



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

**“EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE
ZINC Y COBRE EN SISTEMA ADHESIVO AMBAR DE GRABADO-LAVADO
TOTAL EN EL RECuento DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE
Streptococcus mutans”**

Macarena Paz Castro Arancibia

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

**“EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE
ZINC Y COBRE EN SISTEMA ADHESIVO AMBAR DE GRABADO-LAVADO
TOTAL EN EL RECUENTO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS DE
Streptococcus mutans”**

Macarena Paz Castro Arancibia

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO - 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 MIS PADRES,

*Por estar presentes cada día, permitirme
soñar, cumplir mis grandes anhelos y
siempre confiar en mí.*

A MIS ÁNGELES,

*Por los que ya no están, aún con los años,
los llevo siempre en mi corazón.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Mónica y Armando, por darme la oportunidad de estudiar y tener un futuro profesional, por su eterna comprensión y sabiduría cada vez que lo he necesitado, pero aún más importante, su apoyo incondicional en la vida.

A todos los docentes que fueron parte de mi formación, tanto personal como profesional de la salud, gracias por todas las herramientas entregadas durante estos 7 años de carrera universitaria.

A mis tutores, Dr. Eduardo Fernández, Dra. Patricia Palma y Dr. Patricio Vildósola, por haber confiado en mí para desarrollar este trabajo de investigación, por su ayuda y todos los conocimientos entregados durante el proceso.

Al equipo del Laboratorio de Microbiología Oral, en especial a Daniela Salinas, por su apoyo emocional, como también su paciencia y buena disposición al aclararme dudas durante el procesamiento de las muestras.

A Camila, mi eterna compañera en este proceso final de la carrera, y aún más importante, buena amiga, gracias por todo tu apoyo, soporte y contención. Este proceso no hubiera sido igual sin ti.

A todos mis amigos que conocí durante el período universitario y son parte de mi vida hoy, gracias por todo el apoyo, risas, penas, momentos compartidos y buenos deseos siempre. Guardo los mejores recuerdos de cada uno.

ÍNDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	8
MARCO TEÓRICO	10
1. RESINAS COMPUESTAS	10
2. CARIES DENTAL	10
Microbiología de la Caries Dental	13
3. GRUPO MUTANS STREPTOCOCCI	15
<i>Streptococcus mutans</i>	16
4. ADHESIVOS DENTALES	17
5. NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC (ZnONp) Y COBRE (CuNp)	18
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIÓN	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXOS Y APÉNDICES	56

RESUMEN

Introducción

La caries dental es un problema actual de la salud pública en Chile y el mundo. Se considera una enfermedad multifactorial, crónica, progresiva y no transmisible. *Streptococcus mutans* se considera uno de los principales agentes cariogénicos. El propósito del estudio es determinar si la incorporación de nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) y cobre (Cu) al sistema adhesivo disminuye el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Streptococcus mutans* en restauraciones de resina compuesta confeccionadas con adhesivo cargado.

Materiales y métodos

Se seleccionaron 25 pacientes del postgrado de Ortodoncia, Facultad de Odontología Universidad de Chile (FOUCH), con indicación de extracción de 2 premolares superiores asociado al tratamiento. Se confeccionaron restauraciones de resina compuesta oclusales con adhesivo cargado (A, 5% ZnO y 0.2% Cu) y adhesivo control (B, sin presencia de nanopartículas), en cada diente según secuencia de aleatorización. Una vez finalizado el pulido de las restauraciones, se pincelaron las superficies oclusales con el mismo adhesivo que fueron confeccionadas. Se tomaron muestras microbiológicas de biopelícula con la Técnica de la cubeta, previamente (T0), a la semana (T1) y cuatro semanas (T2) posterior a la confección de las restauraciones. Las muestras se procesaron en el laboratorio de Microbiología Oral, FOUCH. Se utilizó el test de Mann-Whitney para el análisis estadístico.

Resultados

Se aislaron UFC de *Streptococcus mutans* a partir de las muestras obtenidas. Se identificó molecularmente por PCR la presencia de *Streptococcus mutans* en 20 de 25 muestras. De las muestras no identificadas, se realizó fermentación de azúcares obteniendo presencia de *Streptococcus mutans* en 2 muestras.

Por otra parte, se cuantificaron las UFC de la superficie oclusal de las restauraciones en T0, T1 y T2. Al comparar los promedios de los recuentos de UFC

de *Streptococcus mutans* en los distintos tiempos experimentales no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, se obtuvo un valor $p > 0,05$.

Conclusiones

La aplicación del adhesivo con nanopartículas de ZnO y Cu, sobre las restauraciones de resina compuesta, no pareciera reducir significativamente el recuento de UFC de *Streptococcus mutans* provenientes de muestras de biopelícula obtenidas mediante la Técnica de la cubeta.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de los años, han sido muchos los materiales utilizados en restauraciones directas para dientes posteriores, tanto amalgama como resina compuesta. Esta última se ha vuelto el material restaurador más utilizado en los últimos años, representando el 65% de las restauraciones realizadas actualmente en Estados Unidos (Moraschini y cols., 2015), debido a la alta demanda estética por parte de los pacientes, su capacidad de unión al tejido dentario y la necesidad de una menor eliminación de estructura dental.

Sin embargo, los compuestos de resina compuesta tienen un tiempo promedio de reemplazo de 5.7 años, principalmente por causa de caries secundaria y fractura de la restauración (Moncada y cols., 2015; Bourbia y Finer, 2018); por lo tanto, a pesar del atractivo estético surge la preocupación por la tasa de fractura, longevidad reducida, prevalencia de caries secundaria y proliferación bacteriana.

La caries dental es un problema muy importante para la salud pública aún no resuelto. Es un proceso en el cual actúan múltiples factores, entre ellos, se encuentran las bacterias inmersas en la biopelícula (Núñez y García, 2010). Dentro de estas bacterias podemos encontrar al grupo Mutans Streptococci, del cual *Streptococcus mutans* ha sido considerado un agente cariogénico relevante por sus factores de virulencia y gran frecuencia de detección (Herrera y cols., 2007).

Teniendo en cuenta la complejidad de la enfermedad, *Streptococcus mutans* se sigue considerando el agente con un rol cariogénico predominante asociado tanto al inicio, como a la progresión de la caries dental (Ojeda y cols., 2013).

Los sistemas adhesivos contribuyeron de manera fundamental para el avance técnico-científico de la Odontología moderna. Los tejidos envueltos en el proceso de adhesión son bastante diferentes en su composición, lo que por sí solo constituye un desafío si observamos que una única solución adhesiva tendrá que ser eficaz en ambos ambientes.

La aplicación de la nanotecnología para combatir la caries dental, incluida la inhibición de la formación de biopelículas y la regulación del equilibrio de desmineralización y remineralización, es una dirección prometedora para la prevención y el tratamiento de la caries dental.

MARCO TEÓRICO

1. RESINAS COMPUESTAS

Las resinas compuestas son el material de restauración directa de mayor uso actualmente en Chile y en Latinoamérica (Retamal y cols., 2014). Se definen como un material con una gran densidad de entrecruzamientos poliméricos, reforzados por una dispersión de sílice amorfo, vidrio, partículas de relleno cristalinas u orgánicas y/o pequeñas fibras que se unen a la matriz gracias a un agente de conexión (Ralph y Esquivel-Upshaw, 2004).

El tiempo que funcionan las restauraciones es un elemento importante para la toma de decisiones clínicas, la evidencia de la práctica clínica revela que sobre el 60% del tiempo (rango 50% a 75%) el odontólogo lo ocupa en el reemplazo de restauraciones fracasadas (Mjör, 1998; Moncada y cols., 2015).

Del mismo modo, este biomaterial restaurador no logra una interfase cero con el diente, debido a fenómenos de contracción que sufre al polimerizar, lo que en la práctica se traduce en un sellado marginal imperfecto, que trae como consecuencia el fenómeno de filtración marginal (Barrancos, 2006). La evidencia de estudios *in vitro* e *in vivo* plantea que la resina compuesta como material de restauración tiende a acumular más bacterias y biopelículas que el propio esmalte dental (Skjorland y Sonju, 1986).

La causa principal del fracaso de las restauraciones de resina compuesta es la pérdida de la adhesión que se evidencia a través de la microfiltración de esta. La adhesión a los tejidos dentarios no es estable en el tiempo, provocando su degradación con los años lo que permite tinción marginal y mayor probabilidad de caries secundaria.

2. CARIES DENTAL

La caries dental es un problema muy importante para la salud pública aún no resuelto. Es la enfermedad de mayor prevalencia en la cavidad oral, de carácter

crónica, multifactorial, no transmisible y progresiva, llegando incluso a la destrucción total de los tejidos si no se realiza tratamiento alguno (Fejerskov, 2004).

Se describe como un proceso dinámico de desmineralización y remineralización, producto del metabolismo bacteriano sobre la superficie dentaria, que con el tiempo puede producir una pérdida neta de minerales y posiblemente, aunque no siempre, resultará en la presencia de una cavidad (Ojeda-Garcés y cols., 2013).

La caries dental es la enfermedad no transmisible más común del ser humano. Según los datos más actualizados, el 35% de la población a nivel mundial presenta lesiones de caries no tratadas y en Latinoamérica este número es cercano al 45% (Giacaman y cols., 2018).

En el ámbito clínico, la prevalencia de lesiones de caries en dentición permanente está expresada por el índice COPD (C=Caries, O=Obturados y P=Perdidos) (Moncada y Urzúa, 2008), es uno de los factores a considerar al momento de evaluar el riesgo cariogénico. Esto contribuye a establecer un plan de tratamiento específico para satisfacer las necesidades de cada paciente.

La interpretación de la etiopatogenia de la enfermedad ha sufrido cambios fundamentales en los últimos años, pasando de la visión de una enfermedad infecciosa y transmisible causada por una sola especie bacteriana, a una visión de enfermedad ecológica no transmisible causada por el desequilibrio de la biopelícula dental como consecuencia del consumo frecuente de azúcares. Son muchos los estudios epidemiológicos que relacionan el consumo de azúcar con la prevalencia de caries, en los cuales se demuestra una clara asociación entre frecuencia de consumo, ingesta entre comidas y el desarrollo de caries dental (González y cols., 2013).

La composición y metabolismo de la biopelícula ("Comunidad microbiana, dinámica, estructurada, que se adhiere a la superficie dentaria, como también a otras superficies de la cavidad oral. Se encuentra incluida en una compleja matriz polimérica de origen microbiano o del hospedero, que permite la sobrevivencia de la comunidad como un todo"; Kuboniwa y Lamont, 2010) está determinado por una compleja interrelación entre los factores etiológicos, depósitos microbianos y la

superficie dental, en conjunto con los determinantes ecológicos tanto como la composición, flujo y capacidad buffer de la saliva, uso de fluoruros, frecuencia y composición de la dieta. También se puede ver influenciado por factores ambientales y socioeconómicos (Fejerskov, 2004) (Figura 1).

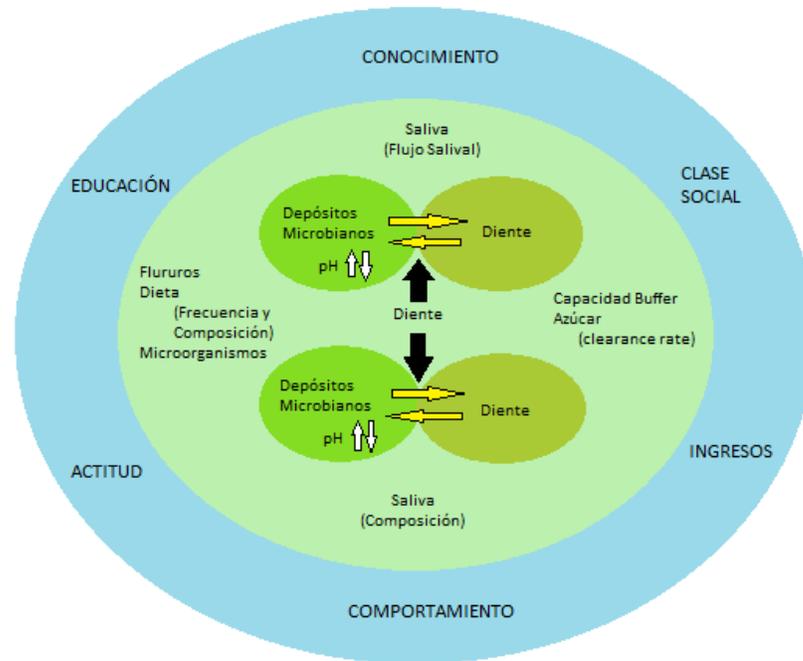


Figura 1. Esquema del concepto actual de caries dental

Frente al frecuente suministro de hidratos de carbono, se acidifica el medio al disminuir su pH permitiendo la adaptación de las bacterias al medio ácido, produciendo en el tiempo un desequilibrio entre los procesos de desmineralización y remineralización, inclinándose hacia la pérdida de minerales que conduce al inicio y progresión de la enfermedad de caries dental (Figura 2).

