



## **POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE POLÍMEROS ADHESIVOS MODIFICADOS CON NANOPARTÍCULAS DE COBRE Y ZINC**

Trabajo de investigación  
Requisito para optar al  
Título de Cirujano Dentista

Alumnos: Gabriela Arredondo Inostroza  
Felipe Durán Cifuentes  
Jorge Núñez Carvajar  
Ivette Saavedra Arredondo

Docente Guía: Prof. Dra. Issis Luque-Martínez  
Cátedra de Operatoria Dental

Valparaíso – Chile  
2019

## Agradecimientos

Quiero agradecer a mis seres queridos y a mis amigos, quienes han sido un apoyo fundamental durante todo este proceso académico, gracias por siempre darme ánimo y contención en los momentos en que más lo necesité.

Quisiera también agradecer de manera especial a Felipe, quien a sido mi compañero incondicional en este camino, en los buenos, y sobre todo en los malos momentos; gracias por estar siempre presente.

Gaby.

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres por su esfuerzo, compañía, comprensión y por sobre todo brindarme la oportunidad para haber llegado a esta instancia.

Un agradecimiento especial a *Gaby*, mi compañera incondicional a lo largo de todo el proceso, un pilar fundamental en el aula, la clínica y por sobre todo en el diario vivir. Gracias a mi hermano, por apoyarme y darme el espacio cuando lo necesité.

A mi familia y amigos, por su apoyo constante y disposición cuando fue requerida.

Un agradecimiento a aquellos docentes que realmente buscaron enseñar y ser parte de una formación de calidad.

Felipe.

Quiero agradecer a mis padres y hermano por su fundamental apoyo durante estos años de carrera. A mis amigos por acompañarme constantemente.

A la Dra. Issis Luque por la oportunidad de participar en este proyecto y a todos aquellos que nos brindaron ayuda para poder finalizarlo.

Ivette.

## Índice

1.	Introducción.....	1
2.	Marco Teórico .....	3
2.1	Cáncer de cabeza y cuello .....	3
2.2	Radioterapia .....	3
2.3	Efectos Adversos .....	3
2.3.1	Caries por Radiación .....	4
2.3.2	Saliva y Radiación .....	4
2.3.3	Tejidos dentarios y Radiación.....	4
2.4	Interfaz diente-restauración.....	5
2.4.1	Estabilidad de la interfaz diente-restauración .....	5
2.5	Sistemas Adhesivos .....	5
2.5.1	Composición de Sistemas Adhesivos.....	7
2.5.1.1	Acondicionador ácido .....	7
2.5.1.2	Primer .....	7
2.5.1.3	Monómeros de resina .....	7
2.5.1.4	Fotoiniciadores .....	9
2.5.1.5	Iniciadores Químicos .....	9
2.5.1.6	Inhibidores .....	9
2.5.1.7	Solventes .....	10
2.5.1.8	Rellenos .....	11
2.6	Biofilm y colonización de la superficie dentaria.....	11
2.6.1	Streptococcus mutans .....	12
2.7	Partículas de cobre .....	12
2.8	Partículas de zinc.....	12
3.	Objetivos.....	14
3.1	Objetivo general .....	14
3.2	Objetivos específicos .....	14
4.	Pregunta de Investigación .....	14
5.	Hipótesis .....	14
6.	Materiales y métodos.....	15
6.1	Formulación de los polímeros adhesivos modificados con nanopartículas .	15
6.2	Tipo de estudio.....	16
6.3	Difusión en agar .....	16

6.4	Microdilución .....	18
6.5	Extracción de ADN .....	19
6.6	Sorción y solubilidad .....	23
6.7	Citotoxicidad .....	24
6.8	Análisis estadístico .....	26
7.	Resultados .....	27
7.1	Difusión en agar .....	27
7.2	Microdilución .....	29
7.3	Extracción de ADN .....	30
7.4	Sorción y solubilidad .....	31
7.5	Citotoxicidad .....	33
8.	Discusión.....	34
9.	Conclusión .....	37
10.	Sugerencias .....	38
11.	Conflictos de interés.....	39
12.	Resumen.....	40
13.	Referencias Bibliográficas.....	41
14.	Anexos .....	45
14.1	Formulario de consentimiento informado .....	45
14.2	Instrucciones de uso de dispositivo intraoral.....	48
14.3	Aprobación bioética.....	49

## 1. Introducción

El cáncer de cabeza y cuello representa el 4% de los casos de cáncer a nivel mundial<sup>(1,2)</sup>. Existen diversos métodos terapéuticos, como cirugía, quimioterapia, radioterapia o combinación de éstos, para tratar este tipo de afección. Sin embargo, la radioterapia es uno de los tratamientos más utilizados para el manejo de neoplasias malignas de cabeza y cuello<sup>(3)</sup>. La radioterapia utiliza radiaciones ionizantes de alta energía, las que tienen efectos acumulativos en los tejidos, afectando no sólo a las células cancerígenas de la lesión tumoral, sino también a tejidos sanos circundantes al área irradiada, provocando efectos colaterales negativos, los que son dosis-dependientes, y pueden ser transitorios y/o permanentes a nivel oral<sup>(1,2,4)</sup>.

Entre los efectos colaterales generados por la radiación, se pueden identificar los transitorios, como mucositis, xerostomía, hiposalivación, cambios en la microbiota oral, candidiasis, trismus, dermatitis y disfagia; asimismo, se describen efectos permanentes, donde también volvemos a encontrar la xerostomía e hiposalivación, junto con caries de radiación y osteorradionecrosis, siendo este último, consecuencia de infecciones de origen odontogénico<sup>(1-4)</sup>.

Las lesiones cariosas que se presentan en los pacientes post-radioterapia, llamadas “caries de radiación”, suelen ser extensas, de avance rápido y se ubican en las superficies lisas de los dientes, lo que implica un desafío importante para el odontólogo, debido al riesgo de infección que esto representa para los pacientes irradiados, generándose condiciones orales adversas que exponen la dentición del paciente a un medio más agresivo<sup>(2,3,5)</sup>.

