesivo B)	0,341
T1 (adhesivo A – adhesivo B)	0,837
T2 (adhesivo A – adhesivo B)	0,556

Al ser $p > 0,05$, se determinó que no existe una diferencia estadísticamente significativa arrojada por la prueba U de Mann-Whitney en el recuento de UFC de *S. mutans* entre los dientes restaurados con los adhesivos A y B, para los tres tiempos.

DISCUSIÓN

Una manera de prevenir la caries dental es mediante el estudio, control y manejo de la microbiota oral. Si bien las bacterias acidogénicas han sido históricamente aceptadas como el principal agente etiológico de la caries, destacando entre ellas la bacteria *Streptococcus mutans*, actualmente esta enfermedad es considerada multifactorial, puesto que la interacción entre los distintos factores ambientales podría impulsar un cambio en el equilibrio de la microbiota residente, alterándose el equilibrio hacia la desmineralización del esmalte (Hurlbutt, 2010). A pesar de que *S. mutans* no es estrictamente un indicador sobre el riesgo y desarrollo de la enfermedad de caries, factores de virulencia como acidogenicidad, aciduricidad, acidofilicidad, síntesis de glucanos y fructanos, y producción de dextranasa (Banas, 2004; Núñez y García, 2010) conforman a esta especie como una de las más importantes en cuanto a la progresión de la caries (Dourado y Reis 2006; Saravia, 2011; Astorga y cols., 2015), configurándola como un estándar para medir riesgo cariogénico en los individuos.

Para minimizar el efecto de la caries sobre la estructura dental, se han introducido las resinas compuestas, conformándose actualmente como el material de restauración más empleado en Operatoria dental. Especialmente en pacientes con un alto riesgo de caries, las caries adyacentes a las restauraciones son las responsables de más del 60% de los fracasos en las restauraciones (Auschill y cols., 2002), y debido a que la interfaz adhesiva diente/restauración es susceptible a la biodegradación y a la consecuente formación de caries adyacentes a las restauraciones, las restauraciones estéticas son constantemente un desafío para los odontólogos.

Una solución prometedora a esta problemática, y aún no dilucidada del todo, es la incorporación de ZnONP y CuNP en los sistemas adhesivos, ya que, si bien la evidencia actual es escasa respecto a esto, se ha encontrado que estas nanopartículas agregan propiedades antimicrobianas a los materiales de restauración. Evidencia reciente señala que la combinación de estas nanopartículas

(cuando los adhesivos no estaban polimerizados) exhiben propiedades antimicrobianas contra *S. mutans* sin ser altamente citotóxico (Gutiérrez y cols., 2019a; Gutiérrez y cols., 2019b) y sin afectar negativamente a la resistencia a la tracción del sistema adhesivo (García y cols., 2016; Gutiérrez y cols., 2019b). Otros estudios han demostrado que la combinación de ZnONP y CuNP inhibe MMP-2, MMP-8 y MMP-9, las cuales son metaloproteinasas activas durante el proceso de caries (Mazzoni y cols., 2015), manteniendo así la estabilidad de la interfaz adhesiva diente/restauración. Además, la incorporación de ZnO favorece la formación de cristalitos de apatita en las fibrillas de colágeno y el entrecruzamiento de ambas nanopartículas puede aumentar la resistencia del colágeno y dejarlo menos susceptible a los efectos de las enzimas proteolíticas (Toledano y cols., 2013).

Aún no existe claridad sobre cuál sería el mecanismo por el cual las nanopartículas generarían su efecto antibacteriano sobre *S. mutans*. Un mecanismo propuesto sería la teoría del “efecto del caballo de Troya”, la cual indica que el ambiente lisosómico ácido promovería la corrosión de nanopartículas, convirtiendo los metales centrales en iones y por lo tanto en sustancias tóxicas para las bacterias (Sabella y cols., 2014). También se ha propuesto que la inhibición del crecimiento bacteriano podría ser mediada por la producción de ROS inducida por las nanopartículas, de este modo, la internalización de ROS en la célula destruiría lípidos, ADN y proteínas (Swetha y cols., 2019; Gutiérrez y cols., 2019a).

En el presente estudio, cuando se compararon las UFC de *S. mutans* obtenidas de la biopelícula de la superficie de las restauraciones de resina compuesta utilizando la “Técnica de cubeta” no se encontraron resultados estadísticamente significativos analizados mediante la prueba U de Mann-Whitney ($p > 0,05$) entre los recuentos medidos en T0, T1 y T2, rechazando nuestra hipótesis original. Estas diferencias entre los grupos de muestras observados en los tres tiempos no coinciden con la revisión de la literatura que menciona la acción antibacteriana de las ZnONP y CuNP sobre *S. mutans*.

