



---

---

Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Medicina

Doctorado en Ciencias de la Salud

**“Análisis cuantitativo de *Streptococcus* adheridos  
a resinas compuestas de prescripción  
ortodóncica”**

**TESIS**

Para Obtener el Grado de  
Doctor en Ciencias de la Salud

Presenta:

Ulises Velázquez Enríquez

Comité de Tutores:

Dr. en O. Rogelio J. Scougall Vilchis  
Tutor Académico

Dra. en O. Rosalía Contreras Bulnes  
Tutor Interno

Dr. en C. Jaime Flores Estrada  
Tutor Externo



---

---

Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Medicina

Doctorado en Ciencias de la Salud

**“Análisis cuantitativo de *Streptococcus* adheridos  
a resinas compuestas de prescripción  
ortodóncica”**

**TESIS**

Para Obtener el Grado de  
Doctor en Ciencias de la Salud

Presenta:

Ulises Velázquez Enríquez

Comité de Tutores:

Dr. en O. Rogelio J. Scougall Vilchis  
Tutor Académico

Dra. en O. Rosalía Contreras Bulnes  
Tutor Interno

Dr. en C. Jaime Flores Estrada  
Tutor Externo



Toluca, Estado de México

2013

“Análisis cuantitativo de  
*Streptococcus* adheridos a resinas  
compuestas de prescripción  
ortodóncica”

# ÍNDICE

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1.    | Resumen / Abstract  | 1  |
| 2.    | Introducción  | 5  |
| 3.    | Antecedentes  | 8  |
| 3.1   | Esmalte dental  | 8  |
| 3.1.1 | Propiedades Físicas   | 8  |
| 3.1.2 | Propiedades Químicas  | 9  |
| 3.1.3 | Estructura  | 10 |
| 3.1.4 | Órgano del esmalte  | 14 |
| 3.1.5 | Órgano externo del esmalte  | 14 |
| 3.2   | Caries dental   | 16 |
| 3.2.1 | Lesión de mancha blanca   | 19 |
| 3.2.2 | Aparatología fija en ortodoncia   | 20 |
| 3.3   | Adherencia Bacteriana   | 21 |
| 3.4   | Resinas compuestas  | 22 |
| 3.5   | Cuantificación bacteriana   | 23 |
| 3.5.1 | Sistemas de cuantificación microbiológica   | 24 |
| 3.5.2 | Sistemas de identificación microbiana   | 25 |
| 3.5.3 | Sistemas de identificación mediante métodos moleculares                               | 26 |
| 3.6   | Medio de cultivo (Caldo Soya Trpticaseina suplementado con Extracto de Levadura) TSBY | 27 |
| 4.    | Planteamiento del problema  | 28 |
| 5.    | Hipótesis   | 31 |
| 6.    | Objetivos   | 32 |
| 7.    | Justificación   | 33 |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 8.  | Materiales y métodos                                | 35 |
|     | 8.1 Diseño metodológico                             | 35 |
|     | 8.2 Criterios de inclusión, exclusión y eliminación | 35 |
|     | 8.3 Procedimientos                                  | 36 |
|     | 8.4 Operacionalización de variables de estudio      | 39 |
|     | 8.5 Recolección de datos                            | 39 |
|     | 8.6 Análisis estadístico                            | 40 |
| 9.  | Resultados  | 41 |
|     | 9.1 Primer artículo                                 | 41 |
|     | 9.1.1 Página frontal del manuscrito                 | 41 |
|     | 9.1.2 Carta de aceptación                           | 42 |
|     | 9.1.3 Resumen                                       | 43 |
|     | 9.1.4 Abstract                                      | 44 |
|     | 9.1.5 Introduction                                  | 45 |
|     | 9.1.6 Materials and methods                         | 46 |
|     | 9.1.7 Results                                       | 48 |
|     | 9.1.8 Discussion                                    | 49 |
|     | 9.1.9 Conclusions                                   | 55 |
|     | 9.1.10 Acknowledgments                              | 55 |
|     | 9.1.11 Table 1                                      | 55 |
|     | 9.1.12 Table 2                                      | 56 |
|     | 9.1.13 References                                   | 56 |
|     | 9.2 Segundo artículo                                | 60 |
|     | 9.2.1 Página frontal del manuscrito                 | 60 |
|     | 9.2.2 Carta de aceptación                           | 61 |
|     | 9.2.3 Resumen                                       | 62 |
|     | 9.2.4 Abstract                                      | 64 |
|     | 9.2.5 Introduction                                  | 64 |
|     | 9.2.6 Material and methods                          | 65 |
|     | 9.2.7 Results                                       | 68 |
|     | 9.2.8 Discussion                                    | 69 |
|     | 9.2.9 Conclusions                                   | 74 |
|     | 9.2.10 Acknowledgments                              | 74 |
|     | 9.2.11 Table 1                                      | 74 |
|     | 9.2.12 Table 2                                      | 75 |
|     | 9.2.13 References                                   | 75 |
| 10. | Discusión General                                   | 79 |
|     | 10.1 Conclusiones                                   | 82 |
|     | 10.2 Limitaciones                                   | 82 |
|     | 10.3 Recomendaciones                                | 83 |
| 11. | Bibliografía  | 84 |

|  |    |
|--|----|
| 12. Anexos   | 88 |
| 12.1 Anexo 1 Constancia de participación en congreso                     | 88 |
| 12.2 Anexo 2 Reconocimiento  | 89 |
| 12.3 Anexo 3 Constancia de participación en congreso                     | 90 |
| 12.4 Anexo 4 Reconocimiento  | 91 |
| 12.5 Anexo 5 Vo. Bo. de revista científica para publicación 1er artículo | 92 |
| 12.6 Anexo 6 Vo.Bo. de revista científica para publicación 2do artículo  | 93 |

## 1. RESUMEN

**Introducción:** Las resinas compuestas de prescripción ortodóncica son utilizadas para la colocación de la aparatología fija. Aproximadamente un 50% de los pacientes con tratamiento de ortodoncia presentan desmineralización o lesiones de mancha blanca.

**Objetivo:** Determinar cuantitativamente la colonización de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* en siete resinas compuestas de prescripción ortodóncica mediante el uso de radiomarcadores.

**Materiales y Métodos:** Las resinas compuestas fueron clasificadas en siete grupos: BeautyOrtho Bond (GI), Blugloo (GII), Enlight (GIII), Grengloo (GIV), Kurasper F (GV), Transbond CC (GVI), y Turbo Bond II (GVII). Se realizaron treinta bloques de resina de 4x4x1mm por cada grupo (210 bloques en total).

Se diseñaron tres grupos experimentales: 1) Se evaluó la colonización bacteriana de *S. mutans* mediante un isótopo radiactivo (Tritio [ $^3\text{H}$ ]), en las siete resinas antes mencionadas con un número de muestra de 30 bloques de resina por grupo (un total de 210), los cuales no recibieron ningún tratamiento previo al análisis. 2) Se cuantificó la adherencia de *S. mutans* y *S. sobrinus* evaluando los microorganismos por separado mediante previo marcaje radiactivo (Tritio [ $^3\text{H}$ ]), en siete resinas con un número de muestras de 30 bloques por grupo haciendo un total de 420 bloques previamente tratadas. (210 bloques para *S. mutans* y 210 bloques para *S. sobrinus*). 3) Se cuantificó la adherencia de *S. mutans* y *S. sobrinus* simultáneamente codificando los microorganismos con isótopos radiactivos ( $^3\text{H}$  para *S. mutans* y  $^{14}\text{C}$  para *S. sobrinus*) en siete resinas con un número de muestra de 30 bloques de resina por grupo (un total de 210 bloques) previamente tratadas. Ambos *Streptococcus* fueron incubados. Los

bloques fueron sumergidos en una solución que contenía los microorganismos radiomarcados durante 2 horas a 37° C y en constante movimiento. Los bloques fueron lavados tres veces con solución salina de fosfato y se secaron durante 12hrs. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en una máquina de combustión para obtener los residuos en una solución acuosa, las muestras fueron leídas y se midió la radiación proporcional a la cantidad de *Streptococcus* adheridos arrojando valores en desintegraciones por minuto (dpm). Los datos fueron estadísticamente analizados mediante ANOVA de un factor y la prueba estadística Sheffè para comparaciones múltiples de grupos con significancia de  $p \leq 0.05$ . **Resultados:** Diferencias estadísticamente significativas fueron encontradas entre los grupos. Los valores más bajos para ambos microorganismos fueron observados en el grupo III. Por otra parte, los valores más altos fueron observados en el grupo VII cuando se analizó *S. mutans* solamente, del mismo modo, el grupo II mostró los valores más altos para ambas bacterias cuando éstas se evaluaron de manera simultánea y separada. **Conclusiones:** La resina evaluada en el grupo III mostró significativamente menor adhesión de *S. mutans* y *S. sobrinus*, lo cual podría reducir el riesgo de desarrollar lesiones de mancha blanca.



## ABSTRACT

**Introduction:** In orthodontics, the orthodontic composite resins are commonly used for placement of fixed appliances. A 50% of patients who are undergo in orthodontic treatment have white spot lesions or enamel demineralization. **Objective:** The purpose of this study was to determinate quantitatively the bacterial colonization of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. **Materials and Methods:** Seven light cured orthodontic composite resins were classified in seven equal groups: (I) BeautyOrtho Bond, (II) Blugloo, (III) Enlight, (IV) Grengloo, (V) Kurasper F, (VI) Transbond CC and (VII) Turbo Bond II. Three experimental groups were performed: 1) 30 blocks of each orthodontic composite were elaborated (a total of 210 blocks) and analyzed with *S. mutans* previously radiolabeled with tritium ( $^3\text{H}$ ). 2) A total of 420 blocks were tested (210 blocks for *S. mutans* and 210 blocks for *S. sobrinus*) analyzed independently using a radiomarker (Tritium [ $^3\text{H}$ ]). 3) A total of 210 blocks (30 samples of each orthodontic composite resin) with *S. mutans* and *S. sobrinus* were jointly analyzed using radiomarkers (Tritium [ $^3\text{H}$ ] for *S. mutans* and Carbon 14 [ $^{14}\text{C}$ ] for *S. sobrinus*). The samples were immersed for 2 hours in a solution with *Streptococcus* in constant movement. After that, the specimens were rinsed with PBS dried and placed in a combustion machine, the radioactivity of the samples were measured, recorded in disintegration per minute (dpm), statistically analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA) and a *post hoc* test (Sheffè) for multiple comparisons (significant  $p \leq 0.05$ ). **Results:** The results demonstrated that the Group III shown the significant lowest adherence for both microorganism. In the other hand, the highest score was found in

group VII when only *S. mutans* was evaluated; in this sense, group II shown the highest values when both microorganisms were tested independently and jointly. **Conclusions:** The application of composite resin whit lower adherence of cariogenic bacteria is desirable in orthodontics in order to avoid the formation of white spot lesion and caries.

## 2. INTRODUCCIÓN

En cualquier sistema de agua corriente, cualquier sólido que esté sumergido en él, tiene en su superficie una rica y variada actividad de microorganismos. La clave para que estos seres vivos puedan mantener su actividad es su capacidad de adhesión. Los microorganismos dependen de dicha propiedad para fijarse a la superficie, nutrirse y reproducirse, o que sean renovados. En condiciones de salud el organismo humano sólo tiene una superficie dura natural sumergida en un fluido como son los dientes, la cavidad oral tiene características que dan un potencial de proliferación bacteriana y ésta a su vez pueden producir ácidos que desmineralizan la superficie del esmalte dental. Los microorganismos se adhieren a la superficie dental mediante la placa dentobacteriana. Se han identificado bacterias con alta capacidad cariogénica entre las que destaca el *Streptococcus sobrinus* y el *Streptococcus mutans*.<sup>1,2</sup>

En el área de la Odontología la sustitución del tejido dentario por un material restaurador y específicamente en la especialidad de Ortodoncia, la colocación de aparatología fija en la cavidad bucal (brackets, bandas, ligadura, arcos, etc.) establecen condiciones para que estas superficies, al estar sumergidas en un fluido como la saliva, sean colonizadas por microorganismos. La superficie del material, su composición, el pH y diversos microorganismos presentes de manera normal en la cavidad oral, pueden influir en la capacidad de adhesión de microorganismos específicos y en la formación de la placa dentobacteriana, lo que aumenta el riesgo de desmineralización en el esmalte, particularmente en superficies dentales alrededor de dicha aparatología,

ya que los brackets se mantienen unidas a los dientes durante el tratamiento activo mediante resinas compuestas de prescripción ortodóncica. Se ha reportado desmineralización del esmalte desde el primer mes después de la colocación de la aparatología fija<sup>3</sup> y se estima que la prevalencia de lesión de mancha blanca en el esmalte (primer signo de desmineralización clínicamente visible) en pacientes tratados ortodóncicamente varia entre un 12.6% a un 50%.<sup>4</sup>

Generalmente, el cementado transitorio de aparatología fija, se realiza con materiales como la resina compuesta para adherir brackets a la superficie dental, ionómero de vidrio o ionómero de vidrio modificado con resina para cementar bandas ortodóncicas, cada uno con propiedades y estructuras diferentes.

Es importante analizar la cantidad de adherencia o acumulación bacteriana existente entre los diversos materiales cementantes adhesivos de uso ortodóncico, debido a que los materiales desarrollados recientemente presentan una gran diversidad en las propiedades físicas, su estructura química y también su ultraestructura<sup>5,6</sup> lo que puede modificar la agregación o disminución bacteriana.

La primera secuela del inminente crecimiento bacteriano a causa de los aparatos ortodóncicos son las lesiones de mancha blanca, éstas son zonas en las que el esmalte dentario pierde la sustancia fundamental interprismática del esmalte y su evolución da lugar a la pérdida o disolución de éste tejido. Por lo que, el objetivo de ésta investigación fue cuantificar la adhesión bacteriana de *Streptococcus mutans* y

*Streptococcus sobrinus* a siete resinas de prescripción ortodóncia mediante el uso de isótopos radiactivos.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Esmalte Dental

##### 3.1.1 Propiedades Físicas:

Es una cubierta protectora de gran dureza, que se encuentra sobre la superficie completa de la corona del diente, por el cuello tiene relación inmediata con el cemento (el cual cubre la raíz dental).

##### *Dureza*

Es un tejido duro (el más duro y mineralizado del cuerpo humano), acelular (por lo tanto no es capaz de sentir estímulos térmicos, químicos o mecánicos). Su dureza y estructura lo tornan quebradizo, lo cual se advierte sobre todo cuando el esmalte pierde su base dentinaria sana.

Su dureza es por:

- Elevado contenido de sales minerales.
- Su organización cristalina.

##### *Espesor*

Es delgado por el cuello y aumenta su espesor en las cúspides del diente. El espesor máximo es de 2 a 2.5 mm (en molares y premolares), protegiendo al diente de las acciones abrasivas de masticación.

## Permeabilidad

Se ha visto por medio de marcadores radioactivos, que el esmalte puede actuar en cierto sentido como una membrana semipermeable, lo cual permite el paso total o parcial de algunas moléculas como urea marcada con  $^{14}\text{C}$ , I, etc. Se ha demostrado el mismo fenómeno por medio de colorantes D.

## *Color*

El esmalte es transparente. El color de los dientes está dado por la dentina, se trasluce a través del esmalte y está determinado genéticamente. Debido a que es una estructura cristalina, el esmalte es un tejido birrefringente. El color varía entre un blanco amarillento y blanco grisáceo. Los dientes blancos amarillentos poseen un esmalte delgado y en los dientes grisáceos el grosor del esmalte es mayor. Esta transparencia se debe a las variaciones del grado de calcificación y homogeneidad del esmalte.

## *Densidad*

La densidad promedio del esmalte es e 2.8<sup>1,8,9</sup>

### 3.1.2 Propiedades Químicas:

#### *Orgánica*

Constituye el (1,5%) esta pequeña cantidad (proteínas y polisacáridos) presenta los restos de la matriz sintetizada y excretada por células productoras de esmalte, o ameloblastos, antes de la mineralización de éste. Las proteínas que la conforman

contienen un alto porcentaje de serina, ácido glutámico y glicina. Cuenta con dos tipos de proteínas: amelogeninas y enamelinas.

### *Inorgánica*

El esmalte está formado principalmente por material inorgánico (94%), fosfato cálcico en forma de cristales de hidroxiapatita organizados en prismas hexagonales fuertemente yuxtapuesto, carbonato, magnesio, flúor, sodio y potasio. Esta mineralización comienza inmediatamente de ser secretada.

En la 2ª mineralización o maduración aumenta notablemente la producción de mineral a comparación de la dentina.

### 3.1.3 Estructura:

#### *Prismas o bastoncillos del esmalte*

El número de estos prismas va de los 5 millones en los incisivos inferiores laterales hasta los 12 millones en los primeros molares, están fuertemente yuxtapuestos tienen 4  $\mu\text{m}$  de diámetro y algunos miden 8  $\mu\text{m}$ . Cada prisma se extiende a lo largo de todo el grosor del esmalte, con orientación oblicua y trayectoria ondulada. Los prismas de las cúspides son más largos. Tienen apariencia cristalina permitiendo que la luz pase a través de ellos. Los pequeños intersticios entre los prismas adyacentes están ocupados por los cristales de hidroxiapatita que están dispuestos casi paralelamente al eje longitudinal del prisma y se desvían unos  $65^\circ$  de este eje hasta encontrarse dentro de las “colas” de los prismas. Estos cristales son irregulares y de espesor promedio de 30 nanómetros y un ancho de 90 nanómetros.



### *Esmalte interprismático*

Su densidad de cristales es similar a la de los prismas, pero se disponen orientados en distintos ejes ( $40^{\circ}$ -  $60^{\circ}$ ).