Al momento de rehabilitar a estos pacientes, el profesional se enfrenta a un esmalte “delaminado”, dejando la dentina expuesta y desmineralizada, además de las condiciones bucales antes mencionadas<sup>(3)</sup>. Desde el punto de vista restaurador, el mejor sustrato para los procedimientos adhesivos es el esmalte, gracias a su bajo contenido orgánico y de humedad; por otro lado, la interfaz diente-restauración a nivel dentinario, se considera la zona más inestable de la restauración, debido a sus propiedades inherentes. Esto es corroborado en la literatura, donde se observa que el mayor porcentaje de recambio de restauraciones se debe a la aparición de caries adyacentes al margen de la restauración<sup>(3)</sup>. De esta forma, la degradación del polímero restaurador, al ceder ante el ataque de las esterasas bacterianas durante la colonización del biofilm dental en el transcurso del tiempo, es parte causal de estas lesiones de caries. Por ello, se han desarrollado nuevos polímeros adhesivos con materiales que poseen propiedades antimicrobianas, como lo son las nanopartículas de bromo y amonios cuaternarios; otras alternativas que se han implementado son los adhesivos con antisépticos adicionados, como la clorhexidina. No obstante, no todos han presentado éxito en preservar esta interfaz, junto con la mantención de las propiedades biomecánicas básicas de la misma<sup>(6,7)</sup>.

Es así como, siguiendo esta línea de investigación y buscando una alternativa más versátil y efectiva, se ha desarrollado un nuevo polímero modificado con nanopartículas de cobre y zinc, las que han demostrado mantener las propiedades

biomecánicas ideales, además de otorgar estabilidad ante la degradación en la interfaz.

En la actualidad, aún no han sido demostradas sus propiedades antibacterianas ni su biocompatibilidad. Este último es un punto que cobra vital importancia al momento de enfrentarse a una situación clínica, en la que el odontólogo busca que la citotoxicidad sea baja para el complejo dentino-pulpar, pues éste será el tejido expuesto al polímero experimental. Esto se convierte en un desafío para el operador, quien debe buscar otras alternativas de tratamiento, que no comprometan la integridad del odontoblasto y ni del tejido circundante, por ende, ser biocompatible para el paciente<sup>(8,9)</sup>.

## 2. Marco Teórico

### 2.1 Cáncer de cabeza y cuello

El cáncer de cabeza y cuello representa alrededor del 4% de casos de cáncer, presentándose principalmente en hombres entre la 5ª y 8ª década de vida, asociado fuertemente al consumo de tabaco y alcohol<sup>(1)</sup>; incluye lesiones malignas que se originan en la cavidad oral, orofaringe, hipofaringe, laringe, glándulas salivales y sistema nervioso central<sup>(10)</sup>, siendo el carcinoma espino celular (originado en la cavidad oral) la lesión tumoral maligna más frecuente<sup>(1,2)</sup>.

El tratamiento más utilizado para tratar este tipo de lesiones es la radioterapia, que en ocasiones se utiliza en combinación con cirugía y quimioterapia<sup>(3,4)</sup>. La radioterapia no sólo afecta a células malignas, sino que también a tejidos circundantes a la zona irradiada, provocando una serie de efectos adversos, los cuales podemos clasificar en temporales y permanentes<sup>(4,11)</sup>.

### 2.2 Radioterapia

La radioterapia consiste en la aplicación terapéutica de radiación ionizante de alta energía en base a rayos X, gamma o beta; las dosis son acumulativas y se administran de forma diaria con periodos de pausa de una semana<sup>(3,4)</sup>. El tratamiento estándar para pacientes de cabeza y cuello acumula una dosis final de entre 40 y 70 Gy<sup>(3)</sup>.

### 2.3 Efectos Adversos

Entre las reacciones adversas temporales al tratamiento en base a radiación, tenemos los efectos que son de aparición temprana como la mucositis, disfagia, disgeusia, sensibilidad dentaria, candidiasis y glosodinia, y otros de aparición tardía como el trismus<sup>(4,11)</sup>.

Dentro de las reacciones temporales destaca la mucositis, que es una respuesta aguda al tratamiento de radioterapia, muy típico en pacientes de cáncer de cabeza y cuello, cuyo tratamiento va de 6 a 7 semanas<sup>(1)</sup>. La gravedad de las lesiones son dosis dependiente, observándose su aparición entre la segunda y tercera semana de tratamiento<sup>(11)</sup>. Éstas afectan la calidad de vida del paciente y pueden llevar incluso a una suspensión no deseada del tratamiento contra el cáncer<sup>(4,11)</sup>.

Entre los efectos permanentes del tratamiento en base a radiación, se observan reacciones tempranas, como xerostomía y necrosis graves, y tardías, como caries por radiación, enfermedad periodontal, necrosis pulpar y osteorradionecrosis, todas ellas afectan directa o indirectamente el desarrollo y la progresión de la caries dental<sup>(4,11)</sup>.

### **2.3.1 Caries por Radiación**

Caries de rápido progreso y altamente destructiva, pudiendo llevar a la destrucción coronaria e incluso a una pérdida completa de la dentición<sup>(10,11)</sup>. La exposición a radiación produce cambios en las glándulas salivales, observándose una alteración en la cantidad y calidad de la saliva, posicionándose como uno de los principales factores que inciden en el desarrollo de este tipo de caries<sup>(5,6,10)</sup>. Además, los pacientes que han sido irradiados muestran cambios en el biofilm oral y cambios estructurales en los tejidos dentarios, los que contribuyen a la aparición de una lesión por caries<sup>(3,10,11)</sup>.

### **2.3.2 Saliva y Radiación**

Las glándulas salivales son sensibles a la radiación, por lo tanto, se ven afectadas al enfrentarse a tratamientos de radioterapia, observándose alteraciones funcionales. Dentro de ellas podemos mencionar la disminución en el flujo salival, modificaciones en la composición salival y una consecuente sobrepoblación de la microflora cariogénica y fúngica<sup>(2,11)</sup>. Esto se debe al daño producido en las membranas plasmáticas y ADN de las células acinares, afectando su capacidad secretora<sup>(11)</sup>.

Como resultado del daño glandular, se observa una sensación de quemazón, xerostomía, labios resecaos y depapilación lingual. Los pacientes presentan una saliva de consistencia más viscosa, con una composición alterada, presentando una menor cantidad de electrolitos, disminución de su capacidad buffer y disminución de su capacidad antibacteriana, tanto inmunitaria como no inmunitaria<sup>(11)</sup>.