En este trabajo de investigación los dientes contralaterales restaurados fueron los mismos en el grupo control y el grupo experimental, y las muestras de biopelícula

depositadas sobre las restauraciones de ambos grupos fueron tomadas de los mismos pacientes (es decir, igual ecosistema oral e iguales determinantes ecológicos); además, las restauraciones fueron realizadas por el mismo operador previamente calibrado y de forma estandarizada, al igual que las muestras de la biopelícula y su posterior procesamiento microbiológico que fueron realizadas por un segundo operador previamente calibrado. Lo anterior significa que los procedimientos fueron efectuados bajo condiciones homogéneas, indicando que las diferencias no significativas en los recuentos de UFC de *S. mutans* en las muestras se podría deber a otros factores, como el riesgo cariogénico bajo o moderado de los pacientes, la hora del último cepillado de los pacientes, el tiempo transcurrido para la toma de muestra en T2 y/o a características físicas y químicas propias del sistema adhesivo Prime&Bond universal™.

En vista de que los pacientes incluidos en este trabajo de investigación estaban en tratamiento de ortodoncia, la mayoría de estos presentaron un riesgo de caries moderado, puesto que su higiene oral, lesiones de caries y/o restauraciones eran constantemente monitoreadas por sus odontólogos tratantes. Para lograr los objetivos de esta tesis, podría resultar más adecuado realizar los estudios solo en pacientes con un alto riesgo cariogénico, ya que su recuento de UFC de *S. mutans* sería mayor (Opdam y cols., 2010; Opdam y cols., 2014).

La indicación para los pacientes sobre la hora del último cepillado previo a la toma de muestras fue de dos horas antes para así estandarizar la acumulación de biopelícula sobre las restauraciones entre los tiempos T0, T1 y T2, pero debido a diversos motivos, esto fue difícil de controlar por parte del operador, y por ende la acumulación de biopelícula, no fue homogénea. Esto habría sido un factor importante de controlar para poder determinar una microbiota que se presentara con las mismas condiciones entre una y otra toma de muestra.

El tiempo transcurrido para la toma de muestra en T2 puede haber sido insuficiente, pues para que ocurran cambios en las superficies de las restauraciones, estas deben exponerse al entorno oral durante un cierto periodo de tiempo (Vildósola y

cols., 2019), ya que luego de 30 días (T2), las restauraciones mantendrán características similares a cuando son recién realizadas (T0).

El sistema adhesivo Prime&Bond universal™ posee monómeros en su composición que se ha demostrado generan una disminución en los valores de resistencia a la tracción después de 28 días de almacenamiento en agua, lo que hace que el material sea más propenso a la degradación temprana (Gutiérrez y cols., 2019b). Lo anterior podría ser un indicador en cuanto a la inestabilidad del material y a su compleja relación con la retención de UFC de *S. mutans*.

Por otro lado, la presencia de porosidad en el material restaurador evidencia que al comparar T0 con T1, los recuentos de UFC de *S. mutans* en T1 podrían haber sido mayores que en T0 (diente no restaurado) por la presencia de la restauración de resina compuesta, pues la adhesión de la biopelícula será mayor debido a que las resinas compuestas promueven la colonización y el crecimiento bacteriano (sus comonómeros pueden estimular especies bacterianas cariogénicas) (Auschill y cols., 2002; Baca y cols., 2002; Marsh, 2006; Vildósola y cols., 2019). Sin embargo, los resultados obtenidos no son constantes en cuanto al aumento o disminución de UFC.

Todo lo anteriormente expuesto señala que se requiere estandarizar más aún la toma de impresiones de muestras de la biopelícula mediante la “Técnica de cubeta”, en cuanto al tiempo después del cepillado y la tercera impresión (T2). Además, la revisión de la literatura al no revelar mayores estudios referentes a la incorporación de las nanopartículas en los sistemas adhesivos es aún insuficiente para poder emitir un juicio en cuanto a su capacidad antibacteriana contra especies cariogénicas *in vivo*. Se hacen necesarios más estudios clínico–microbiológicos que den cuenta del efecto de las nanopartículas no solo en una especie específica, sino que, idealmente, que señalen un efecto sobre el ecosistema oral, entendiendo que la caries es una enfermedad altamente compleja, en donde actúan múltiples microorganismos y factores en el entorno bucal.

La importancia de medir la presencia de esta especie en la placa bacteriana de las restauraciones de resina compuesta se fundamenta en el poder observar en

estudios longitudinales aquellas que tengan un alto recuento de *S. mutans*, monitorizando y controlando los dientes que podrían desarrollar caries secundarias a las restauraciones. Y así, de este modo tomar medidas preventivas adecuadas al riesgo de cada de paciente.