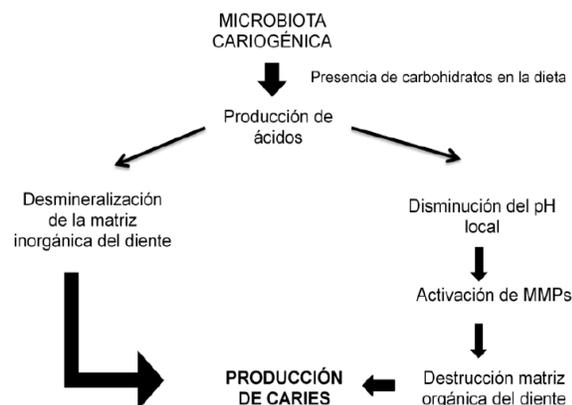


Figura 2. Esquema Producción de Caries

La posibilidad de detener el proceso de caries dental está en directa relación con un diagnóstico precoz y el riesgo cariogénico de cada paciente. Si es detectada antes de que se genere la cavitación, el proceso puede ser revertido por una terapia de remineralización, sin necesidad de restaurar. Por lo tanto, la intervención a realizar será en consecuencia del tipo de lesión específica.

Microbiología de la Caries Dental

Al paso de los años han surgido diversas teorías intentando explicar el origen de la caries dental. En el siglo XVII, Anton Van Leeuwenhoek fue considerado un pionero al plantear la posibilidad de la asociación entre microorganismos y caries (Van Leeuwenhoek, 1677).

En el siglo XIX, Miller propuso la “Teoría Quimioparasitaria”, la cual establece que la caries dental sería el resultado de la degradación de carbohidratos de la dieta por la acción de enzimas bacterianas productoras de ácidos, lo que provocaría la desmineralización del diente (Núñez y García, 2010).

En base a la investigación de esos años, la idea más común a fines del siglo XIX es la “Hipótesis de placa no específica” la cual postula que era la cantidad de placa dental la que determinaba la patogenicidad sin discriminar los niveles de virulencia de las especies.

En 1976, Loesche postula la “Hipótesis de placa específica” al plantear que se requiere la presencia de bacterias específicas en la biopelícula para el desarrollo de la caries dental. Además, definió que una biopelícula con potencial cariogénico debería estar formado por un predominio de bacterias Gram positivo, acidogénicas y acidúricas (Loesche, 1976).

Se identificó a los microorganismos *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus acidophilus* como principales agentes cariogénicos. Este último se encontró en un pequeño porcentaje de la biopelícula dental y con baja capacidad de adherencia a la película salival (Balakrishnan y cols., 2002). En cambio, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) se encontró en un alto porcentaje de la

biopelícula dental, y por ello fue considerado como uno de los microorganismos responsable de la enfermedad (Marsh, 2003).

En 1997, Marsh propone la “Hipótesis de Placa Ecológica”, ésta postula que el balance entre las condiciones que brinda el hospedero con los microorganismos de la cavidad bucal, y aquellos que constituyen la biopelícula dental condicionan la enfermedad (Marsh y Bradshaw, 1997). Por lo tanto, considera la regulación de la biopelícula como un proceso dinámico, donde los factores externos pueden producir alteraciones en la expresión de genes requeridos para su formación, otorgando mayor o menor grado de virulencia o patogenicidad (Figura 3) (Balakrishnan y cols., 2002).

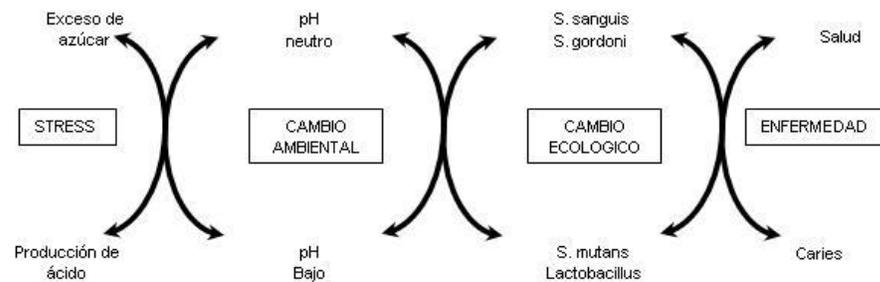


Figura 3. Representación gráfica de la “Hipótesis de Placa Ecológica” de Marsh

Las características claves de la “Hipótesis de Placa Ecológica” son: (a) La selección de bacterias patógenas está directamente asociada a cambios ambientales, y (b) La enfermedad no necesita una etiología específica: cualquier especie con características relevantes puede contribuir al proceso de enfermedad. Sin embargo, *Streptococcus mutans* es considerado el microorganismo con mayor potencial cariogénico, además de sus propiedades de acidogenia, aciduria y acidofilia (Marsh, 2003). Sin olvidar que especies como *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacilli spp.*, entre otras, también están involucradas en el desarrollo de esta patología (Yoshida y cols., 1999).

En 2011, Takahashi y Nyvad, propusieron una extensión de la “Hipótesis de Placa Ecológica” al plantear que la biopelícula dental es un ecosistema microbiano dinámico. Frente a la desestabilización homeostática por la presencia de ácidos generados por *Streptococcus no mutans* de pH bajo, se facilitará el desbalance

entre desmineralización / remineralización (etapa acidogénica). Una vez establecido el ambiente ácido, mutans streptococci y otras bacterias acidúricas pueden aumentar y promover el desarrollo de lesiones de caries al mantener un ambiente en el cual predomine el proceso de desmineralización (etapa acidúrica) (Figura 4).

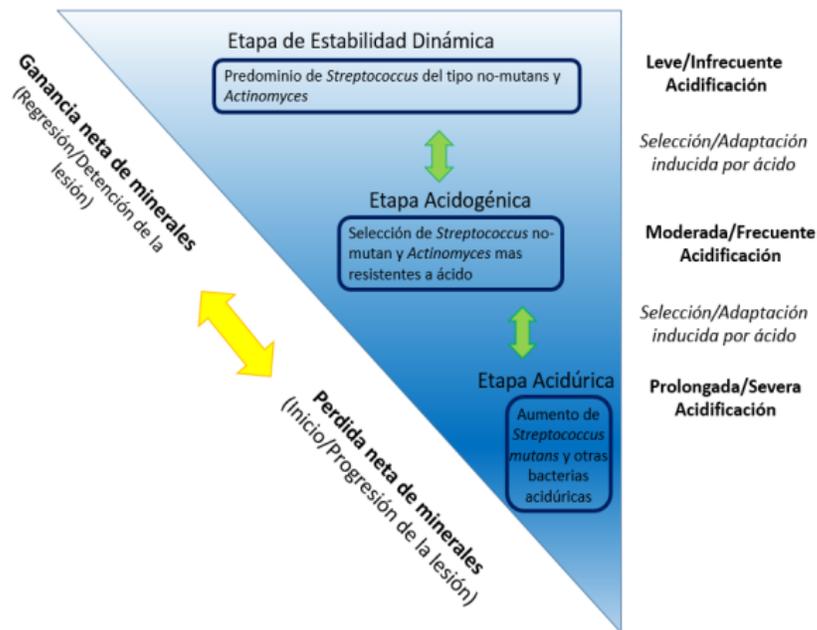


FIGURA 4. Proceso de caries según la Hipótesis de Placa Ecológica extendida.

3. GRUPO MUTANS STREPTOCOCCI

En el proceso de caries actúan diversos factores, entre los cuales, desde el punto de vista microbiológico, encontramos a las bacterias que están inmersas en la biopelícula, y que debido a su virulencia se adhieren a la superficie del diente, produciendo ácidos como producto metabólico, provocando la pérdida de minerales de la superficie dentaria (Takahashi y Nyvad, 2011). Dentro de estas bacterias podemos encontrar el grupo Mutans Streptococci, del cual *Streptococcus mutans* ha sido considerado uno de los principales agentes cariogénicos.

El grupo Mutans Streptococci está formado por bacterias genéticamente heterogéneas, en el que se reconocen 8 serotipos distintos: a, b, c, d, e, f, g y h; y 7 especies diferentes: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus ferus*, *Streptococcus macacae* y

Streptococcus downei. Estas especies son diferenciables mediante pruebas serológicas, bioquímicas y moleculares (Coykendall, 1989).

Especies del grupo Mutans Streptococci se encuentran en la biopelícula. Son anaerobios facultativos, capaces de fermentar hidratos de carbono, de cuyo metabolismo deriva la producción de ácidos y la síntesis de polisacáridos extra e intracelulares (Takahashi y Nyvad, 2011).

Dentro de este grupo, las especies *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* son las más fuertemente implicadas en el inicio de la lesión de caries dental (Marsh, 2006).

Streptococcus mutans

Streptococcus mutans es una especie cocácea, Gram positivo, que se agrupa en cadenas. Para desarrollarse necesita medios enriquecidos y ambientes de microaerofilia o anaerobiosis, con una tensión de dióxido de carbono al 10%. Posee los polisacáridos antigénicos definidos para los serotipos c, e y f, siendo el serotipo c el más predominante de la cavidad oral en seres humanos (Seki y cols., 2006).

Se puede aislar en medios enriquecidos como agar Mitis Salivarius con bacitracina (MSB) y el agar Trypticase Yeast-extract Cystine Saccharose con bacitracina (TYCSB) (Schaeken y cols., 1986). Estos medios son selectivos para esta especie por la presencia de sacarosa y bacitracina en concentraciones críticas, las cuales son toleradas por *S. mutans*, pero no por los demás microorganismos orales (Jordan y cols., 1987).

Este microorganismo se caracteriza por poseer diversos mecanismos de virulencia que formarán parte del inicio y desarrollo de la caries dental. Los factores de virulencia brindan protección a *S. mutans* de las defensas del hospedero, le permiten mantener su nicho ecológico en la cavidad oral y contribuyen en su posibilidad de causar daño. Entre los principales factores de virulencia se encuentran: la habilidad de formar biopelícula, la capacidad acidogénica, acidúrica, la síntesis de glucanos y fructanos por medio de las enzimas glucosil y fructosiltransferasas y la producción de dextranasa (Vásquez y cols., 2014).

A pesar de que *Streptococcus mutans* está fuertemente asociado al desarrollo de la caries dental, esta relación no es única. Es posible observar producción de caries en ausencia aparente de esta especie, como también se puede encontrar *Streptococcus mutans* sin evidencia detectable de desmineralización de tejido dentario (Marsh, 2006).

En lesiones de esmalte superficial, la placa bacteriana contiene *Streptococcus no mutans* y *Actinomyces*, entre otros, que producen un ambiente de acidificación leve, fenómeno compatible con el equilibrio de la desmineralización / remineralización. Bajo prolongadas condiciones ácidas, las bacterias se comportan más acidúricas, en esta etapa *S. mutans* y *Lactobacilos*, así como cepas acidúricas de *Streptococcus no mutans*, *Actinomyces*, Bifidobacterias y levaduras pueden llegar a ser dominantes, entre muchas otras bacterias acidógenas y acidúricas (Astorga y cols., 2015). Por lo tanto, se sugiere que la diversidad bacteriana de la caries varía según su progresión, siendo esto indicativo de que la microbiota asociada a la enfermedad es altamente compleja (Simón-Soro y cols., 2013).