### *Estrías transversales*

Cada prisma está compuesto por segmentos separados por líneas oscuras que le dan un aspecto estriado. Estas estrías son más pronunciadas en esmalte descalcificado. Al llegar a la superficie del esmalte, originan ligeras depresiones de la superficie del esmalte; entre una depresión y la siguiente el esmalte sobresale ligeramente formando las periquematías, muy visibles en la zona cervical de dientes jóvenes. Hay una periquematía especialmente marcada que representa el momento del nacimiento del individuo.<sup>1,2,10</sup>

### *Dirección de los prismas*

Los prismas están orientados en ángulo recto hacia la superficie de la dentina. En las partes cervical y central de la corona de un diente deciduo son horizontales. Los prismas cerca del borde incisal cambian gradualmente hacia una dirección cada vez más oblicua hasta que en la región del borde son casi verticales. En los dientes permanentes los prismas son similares en los dos tercios oclusales de la corona, aunque en la región cervical los prismas se desvían de la horizontal a una dirección apical. Los prismas rara vez son rectos, estos mayormente siguen una trayectoria ondulada desde la dentina hasta la superficie del esmalte.

### *Bandas de Hunter-Schreger*

El cambio regular en la dirección de los prismas puede considerarse a una adaptación funcional que reduce el riesgo de segmentación en dirección axial por influencia de las fuerzas masticatorias oclusales. El cambio en la dirección de los prismas ocasiona la aparición de las bandas de Hunter-Schreger. Estas son bandas oscuras y claras de diferentes anchos que se observan con más precisión en un corte longitudinal por desgaste bajo luz oblicua reflejada. Estas bandas se originan en el borde amelodentinario o se dirigen hacia fuera, terminando a cierta distancia de la superficie externa del esmalte.

### *Líneas incrementadas de Retzius*

Estas líneas aparecen en forma de bandas parduscas en los cortes por desgaste de esmalte. Demuestran la forma como se desarrolla el esmalte, esto es la sucesiva aposición de capas de tejido durante la formación de la corona. En cortes longitudinales rodean la punta de la dentina. En las porciones cervicales de la corona tienen un recorrido oblicuo. Desde la unión amelodentinaria hacia la superficie se desvían en sentido oclusal. En cortes transversales de un diente las líneas incrementales de Retzius se ven como círculos concéntricos. Estas pueden ser comparadas con los anillos de crecimiento de un árbol. Se les denomina "líneas incrementadas" ya que éstas reflejan variaciones en estructura y mineralización que se produce durante el crecimiento del esmalte.

### *Estructuras Superficiales*

Son capas menos estructuradas de 30µm de espesor, que han sido descritas en el 70% de los dientes permanentes y en todos los dientes deciduos. Se encuentra con menos frecuencia sobre los extremos de las cúspides y más comúnmente hacia las áreas cervicales de la superficie del esmalte. Es algo más mineralizada que el resto del esmalte que se encuentra por debajo de ella. Se han observado otros detalles microscópicos en las superficies externas del esmalte de dientes recién erupcionados, tales como periquimatas.<sup>8,9</sup>

### *Cutícula del esmalte*

Es una delicada membrana denominada “membrana de Nasmyth” en mérito a su primer investigador, o cutícula primaria del esmalte, esta cubre toda la superficie de la corona del diente recién erupcionado, pero luego se pierde con la masticación. Los estudios con microscopía electrónica indican que esta membrana es una lámina basal típica que se encuentra por debajo de la mayoría de los epitelios. Esta lámina basal es secretada por los ameloblastos cuando se completa la formación del esmalte, y está cubierta normalmente por una película que parece ser un precipitado de proteínas salivales, la cual vuelve a formarse a las pocas horas de haber limpiado mecánicamente la superficie del esmalte, y después de uno o dos días de ya haberse formado es colonizada por microorganismos para formar una placa bacteriana. Desde la superficie del esmalte hacia la unión amelodentinaria está compuesta por material

orgánico, pero con poco contenido mineral, puede confundirse con fisuras en cortes por desgaste.

#### *Penachos del esmalte*

Los penachos del esmalte se originan en la unión amelodentinaria y recorren al esmalte desde un quinto a una tercera parte de su espesor. Los penachos están constituidos por prismas del esmalte hipocalcificados y sustancias interprismática. Al igual que las laminillas, se extienden en el sentido del eje longitudinal de la corona. Por lo tanto, se observan abundantemente en cortes horizontales y raras veces en los longitudinales; su presencia y desarrollo son consecuencia de condiciones de espacio en el esmalte o una adaptación a ellos.

#### 3.1.4 Órgano del esmalte

En el aspecto histológico, los campos separados en las capas celulares que participan en la secreción del esmalte, están relacionados con la formación y el desarrollo del tejido adamantino. Según la histología clásica, señala que la formación del esmalte puede ser considerada como una sucesión de etapas, las cuales veremos a continuación.

#### 3.1.5 Órgano externo del esmalte

Constituido por una capa de células cúbicas o aplanadas, con numerosas y cortas microvellosidades e interdigitaciones entre las células vecinas. Estas células se

encuentran separadas del tejido conectivo del saco dentario que las rodea. En la convexidad máxima del órgano, las células del epitelio externo del esmalte:

- Toman forma irregular.
- No se diferencia del retículo estrellado. Los capilares que se hallan en contacto con epitelio externo del esmalte muestran áreas con paredes muy delgadas. Antes de que comience la formación del esmalte, los capilares pueden mellar en el retículo estrellado.<sup>8,9,11</sup>

### 3.2 CARIES DENTAL

La caries dental es una enfermedad infectocontagiosa multifactorial que se caracteriza por la destrucción de los tejidos duros del diente como consecuencia de la desmineralización provocada por los ácidos que genera la placa bacteriana a partir de los restos de alimentos, que se exponen a las bacterias que fabrican ese ácido de la dieta. La destrucción química dental se asocia a la ingesta de azúcares y ácidos contenidos en bebidas y alimentos, la caries dental se asocia también a errores en las técnicas de higiene así como pastas dentales inadecuadas, falta de cepillado dental, ausencia de hilo dental, así como también con una etiología genética, se estudia aún la influencia del pH de la saliva en relación a la caries.<sup>3,4</sup>

Se reconoce actualmente que la placa dental juega el papel más importante en la etiología de la caries. Es muy difícil obtener en la boca una superficie de esmalte limpia, porque las prolongaciones de la placa penetran algunos micrones en la superficie del esmalte. Inmediatamente después de llevar a cabo una buena profilaxis de las superficies de esmalte accesibles utilizando copas de goma y pasta ligeramente abrasiva, se deposita sobre el esmalte una cutícula fina de material orgánico, formado a partir de la saliva, y que contiene esencialmente mucopolisacáridos salivales. Esta capa orgánica libre de bacterias se engruesa (se considera que es una película cuando alcanza el grosor de una micra). Las bacterias orales se depositan en esta matriz.<sup>3</sup> Además de este proceso que se desarrolla sobre las superficies limpias del esmalte,

existen numerosas regiones donde es deficiente la integridad de esta superficie; tales regiones pueden ser fácilmente identificadas cuando la superficie del esmalte se examina con el microscopio electrónico de barrido. Es casi imposible eliminar de estos lugares a las colonias de bacterias.

La formación de la placa progresa rápidamente a partir de estos defectos cuneiformes. Aunque se han realizado gran cantidad de investigaciones, la etiología precisa de la caries dental está aún por aclarar. La teoría acidógena fue propuesta por Miller (1890), quien consideraba que sobre la superficie del esmalte, o cerca de la misma, se producían ácidos como consecuencia de la fermentación bacteriana de los hidratos de carbono de la dieta. Los ácidos serían los responsables de la disolución de los cristales de apatita, que constituyen el 95 % de la masa del esmalte. La teoría de la proteólisis fue propuesta por Gottlieb (1944), quien sugería que el ataque inicial al esmalte debía ser más bien proteolítico.<sup>3,4</sup>

El esmalte humano contiene menos del 1% de proteínas en peso, formando un delicado encaje que recubre las superficies de los cristales. La teoría propone que las enzimas proteolíticas liberadas por las bacterias de la cavidad oral podrían destruir la matriz orgánica del esmalte. La teoría proteólisis-quelación, original de Schatz y Martin (1955), propone que algunos de los productos resultantes de la acción bacteriana sobre el esmalte, la dentina, los alimentos y los constituyentes de la saliva podrían tener la propiedad de formar compuestos o quelatos con el calcio. La teoría sugiere que existe la posibilidad de que la desmineralización pueda producirse sin formación de ácidos, ya

que la quelación ocurre con valores de pH neutros o alcalinos. Toda la evidencia comprobable da soporte a la teoría acidogénica.<sup>7</sup>

Los principales microorganismos implicados en la caries dental son:

- *Streptococcus sanguis* (1º en colonizar la película dental).
- *Streptococcus sobrinus*.
- *Streptococcus mitis*.
- *Streptococcus salivarius*.
- *Streptococcus mutans* (predominan 7 días después de la colonización bacteriana).
- *Actinomyces viscosus*.
- *Actinomyces naeslundii*.
- *Streptococcus oralis*.
- *Actinomyces* spp.
- *Haemophilus*.
- *Lactobacillus acidophilus*.
- *Neisseria flava*, *Bifidobacterium*, *Rothias*, *Clostridium*, *Propionibacterium* y *Eubacterium*, poseen un potencial acidógeno y acido-tolerante, pero no como el *S. mutans*, y por lo tanto tienen un bajo potencial cariogénico.
- *Kostadinus ivaniniov*.<sup>11</sup>



### 3.2.1 Lesión de mancha blanca

La primera manifestación clínica de la caries dental es una *mancha blanca*, opaca y con aspecto de tiza, considerada como el inicio de la enfermedad y que se conoce también como *lesión incipiente de caries dental o lesión precariosa*. En este momento el esmalte pierde su brillo y se torna ligeramente poroso y áspero, pero sin presencia de cavitación.<sup>11</sup>

En las lesiones incipientes de caries dental el daño estructural en el tejido dentario es mínimo y no compromete la integridad funcional del diente. La caries en esta etapa es totalmente reversible, podemos revertir ese proceso terapéuticamente o inclusive el organismo sólo tiende a remineralizar esa zona por la acción de la saliva que contiene elementos cálcicos y minerales, si ofrecemos a nuestros pacientes una adecuada educación dietética y mantiene las medidas de higiene correspondientes.

Microscópicamente la caries en esta etapa se visualiza como un área radiolúcida, si la muestra se embebe en agua o se observa por microscopía electrónica, o un área radiopaca, si se embebe en quinoleína; a los Rayos X la imagen de la lesión en el estadio de mancha blanca es radiolúcida y la superficie externa radiopaca.<sup>13</sup>

Las lesiones precariosas o de mancha blanca, pueden localizarse en las fosas y fisuras, en el tercio cervical de todos los dientes, fundamentalmente en molares o coincidiendo con la zona de contacto proximal. Un rasgo importante de estas lesiones incipientes de caries dental es que en muchos casos no se detectan en las radiografías

ni existe deterioro del hilo de seda dental, cuando este es pasado entre los puntos de contacto de superficies interproximales de los dientes; clínicamente, al tacto con el explorador, esa mancha blanca no presenta proceso cavitario ya que el esmalte que cubre ésta lesión, está intacto y debidamente mineralizado, pues la desmineralización ocurre a nivel subsuperficial; sin embargo, cuando éstas lesiones son analizadas microscópicamente se puede observar que la lesión en algunas ocasiones, ya ha penetrado a la mitad del camino a través del esmalte y que cerca del 25% de materia mineral ha sido retirado por disolución. Esto da una idea del tamaño del problema asociado al diagnóstico de las pequeñas lesiones de esmalte ya que el estomatólogo es capaz de diagnosticar lesiones que se encuentran ya muy avanzadas. Otro aspecto importante a señalar es que en el examen bucal de nuestros pacientes muchas veces no incluimos el diagnóstico de estas lesiones incipientes y por lo tanto, se obvia el tratamiento de las mismas, evolucionando hacia la formación de una cavidad por pérdida de la estructura dental.<sup>14</sup>

### 3.2.2 Aparatología fija en ortodoncia

Durante el tratamiento de Ortodoncia, la formación de lesiones incipientes de mancha blanca es el efecto indeseable más frecuente y difícil de prevenir.<sup>15</sup> Dicho fenómeno es originado por la mayor cantidad de acumulo bacteriano cuando los aparatos se han colocado en la cavidad oral. Actualmente, la indeseable formación de lesiones incipientes de mancha blanca es una de las principales preocupaciones de los clínicos y esto se ve reflejado en numerosas investigaciones de relevancia a nivel internacional.<sup>14</sup>

### 3.3 ADHERENCIA BACTERIANA

La adhesión bacteriana depende de unos algunos factores inespecíficos de carácter físico-químicos, eléctricos, etc., y otros factores específicos de carácter adhesina-receptor. El primer requisito para la adhesión es que la bacteria se acerque a la superficie del material.<sup>16</sup>

El transporte de la bacteria se produce por tres mecanismos: 1) difusión; 2) dinámica del fluido y 3) por actividad propia de la bacteria. No existe ninguna interacción entre la superficie sólida y el microorganismo hasta una distancia de 50nm. A ésta distancia aparece una atracción debido a las fuerzas de Van der Waals ( $F_a$ ), que son debidas a un efecto dipolo entre átomos o moléculas. A medida que se va acercando a la superficie y a una distancia más corta que la interacción por las Fuerzas de Van der Waals, aparece una fuerza de repulsión debida a la carga negativa de la bacteria y del material que suelen ser del mismo signo. A esta fuerza se le denomina "Z potencial" ( $F_e$ ). De la interacción de estas dos fuerzas es de lo que depende el mayor o menor acercamiento del microorganismo a la superficie del material es lo que se denomina energía Gibbs. Es importante observar que la capacidad adhesiva a distintos materiales puede depender de los microorganismos empleados, ya que podemos observar mayor adhesión a un material que a otro y no depender del material, sino del microorganismo.<sup>18</sup>

### 3.4 RESINAS COMPUESTAS

Las resinas compuestas debido a sus propiedades no tienen tanta capacidad de inhibición de la adhesión bacteriana como los iónomeros de vidrio. Existen estudios donde al añadir sustancias a su composición se puede inhibir la adherencia. Por ejemplo, la incorporación del triclosan inhibe la adherencia tanto en muestras revestidas, como no revestidas de saliva.<sup>19</sup>

En cuanto al pulido del composite, una resina compuesta rugosa aumenta la adhesión bacteriana, pero cuando su superficie es pulida el efecto sobre la disminución de la adhesión es menor en las resinas compuestas a diferencia de los ionómeros de vidrio. Existen gérmenes como el *S. oralis*, que a diferentes grados de rugosidad no varía su grado de adhesión, ya que esta se produce específicamente a las partículas de relleno.<sup>20,21</sup>

El efecto de agentes aclaradores sobre la superficie de los composites, implica un aumento para la adhesión de *S. mutans* y *S. sobrinus*, tanto con el peróxido de carbamida como con el peróxido de hidrógeno. Sin embargo, se observa una disminución de *A. Viscosus*.<sup>22</sup>

### 3.5 CUANTIFICACIÓN BACTERIANA

Los marcadores radioactivos son uno de los elementos primordiales de las técnicas predictivas de imagen, identificación de compuestos, así como cuantificación de elementos químicos de acuerdo a sus niveles o cantidades de radiación. Se trata de moléculas a las que se añade o sustituye un átomo radioactivo que se fija de forma específica a una célula o molécula. Cuando su átomo radioactivo se desintegra, emiten una radiación que puede seguirse mediante detectores externos. Uno de los principales desafíos de las técnicas predictivas de imagen es encontrar y luego sintetizar marcadores cada vez más específicos de un parámetro biológico dado. Existen diversas técnicas para la aplicación de marcadores radioactivos para la cuantificación de microorganismos adheridos a las superficies de los materiales dentales, entre las que encontramos la adición del hidrógeno ( $^3\text{H}$ ) y el carbono ( $^{14}\text{C}$ ). Además, la microscopía fluorescente se ha convertido en otra herramienta importante de investigación para observar y cuantificar el número de microorganismos existentes en una superficie determinada en la que se asigna un color al microorganismo en observación.<sup>16,26</sup>

### 3.5.1 Sistemas de cuantificación microbiológica

Existen diversos sistemas en el mercado actual para cuantificación como son las siguientes:

- Las placas 3MT PetrifilmT ayudan a maximizar la productividad en el laboratorio. Estas placas listas para usarse reducen el tiempo y optimizan el espacio.
- El sistema Dip N'Count frascos con esponjas cuadrículadas con agar permitiendo contar diferentes tipos de organismos. Los resultados que se obtienen no son exactos, y son aproximaciones.
- El sistema Simplate sirve para realizar recuento de organismos selectos: Cuenta total, coliformes totales y fecales, hongos, levaduras y *Campylobacter*.
- La compañía Spiral Biotechnology ofrece el sistema autoplate 4000 que puede ser usado para enumeración bacteriana, análisis de susceptibilidad antimicrobiana, ensayos de mutagenicidad.
- El sistema Protocol es un sistema modular que abarca desde un sistema para la cuenta de las colonias, hasta el cálculo de las diluciones.
- Placas tipo espiral, ahorrando medio de cultivo, se conecta a una computadora básica y funciona con sistema operativo Windows.
- El sistema Rabbit Impedance Detection y el Lactómetro que se basan en el concepto de impedancia (resistencia al flujo de una corriente alternante que pasa a través de un material conductor).
- El sistema Malthus es para cuantificar microorganismos basado en cambios de conductancia.
- Otros métodos mas sofisticados que incluyen al sistema ChemScan RDI, Sistema D Count (se basa en una combinación de marcaje celular, excitación laser y procesamiento digital).

### 3.5.2 Sistemas de identificación microbiana

Actualmente se han desarrollado nuevas técnicas específicas para la identificación de microorganismos:

- Los sistemas de identificación api comprende celdillas con 20 pruebas bioquímicas en miniatura. El sistema Microbac, también consiste de plaquitas con 16 pruebas bioquímicas.
- El sistema de identificación Micro-ID. Principio: Estos sistemas incluyen 15 celdillas con discos de papel filtro impregnados con reactivos para detectar la presencia específica de enzimas o productos metabólicos.
- El sistema ColiTrak da un resultado presuntivo de cuentas de coliformes, reemplazando al NMP y especialmente aplicado a ensayos de aguas.
- El sistema Vitek automático que identifica en 2 a 24hrs. y realiza también confirmación de patógenos. Los equipos son expandibles con 32, 60, 120, 240 ó 480 exámenes y además realiza el antibiograma y CMI.
- El sistema PASCO es semejante al sistema Vitek.
- El sistema Biolog es capaz de identificar más de 1400 especies de bacterias aerobias, anaerobias, hongos filamentosos y levaduras.