Por lo tanto, en base a la escasa evidencia presentada actualmente, creemos que la incorporación de nanopartículas a los sistemas adhesivos podría generar efectos antibacterianos sobre especies cariogénicas, de forma que contribuiría a la disminución de caries adyacentes a las restauraciones. Y entendiendo que se requieren aumentar y mejorar los estudios con respecto a este tema, los hallazgos de este trabajo de investigación aportan información clínica–microbiológica relevante en cuanto a la búsqueda de soluciones al proceso mencionado anteriormente.

CONCLUSIÓN

Al finalizar esta investigación se puede concluir que:

1. Bajo las condiciones experimentales del presente trabajo de investigación, no existe diferencia estadística en el recuento de las unidades formadoras de colonias de *Streptococcus mutans* sobre restauraciones de resina compuesta pinceladas con un sistema adhesivo universal cargado con nanopartículas de óxido de zinc y cobre, al ser comparado con un sistema adhesivo universal con sus componentes originales.
2. A través de la “Técnica de cubeta” es posible aislar y recuperar UFC de la bacteria *Streptococcus mutans* a partir de muestras de placa bacteriana dental de superficie de restauraciones oclusales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altinci, P., Seseogullari-Dirihan, R., Can, G., Pashley, D. y Tezvergil-Mutluay, A. (2018). Zinc inhibits collagenolysis by cathepsin K and matrix metalloproteinases in demineralized dentin matrix. *Caries research*, 51(6), 576–581. <https://doi.org/10.1159/000479896>
- Anderson, M. H., Molvar, M. P. y Powell, L. V. (1991). Treating dental caries as an infectious disease. *Operative dentistry*, 16(1), 21–28.
- Astorga, B., Barraza, C., Casals, J., Cisterna, M., Mena, D., Morales, F., González, S., Oliveira Junior, O. y Moncada, G. (2015). Avances en el estudio de la diversidad bacteriana oral asociada a caries dental mediante el estudio genómico. *International journal of odontostomatology*, 9(3), 349-356. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2015000300002>
- Auschill, T. M., Arweiler, N. B., Brex, M., Reich, E., Sculean, A. y Netuschil, L. (2002). The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *European journal of oral sciences*, 110(1), 48–53. <https://doi.org/10.1046/j.0909-8836.2001.101160.x>
- Baca, P., Castillo, A. M., Bravo, M., Junco, P., Baca, A. P. y Llodra, J. C. (2002). Mutans streptococci and lactobacilli in saliva after the application of fissure sealants. *Operative dentistry*, 27(2), 107–111.
- Balakrishnan, M., Simmonds, R. S. y Tagg, J. R. (2000). Dental caries is a preventable infectious disease. *Australian dental journal*, 45(4), 235–245. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2000.tb00257.x>
- Banas J. A. (2004). Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, 9(1-3), 1267–1277. <https://doi.org/10.2741/1305>
- Cantín, M., Vilos, C. y Suazo, I. (2010). Nanodontología: el futuro de la odontología basada en sistemas nanotecnológicos. *International journal of odontostomatology*, 4(2), 127-132. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-381X2010000200005>

Carounanidy, U. y Sathyanarayanan, R. (2009). Dental caries: A complete changeover (Part II)-Changeover in the diagnosis and prognosis. *Journal of conservative dentistry: JCD*, 12(3), 87–100. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.57631>

Chen, J., Wang, F., Liu, Q. y Du, J. (2014). Antibacterial polymeric nanostructures for biomedical applications. *Chemical communications*, 50(93), 14482-93.

Cocco, A. R., Rosa, W. L., Silva, A. F., Lund, R. G. y Piva, E. (2015). A systematic review about antibacterial monomers used in dental adhesive systems: Current status and further prospects. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 31(11), 1345–1362. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2015.08.155>

Collins, C. J., Bryant, R. W. y Hodge, K. L. (1998). A clinical evaluation of posterior composite resin restorations: 8-year findings. *Journal of dentistry*, 26(4), 311–317. [https://doi.org/10.1016/s0300-5712\(97\)00019-5](https://doi.org/10.1016/s0300-5712(97)00019-5)

Coykendall A. L. (1989). Classification and identification of the viridans streptococci. *Clinical microbiology reviews*, 2(3), 315–328. <https://doi.org/10.1128/cmr.2.3.315>

De Munck, J., Van Landuyt, K., Peumans, M., Poitevin, A., Lambrechts, P., Braem, M. y Van Meerbeek, B. (2005). A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: methods and results. *Journal of dental research*, 84(2), 118–132. <https://doi.org/10.1177/154405910508400204>

Demirci, M., Tuncer, S., Tekçe, N., Erdilek, D. y Uysal, Ö. (2013). Influence of adhesive application methods and rebonding agent application on sealing effectiveness of all-in-one self-etching adhesives. *Journal of esthetic and restorative dentistry*, 25(5), 326–343. <https://doi.org/10.1111/jerd.12034>

Dentsply Sirona. (2020). *Prime&Bond universal™. Universal Adhesive*. Scientific Compendium.

https://assets.dentsplysirona.com/flagship/en/explore/restorative/prime&bond_universal/Prime-and-Bond-universal-Scientific-Compendium.pdf

Dourado, A. y Reis, A. (2006). Sistemas adhesivos. *RODYB: Revista de Operatoria Dental y Biomateriales*, 1(2), 13-28.