Teniendo en cuenta la complejidad de la enfermedad, *Streptococcus mutans* se sigue considerando el agente más importante asociado tanto al inicio como la progresión de la caries dental (Ojeda y cols., 2013).

4. ADHESIVOS DENTALES

La aplicación de técnicas de odontología mínimamente invasivas tales como la reparación, remodelado y sellado de restauraciones de resinas compuestas defectuosas, presentan evidencia clínica longitudinal en ensayos clínicos randomizados que incrementan su longevidad en los dientes restaurados (Moncada y cols., 2015). Se debe realizar controles clínicos y radiográficos periódicos, para descartar aparición de nuevas lesiones de caries *in situ* o con relación a una restauración preexistente.

Los sistemas adhesivos contribuyeron de manera fundamental para el avance técnico-científico de la Odontología moderna. La gama de derivaciones y

aplicaciones de esta clase de materiales dentales permiten propuestas más conservadoras y con resultados superiores. La clasificación más actual de los sistemas adhesivos se da por su tipo de uso: grabado total o autograbado, o bien, por el número de pasos envueltos en el proceso.

Los estudios señalan que los sistemas autograbantes, a pesar de la eliminación de un paso clínico, pueden presentar resultados clínicos inferiores a largo plazo debido a la baja resistencia química del polímero formado, y también, debido a los procesos de hidrólisis en la interfase de la adhesión. En cambio, los adhesivos de dos o tres pasos tienen mayor aceptación en el ámbito clínico, y han sido considerados superiores cuanto a la longevidad. Ahora bien, independiente del tipo de adhesivo considerado, el proceso de adhesión sigue siendo un gran desafío en la odontología clínica.

El adhesivo AMBAR es un sistema monocomponente fotocurable de dos pasos clínicos: grabado ácido total del esmalte y dentina, seguido de la aplicación del adhesivo (primer + adhesivo) (Perfil Técnico, Revisión 01. Sistema adhesivo para esmalte y dentina. Ambar FGM, <http://www.fgm.ind.br>).

Los tejidos envueltos en el proceso de adhesión son bastante diferentes en su composición, lo que por sí solo constituye un desafío si observamos que una única solución adhesiva tendrá que ser eficaz en ambos ambientes.

Por esta razón, el desarrollo de materiales con propiedades antibacterianas e inhibidoras enzimáticas se vuelve tan importante, para aumentar la durabilidad de la interfase adhesivo / dentina, sin comprometer las propiedades mecánicas del adhesivo (Cocco y cols., 2015).

5. NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC (ZnONp) Y COBRE (CuNp)

La síntesis o extracción de compuestos, tales como nanopartículas con propiedades antimicrobianas, es importante y tiene aplicaciones potencialmente prometedoras en la lucha contra el creciente número de patógenos resistentes a los antimicrobianos actualmente disponibles.

En el año 2000, se mostró la inhibición de metaloproteinasas de la matriz tipo 2 y 9 a través de sulfato de zinc y sulfato de cobre, lo cual fue clave para continuar con la investigación en dicha área. Las nanopartículas de óxido zinc y cobre generan un desequilibrio en la regulación de la destrucción del colágeno tipo I, el más abundante en dentina; su carácter bactericida y la capacidad de reducir la adherencia de microorganismos en la superficie de los materiales (De Souza y cols., 2000)

El óxido de zinc ha demostrado efectos antibacterianos contra varios tipos de bacterias, incluyendo *S. mutans*. El mecanismo antibacteriano de nanopartículas de zinc se atribuye a la actividad modificada de la membrana celular y al estrés oxidativo. (Melo y cols., 2013)

El cobre tiene acción bactericida, principalmente relacionada con su capacidad de dar y aceptar electrones en un proceso continuo. Produce un radical hidroxilo que puede participar en una serie de reacciones adversas a las macromoléculas celulares, como la oxidación de proteínas y lípidos (Sánchez y cols., 2016).

Se ha demostrado que las nanopartículas de cobre son efectivas contra bacterias Gram positivo y Gram negativo (Schrand y cols., 2010). Además de la importante actividad antimicrobiana, el cobre es de bajo costo, por lo que la síntesis de nanopartículas de cobre tiene una mejor relación costo-beneficio.

La idea detrás de la incorporación de ZnONp y CuNp al sistema adhesivo es agregar propiedades antimicrobianas. Ahora bien, sólo los grupos con 5 / 0.2% de ZnO / CuNp mostraron propiedades antibacterianas significativamente más altas que el control al polimerizar el adhesivo (Gutiérrez y cols., 2019a), y además, se demostró que a esta concentración el adhesivo no era altamente citotóxico (Gutiérrez y cols., 2019b).

La idea de usar nanopartículas implica no alterar las propiedades originales del material e incluso mejorar sus propiedades, y así, se resolvería uno de los principales problemas de las resinas compuestas, su longevidad en el tiempo.

La aplicación de la nanotecnología para combatir la caries dental, incluida la inhibición de la formación de biopelículas y la regulación del equilibrio de

desmineralización / remineralización, es una dirección prometedora para la prevención y el tratamiento de la caries dental.

El presente estudio se enfoca en aumentar la longevidad de la restauración por medio del pincelado de adhesivo en la superficie de la restauración, con adhesivo cargado con nanopartículas de óxido de zinc y cobre, y su subsecuente potencial antimicrobiano en toda la superficie y la interfase. El adhesivo permanece adherido a la superficie e interfase de la restauración por adhesión química covalente actuando de reservorio en forma indefinida de iones antimicrobianos.

HIPÓTESIS

La adición de nanopartículas de óxido de zinc y cobre al sistema adhesivo reduce el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Streptococcus mutans* de la superficie oclusal de restauraciones de resina compuesta.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la reducción de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Streptococcus mutans* de la superficie oclusal de restauraciones de resina compuesta, mediante la adición de nanopartículas de óxido de zinc y cobre al sistema adhesivo durante su confección.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar, cuantificar e identificar colonias de *Streptococcus mutans*, a partir de muestras de biopelícula obtenidas mediante la Técnica de la cubeta, previamente y luego, de una y cuatro semanas posteriores a la aplicación del adhesivo dental con y sin nanopartículas de óxido de zinc y cobre.
- Comparar las UFC de *Streptococcus mutans* obtenidas, de restauraciones de superficie oclusal mediante la Técnica de la cubeta, previamente y luego de una y cuatro semanas posteriores a la aplicación del adhesivo dental con y sin nanopartículas de óxido de zinc y cobre.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio corresponde a un objetivo secundario del proyecto Fondecyt 1170575 y fue aprobado por el Comité de Ética Científico de la Universidad de Chile (Anexo 1). Se caracteriza por ser un estudio clínico *split mouth* comparativo experimental ciego tanto para el paciente como para el operador, en el cual se reclutaron pacientes con indicación de extracción de premolares superiores por ortodoncia.

Universo muestral:

El tamaño de la muestra se calculó con análisis a priori utilizando el programa estadístico G*Power®, versión 3.1.9.2, con niveles de confianza del 95% ($\alpha = 0.05$) y un potencial estadístico del 78%. El efecto del tamaño fue medio (0.5). El análisis indicó que se requerían al menos 25 pacientes para lograr resultados significativos.

Cada paciente fue controlado en tres tiempos (T0, T1 y T2), y tenía 2 dientes premolares superiores, idealmente contralaterales, con indicación de extracción por ortodoncia como parte de su plan de tratamiento, en los cuales se realizaron restauraciones de resina compuesta oclusales.

Criterios de Inclusión:

- Pacientes de ambos géneros, sin restricción etaria.
- Pacientes que presentaban 2 dientes premolares superiores con indicación de extracción por ortodoncia e idealmente contralaterales.
- Muestras de saliva inicial positivas a la presencia de *Streptococcus mutans*

Criterios de Exclusión:

- Pacientes que consumieran fármacos que produjeran alteraciones en el flujo salival, como antidepresivos, narcóticos, diuréticos, antihistamínicos, antihipertensivos y antieméticos.
- Pacientes bajo tratamiento con colutorios y/o geles de clorhexidina u otro antiséptico bucal (cuyo compuesto activo fuera cloruro de cetilpiridinio, triclosán, hexetidina, xilitol y sales de zinc como cloruro de zinc, citrato de

zinc y sulfato de zinc) y/o pastas dentales con concentraciones de flúor mayor o igual a 2.500 ppm de ion flúor durante los últimos tres meses.

- Pacientes en tratamiento con antibióticos durante los últimos tres meses.
- Pacientes en tratamiento de fármacos inmunosupresores (corticoides).
- Pacientes clasificados según la *American Society of Anesthesiologic* como ASA III, los cuales son pacientes con enfermedad sistémica grave, pero no incapacitante.
- Pacientes portadores de aparatos protésicos removibles o fijos, planos de relajación o de cualquier artefacto acrílico.
- Pacientes que consumieran goma de mascar cuatro o más días a la semana.
- Pacientes con dificultades motrices que les impidiera realizar su propia higiene dental.

Procedimiento:

Un primer operador, reclutó y seleccionó a los pacientes, tomó las muestras, realizó el procesamiento microbiológico (supervisado por académico del área de microbiología), las exodoncias correspondientes y el análisis estadístico. Un segundo operador confeccionó las restauraciones de resina compuesta.

1) SELECCIÓN DE PACIENTES

Se evaluaron 47 pacientes de la clínica de Ortodoncia de segundo año en la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (FOUCH) en el período de Mayo-Octubre del 2019, previa autorización del alumno tratante, y se ingresaron al estudio los 25 que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión definidos, asignándole un número de ingreso al estudio según una secuencia de aleatorización en planilla del programa Microsoft Office Excel.

2) CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se les invitó a participar en el estudio, se hizo lectura del Consentimiento Informado o Asentimiento Informado en caso de menores de edad (Anexo 2), en el cual se explicó el propósito del estudio, todo procedimiento a realizar, duración del mismo, riesgos y beneficios de participar en el proyecto, dejando en claro su participación voluntaria. El documento fue firmado por todos los involucrados, y se entregó una copia al paciente.

3) DETECCIÓN CLÍNICA DE DIENTES A INCLUIR EN EL ESTUDIO

Se realizó examinación visual para confirmar y detectar los dientes premolares superiores con indicación de extracción por ortodoncia que fueron incluidos en el estudio. Cada paciente tiene su propia ficha clínica (Anexo 3), en la cual se recopilaron antecedentes sistémicos de relevancia, antecedentes de higiene oral, examen oral y diagnóstico clínico diente por diente.

4) TOMA DE MUESTRA DE SALIVA

En cada paciente seleccionado se tomó una muestra de saliva para determinar presencia / ausencia de *Streptococcus mutans* en su microbiota oral. Mediante la estimulación de saliva con papel de parafina, se obtuvo 1 mL (1000 µL) aproximadamente en tubos de ensayo estéril. Los tubos fueron rotulados con el nombre del paciente y la fecha correspondiente.

5) TRANSPORTE DE LA MUESTRA

Los tubos con las muestras de saliva de cada paciente se conservaron a 4°C en bolsos de frío, para en un plazo máximo de 2-3 horas ser transportadas directamente al laboratorio de Microbiología del Departamento de Patología y Medicina Oral (FOUCH) y ser procesadas, preservando siempre su esterilidad.

6) PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA DE SALIVA

Dilución: Previa agitación de la saliva en vórtex por 45 segundos, se tomaron 100 µL de saliva y se agregaron a un tubo eppendorf con 900 µL de buffer fosfato pH 7.4 0,02M, se agitó por 15 segundos en el vórtex. Luego, se tomaron 100 µL de la dilución y se agregaron a un nuevo tubo eppendorf con 900 µL de buffer fosfato, se volvió a agitar y se obtuvo una dilución de 1:100 de saliva estimulada.