### 3.5.3 El sistema de identificación mediante métodos moleculares.

El mercado tiene numerosos sistemas para la identificación molecular actualmente los más conocidos son:

- Los sistemas BAX® utilizan el poder del PCR para lograr resultados rápidos y confiables. Cada prueba esta diseñada para amplificar un segmento de DNA específico de cada organismo, produciendo en pocas horas niveles tales para ser detectados.
- Los sistemas BAX simplifican el PCR ya que incluyen todos los primers requeridos, polimerasa y nucleótidos en una pastilla única, empaquetada dentro del tubo de muestra, evitando errores de manipulación
- El sistema RiboPrinter® Microbial Characterization, detecta múltiples copias del gen RNAr 16seg. logrando la identificación de cualquier bacteria en menos de 8 horas.
- El sistema DARAS es un equipo robótico totalmente automatizado, el cual combinado con las columnas DARAS componen todos los pasos asociados con los análisis rutinarios de Biología Molecular.



### 3.6 MEDIO DE CULTIVO TSBY

Los medios de cultivo son soluciones con nutrientes adecuados para multiplicar, identificar y/o aislar microorganismos en condiciones favorables de temperatura y pH, de acuerdo a sus nutrientes pueden ser selectivos para ciertos microorganismos. El cultivo de caldo de soya tripticaseína suplementado con extracto de levadura (TSBY, Trypticase Soybean Broth Yeast) está constituido por:

| <i>COMPONENTES</i>        | <i>Gramos/Litro</i> |
|---------------------------|---------------------|
| Caseína enzima hidrolasa  | 17.0                |
| Papaina digestiva         | 3.0                 |
| Soya                      | 3.0                 |
| Cloruro de sodio          | 5.0                 |
| Fosfato dibásico potásico | 2.5                 |

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La caries dental ha sido un problema de salud pública a nivel mundial durante muchos años, sobre todo en países en vías de desarrollo, a través de la investigación científica se ha estudiado la complejidad de su etiología, los sistemas de salud de muchos países invierten gran parte de su presupuesto en programas preventivos de salud bucal de manera permanente para disminuir el porcentaje de ésta enfermedad en la población en general.<sup>28</sup>

De acuerdo con la Organización Mundial para la Salud (OMS) y la Norma Oficial Mexicana 013 (NOM 013 SSA) para la prevención y control de las enfermedades bucales, México tiene una prevalencia de caries dental de 90% en su población.<sup>28,29</sup>

La caries es una enfermedad que se reconoce por su etiología multifactorial; sin embargo, además de los factores que comúnmente pueden producir ésta enfermedad existen otros agentes causales para la retención y proliferación de microorganismos, como lo son la aparatología usada durante el tratamiento ortodóncico (brackets y bandas ortodóncicas) los cuales se fijan de manera transitoria durante el tratamiento activo a la superficie dentaria por medio de resinas compuestas, y generan mayor formación de placa dentobacteriana, esto es relacionado a una complicación común durante el tratamiento ortodóncico como son las lesiones de mancha blanca (desmineralización del esmalte dental) alrededor de los brackets, los microorganismos asociados a ésta enfermedad en etapas iniciales son claramente identificados sin

importar el factor causal, entre los más importantes podemos distinguir al *Streptococcus mutans* y el *Streptococcus sobrinus*.

Actualmente en el área de la Odontología y en la mayoría de sus especialidades existe gran variedad de materiales dentales biocompatibles que se encuentran disponibles en el mercado, aún para un mismo propósito los materiales dentales tienen propiedades físico-químicas diferentes entre sí.

Existen diversos estudios acerca de la adherencia de microorganismos en algunos materiales, así como reportes a acerca de una variedad de brackets, bandas, arcos, elásticos, ligaduras, etc., utilizados específicamente en el área de Ortodoncia;<sup>3, 4, 17</sup> sin embargo, las resinas compuestas de última generación para el cementado de brackets no han sido estudiadas ampliamente en relación con la adherencia de microorganismos en particular *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.

Preguntas de investigación:

¿Cuál es la resina para cementado de brackets con menor adherencia de *Streptococcus*?

¿Cuál es la resina para cementado de brackets con mayor adherencia de *Streptococcus*?

¿Qué microorganismo es el que presente mayor adhesión a las resinas para cementado de brackets?

¿Qué diferencias existe entre la cantidad de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* en las resinas para cementado de brackets que presenten mayor adhesión de microorganismos?

## 5. HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo:

Las resinas compuestas de prescripción ortodóncica promueven diferentes cantidades de agregación bacteriana, específicamente de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.

Hipótesis nula:

Los materiales adhesivos de uso ortodóncico promueven cantidades similares de agregación bacteriana, específicamente de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.

Hipótesis estadística:

Las cantidades de agregación bacteriana de las resinas de prescripción ortodóncica tendrán diferencias estadísticamente significativas entre sí con significancia de  $p \leq 0.05$ .

## 6. OBJETIVOS

### General

Determinar cuantitativamente el grado de colonización bacteriana de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* en resinas compuestas de prescripción ortodóncica.

### Específicos

Cuantificar la adherencia de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* a las resinas compuestas de prescripción ortodóncica mediante el uso de marcadores radiactivos.

Cuantificar el número de bacterias (en unidades de dpm) que colonizan una resina compuesta de prescripción ortodóncica específica en un intervalo de tiempo.

Identificar las resinas compuestas de prescripción ortodóncica con mayor o menor susceptibilidad de colonización bacteriana.

## 7. JUSTIFICACIÓN

Los métodos para prevención de caries están bien documentados a través de la educación al paciente, su orientación en la técnica de cepillado, pasta dental fluorada, aplicaciones de fluoruros, recomendaciones dietéticas, aplicación de selladores de fosas y fisuras así como la revisión periódica por el odontólogo, etc.; sin embargo, sigue siendo una enfermedad infectocontagiosa con alto nivel de prevalencia en México.<sup>28, 29</sup>

De manera específica se ha observado que la etapa inicial de la caries (lesión de mancha blanca), ó desmineralización del esmalte es una complicación común durante el tratamiento ortodóncico, por lo que durante años ha sido objeto de investigación científica, identificando que la aparatología fija durante dicho tratamiento favorece una mayor retención de microorganismos que producen caries, del mismo modo se han identificado las bacterias que causan la lesión de mancha blanca.<sup>3, 4</sup> En éste contexto, existen estudios sobre adherencia bacteriana a materiales usados en el área de Ortodoncia como; brackets de diversos materiales, ligaduras, bandas, arcos de distintas aleaciones,<sup>17</sup> etc., a pesar de que existen varios estudios sobre los materiales antes mencionados, no es así para el caso de materiales adhesivos de última generación (resinas de prescripción ortodóncica) para cementación de brackets y su asociación con la adhesión de estreptococos en particular *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.

Si bien existe una gran variedad de resinas de prescripción ortodóncica en el mercado, con ligeras diferencias en su composición físico-química, el conocimiento e identificación de las resinas para cementado de brackets con menor y mayor adherencia de *Streptococcus*, aportaría datos de importancia clínica, orientando al ortodoncista con una visión crítica sobre los materiales utilizados en su práctica profesional así como el éxito del tratamiento ortodóncico, impactando además directamente sobre la disminución de la prevalencia de lesiones de mancha blanca durante el tratamiento.



## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1 DISEÑO METODOLÓGICO**

*Tipo de estudio:* Estudio experimental, prospectivo y transversal.

*Universo:* Resinas de prescripción ortodóncica.

*Muestra:* muestreo por conveniencia con un total general de 630 bloques de resina dividido en dos grupos experimentales:

- 210 bloques de resina de prescripción ortodóncica procedentes de siete diferentes marcas comerciales (30 de cada marca comercial) para el estudio experimental en que se evaluó ambos *Streptococcus* simultáneamente.
- 420 bloques de resina de prescripción ortodóncica procedentes de siete diferentes marcas comerciales (60 de cada marca comercial) para el estudio experimental en el que examinaron ambos *Streptococcus* por separado.

### **8.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y ELIMINACIÓN**

*Criterios de Inclusión:*

Las siete resinas fotopolimerizables de prescripción ortodóncica previamente descritas de nueva generación en bloques de 4 x 4 x1mm.

Bloques de resina procedentes de las siete marcas antes mencionadas que se obtuvieron en buen estado, con limpieza de ultrasonido, esterilizadas y libres de contaminación.

*Criterios de Exclusión:*

Bloques de resina que presenten fracturas, burbujas o irregularidades en la superficie, observables a simple vista

Resina de prescripción ortodóncica para el cementado de brackets modificados con ionómero de vidrio.

Resina de prescripción ortodóncica modificada con algún agente antimicrobiano.

*Criterios de eliminación:*

Bloques de resina con modificación accidental de la superficie, fracturas, o contaminación durante el procedimiento.

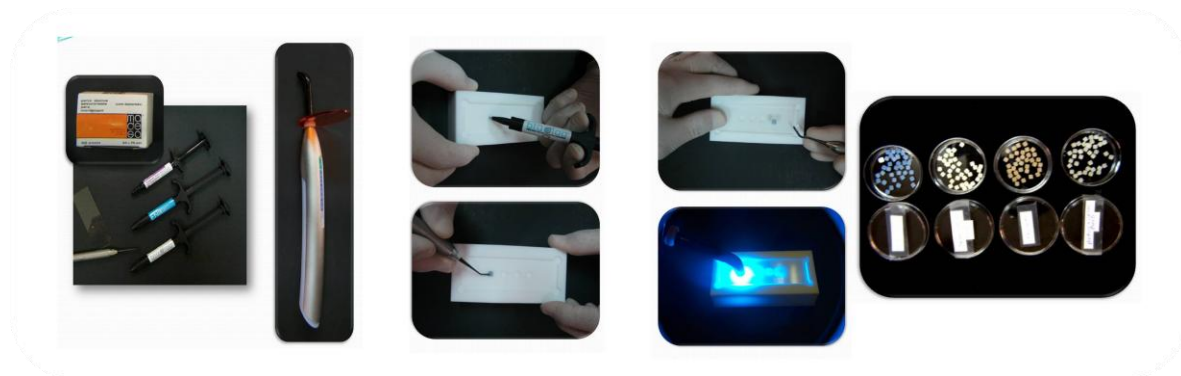
### **8.3 Procedimientos**

Siete resinas compuestas fueron seleccionadas dentro de los materiales más vanguardistas para realizar el análisis y se formaron siete grupos; BeautyOrtho Bond II (GI), Blugloo (GII), Enlight (GIII), Greengloo (GIV), Kurasper F (GV), Transbond Plus CC (GVI), Turbo Bond II (GVII) (Figura 1).



**Figura 1.** Imagen representativa de las resinas compuestas de prescripción ortodóncica.

Se realizaron 30 bloques de cada resina, utilizando un molde de teflón de 4 x 4 x 1mm. Para los materiales fotopolimerizables el procedimiento fue realizado cubriendo el material con un porta objetos de cristal seguido de la aplicación de la lámpara de luz fotopolimerizable (Ortholux, 3M Unitek, Monclovia, Calif., EEUU) por 60seg., similar a los métodos descritos por el fabricante (Figura 2).



**Figura 2.** Las imágenes ilustran el material, instrumental y procedimiento realizado.

Los bloques obtenidos se pulieron ligeramente con papel abrasivo de 6µm y limpiados ultrasónicamente durante un minuto para eliminar impurezas. Se dejó secar las

muestras por 12 hrs., y se almacenaron en recipientes libres de humedad antes de realizar el análisis.

Cepas certificadas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* fueron cultivados con métodos convencionales para su reproducción en cajas Petri y con medios a base de agar con caldo de cultivo tipo caldo de cultivo de soya tripticaseína suplementado con levadura (TSBY sólido y semisólido) (Figura 3).



**Figura 3.** Imágenes representativas del cultivo bacteriano para *S. mutans* y *S. sobrinus*.

### 8.3 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

| <b>Variable Dependiente</b>   | <b>Definición conceptual</b>  | <b>Definición operativa</b>     | <b>Tipo de variable</b> | <b>Escala de Medición</b> |
|-------------------------------|---|---------------------------------|-------------------------|---------------------------|
| <i>Streptococcus mutans</i>   | Bacteria anaerobia facultativa Gram positiva acidófila y acidogénica que se localiza de manera normal en la cavidad oral formando parte de la placa dentobacteriana y es asociada a la caries dental. | desintegración por minuto (dpm) | Cuantitativa            | Razón                     |
| <i>Streptococcus sobrinus</i> | Bacteria Gram positiva ácido láctica, esférica de crecimiento en pares o cadenas, conforma parte de la microbiota normal de la cavidad bucal.   | desintegración por minuto (dmp) | Cuantitativa            | Razón                     |

| <b>Variable Independiente</b> | <b>Definición conceptual</b>  | <b>Definición operativa</b>   | <b>Tipo de variable</b> | <b>Escala de Medición</b> |
|-------------------------------|---|---|-------------------------|---------------------------|
| Material de Cementación       | Material de cementación fotopolimerizable a base de matriz BisGMA, relleno microhíbrido, de prescripción ortodóncica. | BeautyOrto Bond, Blugloo, Enlight, Greengloo, Kurasper F, Transbond CC, Turbo Bond II | Categórica              | Nominal                   |

### 8.4 RECOLECCIÓN DE DATOS

El análisis cuantitativo de la adherencia de los microorganismos a la superficie de los materiales pudo ser realizado mediante marcadores radioactivos codificando las bacterias mediante Tritio ( $^3\text{H}$ ) y Carbono 14 ( $^{14}\text{C}$ ), posteriormente se utilizó un sistema de combustión (ACS-113, Aloka, Tokio, Japón), para capturar los residuos y después se midió la radiación de cada muestra por tres veces (LSC-900, Aloka) (Figura 4).

## 8.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se registraron y analizaron en el programa estadístico SPSS versión 18 (PAWS v.18). En análisis estadístico se calcularon múltiples comparaciones entre diversos materiales con la prueba de ANOVA (Sheffè Post-hoc).



**Figura 4.** A) Imágenes del procedimiento experimental. B) Máquina de combustión (ACS-113B Hitachi-Aloka, Tokyo, Japan). C) Máquina de centelleo (LSC-900, Aloka, Tokyo, Japan).

## 9. RESULTADOS

### 9.1. PRIMER ARTÍCULO

Velazquez-Enriquez U, Scougall-Vilchis RJ, Contreras-Bulnes R, Uematsu S, Yamaguchi R. Quantitative analysis of *S. mutans* and *S. sobrinus* cultivated independently and adhered to polished orthodontic composite resins. J Appl Oral Sci 2012; 20(5): 544-9.

#### 9.1.1 Página Frontal del Manuscrito

www.scielo.br/jaos

## Quantitative analysis of *S. mutans* and *S. sobrinus* cultivated independently and adhered to polished orthodontic composite resins

Ulises VELAZQUEZ-ENRIQUEZ<sup>1</sup>, Rogelio José SCOUGALL-VILCHIS<sup>2</sup>, Rosalia CONTRERAS-BULNES<sup>3</sup>, Jaime FLORES-ESTRADA<sup>4</sup>, Shinsuke UEMATSU<sup>5</sup>, Ryozo YAMAGUCHI<sup>6</sup>

- 1- DDS, MDS, Orthodontist, PhD student, Health Sciences, School of Medicine, Autonomous University State of Mexico, Toluca City, Mexico.
- 2- DDS, MDS, PhD, Orthodontist, Department of Orthodontics, Dental Research Center, School of Dentistry, Autonomous University of State of Mexico, Toluca City, Mexico.
- 3- DDS, PhD, Dental Research Center, School of Dentistry, Autonomous University of State of Mexico, Toluca City, Mexico.
- 4- PhD, School of Chemistry, Autonomous University of State of Mexico, Toluca City, Mexico.
- 5- DDS, PhD, Prosthodontics Department, School of Dentistry, Asahi University, Gifu, Japan.
- 6- PhD, Institute of Radioisotope, School of Dentistry, Asahi University, Gifu, Japan.

Corresponding address: Rogelio José Scougall-Vilchis - Department of Orthodontics, Dental Research Center, School of Dentistry, Autonomous University of State of Mexico - Francisco Carbajal Bahena 241 - Col. Morelos - Toluca City - ZC 50120 - Mexico - Phone: +52 722 212 43 51 - E-mail: rogelio\_scougall@hotmail.com

Received: March 7, 2012 - Modification: June 22, 2012 - Accepted: July 2, 2007

### ABSTRACT

In Orthodontics, the placement of fixed appliances in the oral cavity immersed in a fluid such as saliva, are colonized by microorganisms. Objective: The purpose of this study was to quantitatively determine the independent bacterial colonization of *S. mutans* and *S. sobrinus* in orthodontic composite resins. Material and methods: Seven orthodontic composite adhesives for bonding brackets were selected and classified into 14 groups: (GI<sub>m</sub>, GI<sub>s</sub>) Enlight, (GII<sub>m</sub>, GII<sub>s</sub>) Grengloo, (GIII<sub>m</sub>, GIII<sub>s</sub>) Kurasper F, (GIV<sub>m</sub>, GIV<sub>s</sub>) BeautyOrtho Bond, (GV<sub>m</sub>, GV<sub>s</sub>) Transbond CC, (GVI<sub>m</sub>, GVI<sub>s</sub>) Turbo Bond II, (GVII<sub>m</sub>, GVII<sub>s</sub>) Blugloo. 60 blocks of 4x4x1 mm of each orthodontic composite resin were made (total 420 blocks), and gently polished with sand-paper and ultrasonically cleaned. *S. mutans* and *S. sobrinus* were independently cultivated. For the quantitative analysis, a radioactive marker was used to codify the bacteria (3H) adhered to the surface of the materials. The blocks were submerged in a solution with microorganisms previously radiolabeled and separated (210 blocks for *S. mutans* and 210 blocks for *S. sobrinus*) for 2 hours at 37°C. Next, the blocks were placed in a combustion system, to capture the residues and measure the radiation. The statistical analysis was calculated with the ANOVA test (Sheffé post-hoc). Results: Significant differences of bacterial adhesion were found amongst the groups. In the GI<sub>m</sub> and GI<sub>s</sub> the significant lowest scores for both microorganisms were shown; in contrast, the values of GVII for both bacteria were significantly the highest. Conclusions: This study showed that the orthodontic composite resin evaluated in the GI<sub>m</sub> and GI<sub>s</sub>, obtained the lowest adherence of *S. mutans* and *S. sobrinus*, which may reduce the enamel demineralization and the risk of white spot lesion formation.