### **2.3.3 Tejidos dentarios y Radiación**

En los últimos años, surge evidencia que demuestra una directa influencia de la radioterapia sobre los tejidos dentarios, provocando cambios morfológicos y físicos en dentina<sup>(10)</sup>. La radiación afecta directamente las propiedades mecánicas de los tejidos duros del diente, como la dureza, módulo elástico, resistencia a la tensión y compresión; lo anterior se debe a la radiólisis del agua, que libera radicales libres, y que a su vez oxidan y desnaturalizan los componentes orgánicos del diente<sup>(11,12)</sup>. Se ha encontrado en la literatura que, propiedades como la nanodureza y módulo elástico, disminuyen en esmalte y dentina al exponer un diente a radiación; en cambio, el coeficiente de fricción aumenta<sup>(6)</sup>, dejando una superficie más porosa, siendo más susceptible a la colonización bacteriana. Todas estas propiedades se ven más afectadas a medida que la dosis de radiación aumenta<sup>(12)</sup>.

Otra alteración que se ha observado es que, al exponer dos dientes a un ciclo ácido, uno sometido a radiación y otro no, se evidencia que los dientes sometidos a radiación presentan una disminución mayor en su densidad radiográfica con respecto a su línea base<sup>(12)</sup>.

## 2.4 Interfaz diente-restauración

La caries dental es una de las enfermedades más prevalentes dentro de la población mundial, alcanzando un 80% en jóvenes de entre 6 y 18 años, y un 90% en los adultos. En respuesta a esto, surge el uso de materiales restauradores, que ha evolucionado hasta la odontología adhesiva, la cual está basada en el uso de materiales en base a resina, los que poseen un potencial de sellado<sup>(13)</sup>.

Los sistemas adhesivos *etch-and-rinse* son el gold estándar al momento de realizar restauraciones adhesivas, son aplicados removiendo el smear layer y buscando una desmineralización superficial a través del grabado ácido; para esto se utiliza comúnmente el ácido ortofosfórico, luego se aplica el primer y el adhesivo en uno o dos pasos, buscando una correcta infiltración a través de la matriz colágena, logrando la formación de la llamada capa híbrida. Ésta capa está formada principalmente por fibras colágenas de tipo I y proteoglicanos envueltos en una cadena de polímeros<sup>(13,14)</sup>.

### 2.4.1 Estabilidad de la interfaz diente-restauración

Una de las mayores causas de recambio de las restauraciones en base a resinas, es la caries secundaria. La contracción volumétrica que sufren durante la polimerización los materiales en base a resinas, puede resultar en la formación de gaps entre el diente y la restauración, permitiendo una colonización bacteriana. Las bacterias cariogénicas ejercen una acción enzimática y ácida sobre la interfaz, lo cual acelera su degradación. Además, la formación de estos gaps, sumado a la acción bacteriana, deja expuesta la interfaz al ambiente oral, donde es susceptible a la acción del agua y de enzimas, que también aceleran la degradación de la capa híbrida<sup>(13,14)</sup>. La carga masticatoria también tiene efecto sobre la interfaz, sobre todo en parafunciones como el bruxismo, y tiene implicancias directas sobre la respuesta viscoelástica del complejo diente-restauración, promoviendo fallas en él<sup>(15)</sup>. Otro factor que influye sobre la durabilidad de la interfaz, es la polimerización incompleta, la que puede deberse a una pobre volatilización del solvente o una exposición al agua; también podemos encontrar una capa híbrida más débil, al realizar un excesivo grabado ácido, superando la capacidad de infiltración de los monómeros sobre la matriz colágena o un colapso de ésta. Finalmente, las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs), pueden generar hidrólisis sobre las fibras de colágeno que se encuentren expuestas, logrando una deficiente interfaz<sup>(13)</sup>.

## 2.5 Sistemas Adhesivos

Los adhesivos dentales están diseñados para permitir la unión entre esmalte y/o dentina a diversos materiales de restauración (resinas, cerámicas, postes de fibra, etc.) u otros tipos de materiales, como brackets de ortodoncia. Su formulación química, independiente del tipo de sistema, consta básicamente de monómeros resinosos, fotoiniciadores, estabilizadores o inhibidores, solventes y, en algunos casos, relleno inorgánico<sup>(16,17)</sup>.

Podemos clasificar los sistemas adhesivos según su orden de aparición:

- Primera Generación: Se demostró que las resinas que contienen dimetacrilato de ácido glicerofosfórico (GMDP) se unen a dentina grabada con ácido, pero presentaban el problema de perder resistencia de unión al ser sumergidas en agua. En respuesta a esto, se desarrolla la molécula de acoplamiento, el N-fenilglicina y metacrilato de glicidilo (NPG-GMA). Finalmente demostró pobres resultados a nivel clínico, con una resistencia de unión de sólo 1 a 3 MPa<sup>(18,19)</sup>.
- Segunda Generación: A medida que mejoran los agentes de enlace en los adhesivos, mejora la adhesión a dentina. Para esta nueva generación, se agregaron ésteres halofosforados, como el metacrilato de glicidilo de bisfenol-A (bis-GMA) o el metacrilato de hidroxietilo (HEMA). Con estos nuevos compuestos, se lograba una unión a través de enlaces iónicos al calcio a través de grupos clorofosfatos, pero esta unión seguía siendo débil (de 5 a 7 MPa) y susceptible a la hidrólisis<sup>(18,19)</sup>.
- Tercera Generación: Se adiciona un grabado ácido parcial de la dentina, lo que permite eliminar parcialmente o modificar el smear layer, aumentando la permeabilidad. Además, esta nueva generación, agrega el uso de un imprimador o primer, que contiene moléculas de anhídrido trimetil de hidroxietilo (4-META) y dimetacrilato de bifenilo (BPDM), ambas contienen grupos carboxilo, los cuales son hidrofílicos y permiten una penetración a través del tejido húmedo, como es la dentina. Para esta generación, la resistencia de unión aumentó significativamente, lográndose una resistencia de 8 a 15 MPa<sup>(18,19)</sup>.
- Cuarta Generación: Se modifica el protocolo de grabado, utilizando un grabado total con ácido fosfórico al 40 % sobre esmalte y dentina, durante 15 a 20 segundos, permitiendo la eliminación completa del smear layer. Se plantea la preocupación por el colapso de las fibras colágenas de la dentina al utilizar este nuevo protocolo, y para evitarlo, se describe que la técnica debe dejar dentina humedecida, sin ser excesiva la humedad, ya que puede afectar la adhesión. Esto persigue lograr la interdigitación y ramificaciones laterales entre el adhesivo y la dentina grabada<sup>(20)</sup>. Para esta nueva generación de adhesivos se logra una resistencia de unión de 31 MPa<sup>(18,19)</sup>.
- Quinta Generación: Se busca simplificar la técnica y disminuir el tiempo clínico, para esto se desarrolla un sistema de dos pasos, teniendo dos variantes: la primera, combina primer y adhesivo en una botella, entonces se debe realizar un grabado de la superficie dentaria con ácido fosfórico al 35-37% por 15 a 20 segundos y luego lavar (esto no elimina el problema de colapso de fibras colágenas). La segunda opción es la combinación del ácido y el primer (autograbante) en una botella, conteniendo el adhesivo por separado; el problema que presenta esta alternativa autograbante, es que es menos predecible que el sistema de grabado total y, además, la inclusión del smear layer genera una unión menos confiable a dentina en comparación a su eliminación total<sup>(18)</sup>.