Siembra: Se sembraron 100 µL de la dilución 1:100 en placas de agar Trypticase Yeast-extract Cystine Saccharose con bacitracina (TYCSB: L-cistina 0,2 g/L, Bacto Casitona 15 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, Sulfito de sodio 0,1 g/L, Cloruro de sodio 1 g/L, Fosfato disódico 2 g/L, Acetato de sodio 20 g/L, Sacarosa 50 g/L, Agar 15 g/L y bacitracina 100 UI/L), medio selectivo para *Streptococcus mutans* que ha sido descrito como el medio más sensible y selectivo para cultivar esta especie

bacteriana (Schaeken y cols., 1986). Todo el proceso se realizó en condiciones de esterilidad.

Incubación: Se incubaron las placas en una jarra con vela para crear un ambiente microaerofílico (5% CO₂) y se llevaron a estufa a 37°C por 48 horas, luego se verificó el crecimiento de las colonias de *Streptococcus mutans*.

Identificación y recuento: Se observaron las placas bajo la lupa estereoscópica del microscopio (Stemi 2000-C, Zeiss) y una fuente luminosa (Schott KL 1500, Zeiss); se identificaron las colonias de *Streptococcus mutans* para luego contar y determinar las UFC/mL.

7) TOMA DE MUESTRA MICROBIOLÓGICA INICIAL

Una vez confirmada la presencia de colonias de *Streptococcus mutans* en la muestra de saliva obtenida de cada paciente, se utilizó la “Técnica de la Cubeta” (Zúñiga y cols., 2010; Vildósola y cols., 2013) para obtener la biopelícula depositada sobre la superficie oclusal de los dientes premolares superiores seleccionados, mediante las cubetas destinadas para cada uno de los pacientes del estudio.

Trabajando en una campana de bioseguridad tipo II (Dwyer Mark II, Filtro Met) se colocaron cubetas de flúor en placas de Petri estériles bajo luz ultravioleta durante 20 minutos y se llenaron con 3 mL de agar TYCSB (Figura 5). Se llevaron a estufa de incubación por 24 horas a 37°C para comprobar que los medios de cultivo no se encontraran contaminados, de modo de efectuar un control de calidad. Luego, se guardaron en el refrigerador hasta su utilización.



FIGURA 5: Imagen de cubeta individual cargada con medio de cultivo TYCSB

Previo a la utilización de las cubetas cargadas, se llevaron a estufa de incubación por 15 minutos a 37°C. La toma de muestras se realizó presionando suavemente la cubeta cargada por un minuto sobre la superficie oclusal de las piezas incluidas en el estudio. Se guardó nuevamente en la placa de Petri para ser transportada al laboratorio de Microbiología en un plazo máximo de 2-3 horas, conservadas a 4°C en bolsas de frío. Todo el procedimiento se llevó a cabo contiguo a un mechero encendido para evitar la contaminación ambiental.

8) PROCESAMIENTO MICROBIOLÓGICO

Las placas de Petri que contenían las cubetas se incubaron en estufa a 37°C en jarra con vela para lograr condiciones de microaerofilia durante 48 horas en el laboratorio de Microbiología del Departamento de Patología y Medicina Oral FOUCH.

9) CONFECCIÓN DE LAS RESTAURACIONES OCLUSALES DE RESINA COMPUESTA Y APLICACIÓN DEL ADHESIVO AMBAR CON Y SIN NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC Y COBRE.

En todos los pacientes se trabajó bajo anestesia local, se infiltró 1 tubo de mepivacaína al 2% con epinefrina al 1:100.000 en cada diente incluido en el estudio. Se confeccionaron preparaciones biológicas oclusales de 3 mm vestíbulo-palatino x 3 mm mesial-distal x 2 mm profundidad en dentina, medidas que fueron verificadas con sonda calibrada cada 1 mm. Se utilizaron piedras diamantes cilíndricas nuevas para cada preparación y se trabajó bajo refrigeración continua.

Una vez terminadas las preparaciones biológicas, se grabaron con ácido ortofosfórico al 37% (Super etch, SDI) durante 30 segundos en esmalte y 15 segundos en dentina, y posteriormente lavadas por el doble de tiempo.

Según el número de aleatorización asignado a cada paciente al ingresar al estudio, se indicó la aplicación del adhesivo A o B según correspondía a cada uno de los dientes. Se agitaron los adhesivos previo a su utilización, se aplicó en la preparación biológica con un microbrush eliminando los excesos previamente, se esperó para la evaporación del solvente, se aplicó nuevamente y se fotopolimerizó durante 20

segundos (Halogen Curing Light, Elipar™ 2500, 3M ESPE). Los adhesivos experimentales se utilizaron según las instrucciones del fabricante.

Se confeccionaron las restauraciones oclusales de resina compuesta (Opallis, FGM) mediante la técnica incremental, se comprobó la oclusión y se pulieron las restauraciones. Las dos restauraciones correspondientes a cada paciente fueron realizadas el mismo día.

Una vez finalizadas las restauraciones de resina compuesta, se grabaron con ácido ortofosfórico al 37% (Super etch, SDI) durante 30 segundos, y posteriormente lavadas por el doble de tiempo. Se procedió a pincelar con el mismo adhesivo asignado previamente, toda la superficie oclusal y márgenes de la restauración con el objetivo terapéutico de mejorar el pulido y sellado final de la misma. Se aplicó sobre la restauración con un microbrush eliminando los excesos previamente, se esperó para la evaporación del solvente, se aplicó nuevamente y se fotopolimerizó durante 20 segundos (Halogen Curing Light, Elipar™ 2500, 3M ESPE). Todo lo anterior se realizó bajo una efectiva técnica de aislación relativa.

El adhesivo A corresponde al sistema adhesivo Ambar modificado con 5 / 0.2 % de ZnONp y CuNp respectivamente, en cambio el adhesivo B se utilizó sistema adhesivo Ambar sin nanopartículas en su composición, como control.

Por lo tanto:

Grupo experimental: 25 dientes premolares superiores en los cuales se realizaron restauraciones de resina compuesta oclusal con sistema adhesivo cargado con nanopartículas de óxido de zinc y cobre.

Grupo control: 25 dientes premolares superiores en los cuales se realizaron restauraciones de resina compuesta oclusal con sistema adhesivo no cargado con nanopartículas de óxido de zinc y cobre.

10) TOMA DE MUESTRA MICROBIOLÓGICA POSTERIOR A LA APLICACIÓN DEL ADHESIVO AMBAR CON Y SIN NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC Y COBRE

Una y cuatro semanas después se tomaron muestras de la biopelícula adherida a las restauraciones oclusales de resina compuesta confeccionadas previamente, en ambas ocasiones se utilizó la Técnica de la cubeta (Figura 6).

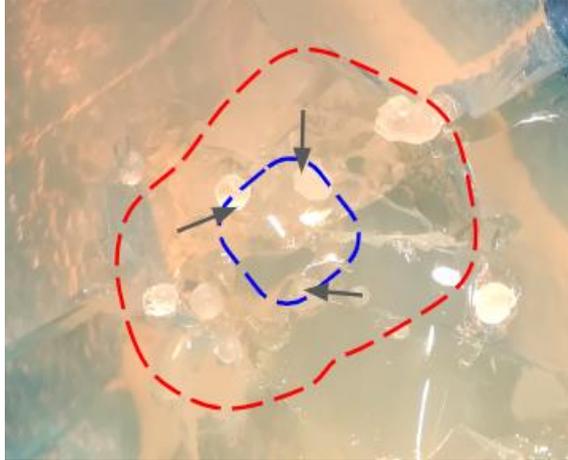


FIGURA 6: Impresión de la superficie oclusal de un premolar con la Técnica de la cubeta. Contorno de la superficie oclusal del diente (rojo) y restauración de resina compuesta (azul). Se señala UFC *Streptococcus mutans* contabilizadas en el recuento del estudio.

De igual manera que en la muestra microbiológica inicial, las placas de Petri que contenían las cubetas fueron trasladadas al laboratorio de Microbiología en bolsas de frío a 4°C en un plazo máximo de 2-3 horas. Una vez ahí, se incubaron en estufa a 37°C en jarra con vela para lograr condiciones de microaerofilia durante 48 horas.

11) AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE COLONIAS DE *S. mutans*

A partir de todas las muestras se identificaron colonias de *Streptococcus mutans* en base a la morfología colonial (macroscópica) y adherencia de las colonias al agar, observadas bajo lupa estereoscópica y fuente luminosa. Además, se realizó el recuento de UFC de *Streptococcus mutans* sobre la impronta en agar TYCSB de las superficies oclusales.

Aislamiento: Las colonias compatibles se aislaron a placa TYCSB y se incubaron en jarra con vela a 37°C en la estufa durante 48 horas.

Inoculación: Frente al crecimiento limpio y compatible con las características ya descritas, se inoculó 1 colonia en 3 mL de caldo Todd-Hewitt (Infusión cerebro-corazón 3,1 g/L, Peptona 20 g/L, Glucosa 2 g/L, Cloruro de Sodio 2 g/L, Fosfato Disódico 0,4 g/L, Carbonato de sodio 2,5 g/L), un medio de cultivo que se caracteriza

por permitir el desarrollo de bacterias de rápido crecimiento y nutricionalmente exigentes (Todd y Hewitt, 1932); y se incubó a 37°C durante 24-48 horas. Concluido el tiempo, el crecimiento bacteriano se observa por la turbidez del medio de cultivo (Murray y cols.,1999) (Figura 7).

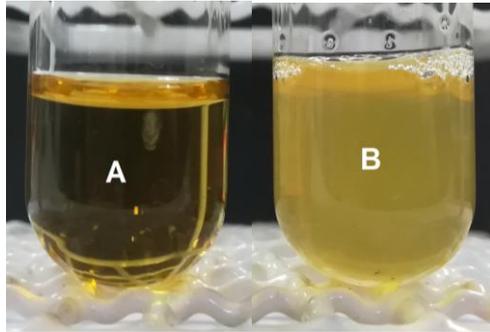


FIGURA 7: (A) Caldo de cultivo Todd Hewitt estéril. (B) Caldo de cultivo Todd Hewitt posterior a su incubación, la turbidez del medio confirma crecimiento bacteriano.

Criopreservación: Una vez confirmado el crecimiento bacteriano se colocaron 500 uL de glicerol y 500 uL de caldos crecidos en tubos eppendorf estériles, los cuales fueron criopreservados a -80°C.

Una vez recolectadas todas las muestras al estado de criopreservación, se continuó con el procedimiento para la identificación molecular.

Resiembra: A partir de cada criopreservado se sembraron con asa estéril en placas de agar TYCSB, se incubaron en jarra con vela a 37°C en la estufa durante 48 horas.

Inoculación: Al confirmar crecimiento puro en las placas, se inocularon en 3 mL de caldo Todd-Hewitt y se incubaron a 37°C durante 24-48 horas.

Preparación de las muestras: Se colocó 1 mL de caldo crecido en tubo eppendorf estéril, se centrifugaron a 4°C a 10.000 rpm por 4 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se repitió el procedimiento 2 veces agregando el caldo al tubo eppendorf correspondiente y se centrifugaron en las mismas condiciones previas. Se elimina completamente el sobrenadante y se conserva el pellet para la extracción de ADN.

Extracción de ADN para *Streptococcus mutans*: Se realizó según las indicaciones establecidas por el fabricante del sistema comercial *Epicentre Masterpure™ DNA Purification Kit* (USA, *Epicentre Biotechnologies*). Como

modificación a este protocolo, luego de suspender el pellet en 150 uL de TE Buffer y vortexear, se agregaron 5 uL de lisozima (20 mg/mL) a cada muestra, se vortexeó suavemente y se incubó en estufa a 37°C durante 12 horas.

Una vez finalizado el protocolo de extracción de ADN para *Streptococcus mutans*, se almacenaron las muestras a -20°C para su posterior análisis mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (*polymerase chain reaction*): Se llevó a cabo bajo campana de bioseguridad tipo II, previamente al uso se dejaron todos los instrumentos 20 minutos bajo luz UV. Se dispensaron 46 uL de mezcla (5 uL Buffer 10x, 4 uL Cloruro de Magnesio 50 mM, 1 uL de DNTPs 1 mM, 1 uL de partidor R y 1 uL de partidor F 20 pmoles/uL, 0.2 uL taq ADN polimerasa 5 U/uL y 33.8 uL agua miliQ) en tubos para PCR, y se agregaron 4 uL por cada muestra de ADN producto de la extracción.