**Key words:** Radioisotope. White spot. Composite resins. *Streptococcus mutans*. *Streptococcus sobrinus*.

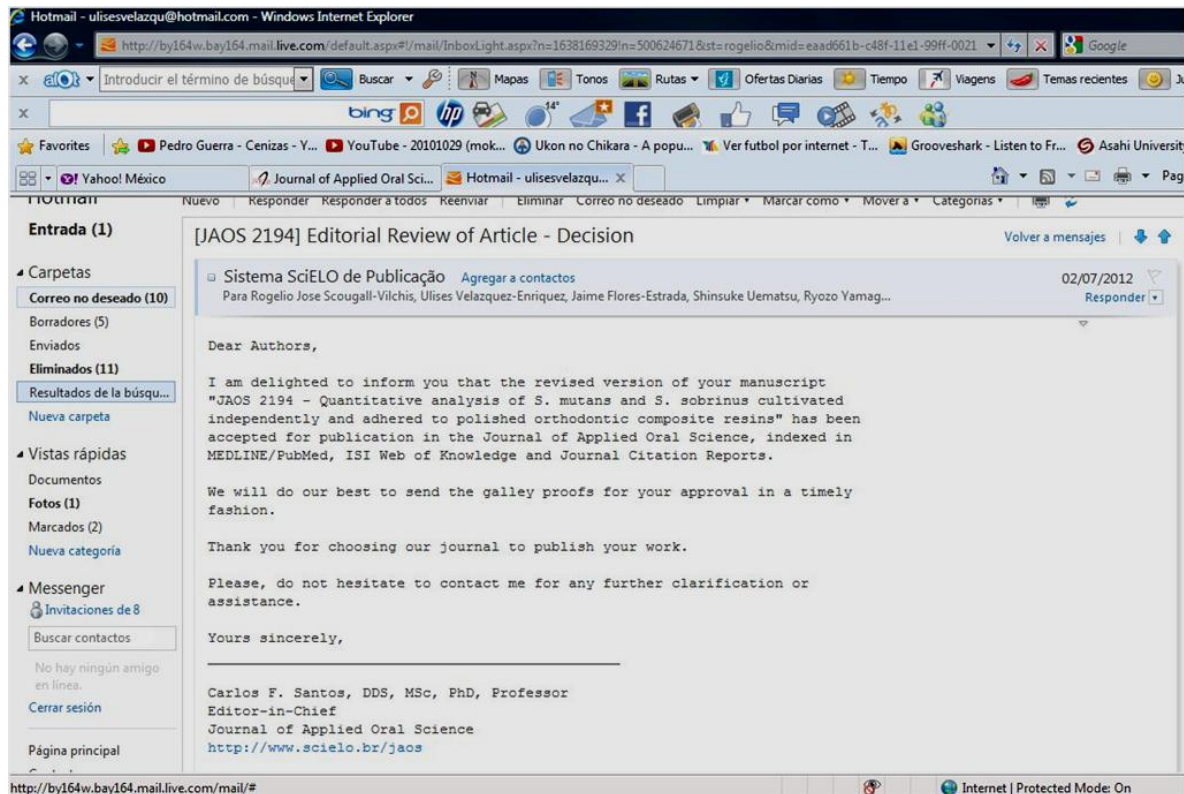
### INTRODUCTION

The increased plaque accumulation and the concomitant bacterial acid production resulted in the white spot lesions or incipient caries. This phenomenon starts on an enamel surface when there is a shift in the equilibrium between

decalcification by diffusion of the calcium and phosphate and remineralization<sup>10</sup>. The enamel demineralization is mainly caused by organic acids produced by various microorganisms. *S. mutans* and *S. sobrinus* were identified as the main pathogens in dental caries, and their presence increases the risk for enamel demineralization<sup>1,19</sup>.



## 9.1.2 Carta de aceptación



## 9.1.3 Resumen

Objetivo: En ortodoncia, la aparatología fija esta inmersa en un fluido como lo es la saliva, y es colonizada por microorganismos. El propósito de éste estudio fue determinar de manera independiente y cuantitativamente el nivel de colonización bacteriana de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* en resinas de prescripción ortodóncica. Materiales y Métodos: Siete resinas compuestas de prescripción ortodóncica para el cementado de brackets fueron seleccionadas y clasificadas en 14 grupos; (GIm, GIs) Enlight, (GIIm, GIIs) Grengloo, (GIllm, GIlls)



Kurasper F, (GIVm, GIVs) BeautyOrtho Bond, (GVm, GVs) Transbond CC, (GVIm, GVIs) Turbo Bond II, (GVIIIm, GVIIIs) Blugloo. Se elaboraron 60 bloques de 4 x 4 x 1 mm de cada resina compuesta (Total de 420 bloques), fueron gentilmente pulidos con papel abrasivo y limpiados ultrasonicamente. *S. mutans* y *S. sobrinus* fueron incubados y evaluados por separado. Para el análisis cuantitativo fue utilizado un radiomarcador para codificar las bacterias ( $^3\text{H}$ ) adheridas a la superficie de las resinas. Los bloques fueron sumergidos en una solución que contenía microorganismos previamente radiomarcados de manera independiente (210 bloques para *S. mutans* y 210 para *S. sobrinus*) durante 2 horas a 37° C. Acto seguido. Los bloques fueron colocados en un sistema de combustión capturando los residuos y midiendo el nivel de radioación. El análisis estadístico fue calculado con una prueba de ANOVA (Sheffè Post-hoc). Resultados: Diferencias estadísticamente significativas fueron encontradas entre grupos. Los grupos GIm y GIs obtuvieron los valores más bajos de adhesión bacteriana para ambos microorganismos; en contraste, los valores del grupo GVII para ambos microorganismos fueron significativamente los más altos. Conclusiones: Los hallazgos de éste estudio mostraron que la resina evaluada en los grupos GIm y GIs, obtuvo los valores más bajos de adherencia bacteriana, lo cual podría reducir la desmineralización del esmalte y el riesgo a la formación de lesión de mancha blanca.

#### 9.1.4 Abstract

Objective: In orthodontics, placement of fixed appliances in the oral cavity immersed in a fluid such as saliva, are colonized by microorganisms. The purpose of this study was to determinate quantitatively the independent bacterial colonization of *S. mutans* and *S.*

*sobrinus* in orthodontics composites resins. Materials and Methods: Seven orthodontic composites adhesives for bonding brackets were selected and classified in 14 groups; (GIm, GIs) Enlight, (GIIm, GIIs) Grengloo, (GIIM, GIIs) Kurasper F, (GIVm, GIVs) BeautyOrtho Bond, (GVm, GVs) Transbond CC, (GVIm, GVIs) Turbo Bond II, (GVIIIm, GVIIIs) Blugloo. 60 blocks of 4 x 4 x 1 mm of each orthodontic composite resin were made (Total 420 blocks), and gently polished with sand-paper and cleaned ultrasonically. *S. mutans* and *S. sobrinus* were cultivated independently. For the quantitative analysis, a radioactive marker was used to codify the bacteria (<sup>3</sup>H) adhered to the surface of the materials. The blocks were submerged in a solution with microorganisms previously radiolabeled and separated (210 blocks for *S. mutans* and 210 blocks for *S. sobrinus*) during 2 hours at 37°C. After that, the blocks were placed in a combustion system, capturing the residues and measure the radiation. The statistic analysis was calculated with ANOVA test (Sheffè Post-hoc). Results: Significant differences of bacterial adhesion were found amongst groups. In GIm and GIs the significant lowest scores for both microorganisms were shown; in contrast, the values of GVII for both bacteria were significantly the highest. Conclusions: This study showed that the orthodontic composite resin evaluated in GIm and GIs, obtained the lowest adherence of *S. mutans* and *S. sobrinus*, which may reduce the enamel demineralization and the risk of white spot lesion formation.

Key words: Radiolabeled. White spot lesion. Orthodontic composite resin. *S. mutans*. *S. sobrinus*.

#### 9.1.5 Introduction

The increased plaque accumulation and the concomitant bacterial acid production result in the white spot lesions or incipient caries, this phenomenon starts on an enamel surface when there is a shift in the equilibrium between decalcification by diffusion of calcium and phosphate and remineralization<sup>9</sup>. The enamel demineralization is caused by organic acids produced by various microorganisms mainly *S. mutans* and *S. sobrinus* identified as the main pathogens in dental caries, and their presence increases the risk for enamel demineralization<sup>6, 16</sup>. Therefore, adhesion of these bacteria to orthodontics composites resins or fixed appliances might influence the formation of pathogenic plaque and enamel demineralization during orthodontic treatment<sup>13</sup>. Several patients with orthodontic treatment have risk to development white spot lesions around brackets, this has been known perfectly from first month after brackets placement in ranges from 12.6% to 50%<sup>12</sup>. Orthodontic appliances can play a major role in enamel demineralization because they provide additional surface areas for bacterial adhesion, and their complex design impedes proper access to the tooth surfaces during cleaning orthodontic treatment, furthermore, the composition of the orthodontic composite resin, the oral pH and various microorganisms normally present in the oral cavity may influence the adhesion capacity of bacteria, formation of plaque, which increases the risk of demineralization in enamel, particularly in areas around the appliances such as brackets<sup>3, 5, 19</sup>.

The orthodontic adhesives remaining on the enamel surface around the bracket are known to be risk factors for predisposition to enamel demineralization because the rough adhesive surface can provide a site for the rapid growth of oral microorganisms<sup>8</sup>.

The aim of this investigation was to determine and compare quantitatively the independent bacterial colonization of *S. mutans* and *S. sobrinus* in seven polished orthodontic composite resins.

#### 9.1.6 Materials and methods

##### Orthodontic composite resins

Seven commercial orthodontic composite resins for bonding brackets were employed and classified in 14 groups: (GI<sub>m</sub>, GI<sub>s</sub>) Enlight (Ormco Corp., Orange, U.S.A); (GII<sub>m</sub>, GII<sub>s</sub>) Grelgloo (Ormco Corp.); (GIII<sub>m</sub>, GIII<sub>s</sub>) Kurasper F (Kuraray, Medical, Tokyo, Japan); (GIV<sub>m</sub>, GIV<sub>s</sub>) BeautyOrtho Bond (Shofu, Kyoto, Japan); (GV<sub>m</sub>, GV<sub>s</sub>) Transbond CC (3M Unitek, Monrovia, U.S.A.); (GVII<sub>m</sub>, GVII<sub>s</sub>) Turbo Bond II (TP Orthodontics, LaPorte, Ind., U.S.A.); (GVIII<sub>m</sub>, GVIII<sub>s</sub>) Blugloo (Ormco Corp.).

##### Samples Preparation

A total of 420 resin blocks (210 block for *S. mutans*, 210 blocks for *S. sobrinus* with 30 blocks for each group of orthodontic composite resin), were made filling into a Teflon mold (4 x 4 x 1 mm), covered with micro-slide glass and irradiated with visible light curing unit device (Ortholux, 3M Unitek) for 60 seconds to polymerize each resin block, the surface blocks were polished with 2000 and 1000 grit sand-paper sheets, cleaned ultrasonically and sterilized with ethylene oxide gas.

##### Radiolabeled bacteria and culture conditions

*S. mutans* ATCC25165 and *S. sobrinus* ATCC33478 were maintained as frozen stock cultures, and cultured anaerobically at 37° C in a semisolid trypticase soy broth (BBL, Cockeysville, MD, USA) and yeast extract (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) for 18 hours. After, the microorganisms were anaerobically inoculated each of one separately from TSBY semisolid to 150 ml of TSBY liquid with a radioactive marker used to codify the microorganism, 74 kBq of [6-<sup>3</sup>H] thymidine (GE healthcare U.S.A.), and cultured by 18 hours at 37° C. After that, the bacteria was collected by centrifugation at 12 000 rpm for 15 minutes into 0.05M phosphate buffer saline (PBS) adjusted to pH 7.0, and washed three times with PBS. The concentration of *S. mutans* and *S. sobrinus* were 10<sup>5</sup> CFU/ml.

### Samples analysis

The blocks of orthodontic composite resin were suspended from the cap of a glass mold and submerged in 150 ml of *S. mutans* (210 blocks) and *S. sobrinus* (210 blocks) radiolabeled fluid respectively at 37° C for 2 hours in constant movement. To remove the bacteria non-adhering, the blocks of orthodontic composite resins were removed of the glass mold and washed three times with PBS.

The radiolabeled bacteria adhered to the orthodontic composite resins blocks were recollected by an automatic sample combustion equipment, and the score measured using a liquid scintillation counter (LSC-900, Aloka, Tokyo, Japan); which, the values

were recorded in disintegration per minute (dpm), this measurement was repeated three times to respect the reliability of results.

### Statistical analysis

Parametric tests with descriptive statistics mean and variance for quantitative variables were used in this test by one-way analysis of variance (ANOVA) with a *post hoc* test (Sheffè) for multiple comparisons. A probability of equal or less than 0.05 for similarity of distribution was considered to be significantly different.

### 9.1.7 Results

#### Bacterial adhesion of *S. mutans*

The adherence of *S. mutans* radiolabeled to orthodontic composite resins were significantly different between groups ( $p \leq 0.05$ ). The scores expressed in disintegration per minute (dpm) are shown in Table 1 and Figure 1. The value of group GI<sub>m</sub> (1577.35 dpm) was significantly the lowest followed by group GII<sub>m</sub> (3393.76 dpm). The values of group GIII<sub>m</sub> (3393.76 dpm) and GIV<sub>m</sub> (3515.56 dpm) were not significant. The value of group GVII<sub>m</sub> (5155.85 dpm) was significantly the highest.

#### Bacterial adhesion of *S. sobrinus*

The bacterial adhesion of *S. sobrinus* radiolabeled to orthodontic composite resins were also significantly different between groups ( $p \leq 0.05$ ). The scores are shown in Table 2 and Figure 2. The value of group GI<sub>s</sub> (457.86 dpm) was significantly the lowest followed by group GIII<sub>s</sub> (1034.70 dpm). The values of group GII<sub>s</sub> (1405.50 dpm), GIII<sub>s</sub> (1034.70

dpm) GIVs (1437.21 dpm) and GVIs (1114.95 dpm) were not significant between each other. The value of group GVIs (6087.06 dpm) was significantly the highest.

#### 9.1.8 Discussion

White spot lesions are the first sign of enamel demineralization, this phenomena is associated to adjacent areas around of fixed orthodontic appliances, because the orthodontic appliances provide additional surface areas for bacterial colonization; furthermore, their complex design impedes an adequate cleaning, specifically the orthodontic composite resins are materials placed onto the enamel surface that is commonly affected for demineralization (white spot lesion) and caries<sup>1, 3</sup>. Various species of bacteria are involved in the formation of dental biofilm and white spot lesions which are caused by acids produced mainly by cariogenic bacterial<sup>10</sup>. Previous studies reported that patients with orthodontic treatment normally present elevated levels of *S. mutans*, and *S. sobrinus*, this alteration in the oral flora can increase the risk of dental caries<sup>12, 23</sup>, on the other hand, studies *in vivo* have reported that presence of these microorganisms are also found on healthy surfaces, and its presence does not always indicate an active process of caries; however, an increased number of these microorganisms on any surface might augment the risk of developing caries lesions<sup>2, 4</sup>.

The bacterial adhesion of these bacteria to orthodontic composite resins is due to electrostatic, hydrophobic interaction and van der Waals forces, also it has been reported that the adhesion of cariogenic *streptococcus* to orthodontic composite resins is higher than orthodontics appliances, this colonization might play a role in the development of cariogenic plaque and remaining bacteria around fixed appliances can

grow rapidly on tooth surfaces<sup>7</sup>. Therefore, this study was performed to determine specifically the level of *S. mutans* and *S. sobrinus* adhered on orthodontic composite resins, cultured and tested independently, because both microorganisms are considered the main responsible for causing dental caries, and are also the greatest producer of acid that causes enamel demineralization<sup>19</sup>.

For this investigation, the samples were not coated with saliva because previous studies<sup>24, 25</sup> had described that saliva coating did not significantly alter the adhesion patterns of *S. mutans* and *S. sobrinus*. This phenomenon is consistent with other investigations showing that saliva coating did not significantly alter the adhesion of *streptococci* to the underlying materials<sup>5, 19</sup>.

The equipment and methodology used in this research, such as the automatic sample combustion machine and the liquid scintillation counter device for measuring <sup>3</sup>H, had been amply described by Hülsen<sup>14</sup> (1970), Saku, *et al.*<sup>20</sup> (2010), and Nagayama, *et al.*<sup>17</sup> (2001), as well as the results expressed and recorded in disintegration per minute (dpm). In this sense, a higher value of dpm means higher radioactivity and therefore higher adherence of a radiolabeled microorganism is found. In contrast, lower values of dpm indicate lesser adherence of the radiolabeled microorganism.