- Sexta Generación: En esta generación se une el ácido, primer y adhesivo en una sola botella. Este sistema logra una buena adhesión a la dentina, pero pobre en esmalte, debido a que la solución ácida es menos efectiva en comparación al ácido fosfórico, al momento de acondicionar la superficie<sup>(18)</sup>.

## **2.5.1 Composición de Sistemas Adhesivos**

### **2.5.1.1 Acondicionador ácido**

Como ya se ha mencionado, el ácido ortofosfórico, en concentraciones que van de 15 al 37%, es el acondicionador más utilizado. Permite una desmineralización superficial del tejido dentario y eliminación de smear layer, permitiendo una mejora en la adhesión<sup>(21)</sup>.

### **2.5.1.2 Primer**

Son resinas hidrófilas bifuncionales, es decir, se comportan como hidrófilas e hidrófobas; a través de su zona hidrófila, se infiltra en la trama colágena, logrando una retención micromecánica, mientras que el extremo hidrófobo se une al material resinoso, por medio de enlaces químicos<sup>(21)</sup>.

### **2.5.1.3 Monómeros de resina**

Son similares a los que contienen las resinas para restauración. Su función consiste en asegurar la unión a través de enlaces covalentes entre la resina y el adhesivo<sup>(16)</sup>. Existe una gran variedad de estos monómeros, y algunos de ellos son:

1. HEMA: Es un monómero de bajo peso molecular, lo que permite que actúe como co-solvente, minimizando la interfaz y aumentando la miscibilidad de componentes hidrofóbicos e hidrofílicos en la solución<sup>(22)</sup>. Presenta buena biocompatibilidad, sin embargo, en su estado sin polimerizar, posee un alto potencial alérgico. Como fluido es soluble en acetona, etanol y agua. Es muy hidrófilo y es excelente promotor de la adhesión. Mejora notablemente la humectación en dentina y con esto, incrementa significativamente las fuerzas adhesivas. HEMA en su estado de monómero o de polímero absorbe agua fácilmente, lo que lleva a algunos autores a pensar en la hipótesis de que al absorber agua podría producir la dilución de los otros monómeros al momento de la polimerización; esto podría resultar en la alteración de las propiedades mecánicas, obteniendo un polímero de menor calidad. Como todo metacrilato, HEMA es susceptible a hidrólisis a pH básico principalmente, pero también en pH ácido<sup>(16,23)</sup>.
2. MDP: Se utiliza principalmente como un monómero de grabado, gracias al grupo dihidrógenofosfato que posee, el que puede disociarse en agua para formar dos protones<sup>(16)</sup>. Estructuralmente, presenta una cadena larga carbonilo, la que hace que sea bastante hidrófobo; es por ello, que el

etanol y la acetona son los disolventes más adecuados para este monómero, además le permitirá mantenerse relativamente estable frente a la hidrólisis. Se ha comprobado que este monómero es capaz de formar enlaces iónicos fuertes con calcio, debido a la baja velocidad de disolución de la sal de  $\text{Ca}^{+2}$ , resultante en su propia solución<sup>(23,24)</sup>.

3. 4-META: Originalmente se utilizó como un monómero que promueve la adhesión, y luego como un monómero desmineralizador<sup>(16)</sup>. Se sabe que 4-MET (forma activa) mejora la humectación de metales, como la amalgama o el oro. Los dos grupos carboxílicos unidos al grupo aromático, proporcionan propiedades ácidas, por lo tanto, desmineralizantes<sup>(16)</sup>. El grupo aromático, sin embargo, es hidrófobo y modera la acidez y la hidrofiliidad de los grupos carboxilo<sup>(16)</sup>. Este monómero es bastante soluble en acetona, moderadamente soluble en etanol y difícilmente soluble en agua. Sin embargo, el etanol no es un disolvente apropiado para este monómero, ya que puede ocurrir una esterificación de los grupos carboxílicos con el grupo hidroxilo, especialmente en condiciones ácidas. Ha demostrado tener buena adhesión a esmalte y dentina, pues puede formar enlaces iónicos con el calcio, pero más débiles que los observados con el MDP<sup>(16)</sup>.
4. Bis-GMA: Se usa universalmente, no sólo en adhesivos, sino también en materiales compuestos. Sin curar, Bis-GMA es altamente viscoso. Debido a su alto peso molecular, proporciona una menor contracción de polimerización y un rápido endurecimiento, por lo que el polímero resultante se caracteriza por tener mejores propiedades mecánicas<sup>(16)</sup>. Sus dos anillos aromáticos voluminosos hacen que este monómero sea bastante rígido; esta propiedad ha demostrado tener un efecto negativo en la tasa de conversión, ya que los grupos de metacrilato polimerizables tendrán dificultades para encontrar un grupo de metacrilato de acoplamiento. Por lo tanto, se requiere la mezcla de otros monómeros de menor peso molecular, para así no comprometer la polimerización<sup>(16)</sup>.
5. TEGDMA: Se usa generalmente junto con Bis-GMA o UDMA, lo cual se debe a que es el peor monómero para ser usado por sí sólo, a razón de su alto valor de contracción de polimerización<sup>(25)</sup>. Una de sus propiedades es que otorga una mayor flexibilidad, y al ser utilizado junto con Bis-GMA (que es más rígido), la mezcla dará como resultado resinas con un mayor índice de conversión. Además, se demostró que esto genera un aumento de la resistencia a la tracción, pero al mismo tiempo reduce la resistencia a la flexión<sup>(16)</sup>.
6. UDMA: Los co-polímeros de UDMA presentan una muy elevada fuerza flexural, módulo elástico y dureza<sup>(26)</sup>. Posee un peso molecular comparable al de Bis-GMA, no obstante, UDMA exhibe propiedades de viscosidad más bajas<sup>(16)</sup>. En los adhesivos, UDMA se usa solo o en combinación con TEGDMA y/o Bis-GMA; su diferencia principal respecto

a esta última, es su flexibilidad superior, ya que los enlaces éter en UDMA permiten una rotación con mayor facilidad en comparación con los dos anillos aromáticos voluminosos en Bis-GMA<sup>(16)</sup>.