Fejerskov O. (2004). Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries research*, 38(3), 182–191. <https://doi.org/10.1159/000077753>

Garcia, I. M., Leitune, V. C., Kist, T. L., Takimi, A., Samuel, S. M. y Collares, F. M. (2016). Quantum dots as nonagglomerated nanofillers for adhesive resins. *Journal of dental research*, 95(12), 1401–1407. <https://doi.org/10.1177/0022034516656838>

Glick, M., Monteiro da Silva, O., Seeberger, G. K., Xu, T., Pucca, G., Williams, D. M., Kess, S., Eiselé, J. L. y Séverin, T. (2012). FDI Vision 2020: shaping the future of oral health. *International dental journal*, 62(6), 278–291. <https://doi.org/10.1111/idj.12009>

Gutiérrez, M. F., Alegría-Acevedo, L. F., Méndez-Bauer, L., Bermudez, J., Dávila-Sánchez, A., Buvinic, S., Hernández-Moya, N., Reis, A., Loguercio, A. D., Farago, P. V., Martin, J. y Fernández, E. (2019a). Biological, mechanical and adhesive properties of universal adhesives containing zinc and copper nanoparticles. *Journal of dentistry*, 82, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2019.01.012>

Gutiérrez, M. F., Bermudez, J., Dávila-Sánchez, A., Alegría-Acevedo, L. F., Méndez-Bauer, L., Hernández, M., Astorga, J., Reis, A., Loguercio, A. D., Farago, P. V. y Fernández, E. (2019b). Zinc oxide and copper nanoparticles addition in universal adhesive systems improve interface stability on caries-affected dentin. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 100, 103366. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.07.024>

HiMedia Laboratories. (2014). *TYCSB Agar Base (Tryptone Yeast Extract Cystine w/ Sucrose & w/o Bacitracin Agar Base)*. Technical Data. <http://himedialabs.com/TD/M1975.pdf>

Hurlbutt, M. (2010). Dental caries: A pH mediated disease. *CDHA Journal*, 25(1), 9-16.

Kidd, E. A. y Fejerskov, O. (2004). What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *Journal of dental research*, 83 Spec No C, C35–C38. <https://doi.org/10.1177/154405910408301s07>

Linossier, A., Vargas, A., Zillmann, G., Arriagada, M., Rojas, R. y Villegas, R. (2003). Streptococci mutans: método semi-cuantitativo para establecer el rango de riesgo de infección bucal en niños preescolares chilenos. *Revista medica de Chile*, 131(4), 412–418.

Liu, W., Su, P., Chen, S., Wang, N., Ma, Y., Liu, Y., Wang, J., Zhang, Z., Li, H. y Webster, T. J. (2014). Synthesis of TiO₂ nanotubes with ZnO nanoparticles to achieve antibacterial properties and stem cell compatibility. *Nanoscale*, 6(15), 9050–9062. <https://doi.org/10.1039/c4nr01531b>

Loesche W. J. (1976). Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral sciences reviews*, 9, 65–107.

Lynch, C. D., Opdam, N. J., Hickel, R., Brunton, P. A., Gurgan, S., Kakaboura, A., Shearer, A. C., Vanherle, G., Wilson, N. H. y Academy of Operative Dentistry European Section (2014). Guidance on posterior resin composites: *Academy of Operative Dentistry - European Section. Journal of dentistry*, 42(4), 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.01.009>

Macchi, R. (2007). *Materiales dentales*. (4.^a ed.). Editorial médica Panamericana.

Mandri, M., Aguirre, A. y Zamudio, M. E. (2015). Sistemas adhesivos en Odontología Restauradora. *Odontoestomatología*, 17(26), 50-56.

Marsh P. D. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC oral health*, 6 Suppl 1(Suppl 1), S14. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-6-S1-S14>

Mazzoni, A., Tjäderhane, L., Checchi, V., Di Lenarda, R., Salo, T., Tay, F. R., Pashley, D. H. y Breschi, L. (2015). Role of dentin MMPs in caries progression and

bond stability. *Journal of dental research*, 94(2), 241–251. <https://doi.org/10.1177/0022034514562833>

Mendez-Vilas, A. (2011). Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. *Editorial Formatex Research Center*, 197-209.