The results (Tables 1 and 2) in this study showed that the groups GI<sub>m</sub> (1577.35 dpm) and GI<sub>s</sub> (457.86 dpm) were lowest bacterial adherence and a statistically significant ( $p \leq 0.05$ ) in comparison with the other groups for both microorganisms, in the same



mode, GVIIIm (5155.85 dpm) and GVIIIs (6087.06 dpm) had the highest bacterial adherence; in general, the level of bacterial adhesion to the materials tested was greater for *S. mutans* than for *S. sobrinus* except for GVIIIs which had more affinity for *S. sobrinus*, these findings are different of other studies<sup>7, 22, 24, 25</sup>. A similar research by Sug-Joon, Bum-Soon and Shin-Jae<sup>24</sup> (2010), reported that in general the bacterial adhesion to orthodontic materials, particularly more to orthodontic composite resins and brackets was greater for *S. mutans* than for *S. sobrinus*, concluding that different strains have a different amounts of adhesion, even though they belong to the same species. The results in this study are similar in six groups (in ranges from group GIIm to GVIIIm, and from GIs to GVIs). However, the findings in groups GVIIIm and GVIIIs demonstrated that the values were greater for *S. sobrinus* than for *S. mutans*, which suggest strongly an affinity amongst *S. sobrinus* and the orthodontic composite resin tested in groups GVIIIm and GVIIIs (Blugloo).

In this study differences in the amount of the bacterial adhesion can be explained by diverse surface characteristics of each type of orthodontic composite resin, the surface characteristics of the materials are known to influence the adhesion of bacteria to surface roughness; therefore, materials with a polished surface provide the same condition for a test bacterial colonization<sup>24</sup>. Although all surfaces were polished, the samples of orthodontic composites resins shown different regularities on the surfaces associated with variable bacterial adhesion, literature suggests that the filler modifies the surface of orthodontic composite resins<sup>3</sup>, an investigation about filler volume (wt%), filler size, and composition of various orthodontic composite resins demonstrated no

effect on the adhesion as that of *S. mutans* or *S. sobrinus*<sup>25</sup>, similar findings are comparable with Groups GIm and GIs, which showed roughness that seemed not to be susceptible to bacterial adhesion compared with the others groups that also had irregularities on surfaces. The orthodontic composite resins tested in this study were light-cured; the resin evaluated in the groups: GIm and GIs presented the lowest value of dpm for both microorganisms respectively; in other words, significantly lowest quantity of *S. mutans* and *S. sobrinus* were adhered to this composite resin when compared with other groups. This findings are similar with a previous study<sup>25</sup>, which evaluated the same composite resin and demonstrated the lowest bacterial adherence, when tested and compared with others materials with antimicrobial properties. Several materials for bonding brackets have antimicrobial properties; however, in previous investigations, some orthodontic composite adhesives had showed no statistically significant differences<sup>7, 15, 22</sup>.

No significant statistically differences was found in the comparison between groups GIIIm and GIVIm, as well as GVIm and GVIIIm, when *S. mutans* adherence was evaluated; in the same sense the groups GIIs, GIIs, GIVs, GVIs no significant differences was found. Although three of the seven resins analyzed are manufactured by the same company, they have shown diverse bacterial adherence, probably due to their different compositions, filler sizes, and properties. Further studies are warrant to analyze the biological and bacteriostatic effects of the composite resins on the microorganism adhered. Nevertheless, the groups GVIIIs and GVIIIm showed the significantly highest

value of *S. mutans* and *S. sobrinus* adherence, indicating superior risk to enamel demineralization and decay.

Previous studies<sup>14, 20</sup> *in vitro* models had assay adherence of microorganisms on dental materials, reporting that a surface roughness is the main determinants of the bacterial adhesion. To minimize the effect of surface roughness on adhesion in this investigation, all surfaces were polished equally, nevertheless, in previous assessments (data not shown), in which the surfaces were untreated (not polished), the groups GI<sub>m</sub> and GI<sub>s</sub> shown the lowest bacterial adherence and GVI<sub>m</sub>, GVI<sub>s</sub> the highest adherence of microorganisms. Therefore, the polish effects seem to be irrelevant for these groups.

Based on the findings obtained in this study, it was clearly that the orthodontic composite resin tested in the groups GI<sub>m</sub> and GI<sub>s</sub>, exhibited desirable properties obtaining the lowest bacterial adhesion, this suggest to the clinic in orthodontics daily practice that the use of this composite resin might reduce the white spot lesions and caries formation during orthodontic treatment and might also be suitable from a clinical preventive point of view. In contrast, the composite resin analyzed in the groups GVI<sub>m</sub> and GVI<sub>s</sub>, showed the highest adhesion; this is theoretically an unfavorable characteristic; in this context, if translated into clinical performance, this suggests that this material can be associated with increased incidence of decalcification around fixed appliances. From a clinical point of view, it seems that various orthodontic composite resins have different levels on the adhesion of *S. mutans* and *S. sobrinus*. However, these data are difficult to directly apply to the clinical situation, because the materials

and their characteristics are variable, according to the manufacturers. In addition, the adhesion amount of oral bacteria can be significantly influenced by the complexity of the appliances and treatment.

Future studies with *S. mutans* and *S. sobrinus* examined jointly and using different radio markers for codify the bacteria, are required to accurately compare the adhesion of these microorganisms to a different orthodontic composites resins.

#### 9.1.9 Conclusions

This study was undertaken to analyze the level of bacterial adhesion to orthodontic composites resins. The results showed that groups GI<sub>m</sub> and GI<sub>s</sub> had the lowest quantity of *S. mutans* and *S. sobrinus* adherence respectively in an assessment carried out by separately. On the other hand, the highest level of bacteria adhesion was observed in groups GVII<sub>m</sub> and GVII<sub>s</sub>. The outcomes suggest a significant affinity of *S. sobrinus* to adhere to group GVII<sub>s</sub>. This research provides valuable information for identifying the orthodontic composite resin with minor risk to develop white spot lesions and caries formation.

#### 9.1.10 Acknowledges

We would like to thank the National Council of Science and Technology in Mexico and Asahi University, Gifu, Japan for provide support in this study.

#### 9.1.11 Table 1.

**Table 1** Quantitative Test to *S. mutans* by radiolabeled ( $^3\text{H}$ )

| Adhesive         | DPM*<br>Mean | SD**   | Sheffè<br>Test*** |
|------------------|--------------|--------|-------------------|
| Enlight          | 1577.35      | 144.57 | A                 |
| Grengloo         | 3393.76      | 113.85 | B                 |
| Kurasper F       | 3989.56      | 758.34 | C                 |
| BeautyOrtho Bond | 3515.56      | 299.86 | B                 |
| Transbond CC     | 4693.63      | 346.48 | D                 |
| Turbo Bond       | 4790.68      | 265.93 | D                 |
| Blugloo          | 5155.85      | 40.49  | E                 |

\* DPM (Desintegration per Minute)

\*\* SD (Standard Deviation)

\*\*\* Composites orthodontic resins with different letters are significantly different from each other.

#### 9.1.12 Table 2

**Table 2** Quantitative Test to *S. sobrinus* by radiolabeled ( $^3\text{H}$ )

| Adhesive         | DPM*<br>Mean | SD**    | Sheffè<br>Test*** |
|------------------|--------------|---------|-------------------|
| Enlight          | 457.86       | 88.35   | A                 |
| Grengloo         | 1405.5       | 205.24  | B                 |
| Kurasper F       | 1034.7       | 80.41   | B                 |
| BeautyOrtho Bond | 1437.21      | 200.48  | B                 |
| Transbond CC     | 2056.05      | 25.95   | C                 |
| Turbo Bond       | 1114.95      | 88.61   | B                 |
| Blugloo          | 6087.06      | 1290.64 | D                 |

\* DPM (Desintegration per Minute)

\*\* SD (Standard Deviation)

\*\*\* Composites orthodontic resins with different letters are significantly different from each other.

#### 9.1.13 REFERENCES

- 1- Ahn SJ, Kho HS, Kim KK, Nahm DS. Adhesion of oral streptococci to experimental bracket pellicles from glandular saliva. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003;124:198-205.
- 2- Ahn SJ, Kho HS, Lee SW, Nahm DS. Roles of salivary proteins in the adherence of oral streptococci to orthodontic brackets. *J Dent Res.* 2002;81:411-5.
- 3- Ahn SJ, Lim BS, Lee SJ. Surface characteristics of orthodontic adhesives and effects on streptococcal adhesion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010;137(4):489-95.
- 4- Ahn SJ, Lim BS, Lee YK, Nahm DS. Quantitative determination of adhesion patterns of cariogenic streptococci to various orthodontic adhesives. *Angle Orthod.* 2006;76(5):869-75.
- 5- Ahn SJ, Lim BS, Yang HC, Chang YI. Quantitative analysis of the adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic metal brackets. *Angle Orthod.* 2005;75:666-71.
- 6- An YH, Friedman RJ. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *J Microbiol Methods.* 1997;30:141-52.
- 7- Artun J, Brobakken BO. Prevalence of caries and white spots after orthodontic treatment with multibonded appliances. *Eur J Orthod.* 1986;8:229-34.
- 8- Babaahmadi KG, Challacombe SJ, Marsh PD, Newman AN. Ecological study of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus spp.* at sub-sites from approximal dental plaque from children. *Caries Res.* 1998;32:51-8.
- 9- Derks A, Katsaros C, Frencken JE, van't Hof MA, Kuijpers-Jagtman AM. Caries-inhibiting effect of preventive measures during orthodontic treatment with fixed appliances. A systematic review. *Caries Res.* 2004;38(5):413-20.

- 10- Featherstone JD. The continuum of dental caries - evidence for a dynamic disease process. J Dent Res. 2004;83(Sp. Iss.):C39-42.
- 11- Featherstone JD. The science and practice of caries prevention J Am Dent Assoc. 2000;131(7):887-99.
- 12- Fletcher M. Methods for studying adhesion and attachment to surfaces. Methods Microbiol. 1990;22(1):251-83.
- 13- Franco e Franco TC, Amoroso P, Marin JM, Avila FA. Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples from Brazilian preschool children by polymerase chain reaction. Braz Dent J. 2007;18(4):329-33.
- 14- Gorelick L, Geiger AM, Gwinnett AJ. Incidence of white spot formation after bonding and banding. Am J Orthod. 1982;81(2):93-8.
- 15- Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. Microbiol Rev. 1980;44(2):331-84.
- 16- Korbmacher HM, Huck L, Kahl-Nieke B. Fluoride-releasing adhesive and antimicrobial self-etching primer effects on shear bond strength of orthodontic brackets. Angle Orthod. 2006;76(5):845-50.
- 17- Lee SP, Lee SJ, Lim BS, Ahn SJ. Surface characteristics of orthodontic materials and their effects on adhesion of mutans streptococci. Angle Orthod. 2009;79(2):353-60.
- 18- Lim BS, Lee SJ, Lee JW, Ahn SJ. Quantitative analysis of adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic raw materials. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2008;133(6):882-8.
- 19- Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev. 1986;50(4):353-80.

- 20- Mota SM, Enoki C, Ito IY, Elias AM, Matsumoto MA. *Streptococcus mutans* counts in plaque adjacent to orthodontic brackets bonded with resin-modified glass ionomer cement or resin-based composite. *Braz Oral Res.* 2008;22(1):55-60.
- 21- Nagayama M, Sato M, Yamaguchi R, Tokuda C, Takeuchi H. Evaluation of co-aggregation among *Streptococcus mitis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. *Lett Appl Microbiol.* 2001;33(2):122-5.
- 22- Quirynen M, Marechal M, Busscher HJ, Weerkamp AH, Darius PL, van Steenberghe D. The influence of surface free energy and surface roughness on early plaque formation: an *in vivo* study in man. *J Clin Periodontol.* 1990;17(3):138-44.
- 23- Rahim ZH, Thurairajah N. Scanning electron microscopic study of *Piper betle* L. leaves extract effect against *Streptococcus mutans* ATCC 25175. *J Appl Oral Sci.* 2011;19(2):137-46.
- 24- Rosenbloom RG, Tinanoff N. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients before, during, and after orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1991;100(1):35-7.
- 25- Saku S, Kotake H, Scougall-Vilchis RJ, Ohashi S, Hotta M, Horiuchi S, et al. Antibacterial activity of composite resin with glass-ionomer filler particles. *Dent Mater J.* 2010;29(2):193-8.
- 26- Scougall-Vilchis RJ, Hotta Y, Hotta M, Idono T, Yamamoto K. Examination of composite resins with electron microscopy, microhardness tester and energy dispersive x-ray microanalyzer. *Dent Mater J.* 2009;28(1):102-12.



27- Stratemann MW, Shannon IL. Control of decalcification in orthodontic patients by daily self-administered application of a water-free 0.4 per cent stannous fluoride gel. Am J Orthod. 1974;66(3):273-9.

28- Tabchoury CP, Sousa MC, Arthur RA, Mattos-Graner RO, Del Bel Cury AA, Cury JA. Evaluation of genotypic diversity of *Streptococcus mutans* using distinct arbitrary primers. J Appl Oral Sci. 2008;16(6):403-7.

## 9.2 SEGUNDO ARTÍCULO

Velazquez-Enriquez U, Scougall-Vilchis RJ, Contreras-Bulnes R, Uematsu S, Yamaguchi R. Adhesion of *Streptococci* to various orthodontic composite resins. Austral Den J (in press)

### 9.2.1 Página frontal del Manuscrito (Prueba de galera)



## Adhesion of *Streptococci* to various orthodontic composite resins

U Velazquez-Enriquez,<sup>\*</sup> RJ Scougall-Vilchis,<sup>†</sup> R Contreras-Bulnes,<sup>‡</sup> J Flores-Estrada,<sup>§</sup> S Uematsu,<sup>¶</sup> R Yamaguchi<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Health Sciences, School of Medicine, Autonomous University State of Mexico, Toluca City, Mexico.

<sup>†</sup>Department of Orthodontics, Dental Research Center, School of Dentistry, Autonomous University State of Mexico, Toluca City, Mexico.

<sup>‡</sup>Dental Research Center, School of Dentistry, Autonomous University State of Mexico, Toluca City, Mexico.

<sup>§</sup>School of Chemistry, Autonomous University State of Mexico, Toluca City, Mexico.

<sup>¶</sup>Private Practice, Gifu, Japan.

<sup>\*\*</sup>Institute of Radiocrope, Aichi University School of Dentistry, Gifu, Japan.

### ABSTRACT

**Background:** This investigation aimed to determine quantitatively the adhesion of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* to orthodontic composite resins that were tested simultaneously using radio-markers.

**Methods:** Seven orthodontic composite resins were classified into seven groups: BeautyOrtho Bond (GI), Blugloo (GII), Enlight (GIII), Grengloo (GIV), Kurasper F (GV), Transbond CC (GVI) and Turbo Bond II (GVII). Thirty 4 x 4 x 1 mm blocks of each orthodontic composite resin were made (a total of 210 blocks). Both *Streptococcus* species were cultivated independently. For the quantitative analysis, radioactive markers were used to codify the bacteria (<sup>3</sup>H for *Streptococcus mutans* and <sup>14</sup>C for *Streptococcus sobrinus*). The blocks were submerged in a solution with microorganisms previously radiolabelled for 2 hours at 37 °C in constant movement. The blocks were placed in a combustion system to quantify the *Streptococcus* adhering to the surface of the materials by capturing the residues and measuring the radiation.

**Results:** Significant differences in bacterial adhesion were found among the groups. The lowest significant scores for both microorganisms were observed in GIII.

**Conclusions:** The orthodontic composite resin evaluated in GIII exhibited the lowest adhesion of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, which may reduce enamel demineralization and the risk of white spot lesion formation.

**Keywords:** Orthodontic composite resin, radiolabelled, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, white spot lesion.

**Abbreviations and acronyms:** ANOVA = analysis of variance; dpm = disintegration per minute; PBS = phosphate buffered saline; RTP = reduced transport fluid.

(Accepted for publication 23 July 2012.)

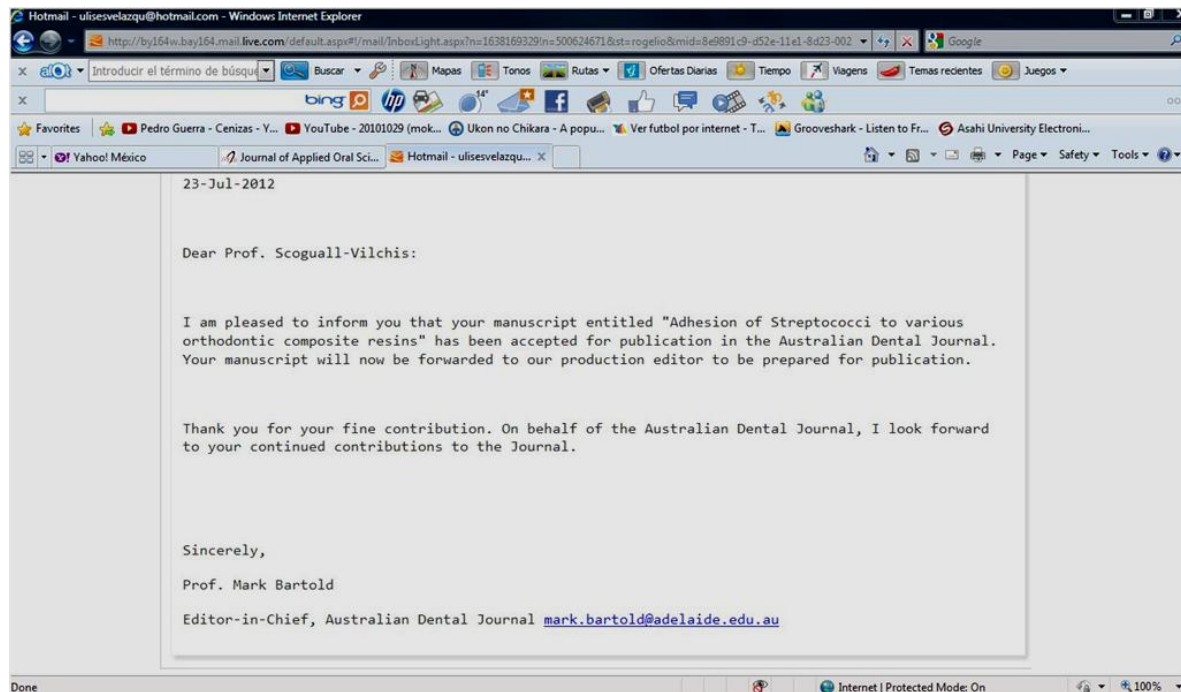
### INTRODUCTION

In orthodontics, materials made of composite resins are traditionally used for bonding brackets.<sup>1</sup> Fixed orthodontic appliances are a significant challenge to patients who undergo orthodontic treatment in terms of maintaining good oral hygiene and avoiding or minimizing decalcification of enamel during treatment.<sup>2</sup> A contributor to the success of fixed appliance therapy is the reliable attachment of bonded components to the teeth; however, bacterial adhesion to biomaterial surfaces constituting the bracket-adhesive-enamel junction represents a growing problem in orthodontics.<sup>3</sup> Furthermore, orthodontic adhesives remaining on the enamel surface around the bracket are known to be risk factors for predisposition to enamel demineralization because the rough adhesive

surface can provide a site for the rapid growth of oral microorganisms that cause demineralization of the enamel surface around the brackets.<sup>4</sup> Some patients are at risk of developing white spot lesions around brackets, which have been found from the first month after bracket placement and range from 12.6% to 50%.<sup>5</sup>

Dental caries starts on an enamel surface when there is a shift in the equilibrium between demineralization and remineralization.<sup>6</sup> Enamel demineralization is caused by organic acids produced by various microorganisms, mainly *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, which are identified as the main pathogens in dental caries.<sup>2</sup> The formation of white spot lesions, commonly called incipient caries, is an aesthetic common side effect of orthodontic treatment with fixed appliances.<sup>7</sup> Despite intensive

## 9.2.2 Carta de aceptación



## 9.2.3 Resumen

**Introducción:** El propósito de ésta investigación es determinar cuantitativamente la adhesión de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* en siete resinas compuestas de prescripción ortodóncica, examinadas simultáneamente mediante el uso de radiomarcadores.