#### **2.5.1.4 Fotoiniciadores**

Existen dos tipos de fotoiniciadores, los tipo I o fotoiniciadores de foto-fragmentación, como los ésteres benzoicos, benzofenona, óxidos de acilfosfina o PPD, donde son estas moléculas excitadas las que liberan radicales libres; los tipo II o fotoiniciadores de transferencia de electrones, como la canforquinona (CQ), donde ocurre una reacción bimolecular en la que el estado de excitación del fotoiniciador interactúa con una segunda molécula (un co-iniciador) para producir radicales libres<sup>(16)</sup>. La CQ es el fotoiniciador más usado, tanto en composite como en adhesivos, y debe ser combinado con un co-iniciador<sup>(16)</sup>. Tiene una gran ventaja, ya que absorbe un amplio espectro de longitudes de onda, de 360 a 510 nm, con una absorbancia máxima de alrededor de 468 nm (luz azul). Luego de ser excitado, formará un complejo excitado que produce radicales libre por "abstracción de hidrógeno"<sup>(16)</sup>. Finalmente, la principal desventaja de la CQ es su color café-amarillento que, a pesar de ser utilizado en muy bajas concentraciones, modifica significativamente el color del adhesivo o composite<sup>(16)</sup>.

#### **2.5.1.5 Iniciadores Químicos**

El uso de iniciadores químicos generalmente está restringido a cementos y resinas que no pueden utilizar únicamente el curado por luz para la polimerización<sup>(16)</sup>. Los adhesivos que se curan químicamente, necesitan la mezcla del iniciador con el co-iniciador, después de lo cual comenzará la reacción de polimerización<sup>(16)</sup>. En esencia, constan de dos botellas separadas, cuyo contenido debe mezclarse antes de la aplicación en la superficie del diente. El iniciador más común en las resinas autopolimerizables sería el peróxido de benzoilo (BPO), junto con una amina terciaria<sup>(16)</sup>. BPO reaccionará con la amina terciaria como un co-iniciador, produciendo radicales. Es un sólido incoloro, cristalino, muy poco soluble en agua, pero soluble en etanol y acetona. Como todos los peróxidos orgánicos, el BPO se somete a una fotólisis lenta cuando se expone a la luz, por lo que los adhesivos autopolimerizables siempre deben almacenarse en la oscuridad<sup>(16)</sup>.

#### **2.5.1.6 Inhibidores**

Los inhibidores y los retardadores evitarán la iniciación espontánea y la propagación de la reacción de polimerización por radicales libres, al contener fácilmente estos radicales, aumentando la vida útil del adhesivo<sup>(16)</sup>. El efecto de los inhibidores en la polimerización propiamente tal es insignificante, ya que sólo se utilizan en cantidades diminutas y cuando la reacción de polimerización se desencadena, ya sea por fotopolimerización o por la mezcla de dos componentes, se formará una cantidad mucho mayor de radicales, lo que supera la cantidad de inhibidor<sup>(16)</sup>. Los inhibidores usados más frecuentemente en los adhesivos son el hidroxitolueno butilado, también el butilhidroxitolueno (BHT) y la hidroquinona de monometil éter (MEHQ). Mientras que

el BHT se usa con más frecuencia en composite y adhesivos hidrófobos, MEHQ se prefiere para las resinas más hidrófilas<sup>(16)</sup>.

### 2.5.1.7 Solventes

La adición de solventes a las resinas es indispensable para la composición de los adhesivos que necesitan lograr adhesión en la dentina. La naturaleza húmeda de la dentina solo permite una buena humectación cuando se aplica una unión hidrofílica<sup>(16)</sup>. Al agregar monómeros hidrófilos, por un lado, y un solvente por otro, el comportamiento de humectación del adhesivo se mejora drásticamente. Dentro de los sistemas adhesivos que podemos encontrar en el comercio, los solventes más comunes son:

1. Agua: Es un disolvente fuertemente polar con una constante dieléctrica alta, capaz de disolver celosías iónicas y compuestos polares. Su capacidad de disolución está muy determinada por su capacidad de formar fuertes enlaces de hidrógeno<sup>(16)</sup>. Sin embargo, el agua es un disolvente pobre para los compuestos orgánicos, es por esto que suele acompañarse de otro solvente como etanol o acetona. El agua permite una rehidratación de las fibras colágenas que han colapsado al momento de secar la superficie<sup>(16)</sup>. Como solvente el gran problema que presenta se da al momento de eliminarlo, debido a su alta temperatura de ebullición y su baja presión de vapor de agua, esto puede alterar la fuerza adhesiva final<sup>(16)</sup>.
2. Acetona: Solvente orgánico que presenta un alto momento dipolar, el cual, en combinación con su constante dieléctrica relativamente baja, permite la disolución, tanto de compuestos polares como apolares; por esta razón, la acetona es una buena opción de solvente en adhesivos que combinan componentes hidrófobos e hidrófilos, disminuyendo la viscosidad de éstos, lo que mejora el poder de penetración del agente adhesivo<sup>(16,27)</sup>. Es cuatro veces más volátil que el etanol, lo que podría reducir la vida útil del adhesivo. La acetona tiene una muy buena capacidad de eliminación de agua, gracias a su alto momento dipolar y excelentes capacidades de evaporación, es por este motivo que es posible encontrarla en adhesivos que utilizan agua como solvente, pero por lo general, la acetona, se utiliza como solvente único; en los casos donde utilizemos un adhesivo que sólo contenga acetona, debemos tener cuidado de no desecar la superficie dentaria, ya que la acetona tiene la capacidad de disminuir la tensión superficial del agua, provocando su desplazamiento, lo que puede desecar la superficie, generando un colapso de la red de colágeno<sup>(16,27)</sup>.
3. Etanol: Al igual que el agua, el etanol es un solvente polar que formará enlaces de hidrógeno con sus solutos<sup>(16)</sup>. Sin embargo, debido a su constante dieléctrica mucho más baja, el etanol también es un disolvente más apropiado para solutos menos polares. Su mayor presión de vapor en comparación con el agua permite una mejor evaporación por secado al aire y, por lo general, el etanol se utiliza junto con el agua como co-disolvente,

logrando una mejor eliminación del agua, este fenómeno ocurre gracias a la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua y de etanol<sup>(16)</sup>. El etanol no es un solvente apropiado para monómeros con restos de ácido carboxílico debido a la esterificación de estos, causando así, una inactivación de la función ácida del monómero<sup>(16)</sup>.