Moncada, G., Vildósola, P., Fernández, E., Estay, J., de Oliveira Junior, O. y Martin, J. (2015). Aumento de longevidad de restauraciones de resinas compuestas y de su unión adhesiva. Revisión de tema. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia*, 27(1), 127-153. <https://dx.doi.org/10.17533/udea.rfo.v27n1a7>

Mooney, J. B. y Barrancos, P. J. (2006). *Operatoria dental*. (4.^a ed.). Editorial médica Panamericana.

Moraschini, V., Fai, C. K., Alto, R. M. y Dos Santos, G. O. (2015). Amalgam and resin composite longevity of posterior restorations: A systematic review and meta-analysis. *Journal of dentistry*, 43(9), 1043–1050. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.06.005>

Núñez, D. y García, L. (2010). Bioquímica de la caries dental. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 9(2), 156-166.

Opdam, N. J., Bronkhorst, E. M., Loomans, B. A. y Huysmans, M. C. (2010). 12-year survival of composite vs. amalgam restorations. *Journal of dental research*, 89(10), 1063–1067. <https://doi.org/10.1177/0022034510376071>

Opdam, N. J., van de Sande, F. H., Bronkhorst, E., Cenci, M. S., Bottenberg, P., Pallesen, U., Gaengler, P., Lindberg, A., Huysmans, M. C. y van Dijken, J. W. (2014). Longevity of posterior composite restorations: a systematic review and meta-analysis. *Journal of dental research*, 93(10), 943–949. <https://doi.org/10.1177/0022034514544217>

Palotie, U. y Vehkalahti, M. M. (2012). Reasons for replacement of restorations: dentists' perceptions. *Acta odontológica Scandinavica*, 70(6), 485–490. <https://doi.org/10.3109/00016357.2011.640274>

Palza, H. (2015). Antimicrobial polymers with metal nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 2099-2116.

Reis, A., Carrilho, M., Breschi, L. y Loguercio, A. D. (2013). Overview of clinical alternatives to minimize the degradation of the resin-dentin bonds. *Operative dentistry*, 38(4), E1–E25. <https://doi.org/10.2341/12-258-LIT>

Rosier, B. T., De Jager, M., Zaura, E. y Krom, B. P. (2014). Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet?. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 92. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00092>

Sabella, S., Carney, R. P., Brunetti, V., Malvindi, M. A., Al-Juffali, N., Vecchio, G., Janes, S. M., Bakr, O. M., Cingolani, R., Stellacci, F. y Pompa, P. P. (2014). A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. *Nanoscale*, 6, 7052–7061. <https://doi.org/10.1039/c4nr01234h>.

Saravia, M. E., Nelson-Filho, P., Ito, I. Y., da Silva, L. A., da Silva, R. A. y Emilson, C. G. (2011). Morphological differentiation between *S. mutans* and *S. sobrinus* on modified SB-20 culture medium. *Microbiological research*, 166(1), 63–67. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.01.001>

Schaeken, M. J., van der Hoeven, J. S. y Franken, H. C. (1986). Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on five isolation media, including a new simple selective medium. *Journal of dental research*, 65(6), 906–908. <https://doi.org/10.1177/00220345860650060901>

Serrano-Granger, J. y Herrera, D. (2005). La placa dental como biofilm: ¿Cómo eliminarla?. *RCOE*, 10(4), 431-439

Sieber, C. (2012). *Recuento de Streptococcus mutans en muestras de biofilm sobre dientes restaurados con resina compuesta oclusal versus dientes sanos mediante el método de cubeta* [Tesis de pregrado, Universidad de Chile]. Repositorio académico de la Universidad de Chile.

Subsecretaría de Salud Pública, División de Prevención y Control de Enfermedades, Departamento de Salud Bucal (2017). *Plan Nacional de Salud Bucal 2018-2030*. URL: https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/12/Plan-Nacional-Salud-Bucal-2018-2030-Consulta-P%C3%BAblica-20_12_2017.pdf (02/01/19)

Swetha, D. L., Vinay, C., Uloopi, K. S., RojaRamya, K. S., y Chandrasekhar, R. (2019). Antibacterial and mechanical properties of pit and fissure sealants containing zinc oxide and calcium fluoride nanoparticles. *Contemporary clinical dentistry*, 10(3), 477–482. https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_805_18

Todd, E.W. y Hewitt, L.F. (1932). A new culture medium for the production of antigenic streptococcal haemolysin. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 35(6), 973-974.

Toledano, M., Yamauti, M., Ruiz-Requena, M. E. y Osorio, R. (2012). A ZnO-doped adhesive reduced collagen degradation favouring dentine remineralization. *Journal of dentistry*, 40(9), 756–765. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2012.05.007>

Toledano, M., Sauro, S., Cabello, I., Watson, T. y Osorio, R. (2013). A Zn-doped etch-and-rinse adhesive may improve the mechanical properties and the integrity at the bonded-dentin interface. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 29(8), e142–e152. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.04.024>

Torres, L. y Torres, C. (2014). Caracterización de la dentina tratada endodónticamente. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia*, 25(2), 372-388.