**Materiales y Métodos:** Siete resinas compuestas de prescripción ortodóncica fueron clasificadas en siete grupos: BeautyOrtho Bond (GI), Blugloo (GII), Enlight (GIII), Grengloo (GIV), Kurasper F (GV), Transbond CC (GVI), and Turbo Bond II (GVII).

Fueron elaborados 30 bloques de resina de 4 x 4 x 1 mm de cada grupo de resina (un total de 210 bloques). Ambos *Streptococcus* fueron cultivados independientemente. Para el análisis cuantitativo se utilizaron radiomarcadores para codificar las bacterias ( $^3\text{H}$  for *Streptococcus mutans* and  $^{14}\text{C}$  for *Streptococcus sobrinus*) Los bloques fueron sumergidos en una solución con microorganismos previamente radiomarcados durante 2 horas a  $37^\circ\text{C}$  en constante movimiento. Los bloques se colocaron en un sistema de combustión para cuantificar los *Streptococcus* adheridos a la superficie de las resinas mediante la lectura de la radiación de los residuos incinerados.

*Resultados:* Diferencias estadísticamente significativas fueron encontradas entre los grupos. Los valores más bajos de adherencia bacteriana para ambos microorganismos fueron observadas en el grupo GIII.

*Conclusiones:* La resinas compuesta de prescripción ortodóncica evaluada en el grupo GIII mostró los valores más bajos de adhesión de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, lo cual podría reducir la desmineralización del esmalte dental y el riesgo a desarrollar lesiones de mancha blanca y caries.

#### 9.2.4 Abstract

*Background:* This investigation aimed to determine quantitatively the adhesion of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* to orthodontic composite resins, tested simultaneously using radiomarkers.

*Materials and Methods:* Seven orthodontic composite resins were classified into seven groups: BeautyOrtho Bond (GI), Blugloo (GII), Enlight (GIII), Grengloo (GIV), Kurasper F (GV), Transbond CC (GVI), and Turbo Bond II (GVII). Thirty 4 x 4 x 1 mm blocks of

each orthodontic composite resin were made (a total of 210 blocks). Both *Streptococcus* species were cultivated independently. For the quantitative analysis, radioactive markers were used to codify the bacteria ( $^3\text{H}$  for *Streptococcus mutans* and  $^{14}\text{C}$  for *Streptococcus sobrinus*). The blocks were submerged in a solution with microorganisms previously radiolabeled for 2 hours at  $37^\circ\text{C}$  in constant movement. The blocks were placed in a combustion system to quantify the *streptococcus* adhering to the surface of the materials, by capturing the residues and measuring the radiation. *Results:* Significant differences in bacterial adhesion were found among the groups. The lowest significant scores for both microorganisms were observed in GIII. *Conclusions:* The orthodontic composite resin evaluated in GIII exhibited the lowest adhesion of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, which may reduce enamel demineralization and the risk of white spot lesion formation.

Key words: Orthodontic composite resin, radiolabeled, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, white spot lesion.

### 9.2.5 Introduction

In orthodontics, materials made of composite resins are traditionally used for bonding brackets.<sup>1</sup>

Fixed orthodontic appliances are a significant challenge to patients who undergo orthodontic treatment, in terms of maintaining good oral hygiene and avoiding or minimizing decalcification of enamel during treatment.<sup>2</sup> A contributor to the success of fixed-appliance therapy is the reliable attachment of bonded components to the teeth; however, bacterial adhesion to biomaterial surfaces constituting the bracket-adhesive-

enamel junction represents a growing problem in orthodontics.<sup>3</sup> Furthermore, orthodontic adhesives remaining on the enamel surface around the bracket are known to be risk factors for predisposition to enamel demineralization, because the rough adhesive surface can provide a site for the rapid growth of oral microorganisms that cause demineralization of the enamel surface around the brackets.<sup>4</sup> Some patients are at risk of developing white spot lesions around brackets, which have been found from the first month after bracket placement in ranges from 12.6% to 50%.<sup>5</sup>

Dental caries starts on an enamel surface when there is a shift in equilibrium between demineralization and remineralization.<sup>6</sup> Enamel demineralization is caused by organic acids produced by various microorganisms, mainly *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, identified as the main pathogens in dental caries.<sup>2</sup> The formation of white spot lesions, commonly called incipient caries, is an unesthetic common side effect of orthodontic treatment with fixed appliances.<sup>7</sup> Despite intensive efforts to educate patients on effective oral hygiene procedures, enamel demineralization associated with fixed orthodontic appliances remains a significant clinical problem.<sup>8</sup>

Ecological changes observed in the oral cavity, such as a low pH environment and increased retentive sites for bacterial adhesion, are probably responsible for postorthodontic-treatment decalcification.<sup>8,9</sup>

Previous studies<sup>9,10</sup> have reported that composite resins tend to accumulate more bacteria or plaque than do other restorative materials *in vitro* and *in vivo*. Differences in the amount of bacterial adhesion can be explained by the diverse surface characteristics of each type of orthodontic composite resin.<sup>11</sup>

The aim of this investigation was to determine and compare, quantitatively and jointly, the adhesion of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in seven polished composite orthodontic resins.

#### 9.2.6 Materials and methods

##### Orthodontic composite resins

Seven commercial orthodontic composite resins for bonding brackets were employed and classified into seven groups: BeautyOrtho Bond (GI) [Shofu, Kyoto, Japan], Blugloo (GII) [Ormco Corp., Orange, U.S.A], Enlight (GIII) [Ormco Corp.], Grengloo (GIV) [Ormco Corp.], Kurasper F (GV) [Kuraray, Medical, Tokyo, Japan], Transbond CC (GVI) [3M Unitek, Monrovia, U.S.A.], and Turbo Bond II (GVII) [TP Orthodontics, LaPorte, Ind., U.S.A.].

##### Preparation of samples

A total of 210 resin blocks (30 blocks for each group of orthodontic composite resin, tested at the same time for *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*) were made by filling into a Teflon mold (4 x 4 x 1 mm), covered with microslide glass and irradiated with a visible light curing unit device (Ortholux, 3M Unitek) for 60 seconds to polymerize each resin block. The surface of the blocks was polished with 2000 and 1000 grit sandpaper sheets, cleaned ultrasonically, and sterilized with ethylene oxide gas.

##### Radiolabeled bacteria and culture conditions

*Streptococcus mutans* ATCC25165 and *Streptococcus sobrinus* ATCC33478 were maintained as frozen stock cultures and were cultured anaerobically at 37°C in a

semisolid trypticase soy broth (BBL, Cockeysville, MD, USA) and yeast extract (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) for 18 hours. The microorganisms were then anaerobically inoculated, each one separately from trypticase soy broth and yeast extract (TSBY) semisolid to 150 ml of TSBY liquid with a radioactive marker used to codify the microorganism: Thymidine [methyl-<sup>3</sup>H] (specific activity, 2.22 to 2.96 T Bq/mmol American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis U.S.A.) was used at a final concentration of 74 kBq/ml for radioactive labeling of samples with *Streptococcus mutans*. For radioactive labeling of samples with *Streptococcus sobrinus*, Thymidine [2-<sup>14</sup>C] (specific activity, 1.85 to 2.22 G Bq/mmol American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis U.S.A.) was used at a final concentration of 37 KBq/ml. The microorganisms were then cultured for 18 hours at 37°C. After incubation, the bacteria were collected by centrifugation at 8000 g for 15 minutes at 4 C° into 0.05 M phosphate buffer saline (PBS) adjusted to pH 7.0, and washed three times with PBS. The concentration of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* was 10<sup>5</sup> CFU/ml.

Both *streptococci* were adjusted to a cell suspension of 1×10<sup>5</sup> CFU/ml with reduced transport fluid (RTF). Each sample was immersed in this suspension and anaerobically inoculated for 18 hours. The bacterial suspension was estimated by culturing on TSBY agar plates, either undiluted or diluted 10-fold, and incubated at 37°C for 4 days. The exact number of colonies was counted in 10 samples for each material.

#### Sample analysis

The blocks of orthodontic composite resin (a total of 210 blocks) were suspended from the cap of a glass mold and submerged in 150 ml of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* radiolabeled fluid, separately, at 37°C for 2 hours in constant



movement. To remove the nonadhering bacteria, the blocks were removed and washed thrice with PBS. The radiolabeled bacteria that adhered to the blocks were re-collected by an automatic sample combustion equipment (ACS-113B Hitachi-Aloka, Tokyo, Japan), the blocks of each orthodontic composite resin were combusted in oxygen to tritiated water and  $^{14}\text{CO}_2$  for direct collection, capturing the radioactivity as water in aquasol-2 into a glass bottle, and the scores were measured using a liquid scintillation counter (LSC-900, Aloka, Tokyo, Japan). The liquid scintillation counter (LSC-900, Aloka, Tokyo, Japan) used in this study employ the “liquid scintillation counting method” this technique is the most sensitive and versatile for the detection and measurement of radioactivity. It is applicable to  $^3\text{H}$ , and  $^{14}\text{C}$  radionuclides. It is possible to measure simultaneous assay of  $^3\text{H}$ , and  $^{14}\text{C}$  in double-isotope biological samples. Values were recorded in disintegration per minute (dpm). This process was repeated three times to ensure the reliability of the results. High dpm values mean greater adhesion of *Streptococci*.

#### Statistical analysis

Parametric tests with descriptive statistics, such as mean and variance for quantitative variables, were used in this test by one-way analysis of variance (ANOVA), with a post hoc test (Sheffè) for multiple comparisons. A probability equal to or less than 0.05 for similarity of distribution was considered to be significantly different.

#### 9.2.7 Results

##### Adhesion of *Streptococcus mutans*

The adhesion of radiolabeled *Streptococcus mutans* to orthodontic composite resins was significantly different between groups ( $p \leq 0.05$ ). Table 1 shows the scores (in dpm). The score of GIII (779.30 dpm) was significantly the lowest, followed by that of GIV (1533.25 dpm). The scores of GI (1626.62 dpm), GIV (1533.25 dpm), GV (1625.26 dpm), GVI (1719.18 dpm), and GVII (1701.32 dpm) were not significant. The score of GII (2074.76 dpm) was significantly the highest.

#### Adhesion of *Streptococcus sobrinus*

The bacterial adhesion of *Streptococcus sobrinus* radiolabeled to the orthodontic composite resins was also significantly different between groups ( $p \leq 0.05$ ). Table 2 shows the scores of the groups. The score of GIII (640.61 dpm) was significantly the lowest, followed by GVI (1169.13 dpm). The scores of GI (1260.54 dpm), GV (1170.38 dpm), GVI (1169 dpm), and GVII (1172.79 dpm) were not significant, while the score of GIV (1396.18 dpm) was significantly different from the others, with an intermediate value of dpm. The score of GII (1535.30 dpm) was significantly the highest.

#### 9.2.8 Discussion

Previous studies have reported that patients with orthodontic treatment normally present elevated levels of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, and this alteration in the oral flora can increase the risk of dental caries.<sup>5,14</sup> However, *in vivo* studies have reported that these microorganisms are also found on healthy surfaces, and their presence does not always indicate an active process of caries. Nevertheless, increased levels of these microorganisms on any oral surface might augment the risk of developing caries lesions.<sup>14,15</sup> These microorganisms adhere to orthodontic composite

resins because of electrostatic and hydrophobic interaction, as well as van der Waals forces, and it has been reported that the adhesion of cariogenic *streptococcus* to orthodontic composite resins is higher than that in orthodontic appliances. This colonization might play a role in the development of cariogenic plaque, and the remaining bacteria around fixed appliances can grow rapidly on tooth surfaces.<sup>17</sup> Therefore, this study was performed to specifically determine the level of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* adhering to orthodontic composite resins, because both microorganisms are considered the main responsible for causing dental caries and are also the greatest producers of acid that causes enamel demineralization.<sup>16,17</sup> The methods used were radiolabeling, culturing, and joint testing.

For this investigation, the samples were not coated with saliva, because previous studies<sup>4,18</sup> had found that saliva coating did not significantly alter the adhesion patterns of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. This phenomenon is consistent with other investigations showing that saliva coating did not significantly alter the adhesion of *Streptococci* to the underlying materials.<sup>17,19</sup> However, other authors suggest emulating the conditions of the oral cavity, such as temperature, constant movement, and saliva coating, which could represent an environment closer to reality.<sup>11,14,18,23</sup>

The equipment and the methodology used in this research, such as the automatic sample combustion machine and the liquid scintillation counter device for measuring <sup>3</sup>H, are amply described by Hülsen<sup>20</sup> (1970), Saku *et al.*<sup>21</sup> (2010), and Nagayama *et al.*<sup>22</sup> (2001), and the results have been expressed and recorded in dpm. In this sense, a higher dpm value means higher radioactivity; thus, greater adhesion of the radiolabeled

microorganism is found. In contrast, lower dpm values indicate lesser adhesion of the radiolabeled microorganism.

The results (Tables 1 and 2) of this study show that GIII (*Streptococcus mutans* test adhesion – 779.30 dpm; *Streptococcus sobrinus* test adhesion – 640.61 dpm) had the lowest bacterial adhesion and a statistically significant score ( $p \leq 0.05$ ) compared with the other groups for both microorganisms. In contrast, GII (*Streptococcus mutans* test adhesion – 2074.76 dpm; *Streptococcus sobrinus* test adhesion – 1535.30 dpm) had the highest bacterial adhesion. In general, the level of bacterial adhesion to the materials tested was greater for *Streptococcus mutans* than for *Streptococcus sobrinus*, and these findings are similar to the findings of other studies.<sup>16,18,23,24</sup> A study by Ahn *et al.*<sup>24</sup> (2010) reported that, in general, the bacterial adhesion to orthodontic materials, particularly to orthodontic composite resins and brackets, was greater for *Streptococcus mutans* than for *Streptococcus sobrinus*, and concluded that different strains have different levels of adhesion, even though they belong to the same species. The results of this study are similar in five of the groups examined (GI, GIV, GV, GVI, and GVII). However, the findings in GVII demonstrated greater values for *Streptococcus mutans* than for *Streptococcus sobrinus*, which strongly suggests an affinity among *Streptococcus mutans* and the GVII orthodontic composite resin tested.

The differences in the levels of bacterial adhesion found in this study can be explained by the diverse surface characteristics of each type of orthodontic composite resin and by the surface characteristics of the materials. These factors are known to influence the adhesion of bacteria to surface roughness. Therefore, materials with a polished surface provide the same condition for testing bacterial colonization.<sup>11,24</sup> Although all the

surfaces in this study were polished, the samples of orthodontic composite resins showed different regularities on the surface, which were associated with variable bacterial adhesion. The literature suggests that the filler modifies the surface of orthodontic composite resins.<sup>12</sup> An investigation on filler volume (wt%), filler size, and composition of various orthodontic composite resins demonstrated no effect on the adhesion of *Streptococcus mutans* or *Streptococcus sobrinus*.<sup>18</sup> These findings are comparable with the score of GIII observed in the present study, which showed roughness that seemed not to be susceptible to bacterial adhesion, compared with the other groups that also had irregularities on their surfaces.

The orthodontic composite resins tested in this study were light-cured. GIII presented the lowest dpm value for each of the two microorganisms; in other words, the significantly lowest number of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* adhered to this composite resin, compared with the other groups. This finding is similar to that of a previous study,<sup>18</sup> which evaluated the same composite resin and demonstrated the lowest bacterial adherence, when tested and compared with others materials with antimicrobial properties. Several materials for bonding brackets have antimicrobial properties; in previous investigations, however, some orthodontic composite adhesives had shown no statistically significant differences.<sup>16,23,25</sup>

No significant differences were found when GI, GIV, and GV were compared, and when GI, GV, GVI, and GVII were compared, in terms of *Streptococcus mutans* adhesion. Similarly, GI, GIV, GV, and GVII showed no significant differences with regard to *Streptococcus sobrinus* adhesion. Although three of the seven resins analyzed are manufactured by the same company, they have shown diverse bacterial adherence,

probably due to their different compositions, filler sizes, and properties. Further studies are warranted to analyze the biological and bacteriostatic effects of the composite resins on the adhering microorganisms. Nevertheless, GII showed the significantly highest value of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* adhesion, indicating a higher risk of enamel demineralization and decay.