### **2.5.1.8 Rellenos**

Los sistemas adhesivos para restauraciones directas tradicionalmente no contenían partículas de relleno. Los rellenos se pueden agregar a los adhesivos por varias razones. Algunos autores sugieren adicionar partículas de relleno para fortalecer la capa adhesiva, esto es controversial debido a que el porcentaje de relleno agregado es mínimo<sup>(16)</sup>. Otros autores proponen el relleno como medio para aumentar la viscosidad del adhesivo, logrando con esto una capa adhesiva de mayor grosor, se busca lograr esto fundamentado en que capas muy delgadas de adhesivo no logran una polimerización completa debido a la inhibición del oxígeno. Dependiendo de la composición química del relleno, podrían liberar fluoruros y aumentar la radiopacidad<sup>(16)</sup>. Finalmente, las partículas de relleno no pueden superar los 20 nm, ya que se ha demostrado que el espacio interfibrilar de las fibras colágenas luego de ser grabadas es de 20 nm, por lo tanto, de superar este tamaño no se logra que penetre correctamente para formar una capa híbrida, sin embargo, a pesar de estos datos y de utilizar partículas de relleno, 7 o más nanómetros más pequeñas que este espacio, todavía existe un debate respecto a si realmente logran la infiltración del entramado de fibras colágenas<sup>(16)</sup>.

## **2.6 Biofilm y colonización de la superficie dentaria**

Como la mayoría de los biofilm, la formación del biofilm oral está caracterizado por un proceso continuo de sucesión de especies bacterianas, donde cada una cumple una función relevante dentro del proceso de formación<sup>(28)</sup>. Éste puede dividirse en 3 grandes etapas: adhesión, colonización y maduración del biofilm. Todo el proceso está caracterizado por colonizadores tempranos y tardíos, donde los tempranos serán los encargados de las primeras dos etapas. Las especies de estreptococos son colonizadores primarios y son considerados la piedra angular en la formación del biofilm, ya que poseen la habilidad de enlazarse a través de sus antígenos I y II a las proteínas salivales, promoviendo la llegada de colonizadores secundarios a través de coagregación intergenérica<sup>(29)</sup>. *Actinomyces naeslundii* es un colonizador secundario, bien conocido por su afinidad con la especie de estreptococo; el gran participante de esta etapa de colonización es el *Fusobacterium nucleatum*, quien tiene una gran capacidad de coagregarse, tanto a colonizadores primarios, como secundarios. Para el último grupo que participa de este proceso, tenemos especies de bacteroides y espiroquetas. La coagregación intergenérica no sólo contribuye al crecimiento y colonización del biofilm, sino que también a intercambios genéticos y metabólicos entre las diferentes especies<sup>(28)</sup>.

### **2.6.1 Streptococcus mutans**

Corresponde a una bacteria coco gram positivo, dispuesto en cadena no móvil, acidúrico y fermentador de glucosa<sup>(30)</sup>. Los estudios clásicos respecto a cultivos microbianos han establecido como agentes causantes principales de la caries dental al *Streptococcus mutans* y al *Lactobacillus*<sup>(29)</sup>. Presenta un rol potencial en el inicio del cambio ecológico, al promover la acidificación o adherencia y al desencadenar un estado disbiótico<sup>(31)</sup>. A pesar de que se conoce en la actualidad que existen muchas otras bacterias involucradas en el proceso de la caries dental, el *Streptococcus mutans* sigue siendo el gold estándar para ser utilizado en investigación<sup>(29,31)</sup>.

### **2.7 Partículas de cobre**

Como ya hemos mencionado, una parte vital dentro de las restauraciones adhesivas es la interfaz diente-restauración, la cual está sometida a colonización bacteriana; es por esto que se ha investigado la manera de desarrollar materiales dentales que logren disminuir la formación de biofilm en los márgenes<sup>(32)</sup>.

Se ha evidenciado que las nanopartículas metálicas tienen buenas propiedades antibacterianas, presentando una alta actividad química y efectividad biocida<sup>(33)</sup>. Asimismo, se ha estudiado ampliamente la actividad antimicrobiana de la plata y el cobre; sin embargo, este último ha demostrado mayor actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus*<sup>(32)</sup>. Junto con lo anterior, el cobre presenta otras ventajas, como ser menos costoso, de sintetización sencilla y ser de fácil oxidación en medios aéreos y acuosos, produciendo nanopartículas de óxidos. Las nanopartículas pueden ser fácilmente adicionadas a los polímeros, manteniendo su estabilidad y propiedades mecánicas<sup>(32,33)</sup>.

Los mecanismos de acción del cobre más aceptados en la literatura son: la acumulación y disolución de nanopartículas de óxidos de cobre (NPOC) en la membrana bacteriana, cambiando su permeabilidad y teniendo como consecuencia la liberación de lipopolisacáridos, proteínas de membrana y biomoléculas intracelulares, y la disipación de la fuerza motriz protónica a través de la membrana plasmática<sup>(34)</sup>. Otra teoría es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o de iones de NPOC, provocando daño oxidativo posterior a las estructuras celulares. La última hipótesis es la captación de iones metálicos derivados de NPOC o de NPOC en su totalidad en las células, seguido por el agotamiento de la producción intracelular de ATP y alteración de la replicación del ADN<sup>(32,34,35)</sup>.

### **2.8 Partículas de zinc**

El colágeno sirve como una matriz orgánica para la aposición de minerales durante el desarrollo del diente, y posteriormente, soporta la estructura de la dentina. Además, en el campo de la odontología adhesiva, el colágeno forma una capa híbrida con los adhesivos para la unión de resina a la dentina, sirviendo como componente central para la resistencia de esta unión<sup>(36)</sup>.