Valenzuela, V., García, D. y Zamorano, X. (2012). Hybrid layer micromorphology of two adhesive systems. TEM análisis. *Avances en Odontoestomatología*, 28(3), 133-140.

Van Tassel P. R. (2013). Nanotechnology in medicine: nanofilm biomaterials. *The Yale journal of biology and medicine*, 86(4), 527–536.

Vásquez, S., Lobos, O. y Padilla, C. (2014). Presencia de genes de virulencia *gtfB* y *spaP* en *Streptococcus mutans* aislados desde saliva y su relación con el índice

COPD y ceod. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 7(2), 65-71. <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-01072014000200004>

Vildósola, P., Palma, P., Zúñiga, P., Fernández, E., Oliveira, O. B. y Moncada, G. (2013). Recovering *Streptococcus mutans* over restorations by the tray technique: a randomized clinical study. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, 12(4), 292-297.

Vildósola, P., Fernández, E., Palma, P., Moncada, G., Cury, J. y Martin, J. (2015). Is there difference of *Streptococcus mutans* count and adherence on amalgam and resin occlusal restorations? A blind clinical study. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, 14(1), 05-09.

Vildósola, P., Fernández, E., Cury, J., Palma, P., Chaple, A., Acuña, N. y Moncada, G. (2019). Decrease in *Streptococcus mutans* after applying sealants to the occlusal surfaces of permanent teeth in adults. *Revista Cubana de Estomatología*, 56(3), 1-12

Welch, K., Cai, Y., Engqvist, H. y Strømme, M. (2010). Dental adhesives with bioactive and on-demand bactericidal properties. *Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials*, 26(5), 491–499. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2010.01.008>

Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Daskalakis, N., Jeuken, L., Povey, M., O'Neill, A. y York, D. (2010). Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against *E. coli*. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1625–1636.

Zúñiga, P. (2010). *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* [Tesis de pregrado, Universidad de Chile]. Repositorio académico de la Universidad de Chile.

ANEXOS


Anexo 1



**COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO DE LA FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
UNIVERSIDAD DE CHILE**

CERTIFICADO

Yo Marco Cornejo Ovalle, Presidente (S) del Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, declaro que el proyecto Fondecyt, titulado "Effect of the incorporation of copper and zinc nanoparticles into dental adhesives on their antimicrobial properties and dentinal matrix metalloproteinases activity: from molecular basis to clinical trials", cuyo investigador principal es el Prof. Dr. Eduardo Fernández Godoy, se encuentra aprobado por este Comité con fecha 5 de mayo de 2017.


Dr. Marco Cornejo Ovalle
Presidente (S) CEC



Santiago, Mayo 2017.

Anexo 2

2° versión

25 de abril de 20016

1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Usted ha sido invitado a participar a en el estudio:

Effect of the incorporation of copper and zinc nanoparticles into dental adhesives on their antimicrobial properties and dentinal matrix metalloproteinases activity: from molecular basis to clinical trials.

Traducción " Efecto de la incorporación de cobre y zinc dentro de los adhesivos dentales , en sus propiedades antimicrobianas y las metaloproteinasas de la matriz dentinaria; desde las bases moleculares hacia la clinica"

Antes de que usted decida tomar parte en este trabajo de *investigación*, es importante que lea detenidamente este documento. El investigador discutirá con usted el contenido de este informe y le explicará todos aquellos puntos en los que tenga dudas. Si después de haber leído y entendido toda la información usted decide participar en este estudio, deberá firmar este consentimiento en el lugar indicado y devolverlo al investigador.

El investigador responsable es el Dr. Eduardo Fernández Godoy (Teléfono: 98854770, Dirección Sergio Livingstone 943, Independencia), quién puede ser contactado en cualquier momento por Usted para aclarar dudas o manifestar sus eventuales inquietudes. También puede dirigirse al Departamento de Odontología Restauradora, misma dirección 3er piso – Edificio administrativo.