Previous studies<sup>21,22</sup> with *in vitro* models had assayed the adhesion of microorganisms on dental materials, reporting that surface roughness is the main determinant of bacterial adhesion. To minimize the effect of surface roughness on adhesion, all surfaces in the present investigation were polished equally. Nevertheless, in previous assessments (data not shown), in which the surfaces were untreated (not polished), Enlight (GIII) showed the lowest bacterial adhesion and Blugloo (GII) exhibited the highest bacterial adhesion of microorganisms. Therefore, the polish effects seem to be irrelevant for these groups.

Based on the findings of this study, it is clear that the orthodontic composite resin GIII exhibited desirable properties, obtaining the lowest bacterial adhesion, which suggests to the daily clinical practice in orthodontics that the use of this composite resin might reduce white spot lesions and caries formation during orthodontic treatment, and might also be suitable from the clinical prevention point of view. In contrast, the composite resin GII showed the highest adhesion, which is theoretically an unfavorable characteristic. In this context, if translated into clinical performance, this suggests that this material can be associated with increased incidence of decalcification around fixed appliances. From a clinical point of view, it seems that various orthodontic composite resins exhibit different levels of adhesion of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus*

*sobrinus*. However, these data are difficult to directly apply to the clinical situation, because the materials and their characteristics are variable, according to the manufacturers. In addition, the adhesion levels of oral bacteria can be significantly influenced by the complexity of the appliances and treatment.

Future studies are required to analyze surface parameters, such as surface free energy or surface topography/roughness, as well as the impact of the resin matrix or filler composition on microbial adhesion, to accurately compare the adhesion of *Streptococci* to different orthodontic composite resins. In addition, more studies are required to evaluate and compare these results in real long term.

#### 9.2.9 Conclusions

This study was undertaken to analyze the level of bacterial adhesion to orthodontic composite resins. The results show that GIII (Enlight) had the lowest levels of both *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* adhesion in an assessment carried out jointly. On the other hand, the highest level of bacteria adhesion was observed in GII (Blugloo). The outcomes suggest a significant affinity of bacterial adhesion to GII. This research provides valuable information for identifying the orthodontic composite resins with minor risk in terms of the development of white spot lesions and the formation of caries.

### 9.2.10 Acknowledgments

We thank the National Council of Science and Technology, Mexico, and Asahi University, Gifu, Japan, for supporting this study.

### 9.2.11 **Table 1.** Quantitative analysis to radiolabeled *S. mutans* ( $^3\text{H}$ )

| Group              | dpm *<br>Mean | SD **  | Sheffè<br>Test *** |
|--------------------|---------------|--------|--------------------|
| I BeautyOrtho Bond | 1626.62       | 161.95 | A, B               |
| II Blugloo         | 2074.76       | 142.46 | C                  |
| III Enlight        | 779.30        | 53.94  | D                  |
| IV Grengloo        | 1533.25       | 155.18 | A                  |
| V Kurasper F       | 1625.66       | 158.91 | A, B               |
| VI Transbond CC    | 1719.18       | 99.16  | B                  |
| VII Turbo Bond     | 1701.32       | 115.67 | B                  |

\* dpm (desintegration per minute).

\*\* SD (Standard Deviation).

\*\*\* Composites orthodontic resins with different letters are significantly different from each other.

### 9.2.12 **Table 2.** Quantitative analysis of radiolabeled *S. sobrinus* ( $^{14}\text{C}$ )

| Group              | dpm *<br>Mean | SD **  | Sheffè<br>Test *** |
|--------------------|---------------|--------|--------------------|
| I BeautyOrtho Bond | 1260.54       | 30.40  | A                  |
| II Blugloo         | 1535.30       | 168.14 | B                  |
| III Enlight        | 640.61        | 47.70  | C                  |
| IV Grengloo        | 1396.18       | 165.29 | D                  |
| V Kurasper F       | 1170.38       | 66.76  | A                  |
| VI Transbond CC    | 1169.13       | 54.12  | A                  |



---

\* dpm (desintegration per minute).

\*\* SD (Standard Deviation).

\*\*\* Composites orthodontic resins with different letters are significantly different from each other.

### 9.2.13 REFERENCES

1. Balenseifen JW, Madonia JV. Study of dental plaque in orthodontic patients. *J Dent Res* 1970;49:320-324.
2. Ogaard B, Rolla G, Arends J. Orthodontic appliances and enamel demineralization. Part 1. Lesion development. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1988;94:68-73.
3. Mei L, Busscher HJ, Van der Mei HC, Chen Y, de Vries J, Ren Y. Oral bacterial adhesion forces to biomaterial surfaces constituting the bracket-adhesive-enamel junction in orthodontic treatment. *Eur J Oral Sci* 2009;117:419-426.
4. Ahn SJ, Lim BS, Lee SJ. Surface characteristics of orthodontic adhesives and effects on streptococcal adhesion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;137:489-495.
5. Gorelick L, Geiger AM, Gwinnet AJ. Incidence of white spot formation after bonding and banding. *Am J Orthod* 1982;81:93-98.
6. Featherstone JD. The continuum of dental caries evidence for a dynamic disease process. *J Dent Res* 2004;83(spec no):C39-42.
7. Boersma JG, van der Veen MH, Lagerweij MD, Bokhout B, Prahl-Andersen B. Caries prevalence measured with QLF after treatment with fixed orthodontic appliances: influencing factors. *Caries Res* 2005;39:41-47.

8. Stratemann MW, Shannon IL. Control of decalcification in orthodontic patients by daily self-administered application of a water free 0.4 per cent stannous fluoride gel. *Am J Orthod.* 1974;66:273-279.
9. Svanberg M, Mjör IA, Orstavik D. Mutans streptococci in plaque from margins of amalgam, composite and glass ionomer restorations. *J Dent Res* 1990;69:861-864.
10. Derks A, Katsaros C, Frencken JE, van't Hof MA, Kuipers-Jagtman AM. Caries-inhibiting effect of preventive measure during orthodontic treatment with fixed appliances. A systematic review. *Caries Res* 2004;38:413-420.
11. Ahn SJ, Kho HS, Lee SW, Nahm DS. Roles of salivary proteins in the adherence of oral streptococci to various orthodontic brackets. *J Dent Res* 2002;81:411-415.
12. Ahn SJ, Lim BS, Yang HC, Chang YI. Quantitative analysis of the adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic metal brackets. *Angle Orthod* 2005;75:666-671.
13. Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc* 2000;131:887-899.
14. Ahn SJ, Kho HS, Kim KK, Nahm DS. Adhesion of oral streptococci to experimental bracket pellicles from glandular saliva. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;124:198-205.
15. An YH, Friedman RJ. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *J Microbiol Methods* 1997;30:141-152.

16. Lim BS, Lee SJ, Lee JW, Ahn SJ. Quantitative analysis of adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic raw materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2008;133:882-888.
17. Rosenbloom RG, Tinanoff N. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients before, during, and after orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1991;100:35-37.
18. Ahn SJ, Lim BS, Lee YK, Nahm DS. Quantitative determination of adhesion patterns of cariogenic streptococci to various orthodontic adhesives. *Angle Orthod* 2006;76:869-875.
19. Artun J, Brobakken BO. Prevalence of caries and white spots after orthodontic treatment with multibonded appliances. *Eur J Orthod* 1986;8:229–234.
20. Hülsen W. A completely automatic sample combustion device for the technique of measuring H-3 and C-14 in the liquid scintillation spectrometer. *Experientia* 1970;26:1406-1407.
21. Saku S, Kotake H, Scougall-Vilchis RJ, Ohashi S, Hotta M, Horiuchi S, Hamada K, Asaoka K, Tanaka E, Yamamoto K. Antibacterial activity of composite resin with glass-ionomer filler particles. *Dent Mater J* 2010;29:193–198.
22. Nagayama M, Sato M, Yamaguchi R, Tokuda C, Takeuchi H. Evaluation of co-aggregation among *Streptococcus mitis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. *Lett Appl Microbiol* 2001;33:122-125.
23. Lee SP, Lee SJ, Lim BS, Ahn SJ. Surface characteristics of orthodontic materials and their effects on adhesion of mutans streptococci. *Angle Orthod* 2009;79:353-360.

24. Ahn SJ, Lim BS, Lee SJ. Surface characteristics of orthodontic adhesives and effects on streptococcal adhesion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;137:489-495.
25. Korbmacher HM, Huck L, Kahl-Nieke B. Fluoride-releasing adhesive and antimicrobial self-etching primer effects on shear bond strength of orthodontic brackets. *Angle Orthod* 2006;76:845-850.

## 10. DISCUSIÓN GENERAL

Las lesiones de mancha blanca son el primer signo de desmineralización del esmalte, éste fenómeno es asociado a algunas áreas circundantes a la aparatología ortodóncica fija, debido a que éstos generan superficies y retenciones adicionales para una colonización bacteriana,<sup>30,32</sup> además, su complejo diseño impide una adecuada limpieza, específicamente las resinas de prescripción ortodóncica son materiales que se colocan sobre la superficie del esmalte dental el cual es comúnmente afectado por desmineralización (lesiones de mancha blanca) y caries.<sup>1</sup>

Varias especies de bacterias son asociadas con la formación de placa dentobacteriana y las lesiones de mancha blanca, las cuales son causadas por ácidos orgánicos producidos principalmente por bacterias cariogénicas.<sup>34</sup> Estudios previos han reportado niveles altos de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* en pacientes con tratamiento ortodóncico, ésta alteración en la flora oral puede incrementar el riesgo de caries dental.<sup>35</sup> La adhesión de éstas bacterias a las resinas compuestas de prescripción ortodóncica es debido a una interacción electrostática hidrofóbica así como también a fuerzas de van der Waals, también ha sido reportado una mayor adhesión de *Streptococcus* a resinas compuestas de prescripción ortodóncica que a distintos aparatos ortodóncicos, lo cual puede implicar un rol fundamental en el desarrollo de placa dentobacteriana y en un crecimiento bacteriano rápido en la superficie de los dientes específicamente en el área circundante a la aparatología ortodóncica fija.<sup>36</sup> Por lo que éste estudio fue diseñado específicamente para medir cuantitativamente el nivel de colonización de *S. mutans* y *S. sobrinus* evaluándolos

tanto de manera independiente (primer artículo), como de forma simultánea (segundo artículo).

Para ésta investigación las muestras (los bloques de resina) no fueron recubiertas con saliva porque estudios previos<sup>37, 38</sup> han descrito que el recubrimiento con saliva no altera significativamente los patrones de adhesión para *S. mutans* y *S. sobrinus*. Éste fenómeno es consistente con otras investigaciones en las que se encontró que el recubrimiento con saliva no alteró significativamente la adhesión cuando se examinó adhesión de *Streptococcus* a la superficie distintos materiales.<sup>4, 39</sup>

El material, equipo y metodología utilizada en éste estudio, el uso de la máquina automática de combustión de muestras y el dispositivo medidor de líquido por centelleo para la medición de <sup>3</sup>H y <sup>14</sup>C han sido ampliamente descritas por Hülsen<sup>40</sup> (1970), Saku *et al.*<sup>41</sup> (2010) y Nagayama *et al.*<sup>26</sup> (2001), así como los resultados expresados y registrados en unidades de desintegración por minuto (dpm). En éste sentido, un incremento en el valor de dpm significa un incremento de radiactividad, y por lo tanto, es traducido en una mayor adherencia del microorganismo. En contraste, valores disminuidos de dpm indican menor adherencia del microorganismo codificado con el radiomarcador.

Para ambos grupos experimentales en los que se determinó el grado de colonización bacteriana por microorganismos de manera independiente, así como de manera conjunta, la resina evaluada en el grupo GI (Enlight) obtuvo el valor más bajo de dpm

para ambos microorganismos con significancia estadística de  $p \leq 0.05$  cuando se comparó con todos los otros grupos: obteniendo 1577.35 dpm para *S. mutans*, 457.86 dpm para *S. sobrinus* cuando examinó de manera independiente. Mientras que, cuando se evaluó de manera conjunta, se encontraron valores de 779.30 dpm para *S. mutans*, y de 640.61 dpm para *S. sobrinus*. En general el nivel de colonización de bacterias adheridas a las resinas compuestas fue mayor la adhesión de *S. mutans* que la de *S. sobrinus* éstos hallazgos son similares a los reportados por Ahn *et al.*<sup>42</sup> (2010); sin embargo, los valores más altos de adherencia bacteriana con significancia estadística de  $p \leq 0.05$  en comparación con todos los demás grupos fueron para el grupo GVII (Turbo Bond II) cuando se examinaron las bacterias de forma independiente obteniendo valores de 5155.85 dpm para *S. mutans* y de 6087.06 dpm para *S. sobrinus*. Lo que sugiere una marcada afinidad del *S. sobrinus* por la resina examinada en el grupo GVII (Turbo Bond II).

En el grupo experimental en que se evaluó el nivel de colonización bacteriana de manera conjunta, el grupo GII (Blugloo) mostró los valores más altos estadísticamente significativos ( $p \leq 0.05$ ) en comparación con los demás grupos para ambos microorganismos con valores de 2074.76 dpm para *S. mutans* y 1535.30 dpm *S. sobrinus*. La variación en las cantidades de adherencia bacteriana a las resinas compuestas de acuerdo con la literatura<sup>42</sup> puede ser explicada por las distintas características de las superficies de cada resina, aunque todas las superficies de las resinas fueron pulidas, las muestras presentaron diferentes irregularidades, Ahn *et al.*<sup>32</sup>. Sugiere que las partículas de nanorrelleno de las resinas compuestas modifican la

superficie de las resinas. Sin embargo, se observó que en el caso de de las resina Blugloo (en cualquiera de los dos modelos experimentales), presentó irregularidades como rugosidades y grietas, lo cual aparentemente no influyó en el nivel de adhesión bacteriana, éstos resultados son comparables con otros estudios <sup>31, 35, 42</sup> donde a pesar de las aparentes retenciones de la resina no incrementó el nivel de colonización bacteriana.

### 10.1 Conclusiones

Basado en los hallazgos de éste estudio, es claro que la resina Enlight analizada mostró propiedades ideales, obteniendo los valores más bajos de adherencia bacteriana, lo cual sugiere su uso en la práctica clínica diaria en ortodoncia ya que el uso de esta resina podría reducir el riesgo de formación de lesiones de mancha blanca y caries durante el tratamiento ortodóncico. En contraste, las resinas Blugloo y Turbo Bond II evaluadas ambos modelos experimentales, mostraron los valores más altos de adhesión bacteriana, lo cual teóricamente representa características desfavorables. En éste contexto, si trasladamos éstas características a un modelo clínico, sugiere que tales resinas pueden ser asociadas al incremento de la incidencia en la descalcificación circundante a la aparatología fija en ortodoncia.

### 10.2 Limitaciones

Es importante remarcar que el uso de saliva en éstos modelos de estudio *in vitro* no influyen significativamente en la adhesión bacteriana, muchos autores sugieren emular las condiciones del fenómeno para ejecutar un estudio lo más cercano a la realidad.



Los resultados de la investigación mostraron diferentes niveles de adhesión de *S. mutans* y *S. sobrinus*. Sin embargo, estos datos son difíciles de aplicar directamente a la situación clínica, porque las características de los materiales son variables de acuerdo con sus fabricantes; además, que los niveles de adhesión de los microorganismos puede ser significativamente influenciados por la complejidad de la aparatología y el tratamiento ortodóncico

### 10.3 Recomendaciones

Se requieren estudios posteriores para analizar los parámetros de superficie de las resinas, así como la energía libre de superficie o topografía de superficie (para evaluar rugosidad), estudiar el tipo de matriz de resina, composición y tamaño de nanorrellenos y su impacto en la adhesión bacteriana entre diferentes cepas de *Streptococcus*. Además evaluar y comparar éstos resultados en tiempo real a largo plazo.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Babaahmady KG, Challacombe SJ, Marsh PD, Newman HN. Ecological study of streptococcus mutans, streptococcus sobrinus and lactobacillus spp. at sub-sites from approximal dental plaque from children. Caries Res 1998; 32:51-8.
2. Hamada S, Slade HD. Biology, Immunology, and cariogenicity of streptococcus mutans. Microbiol Rev 1980; 44: 331-84.
3. Gorelick L, Geiger AM, Gwinnett AJ. Incidence of white spot formation after bonding and banding. Am J Orthod 1982; 81:93-8.
4. Artun J, Brobakken B. Prevalence of caries and white spots after orthodontic treatment with multibonded appliances. Eur J Orthod 1986; 8:229-34.
5. Scougall-Vilchis RJ, Hotta Y, Hotta M, Idono T, Yamamoto K. Examination of composite resins with electron microscopy, microhardness tester and energy dispersive x-ray microanalyzer. Dent Mater J 2009; 28: 102-12.
6. Scougall-Vilchis RJ, Hotta Y, Yamamoto K. Examination of six orthodontic adhesives with electron microscopy, hardness tester and energy dispersive x-ray micro analyzer. Angle Orthod 2008; 78: 655-61.
7. Silverstone Leon M. Odontología Preventiva. Ed. Doyma. USA 1995. p.p. 3- 18.
8. Newbrun E. Cariología. Edt. Limusa. Cap. 7 1984. p. 271-80.
9. Orams H, Pharkey P, Rachinger W, Zyber J. Visualization of microphane structure in human dental enamel nature. 1974; 252: 584-5.
10. Robinson C, Kirklan I, Briggs H, Atkinson P. Enamel proteins from secretion to maturation. J Dent Res 1982; 61: 1490-94
11. Kuhar M, Scharq M, Funduk N. Enhanced permeability of acid-etched or ground dental enamel. J Proth Dent 1997; 77: 578-82.
12. Thylstrup A, Fejerskov O. Caries. Edit. Doyma, S.A. Barcelona. 1988. p. 338.