Las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) son enzimas dependientes de  $Zn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ , capaces de degradar casi todos los componentes de la matriz extracelular. Durante el desarrollo del diente, las MMPs participan en la formación de la matriz orgánica y reconstituyen el tejido normal en el esmalte y en la dentina antes de la mineralización<sup>(36,37)</sup>. Las MMPs son segregadas por odontoblastos o ameloblastos y existen como proenzimas hasta su activación a través de la escisión de péptidos por estímulos externos, como el ambiente ácido, enzimas bacterianas, agua y calor. Estudios han verificado la participación de las MMPs activadas por caries dental, provocando el colapso de la interfaz adhesiva y erosión química de los dientes<sup>(36,37)</sup>.

Para lograr la protección de la matriz colágena de la acción de las MMPs, se ha utilizado una alta concentración de zinc, fundamentado en el papel estructural del zinc sobre las proteínas, logrando una estabilidad dentro de su estructura terciaria<sup>(14)</sup>.

El óxido de zinc expone un amplio espectro de actividad biocida ante diferentes bacterias, hongos y virus, dada su producción de ROS y a la liberación de iones de zinc<sup>(32)</sup>. Por otro lado, las nanopartículas de óxido de zinc son versátiles y se consideran como potenciales materiales que actúan como agentes biocidas o desinfectantes, propiedad que es atribuida a su alta estabilidad<sup>(38)</sup>. Se ha comprobado que estas nanopartículas son bioseguras y biocompatibles, razón por la cual han sido utilizadas en diversas áreas de la medicina<sup>(39)</sup>.

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo general

Determinar el potencial antimicrobiano y citotóxico de polímeros adhesivos modificados con nanopartículas de cobre y zinc, en comparación al polímero adhesivo convencional.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Evaluar el halo de inhibición frente a *Streptococcus mutans* de los polímeros adhesivos modificados con nanopartículas de cobre y zinc, y convencionales mediante la prueba de difusión en agar.
- Determinar la concentración inhibitoria mínima para la inhibición de crecimiento bacteriano de *S. Mutans* de los polímeros adhesivos modificados con nanopartículas de cobre y zinc, y convencionales mediante el test de microdilución.
- Cuantificar el crecimiento del microbioma sobre los polímeros adhesivos modificados con nanopartículas de cobre y zinc, y convencionales, mediante la prueba de extracción de ADN.
- Evaluar la estabilidad de la matriz polimérica formada de polímeros adhesivos modificados con nanopartículas de cobre y zinc, y convencionales, mediante el test de sorción y solubilidad.
- Evaluar el potencial citotóxico (inducción de apoptosis) de polímeros adhesivos modificados con nanopartículas de cobre y zinc, y convencionales.

### 4. Pregunta de Investigación

¿Cuál es el potencial antimicrobiano y citotóxico de polímeros adhesivos modificados con nanopartículas de cobre y zinc en comparación a un polímero adhesivo convencional?

### 5. Hipótesis

**H<sub>0</sub>:** No existe diferencia en el potencial antimicrobiano y de citotoxicidad generado por los polímeros adhesivos modificados con nanopartículas de cobre y zinc, y los convencionales.

**H<sub>1</sub>:** Existe diferencia en el potencial antimicrobiano y de citotoxicidad generado por los polímeros adhesivos modificados con nanopartículas de cobre y zinc, y los convencionales.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Formulación de los polímeros adhesivos modificados con nanopartículas

Para este fin, se utilizaron tres sistemas adhesivos poliméricos comerciales, los cuales son Prime and Bond 2.1® (Dentsply®, Charlotte, EE.UU), XP Bond® (Dentsply®, Charlotte, EE.UU) y Prime and Bond Universal® (Sirona Dentsply®, Charlotte, EE.UU). La composición de dichos sistemas se presenta en la tabla I.

De cada sistema polimérico convencional, se formularon 4 variantes, adicionando a cada una de ellas diferentes concentraciones y combinaciones de cobre (Cu) y zinc (Zn), las que corresponden a:

- Polímero Cu I: al polímero convencional se le adicionaron nanopartículas de cobre I, logrando una concentración final en botella de 1% de cobre.
- Polímero Cu II: al polímero convencional se le adicionaron nanopartículas de cobre II, logrando una concentración final en botella de 1% de cobre.
- Polímero Cu I + Zn: al polímero convencional se le adicionaron nanopartículas de cobre I y zinc, logrando una concentración final en botella de 0,5% de cobre I y 0,5% de zinc.
- Polímero Cu II + Zn: al polímero convencional se le adicionaron nanopartículas de cobre II y zinc, logrando una concentración final en botella de 0,5% de cobre II y 0,5% de zinc.

Para la formulación de estos polímeros se llevó a cabo el mismo protocolo en cada una de las variantes, el cual consistió en adicionar estas nanopartículas al polímero convencional, mediante el uso de una micropipeta, para posteriormente llevarlo a una sonicadora durante 30 minutos. Dicho polímero modificado estará contenido en la botella de fábrica; para su sonicación se colocó en posición vertical dentro de un vaso de precipitado, el cual estará en contacto directo con el agua contenida en la sonicadora, manteniendo de esta forma el frasco del polímero seco. Esta agua debe ser desmineralizada y no debe superar los 25 °C. Durante este proceso, el polímero modificado debe ser retirado cada 5 minutos de la sonicadora para ser agitado manualmente de forma horizontal en posición vertical; el objetivo de esto es lograr una mejor distribución y homogeneización de las nanopartículas en el polímero.

De esta manera, se obtuvieron en total 12 polímeros adhesivos modificados con nanopartículas. Para la ejecución de las diferentes pruebas, se utilizaron estos 12 polímeros junto con la variante control (polímero adhesivo convencional, sin modificar) de cada uno, disponiendo así de un total de 15 polímeros.

Para efectos de esta investigación, se utilizó la siguiente nomenclatura:

- PB: Prime and Bond 2.1®, Dentsply®, Charlotte, EE.UU.
- XP: XP Bond®, Dentsply®, Charlotte, EE.UU.
- PBU: Prime and Bond Universal®, Sirona Dentsply®, Charlotte, EE.UU.