Como control positivo se utilizó la cepa de *S. mutans* ATCC 25175 y agua para biología molecular estéril como control negativo. El total de 27 muestras (incluyendo control positivo y negativo) se colocó en el termociclador (*Axygen™ THERM-1000*), con el siguiente protocolo de PCR determinado para identificación molecular de *Streptococcus mutans*, utilizando los primers para el gen *spaP*: denaturación inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos por 1 minuto a 94°C (denaturación), 30 segundos a 50°C (apareamiento) y 1 minuto a 72°C (elongación), concluyendo con una extensión final a 72°C por 5 minutos, y por último se mantiene a 4°C.

Los productos de la amplificación se evidenciaron en la cámara de electroforesis (Gel XL Plus, *Mini Gel Electrophoresis System, Labnet International Inc.*) en geles de agarosa al 2%. Una vez finalizada la separación electroforética, los geles fueron visualizados en un transiluminador UV y se observó mediante el programa Carestream MI SE versión 5.4.

La presencia de *S. mutans* se identifica por un fragmento de 192 pb (Vásquez y cols., 2014). La identificación de la especie se realizó mediante amplificación por PCR de un fragmento de 192 pb del gen *spaP*, utilizando los partidores diseñados por Ono y cols. en 1994, cuyas secuencias se detallan en la Tabla 1.

Nombre	Secuencia de ADN	Amplicón (pb)
spaP-F	5' AAC GAC CGC TCT TCA GCA GAT ACC 3'	192 pb
spaP-R	5' AGA AAG AAC ATC TCT AAT TTC TTG 3'	

Tabla 1. Partidores utilizados para la identificación molecular de aislados de *S. mutans*.

Las pruebas bioquímicas realizadas, para las cinco muestras que resultaron negativas para la identificación molecular por *spaP*, fueron la fermentación de Rafinosa y Melobiosa e hidrólisis de la Esculina, las tres positivas sólo para *Streptococcus mutans* (Coykendall, 1989).

Posterior a las 48 horas de incubación de cada cepa, cada caldo fue centrifugado en tubos centrífuga tipo Falcon por 5 minutos a 1500 rpm (Heraeus Megafuge 8R Centrifuge, Thermo Scientific) con el fin de obtener un pellet, el cual se resuspendió en 400 uL de buffer fosfato pH 7.4 hasta obtener una suspensión ajustada a Mc Farland 5.

De esta suspensión se sembraron 100 µL, en 500 µL de Esculina (*Brain Heart Infusion* + 1% de Esculina), en 500 µL de Rafinosa (Tioglicolato sin indicador ni dextrosa + 1% de Rafinosa) y en 500 µL de Melobiosa (Tioglicolato sin indicador ni dextrosa + 1% de Melobiosa). Los tubos fueron llevados a estufa de incubación por 24 horas a 37°C. Después de este tiempo, se agregó tres gotas de citrato férrico amoniacal (1%) al caldo de Esculina y tres gotas de rojo fenol (0.025%) a los caldos de Melobiosa y Rafinosa respectivamente.

Se confirmó positiva la hidrólisis de la Esculina frente al cambio de coloración a negro del caldo. En el caso de la fermentación de la Rafinosa y la Melobiosa, la aparición de un amarillo intenso indicó la positividad de la prueba. Al obtener las tres pruebas positivas, se confirmó el diagnóstico de *Streptococcus mutans*.

12) TOMA DE REGISTROS FOTOGRÁFICOS

Se tomaron fotografías de las impresiones correspondientes a las muestras microbiológicas de cada paciente incluido en el estudio. En ellas se pudo delimitar el área de la superficie oclusal de cada premolar, y además, la restauración de

resina compuesta confeccionada durante el estudio. Esto permitió guardar el registro del recuento de UFC de *S. mutans*.

13) ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico se utilizaron los recuentos de *Streptococcus mutans* en T0 (previa aplicación de los adhesivos), T1 (una semana posterior a la aplicación de los adhesivos) y T2 (cuatro semanas posteriores a la aplicación de los adhesivos).

Se utilizó el test Shapiro-Wilk ($p \leq 0.05$) para determinar si la distribución de los datos fue normal. Como los datos no se distribuyeron de forma normal, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para la comparación de los resultados en T0, T1 y T2, con un nivel de confianza de 95%. Todo el análisis se llevó a cabo con el programa *IBM SPSS Statistics Versión 25*.

14) INFORMACIÓN AL PACIENTE

Una vez realizados los recuentos, se le informó a cada paciente sobre sus resultados. Se les motivó a seguir hábitos saludables, tanto para mantener su salud oral como beneficiar su tratamiento de ortodoncia en desarrollo.

Por último, se llevaron a cabo las exodoncias de los premolares superiores por indicación de ortodoncia, previamente planificadas por el alumno tratante.

RESULTADOS

En el presente se incluyó un total de 25 pacientes, no existiendo pérdida de pacientes ni de muestras durante el estudio. En la Tabla 2 se caracterizó a cada paciente que colaboró con su participación.

Paciente	Edad	Sexo	UFC <i>S. mutans</i> en saliva	COPD
1	15	M	2.64×10^5	0
2	14	M	1.7×10^5	2
3	21	M	7×10^3	10
4	14	F	7.4×10^4	1
5	41	F	1.46×10^5	16
6	25	M	3.9×10^4	4
7	25	F	1×10^6	13
8	26	F	1×10^6	16
9	26	M	1×10^6	14
10	25	M	1×10^6	6
11	30	M	1.2×10^4	15
12	27	F	1.94×10^5	10
13	23	F	1×10^6	8
14	26	F	1×10^4	11
15	28	F	4×10^3	6
16	15	M	2.6×10^4	1
17	17	F	8.8×10^4	2
18	24	F	3×10^3	10
19	22	F	3.1×10^4	7
20	25	F	2.5×10^4	10
21	16	F	3.08×10^5	2
22	13	F	3.1×10^4	0
23	26	F	1×10^4	11

24	11	M	2.28×10^6	1
25	14	F	1.8×10^5	1
Promedio	21.96	16 F (64%) 9 M (36%)	3.56×10^5	7.08
Desviación estándar	6.907	-	5.53×10^5	5.43

Tabla 2. Descripción de pacientes del estudio: edad, sexo, UFC *Streptococcus mutans* en saliva y COPD.

El promedio de edad de los pacientes fue de 22 años. Se contó con la participación de 16 mujeres (64%) y 9 hombres (36%). Se presenta una amplia distribución con respecto al recuento de las UFC de *S. mutans* en saliva. Y, por último, la experiencia de caries está representado por el COPD de cada paciente, cuyo promedio de los 25 pacientes fue de 7.08.

1. Aislamiento e identificación de *Streptococcus mutans*

A partir del cultivo y aislamiento bacteriano de muestras de saliva estimulada, como de la biopelícula dental obtenida mediante la Técnica de la cubeta, se obtuvo colonias aisladas con características macroscópicas y de adherencia compatibles con *S. mutans* (Figura 8). En relación con la macromorfología de colonias de *S. mutans* se observó en algunos individuos un solo tipo de morfología, mientras que en otros, una mayor diversidad (Figura 9).

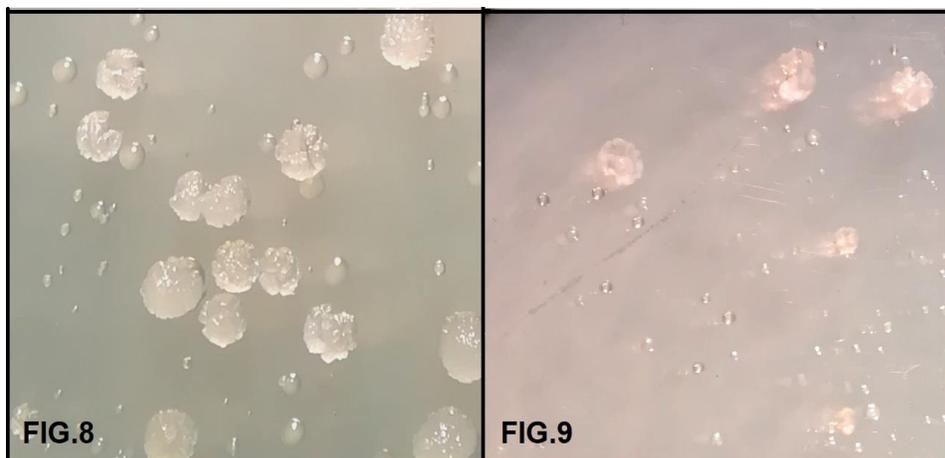


FIGURA 8: Colonias en saliva de *Streptococcus mutans* en agar TYCSB. Colonias blanquecinas y de superficie rugosa, nótese como rompen el agar al que se adhieren. (Aumento 5x).

FIGURA 9: Colonias en saliva de *Streptococcus mutans* en agar TYCSB. Obsérvese el polimorfismo colonial. Diferentes formas de colonias y todas adherentes. (Aumento 3x)

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

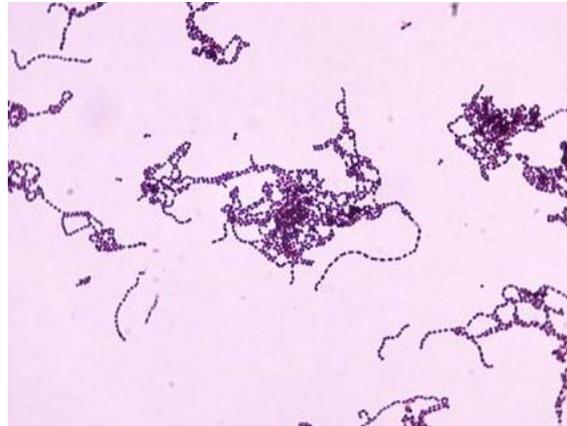


FIGURA 10: Frotis de un subcultivo líquido a partir de colonia de *Streptococcus mutans*, seleccionada por su macromorfología colonial, teñido con tinción Gram (Aumento 100x).

Se determinó que 20 de 25 muestras fueron positivas, según la técnica de PCR para la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* (Figura 11).

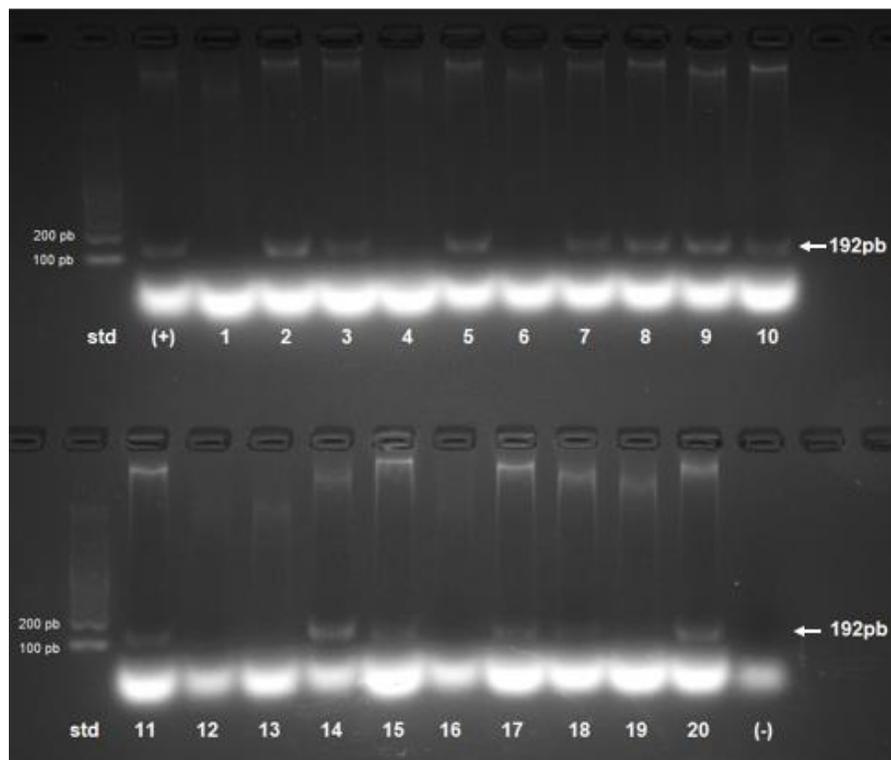


FIGURA 11: Gel de agarosa al 2% mostrando el fragmento de amplificación utilizado para identificar la presencia de *S. mutans* (192 pb, gen *spaP*). Cepa de *S. mutans* ATCC 25175 control positivo. Control negativo agua para biología molecular. Se utilizó marcador de peso molecular 100pb (*DNA ladder*).