- 1 El propósito del estudio es analizar efecto de la inclusión de cobre o zinc en un adhesivo (material dental para pegar las tapaduras al diente) sobre la infección bacteriana (poder anti-bacterias del material) y sobre las metalo-proteasas de la matriz (efecto reductor del avance de una caries dentro del diente). Actualmente no existe evidencia (respaldo) en pacientes de que estos nuevos materiales generen efectos beneficiosos como debería ser de acuerdo a lo que existe y hemos estudiado. Este estudio intentará eso.
- 2 Si usted está embarazada, en etapa de lactancia, y/o tiene declarada alguna alergia conocida con metales, usted **no puede** participar en este estudio y debe comunicárselo al investigador.
- 3 El estudio requiere que se le realice una radiografía bite-wing (radiografía para ver caries entre los dientes // caras vecinas de ellos y no se ven a simple vista) previa al tratamiento, que **no significará ningún costo para usted**, y son exámenes rutinarios para cualquier paciente que se realiza restauraciones.
- 4 Los pacientes participantes (70 en total), deberán ser pacientes que por indicación de ortodoncia (frenillos) sus premolares (dientes posteriores que están delante de las



muelas) serán extraídos (sacados), y nuestro propósito es antes de sacarlos realizar 2 restauraciones de resina compuesta (tapaduras blancas), en 2 premolares superiores, con los procedimientos normales de realización de las restauraciones (hacer la perforación, usar materiales dentales normales como adhesivo que sería el pegamento de la tapadura y luego el material blanco de la tapadura (en 1 diente el común y en otro diente el mezclado con cobre y/o zinc) y finalmente poner la luz para que endurezca) este procedimiento es muy sencillo y debería durar 20 minutos como máximo y luego de 1 mes, que es un período que en general coincide con la planificación (período normal y en general no atrasa su tratamiento de frenillos) de la ortodoncia (frenillos), sacarlos (porque había que sacarlos) y someterlos a análisis de laboratorio para eso usted nos debe donar esos 2 dientes.

- 5 Los procedimientos de restauraciones (tapaduras blancas), serán realizados por profesores de Odontología Restauradora (Eduardo Fernández y/o Cristian Bersezio), son procedimientos rápidos, con anestesia local, la probabilidad de problemas causados por este procedimiento es muy baja, sin embargo podría haber un poco de sensibilidad (molestias) post-atención que en caso que hubiese será manejado con AINES (Antiinflamatorios proporcionados por el equipo investigador), la realización de estas tapaduras con adhesivos experimentales "no representa ningún riesgo para su salud".
- 6 Existirán 4 subgrupos de estudio, representados por 2 grupos de pacientes, 1 grupo de pacientes con restauraciones con adhesivos con cobre y sin cobre, y otro grupo de pacientes con adhesivos con zinc y sin zinc, luego después de 1 mes y antes de la extracción, se tomará un molde de boca completa para saber acerca del efecto anti-bacterias de los adhesivos. Este molde es un procedimiento que no dura más allá de 5 minutos y será tomado por otro investigador (Patricio Vildósola), y no representa ningún riesgo para su salud.
- 7 La idea es intentar comprobar en los dientes que usted **perderá igual aunque no participe de este estudio** por necesidad de su tratamiento de frenillos, propiedades que podrían dar bajísimas cantidades de cobre o zinc que estarán presentes es los adhesivos de nuestro experimento. Usted estará colaborando con su tiempo, voluntad y sus dientes a un proyecto científico que podría ayudar a explicar ventajas de una nueva era de materiales dentales plásticos mezclados con bajísimas concentraciones de metales, cobre o zinc. Propiedades que son ampliamente conocidas y las usamos todos los días, por ejemplo en la mezcla habitual de productos contra bacterias (ropa, muebles, etc.). Además los materiales metálicos han sido usados históricamente en odontología "amalgama", con cantidades mucho mayores de cobre o zinc, por lo tanto su uso en odontología no significa algo nuevo.
- 8 Al acceder a participar, 2 dientes (premolares) de su boca serán asignados a uno de los dos subgrupos del estudio (adhesivo con cobre o zinc o adhesivo sólo), por medio de un proceso de randomización (como tirar una moneda al aire), y de esa forma se definirá que diente recibirá uno u otro adhesivo.