13. Holmen L, Thylstrup A, Ogaard B, Kragh F. A polarized light microscopic study of progressive stage of enamel caries in vivo. *Caries Res* 1985; 384-54.
14. Ingram G, Fejerskov O. A scanning electron microscopic study of artificial caries lesion formation. *Caries Res* 1985; 348-68.
15. Scougall-Vilchis RJ, Yamamoto S, Kitai N, Yamamoto K. Shear bond strength of orthodontic brackets bonded with different self-etching adhesives. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2009; 136: 425-30.
16. Anhoury P, Nathanson D, Hughes CV, Socransky S, Feres M, Chou LL. Microbial profile on metallic and ceramic brackets. *Angle Orthod* 2002; 72:338-43.
17. Mitchell L. Decalcification during orthodontic treatment with fixed appliances: an overview. *Br J Orthod* 1992; 19:199-205.
18. Quirynen M, Bollen L: The influence of surface roughness and surface-free energy on supraand subgingival plaque formation in man. *J Clin Periodontol* 1995; 22: 1-14
19. Imazato S, Torii M, Tsuchitani Y: Antibacterial effect of composite incorporating triclosan against streptococcus mutans. *J Osaka Univ Dent Sch.* 1995; 35: 5-11.
20. Carlen A, Nikdel K, Wennerberg A: Surface Characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. *Biomaterials.* 2001; 22: 481-7.
21. Yamamoto K, Ohashi S, Taki E. Adherence of oral streptococci to composite resin of varying surface roughness. *Dent Mater.* 1996; 15: 201-4.
22. Mor C, Steinberg D, Dogan H: Bacterial adherence to bleaches surfaces of composite resin in vitro. *Oral Surg oral Med oral Pathol Oral radiol Endod.* 1998; 86: 582-6.
23. Shahal Y, Steinberg D, Hirschfeld Z: In vitro bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restorative materials. *J Oral Rehabil.* 1998; 25: 52-8.
24. Kawai K, Murano M: Adherence of plaque components to different restorative materials. *Oper Dent.* 2001; 26: 396-400.

25. Palenik CJ, Behnen MJ, Setcos JC : Inhibition of microbial adherence and growth by various glass ionomers in vitro. *Dent Mater.* 1992; 8:16-20
26. Nagayama M, Sato M, Yamaguchi R, Tokuda C, Takeuchi H. Evaluation of co-aggregation among *Streptococcus mitis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. *Letters in applied microbiology* 2001; 33:122-5.
27. Scougall-Vilchis RJ, Mimura S, Yamamoto K. Propiedades de un adhesivo ortodóncico liberador de fluoruro que contiene partículas de relleno tipo S-PRG. *Rev Esp Ortod* 2007; 37: 119-26.
28. Scougall-Vilchis RJ, Yamamoto S, Kitai N, Hotta M, Yamamoto K. Shear bond strength of a new fluoride-releasing orthodontic adhesive. *Dent Mater J* 2007; 26: 45-51.
28. [www.mex.ops-oms.org/documentos/publicaciones/hacia/a03.pdf](http://www.mex.ops-oms.org/documentos/publicaciones/hacia/a03.pdf). Consulta 3 mayo 2010.
29. [www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m013ssa24.html](http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m013ssa24.html). Consulta 3 mayo 2010.
30. Ahn SJ, Ahn SJ, Kho HS, Lee SW, Nahm DS. Roles of salivary proteins in the adherence of oral streptococci to orthodontic brackets. *J Dent Res.* 2002;81:411-5.
- 31 Ahn SJ, Kho HS, Kim KK, Nahm DS. Adhesion of oral streptococci to experimental bracket pellicles from glandular saliva. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003;124: 198-205.
32. Ahn SJ, Lim BS, Yang HC, Chang YI. Quantitative analysis of the adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic metal brackets. *Angle Orthod.* 2005;75:666-71.
33. An YH, Friedman RJ. Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *J Microbiol Methods.* 1997;30:141-52.
34. Featherstone JD. The science and practice of caries prevention. *J Am Dent Assoc.* 2000;131:887-99.
35. Ahn SJ, Kho HS, Kim KK, Nahm DS. Adhesion of oral streptococci to experimental bracket pellicles from glandular saliva. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003;124:198-205.
36. Bum-Soon L, Shin-Jae L, Jae-Won L, Sug-Joon A. Quantitative analysis of adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic raw materials. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2008;133:882-8.

37. Sug-Joon A, Bum-Soon L, Shin-Jae L. Surface characteristics of orthodontic adhesives and effects on streptococcal adhesion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010;137:489-95.
38. Sug-Joon A, Bum-Soon L, Yong-Keun L, Dong-Seok N. Quantitative determination of adhesion patterns of cariogenic streptococci to various orthodontic adhesives. *Ang Othod.* 2006;76:869-75.
39. Rosenbloom RG, Tinanoff N. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients before, during, and after orthodontic treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1991;100:35-7.
40. Hülsen W. A completely automatic sample combustion device for the technique of measuring H-3 and C-14 in the liquid scintillation spectrometer. *Experientia.* 1970;2:1406-7.
41. Saku S, Kotake H, Scougall-Vilchis RJ, Ohashi S, Hotta M, Horiuchi S, Hamada K, Asaoka K, Tanaka E, Yamamoto K. Antibacterial activity of composite resin with glass-ionomer filler particles. *Dent Mater J.* 2010;29:193–8.
42. Ahn SJ, Lim BS, Lee SJ. Surface characteristics of orthodontic adhesives and effects on streptococcal adhesion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;137:489-95.



Universidad Veracruzana

**XX Encuentro Nacional  
XI Iberoamericano**



**Boca del Río, Ver.  
2012**  
*De Investigación en Odontología*

**XX ENCUENTRO NACIONAL Y  
XI IBEROAMERICANO DE  
INVESTIGACIÓN EN ODONTOLOGÍA**

**Universidad Veracruzana**  
Facultad de Odontología



Otorga la presente

**CONSTANCIA**  
a

**Ulises Velázquez Enríquez**

Por su participación con la ponencia titulada

**ANÁLISIS CUANTITATIVO DE STREPTOCOCCUS  
ADHERIDOS A RESINAS DE PRESCRIPCIÓN ORTODÓNICA**

**En el XX ENCUENTRO NACIONAL Y XI IBEROAMERICANO DE  
INVESTIGACIÓN EN ODONTOLOGÍA**

**"LIZ DE VERACRUZ, ARTE, CIENCIA, LUZ"**  
BOCA DEL RIO VERACRUZ DEL 7 AL 9 DE NOVIEMBRE DEL 2012

**Dra. Clara Luz Parra Uscanga**  
Comité organizador

**Mtro. Jorge Alanis Tavira**  
Presidente del SNIO

**Dr. Miguel Ángel Díaz Castillejos**  
Director de la Facultad de  
Odontología



Universidad Veracruzana

XX ENCUENTRO NACIONAL Y  
XI IBEROAMERICANO DE  
INVESTIGACIÓN EN ODONTOLOGIA



**Universidad Veracruzana**  
Facultad de Odontología

XX Encuentro Nacional  
XI Iberoamericano



Boca del Río, Ver.  
**2012**  
De Investigación en Odontología

Otorga el presente

# RECONOCIMIENTO

a

Ulises Velázquez Enriquez (UAEM), Rogelio José Scougall Vilchis, Rosalía Contreras Bulnes, Jaime Flores Estrada, Shinsuke Uematsu, Ryozo Yamaguchi

Por haber obtenido el **SEGUNDO LUGAR** con la ponencia titulada **ANÁLISIS CUANTITATIVO DE STREPTOCOCCUS ADHERIDOS A RESINAS DE PRESCRIPCIÓN ORTODÓNICA (CATEGORIA EPIDEMIOLOGIA - NIVEL DOCTORADO)**

En la modalidad **ORAL** en el XX ENCUENTRO NACIONAL Y XI IBEROAMERICANO DE INVESTIGACIÓN EN ODONTOLOGÍA

"LIZ DE VERACRUZ, ARTE, CIENCIA, LUZ"  
BOCA DEL RIO VERACRUZ DEL 7 AL 9 DE NOVIEMBRE DEL 2012

  
**Dr. Miguel Ángel Díaz Castillejos**  
Director de la Facultad de Odontología

  
**Dra. Clara Luz Parra Uscanga**  
Comité organizador

  
**Mtro. Jorge Alanís Tavira**  
Presidente del SNIO





Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Odontología  
a través del Cuerpo Académico Salud - Enfermedad Bucal



Otorga la presente  
**CONSTANCIA**

A: *Ulises Velázquez Enriquez, Rogelio J. Scougall Vilchis, Rosalía Contreras Bulnes, Jaime Flores Estrada, Juan Carlos González Pérez*

Por su valiosa participación académica en el Cuarto Coloquio Nacional de Investigación en Salud Bucal, con la presentación del trabajo de investigación titulado:

**ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ESTREPTOCOCOS ADHERIDOS A RESINAS COMPUESTAS DE PRESCRIPCIÓN ORTODÓNICA**

Toluca, Estado de México 6 de febrero del 2013



Dr. en E. P. Alberto Salgado Valdés  
Director de la Facultad de Odontología



Dr. en E. P. David Eduardo Velázquez Muñoz  
Subdirector Académico de la Facultad de Odontología





Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Odontología  
a través del Cuerpo Académico Salud - Enfermedad Bucal



Otorga el presente  
**RECONOCIMIENTO**

A: *Ulises Velázquez Enríquez, Rogelio J. Scougall Vilchis, Rosalía Contreras Bulnes,  
Jaime Flores Estrada, Juan Carlos González Pérez*

**PRIMER LUGAR**  
Modalidad: Cartel

**ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ESTREPTOCOCOS ADHERIDOS A RESINAS COMPUESTAS DE PRESCRIPCIÓN  
ORTODÓNICA**

**en el Cuarto Coloquio Nacional de Investigación en Salud Bucal**

Toluca, Estado de México 6 de febrero del 2013



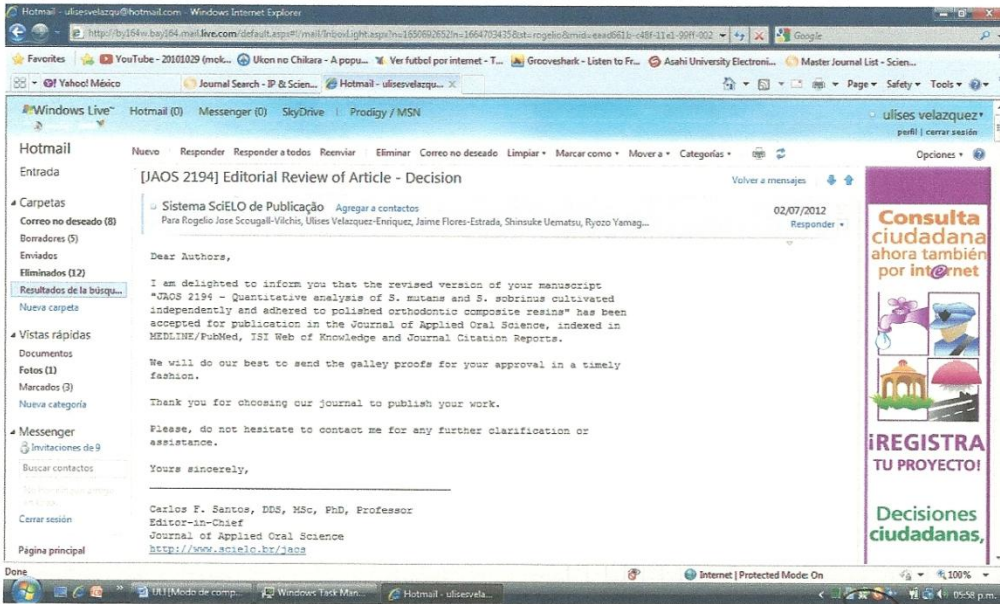
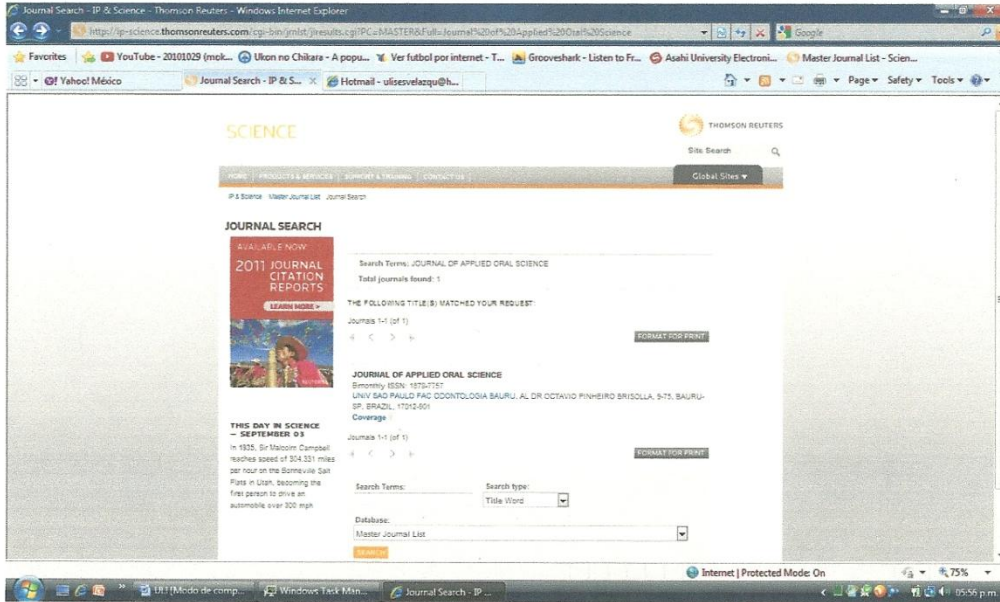
**Dr. en E. P. Alberto Salgado Valdés**  
Director de la Facultad de Odontología

**Dr. en E. P. David Eduardo Velázquez Muñoz**  
Subdirector Académico de la Facultad de Odontología



**Dra. en O. Blanca-Silvia González López**  
Líder del Cuerpo Académico

# 12.5 ANEXO 5



*Carla Valderrama*  
2/10/2012

12.6 ANEXO 6

*Esraa Valdez*  
2/04/2012

|    |                      |           | Total Cites | Impact Factor | Impact Factor | Immediacy Index | Articles | Link Half-life | Eigenfactor Score | Article Influence Score |
|----|----------------------|-----------|-------------|---------------|---------------|-----------------|----------|----------------|-------------------|-------------------------|
| 41 | DENT TRAUMATOLOGY    | 1809-4409 | 1276        | 1.204         | 1.360         | 0.213           | 89       | 8.5            | 0.00236           | 0.248                   |
| 42 | INT J PERIODONT REST | 0199-7509 | 1081        | 1.197         | 1.064         | 0.265           | 77       | 9.3            | 0.00250           | 0.531                   |
| 43 | AUST DENT J          | 0043-0421 | 1283        | 1.180         | 1.362         | 0.169           | 71       | 9.3            | 0.00235           | 0.397                   |
| 44 | J PUBLIC HEALTH DENT | 0022-4005 | 1093        | 1.186         | 1.410         | 0.815           | 54       | 9.1            | 0.00185           | 0.432                   |
| 45 | PUBL J DENT EDUC     | 1206-2883 | 903         | 1.183         | 0.605         | 43              | 5.1      | 0.00096        |                   |                         |
| 46 | DENT MATER J         | 0287-4547 | 1095        | 1.137         | 1.363         | 0.300           | 120      | 4.8            | 0.00345           | 0.253                   |
| 47 | MED ORAL PATHOL ORAL | 1600-4447 | 1015        | 1.130         | 0.370         | 188             | 3.8      | 0.00374        |                   |                         |
| 48 | J ACQUIS DENT        | 1461-5185 | 1010        | 1.114         | 1.807         | 0.134           | 87       | 6.0            | 0.00279           | 0.453                   |
| 49 | DENTOMAXILLOFAC RAD  | 0250-832X | 1522        | 1.081         | 1.557         | 0.180           | 79       | 7.2            | 0.00346           | 0.458                   |
| 50 | ACTA ODONTOL SCAND   | 0901-6357 | 2181        | 1.066         | 1.388         | 0.250           | 80       | >10.0          | 0.00289           | 0.408                   |
| 51 | INFLAM DENT          | 1059-0163 | 1026        | 1.050         |               | 0.120           | 75       | 6.6            | 0.00210           |                         |
| 52 | GERODONTOLOGY        | 0734-0604 | 588         | 1.033         |               | 0.149           | 47       | 6.5            | 0.00119           |                         |
| 53 | PERIODE DENT         | 0184-1283 | 1626        | 1.022         | 1.454         | 0.314           | 70       | 9.2            | 0.00210           | 0.200                   |
| 54 | J PROSTHODONT        | 1050-041X | 952         | 1.009         |               | 0.094           | 106      | 5.3            | 0.00273           |                         |
| 55 | INT J PEDIATR DENT   | 0930-7439 | 980         | 1.008         | 1.231         | 0.141           | 84       | 6.8            | 0.00206           | 0.332                   |
| 56 | J CAN DENT ASSOC     | 1486-2159 | 1087        | 1.000         | 1.361         | 0.104           | 48       | 8.7            | 0.00211           | 0.432                   |
| 57 | J EDENT BEYOND DENT  | 1496-8155 | 436         | 0.996         |               | 0.028           | 26       | 6.1            | 0.00129           |                         |
| 58 | INT DENT J           | 0020-6539 | 1432        | 0.983         | 1.037         | 0.823           | 49       | >10.0          | 0.00151           | 0.302                   |
| 59 | AUST ENDOD J         | 1328-1947 | 180         | 0.958         |               | 0.081           | 22       | 4.5            | 0.00064           |                         |
| 60 | BRIT DENT J          | 0007-0610 | 3128        | 0.915         | 1.085         | 0.509           | 129      | >10.0          | 0.00350           | 0.274                   |

23-Jul-2012

Dear Prof. Scogwell-Vilchis:

I am pleased to inform you that your manuscript entitled "Adhesion of Streptococci to various orthodontic composite resins" has been accepted for publication in the Australian Dental Journal. Your manuscript will now be forwarded to our production editor to be prepared for publication.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Australian Dental Journal, I look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,  
 Prof. Mark Bartold  
 Editor-in-Chief, Australian Dental Journal [mark.bartold@adelaide.edu.au](mailto:mark.bartold@adelaide.edu.au)