Las pruebas de hidrólisis de Esculina y fermentación de Rafinosa y Melobiosa, fueron positivas para dos de cinco de los aislados que resultaron negativos en la PCR; por lo tanto, se detectó presencia de *Streptococcus mutans* (Figura 12).

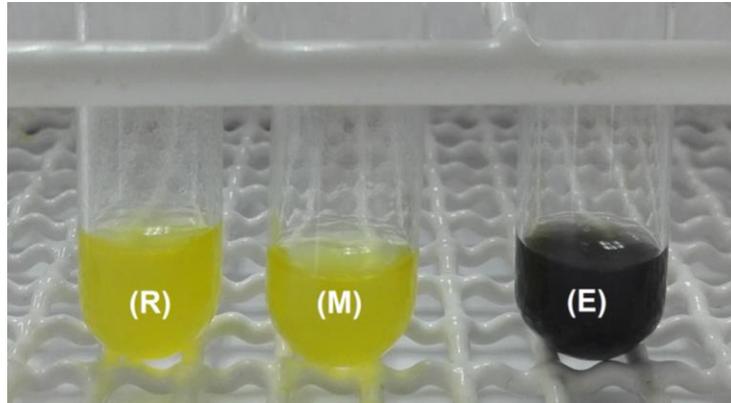


FIGURA 12: (R) Tubo con Rafinosa luego de la adición de rojo fenol. (M) Tubo con Melobiosa luego de la adición de rojo fenol. (E) Tubo con Esculina luego de la adición de citrato férrico amoniacal.

Por lo tanto, se identificó *Streptococcus mutans* en 88% de las muestras microbiológicas analizadas durante el estudio, un 80% mediante técnica de PCR y un 8% por batería de fermentación de azúcares.

Con respecto a las tres muestras restantes se observó compatibilidad morfológica en el crecimiento colonial, adherencia al medio de cultivo, turbidez del medio posterior a la inoculación en caldo y presencia de células agrupadas en cadena Gram positivo, no obstante, no se logró identificar presencia de *Streptococcus mutans* mediante ninguno de los análisis mencionados anteriormente.

2. Cuantificación de *Streptococcus mutans*

En la Tabla 3 se describe la cantidad de UFC de *Streptococcus mutans* contadas en la superficie oclusal de los premolares, con indicación de exodoncia por tratamiento de ortodoncia, a partir de muestras de biopelícula obtenidas de un mismo diente previamente (T0 = primera muestra microbiológica), después de una semana (T1 = segunda muestra microbiológica) y después de cuatro semanas (T2 = tercera muestra microbiológica) de la confección de resinas compuestas oclusales con adhesivo con / sin nanopartículas (NP) de óxido de zinc y cobre, mediante la Técnica de la cubeta.

Paciente	Diente A (con NP)			Diente B (sin NP)		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2
1	0	0	0	0	1	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	6	0	0	3
4	0	3	1	5	0	0
5	0	1	3	2	5	8
6	0	5	1	0	3	1
7	5	1	0	2	3	0
8	6	2	0	3	3	2
9	11	25	0	27	11	19
10	0	1	0	0	2	0
11	2	0	10	2	0	0
12	5	4	0	0	0	0
13	2	1	0	6	6	0
14	3	0	11	0	12	0
15	0	1	1	0	5	1
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	2	1	1	5
19	0	0	0	0	0	0
20	0	1	0	0	0	2
21	0	0	0	0	1	0
22	2	2	3	1	0	1
23	0	0	0	0	0	0
24	1	0	0	1	1	0
25	0	0	0	0	0	0

Tabla 3. Recuento de UFC de *Streptococcus mutans* en el área oclusal de premolares, en muestras de biopelícula obtenidas de un mismo diente en T0, T1 y T2, mediante la Técnica de Cubeta.

Una vez analizadas todas las muestras microbiológicas, se determinó que la Técnica de la cubeta permitió aislar colonias de *Streptococcus mutans* en un 76% de las superficies oclusales estudiadas. En el otro 24%, si bien, se observó presencia de *Streptococcus mutans* en la muestra microbiológica esta no correspondía a la superficie oclusal del diente incluido en el estudio; por esta razón, no fueron consideradas en el recuento de las colonias.

3. Diferencias en el recuento de UFC de *Streptococcus mutans* antes y después de la aplicación del adhesivo.

En primer lugar, se aplicó el test de Shapiro-Wilk para determinar la forma en que se distribuyeron los datos de la muestra, el que mostró que la distribución de los valores no resultó normal ($p < 0.05^*$), tal como se describe en la tabla 4.

	Diente A (con NP)			Diente B (sin NP)		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2
N° de Casos	25	25	25	25	25	25
Mínimo	0	0	0	0	0	0
Máximo	11	25	11	27	12	19
Shapiro Wilk Estadístico	0.630	0.393	0.571	0.400	0.695	0.476
Shapiro Wilk p-Valor	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.000*

Tabla 4. Tabla comparativa donde se observa para cada variable (diente A-con NP y diente B- sin NP), número de casos, mínimo, máximo, y los resultados del test de Shapiro Wilk.

A continuación, se observa el gráfico con la distribución de los datos en T0 (previamente a la aplicación), T1 (una semana posterior a la aplicación) y T2 (cuatro semanas posteriores a la aplicación) del recuento de UFC de colonias de *Streptococcus mutans*, tanto para el adhesivo experimental como el control (Figura 13).

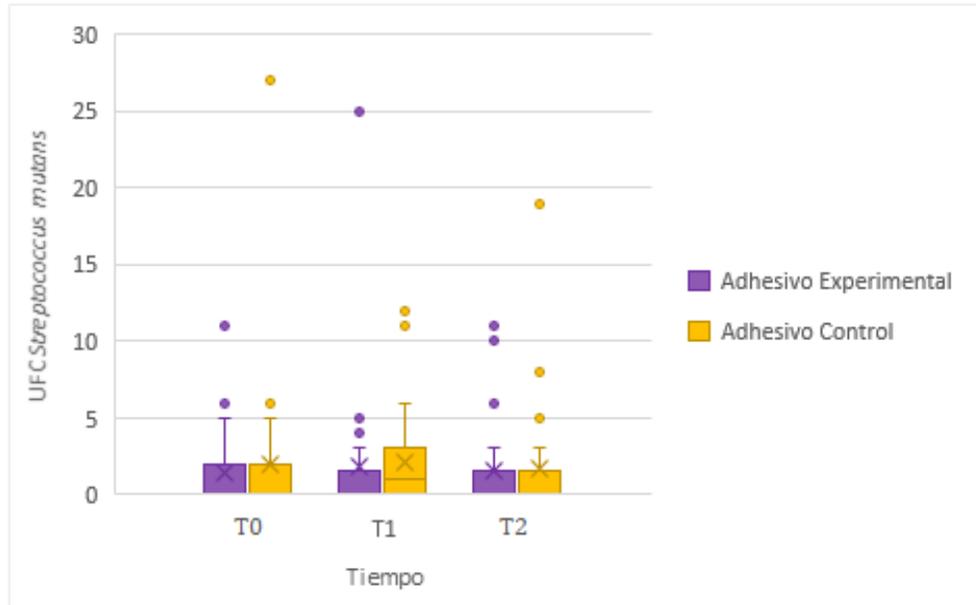


FIGURA 13: Gráfico tipo caja y bigotes, se presenta el recuento de las UFC de *S. mutans* del adhesivo experimental (con ZnONp y CuNp) y adhesivo control (sin ZnONp y CuNp) en T0, T1 y T2. La línea continua representa la mediana, las X representan el promedio y los círculos corresponden a los valores extremos.

Además, se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney test no paramétrico, al comparar una misma característica (recuento de UFC *S. mutans* en la superficie oclusal de las restauraciones de resina compuesta) en 3 circunstancias distintas (T0, T1 y T2). La intención fue comparar la diferencia entre 2 variables numéricas (antes y después de la aplicación del adhesivo) en un mismo grupo (Tabla 5).

Tiempo	Promedio	Desviación Estándar	Significancia (p-valor)
T0 con NP	1.48	2.69 (± 0.54)	0.938*
T0 sin NP	2.00	5.45 (± 1.09)	
T1 con NP	1.88	5.00 (± 1.00)	0.492*
T1 sin NP	2.16	3.35 (± 0.67)	
T2 con NP	1.52	3.05 (± 0.61)	0.964*
T2 sin NP	1.68	4.07 (± 0.81)	

Tabla 5. Tabla comparativa donde se observa el promedio del recuento de *S. mutans* en T0, T1 y T2, desviación estándar y significancia (p-valor); datos calculados por la prueba de U de Mann-Whitney.

($p < 0.05^*$ estadísticamente significativos)

El promedio del recuento de UFC de *Streptococcus mutans* en el grupo experimental (adhesivo cargado con nanopartículas de óxido de zinc y cobre), T1 y T2 fueron mayores que T0. Por otra parte, el promedio del recuento de UFC de *Streptococcus mutans* en el grupo control (adhesivo sin nanopartículas en su composición) T1 fue mayor que T0, pero disminuyó en T2.

Al comparar los recuentos de las UFC de *Streptococcus mutans* en T0, T1 y T2 con la prueba de U de Mann-Whitney nos otorgó los valores de 0.938, 0.492 y 0.964 respectivamente, lo cual determinó que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los resultados obtenidos, puesto que se requería un valor de $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

La caries dental es una de las patologías orales más comunes, presenta una alta incidencia y es la patología bucodentaria de mayor prevalencia en Chile. Se ha descrito como una enfermedad compleja y crónica que progresa lentamente en la mayoría de los pacientes. No es autolimitante; por lo tanto, puede progresar hasta la destrucción completa del diente (Carounanidy y Sathyanarayanan, 2009).

El origen multifactorial de la caries dental permite varias líneas de investigación, es por esto que nos hemos centrado específicamente en aspectos microbianos de la enfermedad, siendo *Streptococcus mutans* el agente bacteriano más comúnmente estudiado y aislado (Banas, 2004). 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), le otorgan un rol cariogénico importante. En el 2011, Linossier y cols., determinaron una alta prevalencia de *S. mutans* en la población chilena, siendo motivo permanente de estudio.

Este trabajo de investigación está adscrito al proyecto Fondecyt 1170575 que requería seleccionar pacientes con ciertos requisitos, uno de ellos, indicación de exodoncia dental para su posterior análisis. Por esta razón, los pacientes incluidos en el presente estudio pertenecían al postgrado de Ortodoncia de la clínica FOUCH con tratamiento en evolución; por lo tanto, se encontraban de alta preventiva / integral y en constante monitoreo de su higiene oral, lo que aparentemente generó una dificultad mayor en la detección y aislamiento de la bacteria *S. mutans* por cultivo. Lo que motivó a incluir en este trabajo sólo a pacientes que tuvieran detección positiva de esta bacteria en saliva previo a la muestra mediante la Técnica de la cubeta.

Como bien se describe en la metodología del estudio, se decidió utilizar la Técnica de la cubeta como parte del procedimiento para la toma de muestras microbiológicas. Esta técnica nos permitió aislar colonias de *S. mutans* en un 76% de las superficies oclusales correspondientes a los dientes incluidos por cada uno

de los pacientes previamente seleccionados. En el 24% restante, si bien, no fue posible aislar colonias de *S. mutans* de las superficies oclusales, se pudo observar su presencia al inspeccionar la muestra microbiológica en su totalidad. Esto se explicaría, porque la superficie dentaria analizada en este estudio es reducida y acotada a una parte de la superficie oclusal, por lo tanto, la posibilidad de aislar colonias también se redujo.