- 9 La extracción de los premolares serán realizada por profesores de odontología de la FOUCH (con experiencia), bajo anestesia local. Esta intervención dura aproximadamente 15 minutos, **sin costo alguno para usted.**
- 10 Como todo procedimiento quirúrgico, no está exento de posibles complicaciones. Si usted llegara a presentar alguna complicación postoperatoria durante su participación en el estudio, recibirá el tratamiento oportuno y gratuito correspondiente, en las dependencias del mismo Servicio.
- 11 Durante los días posteriores a las extracciones, usted podría presentar algún grado de molestias incluso un poco de dolor, para lo cual se le entregarán medicamentos analgésicos (paracetamol e ibuprofeno). Además, puede existir la posibilidad muy lejana de hemorragia (sangramiento) postoperatoria, que es de muy escasa ocurrencia, y que no suele presentar mayores complicaciones.
- 12 La participación en este estudio es de carácter voluntario. Usted se puede retirar del estudio en cualquier etapa de este , y no existirá absolutamente ningún problema debido a esto
- 13 Entendemos que usted por participar de este estudio además de estar donando sus dientes que por causas justificadas serán extraídos (frenillos) , y esta donando su tiempo y exponiéndose a hacerse restauraciones para el estudio, le ofreceremos los siguientes "beneficios":
- Limpieza de dientes sin costo alguno para usted , al momento del exámen , previo a la extracción , y otra posterior en algún momento de su tratamiento de ortodoncia.
 - Radiografías bite-wing sin costo por 1 vez en el tratamiento
 - Extracciones de los premolares sin costo
 - Tratamiento de 2 restauraciones simples que usted necesite realizarse previo al estudio
 - Control por profesionales con experiencia por 1 año sin costo para usted
- 14 La información privada obtenida en este estudio es confidencial, teniendo acceso a ella solo el equipo de investigación.
- 15 Cualquier problema ocasionado por algún procedimiento de alguna intervención de este estudio , tapaduras , extracciones , impresión , el equipo investigador se hará absolutamente responsable,
- 16 Los resultados de este estudio pueden ser publicados en congresos y revistas científicas, sin embargo su identificación no aparecerá en ningún informe, ni publicaciones resultantes del presente estudio. En caso de tener dudas al respecto, el investigador puede resolverlas antes de que decida participar en el estudio. Y en



el futuro nos contactaremos para hacerle llegar los resultados producto también de su fundamental participación y voluntad en contribuir a la ciencia.

17 Este estudio tiene una duración de 1 mes para usted.

Si usted tiene alguna pregunta acerca de la investigación o de sus derechos como sujeto de investigación puede dirigirse al Comité Ético Científico de la FOUCH de la Universidad de Chile, específicamente al Vice-Presidente (Marco Cornejo Ovalle) mail: cec@odontologia.uchile.cl. O al investigador que le está haciendo entrega de este documento, manifestarlo por escrito en este mismo documento en el área especialmente diseñada para esto, o bien dirigirse directamente con el investigador responsable Dr. Eduardo Fernández Godoy, (teléfono: 98854770).

Recuerde que al firmar este consentimiento, usted establece estar en conocimiento de los pormenores de dicha investigación y acepta los puntos previamente establecidos para participar en este estudio.

Su participación es de carácter **voluntario y no remunerado**.

No es necesario que tome la decisión en este momento, si lo desea puede retirar este documento, analizarlo detalladamente, clarificar sus dudas y responderlo cuando lo estime conveniente. Usted es libre de retirarse en el curso del estudio, dando aviso al investigador para no interferir con los resultados del mismo, sin que esto implique ningún perjuicio para usted o para su relación con su equipo tratante.

En las siguientes líneas punteadas Ud. podrá manifestar por escrito, si lo desea, preguntas o dudas:

.....

.....

.....

Las dudas planteadas han sido clarificadas por el equipo de investigación:

Sí___ No___.

Certifico ser mayor de edad y tener la capacidad legal para consentir.

Declaro haber leído detenidamente y comprendido este consentimiento. El investigador me ha explicado y he entendido claramente en que consiste el estudio y mi participación en él. Tuve la posibilidad de aclarar todas mis dudas, tomando mi decisión libremente y sin ningún tipo de presiones.

Mi firma en este documento certifica mi deseo de participar en el estudio.



Nombre.....

RUT:.....

Firma:.....

Fecha:.....

Testigo

Nombre.....

RUT:.....

Firma:.....

Fecha:.....

Coinvestigador

He discutido el contenido de este consentimiento con el participante. Le he explicado los riesgos y beneficios potenciales del estudio y se han clarificado todas sus inquietudes.

Nombre.....

RUT:.....

Firma:.....

Fecha:.....

Investigador Responsable

Nombre investigador:.....

RUT:.....

Firma:.....

Fecha:.....



Anexo 3

Universidad de Chile
 Facultad de Odontología
 Dpto. Odontología Restauradora
 Dpto. Patología y Medicina Oral

FICHA CLÍNICA

Nombre _____ RUT _____
 Edad _____ Género _____
 Teléfono _____ Celular _____

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

Diente	Diagnóstico clínico	Indicación RC	Diente	Diagnóstico clínico	Indicación RC
1.8			3.8		
1.7			3.7		
1.6			3.6		
1.5			3.5		
1.4			3.4		
1.3			3.3		
1.2			3.2		
1.1			3.1		
2.1			4.1		
2.2			4.2		
2.3			4.3		
2.4			4.4		
2.5			4.5		
2.6			4.6		
2.7			4.7		
2.8			4.8		

4. Aplicación de RC con adhesivo

	Diente A	Diente B	Fecha y Hora
Colocación (adhesivo A o B)			-
Diente seleccionado			-
UFC cm ² en T0			
UFC cm ² en T1			
UFC cm ² en T2			