En consecuencia con lo anterior, este estudio presenta resultados similares al trabajo de Zúñiga y cols. en 2010, ya que mediante la misma técnica se logró aislar y cuantificar el microorganismo estudiado. Ahora bien, una desventaja de la Técnica de la cubeta radica en su limitación a las caras oclusales y libres de las piezas dentarias, puesto que, al ser los espacios proximales zonas estrechas y de mayor retención provocan que el agar, categorizado como material poco resistente a la tracción, tiende al desgarro en dichas zonas (Sieber y cols., 2012), dificultando la recuperación de colonias.

Por otra parte, el análisis macromorfológico de las colonias de *S. mutans* también implica cierta dificultad, puesto que, el polimorfismo colonial que presenta esta especie complejiza la situación por su similitud morfológica con colonias de otras especies bacterianas. Por esta razón, la muestra fue tomada con la cubeta cargada con medio TYCSB permitiendo el crecimiento de *S. mutans*, seleccionándolo en presencia de sacarosa y bacitracina a concentraciones críticas, condiciones que no son toleradas por otros microorganismos que comparten ese hábitat (Jordan y cols., 1987).

Adicionalmente, el análisis macromorfológico se complementa con el análisis micromorfológico como parte del diagnóstico microbiológico. Sin embargo, se debe esclarecer que dentro de las limitaciones de la microscopía directa está proporcionar datos útiles como la morfología, la agrupación y el tipo de pared; pero en ningún caso, permite determinar identidad a nivel de género, ni menos a nivel de especie, siendo ambas metodologías meramente una orientación diagnóstica. Con relación a lo anterior, en este trabajo se ha complementado la identificación con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar los aislados a nivel

de especie, siendo esta técnica de bajo costo, rápida y de sensibilidad superior al método microbiológico clásico (Ojeda-Garcés y cols., 2013).

En nuestro estudio se utilizó el gen *spaP* para la identificación molecular, siendo evidenciado en un 80% de los aislados analizados, lo cual es similar a lo detectado por Vásquez y cols. en el 2014, estudio realizado en población chilena. En ese trabajo se evidenció el gen *spaP* en aislados de *S. mutans* provenientes de saliva en el 63.6% de los individuos estudiados. Sin embargo, aun considerando las ventajas que proporciona la técnica de PCR, hubo una fracción de aislados que no fue posible su identificación a través de esta técnica. Este resultado puede explicarse por la ausencia de este gen en esos aislados, puesto que, según reportan otros autores sólo se detectó en 73.6% (Aguilera y Estrada, 2003) y 91.3% de los aislados estudiados en México (Durán-Contreras y cols., 2011).

Una posibilidad de haber complementado la identificación por PCR podría haber sido la elección de otro gen específico para *S. mutans*, como el gen *gtfB* que se reporta en 88.5% (Pinto, 2007) y 100% de los aislados en la población de Chile (Vásquez y cols., 2014), Japón (Hata y cols., 2006), India (Mishra y cols., 2015) y entre 80-100% de los aislados en población de Corea del Sur (Choi y cols., 2009). No obstante, en el laboratorio no contábamos con los insumos para desarrollar esta alternativa. Por ello, se adicionó la batería de fermentación de azúcares que permitió identificar al 40% de los aislados con resultado negativo para PCR, con un nivel de sensibilidad de 100% según lo reportado por Zuñiga y cols. en 2010, Sieber y cols. en 2012 y Acuña y cols. en 2013, en aislados obtenidos de población chilena. Finalmente, hubo 3 aislados que no fue posible establecer identidad a nivel de especie, lo que pudo deberse a la presencia de otras especies del género que presentan cierta similitud en la macromorfología colonial y similitud en la micromorfología celular, siendo en ambos casos características morfológicas comunes de expresión, pudiendo dificultar su diferenciación e identificación. Si bien, los resultados podrían haber sido compatibles a *Streptococcus sobrinus* en las pruebas bioquímicas, no son determinantes y hubiera sido necesario realizar identificación de especie a nivel molecular, pero no era parte de los objetivos de este trabajo.

Con respecto a la comparación del recuento de UFC de *S. mutans* obtenidas de la biopelícula de la superficie oclusal de las restauraciones de resina compuesta, confeccionadas con adhesivo cargado con ZnONP y CuNP y sin presencia de nanopartículas, utilizando la Técnica de la cubeta; no se encontraron resultados estadísticamente significativos analizados mediante el test Mann-Whitney ($p > 0.05$) entre los recuentos obtenidos en T0, T1 y T2.

En este trabajo, los dientes utilizados para la confección de las restauraciones de resina compuesta pertenecientes tanto al grupo control, como al grupo experimental son contralaterales. Las muestras de biopelícula depositadas sobre las restauraciones de ambos grupos fueron tomadas del mismo paciente, es decir, dientes situados en un mismo ecosistema oral condicionado por los mismos determinantes ecológicos. Además, las muestras de biopelícula y su posterior procesamiento microbiológico fueron realizadas por un mismo operador, de igual forma que las restauraciones realizadas por un único segundo operador. Por lo tanto, factores asociados a los procedimientos no debieron influir mayormente en estas diferencias, si no que más bien se deberían a otros factores, como el riesgo cariogénico bajo o moderado de los pacientes, la hora de su último cepillado, el tiempo transcurrido para la toma de muestra en T2 y/o características propias del material de restauración.

Considerando que se trabajó con pacientes en tratamiento de ortodoncia, que se encuentran en constante control de su higiene oral, aparición de nuevas lesiones de caries o problemas con restauraciones preexistentes; son todos factores que contribuyen a reducir y mantener la actividad de caries disminuida, siendo menos probable recuperar esta bacteria mediante la Técnica de la cubeta. Es por ello, que se sugeriría que en estudios posteriores se consideraran pacientes con un alto riesgo cariogénico y en actividad de caries.

El resultado puede estar influenciado por el momento de higiene de los pacientes. El operador encargado no pudo controlar exactamente la hora del último cepillado ni el consumo alimenticio previo a las citas concertadas, y por lo tanto, la acumulación de biopelícula sobre las restauraciones entre los tiempos T0, T1 y T2 pudo sufrir alteraciones y haber tenido toda la adherencia al protocolo como se

planteó en la metodología. La indicación de no cepillarse los dientes y evitar la ingesta de alimentos antes de la toma de muestra, tuvo como fin normalizar todas las muestras y recuperar *S. mutans* en un momento muy oportuno sin alteraciones (Gamboa y cols., 2016).

El tiempo transcurrido para la muestra microbiológica en T2 puede haber sido insuficiente, es probable que no existan diferencias en el corto plazo de estudio (cuatro semanas) debido a que las condiciones de las restauraciones son alfa, en criterios Ryge (Ryge, 1972). Con el tiempo, tanto las enzimas bacterianas como las propias de la cavidad oral, provocarán la degradación de la superficie de las restauraciones generando irregularidades, y pudiendo así, incrementar la colonización de colonias de *S. mutans*. Es en este punto que podría existir un efecto antimicrobiano del adhesivo modificado, pero esto debe ser confirmado con otros estudios.

La sola presencia del material restaurador en T1 y T2 evidenció que al ser comparados con T0, los recuentos de UFC de *S. mutans* en T1 y T2 podrían haber sido mayores que en T0 (diente sin restauración). Esto concuerda con la literatura al señalar que las restauraciones de resina compuesta acumulan más bacterias y placa bacteriana que la superficie del esmalte, “*in vitro*” e “*in vivo*” (Skjorland y Sonju 1986; Banas, 2004). Por lo tanto, las diferencias obtenidas en el recuento microbiológico se deben más bien a las características propias de las resinas compuestas, está documentada su influencia en la colonización bacteriana y formación de la biopelícula sobre su superficie (Skjorland y Sonju 1986; Kawai y Takaoka, 2001; Banas, 2004). A pesar de ello, los resultados obtenidos no reflejan un aumento o disminución de UFC constante.

Las restauraciones estéticas son un desafío constante para los odontólogos, por esta razón, los componentes del material de restauración serán clave en la colonización de los microorganismos orales debido a que la interfaz adhesiva diente / restauración es susceptible a la biodegradación y, por consecuencia, la formación de caries secundaria a las restauraciones. Frente a la presente problemática, se plantea la incorporación de ZnONp y CuNp en los sistemas adhesivos como posible

solución, si bien la evidencia actualmente es limitada, se ha decretado que estas nanopartículas agregan propiedades antimicrobianas al material de restauración.

Varios estudios han demostrado las propiedades antimicrobianas de ZnONp (Hernández-Sierra y cols., 2008) y CuNp (Amiri y cols., 2017) de forma independiente, o cuando los adhesivos dentales se cargaron con ZnONp (Saffarpour y cols., 2016) o CuNp (Gutiérrez y cols., 2017a, 2017b). A pesar de que la evidencia con respecto a la combinación de ambas nanopartículas es escasa, se señala que la adición de ZnONp y CuNp proporciona actividad antimicrobiana contra *S. mutans* e inhibición de las metaloproteinasas de la matriz 2, 8 y 9, sin influencia negativa en propiedades mecánicas (Gutiérrez y cols., 2019a) ni riesgos biológicos (Gutiérrez y cols., 2019b), mejorando y estabilizando la calidad de la interfaz material de restauración / dentina. El grado de liberación de los componentes del adhesivo experimental efectivo en la inhibición de la formación y adherencia a la superficie de las colonias de *S. mutans*, debe ser confirmado por otros estudios. Este es el primer estudio *in vivo* que evaluó el efecto de la incorporación de las ZnONp y CuNp agregadas al adhesivo dental sobre *Streptococcus mutans*.

Como limitantes del estudio, cabe mencionar lo acotado del tamaño muestral en estudio producto que, la indicación de exodoncias de premolares por tratamiento ortodóntico es cada vez más infrecuente. Asimismo, la exposición de los adhesivos al medio oral es reducida, ya que el tiempo transcurrido desde la confección de las restauraciones a T2 corresponde a cuatro semanas, puesto que se debían realizar las exodoncias planificadas por el equipo de ortodoncia. Además, frente a la falta de publicaciones referentes a la incorporación de nanopartículas a los adhesivos dentales, es necesario continuar efectuando estudios clínico - microbiológicos para recién permitirnos emitir un juicio en cuanto a su capacidad antibacteriana contra agentes cariogénicos, como *Streptococcus mutans*. Si bien se debe profundizar la investigación, los hallazgos de este trabajo de investigación aportan información de relevancia clínica para afrontar la compleja búsqueda de soluciones al proceso de la caries dental.

En el futuro, se sugiere realizar estudios enfocados en el potencial antimicrobiano de las ZnONp y CuNp sobre otros microorganismos orales relacionados a la

enfermedad de caries dental, como *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacilli spp.* De igual modo, se podría analizar si existe un efecto por la incorporación de las nanopartículas en el recuento de *Streptococcus mutans* presente en saliva a largo plazo, y ser considerado como un efecto protector. Y por último, probar su utilidad en el reacondicionamiento o reparación de restauraciones de resina compuesta con años de antigüedad, aprovechando así el efecto antimicrobiano de las nanopartículas, al disminuir la probabilidad de desarrollo de caries secundaria y el inminente recambio de la restauración, a cambio de prolongar su longevidad y la del tejido dentario.

CONCLUSIÓN

Al finalizar esta investigación se puede concluir que la aplicación del adhesivo con nanopartículas de óxido de zinc y cobre, sobre las restauraciones de resina compuesta, no pareciera reducir significativamente el recuento de UFC de *Streptococcus mutans* provenientes de muestras de biopelícula obtenidas mediante la Técnica de la cubeta.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acuña N, Vildósola P, Palma P, Moncada G (2013). Estudio clínico comparativo de recuento de *Streptococcus mutans* antes y después de la aplicación de sellante. Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Aguilera GLA, Estrada GIC (2003). Detección de una secuencia del gene spaP de *Streptococcus mutans* en muestras de placa dental mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Rev ADM*; 60 (5):180-184.

Amiri M, Etemadifar Z, Daneshkazemi A, Nateghi M (2017). Antimicrobial effect of copper oxide nanoparticles on some oral bacteria and *Candida* species. *J Dent Biomater* 4, 347–352.

Astorga B, Barraza C, Casals JM, Cisterna MJ, Mena D, Morales F y cols. (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

Balakrishnan M, Simmonds RS, Tagg JR. (2000). Dental caries is a preventable infectious disease. *Aust Dent J*. 45 (4):235-45

Banas, JA. (2004). "Virulence factors of *Streptococcus mutans*." *Frontiers in Bioscience* 9:1267-1277

Barrancos P. (2006) Manipulación y comportamiento de los composites. Operatoria dental. Cuarta Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, pp 777-814.

Bourbia M, Finer Y (2018). Biochemical Stability and Interactions of Dental Resin Composites and Adhesives with Host and Bacteria in the Oral Cavity: A Review. *Journal Canadian Dental Association*, 84:i1

Carounanidy U, Sathyanarayanan R (2009). Dental caries: A complete changeover (Part II) - Changeover in the diagnosis and prognosis. *J Conserv Dent*; 12:87-100

Choi EJ, Lee SH, Kim YJ (2009). Quantitative real-time polymerase chain reaction for *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples and its association with early childhood caries. *Int J Paediatr Dent*, 19 (2):141-147

Cocco AR, Rosa WL, Silva AF, Lund RG, Piva E (2015). A systematic review about antibacterial monomers used in dental adhesive systems: current status and further prospects. *Dent. Mater.* 31, 1345–1362.

Coykendall AL (1989). Classification and identification of the viridans streptococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 2 (3):315-28

De Souza AP, Gerlach RF, Line SR (2000). Inhibition of human gingival gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by metal salts. *Dent Mater*, 16 (2):103-8.

Durán-Contreras GL, Torre-Martínez HH, de la Rosa EI, Hernández RM, de la Garza M (2011). spaP gene of *Streptococcus mutans* in dental plaque and its relationship with early childhood caries. *Eur J Paediatr Dent*, 12 (4):220–224.

Fejerskov O (2004). Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. *Caries Research* 38:182–191

Gamboa F, García DA, Lamby CP, Sarralde AL (2016). Biotipos y susceptibilidad antimicrobiana de *S. mutans* en niños con y sin caries dental. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, Vol. 45 (2), 288-304

Giacaman R, Aranguiz V, Botelho J, Bustos I, Cabello R, Candiales Y y cols. (2018). Creación de un Currículo de Competencias en Cariología para Estudiantes de Pregrado de Odontología en Chile. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 11 (1), 58-68

González AM, González BA, González E (2013). Salud dental: relación entre la caries dental y el consumo de alimentos. *Nutrición Hospitalaria*, 28 (Supl. 4), 64-71

Gutiérrez MF, Malaquias P, Hass V, Matos TP, Lourenco L, Reis A y cols. (2017a). The role of copper nanoparticles in an etch-and-rinse adhesive on antimicrobial

activity, mechanical properties and the durability of resin-dentine interfaces. *J. Dent.* 61, 12–20.

Gutiérrez MF, Malaquias P, Matos TP, Szesz A, Souza S, Bermúdez J y cols.(2017b). Mechanical and microbiological properties and drug release modeling of an etch-and-rinse adhesive containing copper nanoparticles. *Dent. Mater.* 33, 309–320.

Gutiérrez MF, Bermudez J, Dávila-Sánchez A, Alegría-Acevedo LF, Méndez-Bauera L, Hernández M y cols. (2019a). 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.

Gutiérrez MF, Alegría-Acevedo LF, Méndez-Bauer L, Bermudez J, Dávila-Sánchez A, Buvinic S y cols.(2019b). Biological, mechanical and adhesive properties of universal adhesives containing zinc and copper nanoparticles. *J Dent.* 2019 Mar; 82:45-55.

Hata S, Hata H, Miyasawa-Hori H, Kudo A, Mayanagi H (2006). Quantitative detection of *Streptococcus mutans* in the dental plaque of Japanese preschool children by real-time PCR. *Lett Appl Microbiol*; 42 (2):127-131.

Hernández-Sierra JF, Ruiz F, Pena DC, Martínez-Gutierrez F, Martínez AE, Guillen Ade J y cols. (2008). The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomedicine* 4, 237–240.

Herrera C, Pantoja P, de La Maza T, Sanhueza A, Salazar L (2007). Diagnóstico microbiológico y molecular de bacterias cariogénicas en mujeres embarazadas de la Región de La Araucanía, Chile. *Rev Chil Infect*, 24 (4):270-275.

Jordan HV, Laraway R, Snirch R, Marmel M (1987). A simplified diagnostic system for cultural detection and enumeration of *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research* 66 (1):57-61

Kawai K, Takaoka T (2001). Inhibition of bacterial and glucan adherence to various light-cured fluoride-releasing restorative materials. *J Dent*, 29:119-122.

Kuboniwa M, Lamont RJ. (2010). Subgingival biofilm formation. *Periodontol 2000*; 52(1):38-52.

Linossier A, Valenzuela C, Soler E, Contreras E (2011). Colonización de la cavidad oral por *Streptococcus* grupo mutans, según edad, evaluado en saliva por un método semi-cuantitativo. *Rev Chil Infect*; 28 (3):230-237.

Loesche WJ (1976). Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev*. 9:65-107

Marsh PD, Bradshaw DJ (1997). Physiological approaches to the control of oral biofilms. *Adv Dent Res*. 11 (1):176-85.

Marsh PD (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*. 149 (Pt 2):279-94

Marsh PD (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health* 6 Suppl 1:S14.

Melo MA, Guedes SF, Xu HH, Rodrigues LK (2013). Nanotechnology-based restorative materials for dental caries management. *Trends in biotechnology*, 31 (8), 459-67

Mishra A, Pandey RK, Manickam N (2015). The significance of *gtf* genes in caries expression: a rapid identification of *Streptococcus mutans* from dental plaque of child patients. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*; 33 (2):134-137

Mjör IA (1998). The location of clinically diagnosed secondary caries. *Quintessence Int*. 29 (5), 313-7.

Moncada C, Urzúa I (2008). *Cariología Clínica. Bases Preventivas y Restauradoras*. Santiago, Chile. Cap. 1, pp. 17-20.

Moncada G, Vildósola P, Fernandez E, Estay J, de Oliveira Junior OB, 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

Moraschini V, Fai CK, Alto RM, Dos Santos GO (2015). Amalgam and resin composite longevity of posterior restorations: A systematic review and meta-analysis. *Journal of dentistry* 43 (9):1043-50

Murray PR, Baron, Pfaller, Tenover and Tenover (1999). Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

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

Ojeda-Garcés JC, Oviedo-García E, Salas LA (2013). Streptococcus mutans y caries dental. *CES Odontología*, 26 (1), 44-56.

Ono T, Hirota K, Nemoto K. (1994). Detection of Streptococcus mutans by PCR amplification of spaP gene. *J Med Microbiol* 41:231–235.

Perfil Técnico, Revisión 01. Sistema adhesivo para esmalte y dentina. Ambar FGM, <http://www.fgm.ind.br>

Pinto C (2007). Identificación y genotipificación de aislados Streptococcus mutans provenientes de niños chilenos de 6 a 11 años de una población urbana y otra rural. Facultad de Odontología, Universidad de Chile

Ralph H y Esquivel-Upshaw J. (2004) Phillips Ciencia de los Materiales Dentales Undécima edición. Resinas para restauraciones 15, 399-441

Retamal AF, Retamal J, Bader Mattar M. (2014). Análisis comparativo in vitro del grado de filtración marginal de restauraciones de resina compuesta realizadas con dos métodos de grabado ácido distintos. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*, 7 (1), 8-11

Ryge, G. (1972) Evaluating the clinical quality of restorations. *J Am Dent Assoc*; 87:369-377.

- Saffarpour M, Rahmani M, Tahriri M, Peymani A (2016). Antimicrobial and bond strength properties of a dental adhesive containing zinc oxide nanoparticles. *Braz. J. Oral Sci.* 15, 66–69.
- Sánchez-Sanhueza G, Fuentes-Rodríguez D, Bello-Toledo H (2016). Copper Nanoparticles as Potential Antimicrobial Agent in Disinfecting Root Canals: A Systematic Review. *International journal of odontostomatology*, 10 (3), 547-554
- Schaeken MJ, van der Hoeven JS, Franken HC (1986). Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on five isolation media, including a new simple selective medium. *Journal of Dental Research* 65 (6):906-8.
- Schrand AM, Rahman MF, Hussain SM, Schlager JJ, Smith DA, Syed AF (2010). Metal-based Nanoparticles and Their Toxicity Assessment. vol. 2. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.*, pp. 544–568.
- Seki M, Yamashita Y, Shibata Y, Torigoe H, Tsuda H, Maeno M (2006). Effect of mixed mutans streptococci colonization on caries development. *Oral Microbiology and Immunology* 21 (1):47-52
- Sieber C, Moncada G, Palma P, Vildósola P (2012) Recuento de *Streptococcus mutans* en muestras de biofilm sobre dientes restaurados con resina compuesta oclusal versus dientes sanos mediante el método de cubeta. Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
- Simón-Soro A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Alcaraz L.D, Mira A (2013). A Tissue-Dependent Hypothesis of Dental Caries. *Caries Research* 47:591–600
- Skjorland K, Sonju, T (1986). Effect of sucrose rinses on bacterial colonization on amalgam and composite. *Acta Odontol Scand* 40:193-196
- Takahashi N, Nyvad B (2011). The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *Journal of Dental Research* 90 (3):294-303

Todd EW, Hewitt LF. (1932). A new culture medium for the production of antigenic streptococcal hæmolysin. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 35 (6), 973-974.

Van Leeuwenhoek A. (1677). Observations, Communicated to the Publisher by Mr Antony van Leewenhoek in a Dutch Letter of the 9th of Octob, 1676. Here English'd: concerning little animals by him observed in rain-well-sea, and snow water; as also in water wherein pepper had lein infused. *Phil trans*; 12:821-831.

Vásquez S, Lobos O, 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

Vildósola P, Palma P, Zúñiga P, Fernández E, Oliveira OB, 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.

Yoshida K, Tanagawa M, Matsumoto S, Yamada T, Atsuta M (1999). Antibacterial activity of resin composites with silver-containing materials. *Eur J Oral Sci*. 107 (4):290-6.

Zúñiga PA, Moncada G, Palma P, Vildósola 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. Facultad de Odontología, Universidad de Chile

ANEXOS Y APÉNDICES

ANEXO N°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 N°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 clínica"

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:.....



En pacientes menores de edad**ASENTIMIENTO INFORMADO:**

Declaro haber leído este consentimiento en compañía y con el apoyo de mi representante legal o tutor. 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 y la de mi representante legal en este documento certifican que presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Nombre

Fecha de nacimiento

Edad

Firma

Fecha

Como representante legal del paciente, por medio de mi firma, certifico que se ha realizado un proceso de información detallada, que el paciente representado ha clarificado sus dudas y ha decidido libremente y sin ningún tipo de presiones externas, participar en el estudio.

Nombre del representante legal (tutor)



Firma

Fecha

Coinvestigador

He discutido el contenido de este consentimiento con el participante y su representante legal o tutor. Les 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 N°3

Universidad de Chile
 Facultad de Odontología
 Dpto. Odontología Restauradora
 Dpto. Patología Área de Microbiología Bucal

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	Plan de Tratamiento	Diente	Diagnóstico clínico	Plan de Tratamiento
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. Trabajo clínico y Estudio microbiológico

	1	2	Fecha y Hora
UFC cm ² en Saliva			
Diente en estudio			-
UFC cm ² en T0			
Alocación (Adhesivo A o B)			
UFC cm ² en T1			
UFC cm ² en T2			