<b>Composición polímeros adhesivos convencionales</b>		
Prime and Bond 2.1® (libre de HEMA)	XP Bond® (con HEMA)	Prime and Bond Universal® (con polímeros ácidos)
Dimetacrilato de uretano (UDMA)	Dimetacrilato modificado con ácido carboxílico (resina TCB)	Ácido fosfórico modificado con acrilato de resina (PENTA)
Ácido fosfórico modificado con acrilato de resina (PENTA)	Ácido fosfórico modificado con acrilato de resina (PENTA)	Acrilato multifuncionales
Canforquinona	(PENTA)	Acrilatos acídicos
Etil dimetil aminobenzoato (EDAB)	Dimetacrilato de uretano (UDMA)	Isopropanol
Butil Hidroxitolueno (BHT)	Trietilenglicol dimetacrilato (TEGDMA)	Agua
Fluorhidrato de Cetilamina	2-hidroxietilmetacrilato (HEMA)	Iniciadores
Acetona	Bencenodiol butilado (estabilizador)	Estabilizante
	Etil-4(dimetilamino) benzoato	
	Canforquinona	
	Sílica amorfa funcionalizada	
	Butanol terciario	

Tabla I. Composición de polímeros adhesivos convencionales (comerciales)<sup>(40-42)</sup>.

## 6.2 Tipo de estudio

Estudio de tipo experimental in vitro.

## 6.3 Difusión en agar

Para la ejecución de esta prueba, se siguió la pauta establecida en el estudio realizado por Imazato<sup>(43)</sup>, con el fin de evaluar el halo de inhibición frente a *S. mutans* de los polímeros adhesivos experimentales en agar.

Para su realización, se utilizó la cepa de *Streptococcus mutans* (ATCC® 25175TM). Dicha cepa fue activada mediante la realización de su siembra en agar Columbia, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las bacterias fueron incubadas durante 48 horas a 37 °C en una estufa de cultivo, transcurrido este período se realizó la inoculación de la cepa, siguiendo las normas del comité para estudios clínicos y de laboratorio. Se sembró la cepa con una suspensión bacteriana de 0.5 McFarland en agar Mueller Hinton suplementado con sangre de cordero al 5%, se dejó incubando por 24 horas a 37°C en una estufa de cultivo. Desde este cultivo joven, se realizó la inoculación en agar Mueller Hinton suplementado con sangre de cordero al 5% dispuesto en una placa de cultivo, para la ejecución de la prueba de difusión.

Para la formulación de las muestras de polímeros, se embebieron discos de papel filtro estéril de 6 mm de diámetro; para esto se pipetearon 20  $\mu$ L de polímero en cada disco de papel, posteriormente se dejaron secar las muestras para eliminar los excesos de polímero. Asimismo, se confeccionó una muestra control positivo, siguiendo la misma metodología anterior, mediante el uso de clorhexidina al 0,2%, en vez de polímero.

De esta forma, se obtuvo un total de 54 discos de muestra, considerando la realización de esta prueba por triplicado. Los discos se posicionaron sobre la placa de cultivo de forma equidistante, quedando el control positivo ubicado en el centro de la placa, y a su alrededor 5 discos de muestra correspondientes a los polímeros (fig.1). A cada polímero y al control positivo se le asignó previamente un número, el cual se etiquetó con lápiz indeleble en el reverso de la placa de cultivo, a modo de rotular cada uno de los discos (Tabla II).

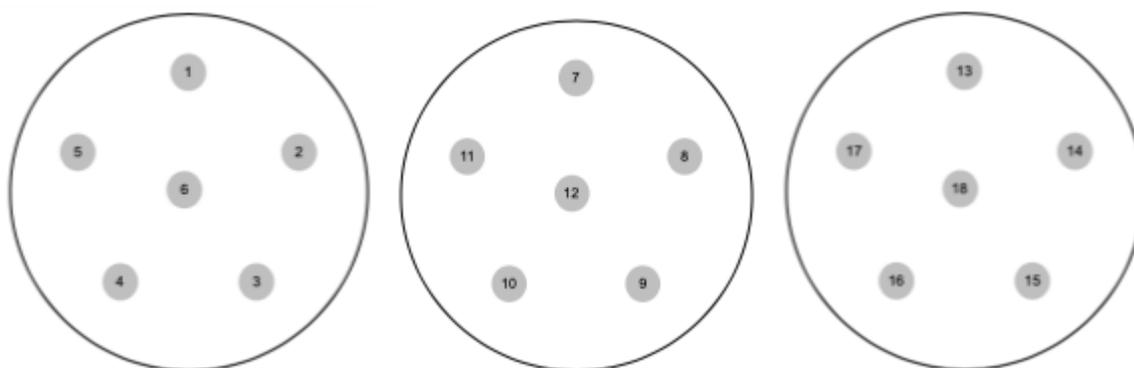


Figura 1. Distribución discos de prueba en agar.

Número asignado	Compuesto
1	PB
2	PB Cu I
3	PB Cu II
4	PB Cu I + Zn
5	PB Cu II + Zn
7	XP
8	XP Cu I
9	XP Cu II
10	XP Cu I + Zn
11	XP Cu II + Zn
13	PBU
14	PBU Cu I
15	PBU Cu II
16	PBU Cu I + Zn
17	PBU Cu II + Zn
6, 12, 18	Clorhexidina al 0,2%

Tabla II. Rotulación de discos de prueba.

Una vez posicionados todos los discos, se dejaron incubar por 24 horas a 37°C, en una estufa de cultivo; al cabo de este tiempo, se realizó la observación de las muestras y la medición del halo de inhibición que produjo cada compuesto en el agar, mediante el uso de una regla milimetrada transparente, la que se ubicó sobre la placa, sin entrar en contacto con el agar. Se consideró como marca inicial el borde externo del disco de papel, mientras que el otro extremo de la medición fue ubicado hasta el límite externo del halo de inhibición. La medición fue realizada por 3 examinadores calibrados y se consignó la medición llegada a consenso entre los 3 investigadores.

#### 6.4 Microdilución

Para la realización de esta prueba, se siguió la pauta establecida en el estudio realizado por Cheng et al<sup>(7)</sup>, con el objetivo de determinar la concentración inhibitoria mínima de los polímeros adhesivos experimentales, para poder inhibir el crecimiento bacteriano del *S. mutans*.

Para su realización, se utilizó caldo cerebro corazón (BHI), del cual se extrajeron 200 µL mediante el uso de una micropipeta, cantidad que se dispuso en un tubo Eppendorf de 1.5 mL; este procedimiento se realizó 8 veces, obteniendo de esta manera, 8 tubos Eppendorf rotulados previamente (del 1 al 8). La rotulación se correspondía al primer polímero experimental a trabajar.

Una vez añadidos estos 200 µl de caldo en cada tubo Eppendorf, se aplicó en el primero de ellos, 200 µl de polímero experimental, se homogeneizó la mezcla y luego se extrajeron 200 µl de dicha mezcla y se colocó en el siguiente tubo Eppendorf (número 2); de esta forma, se obtienen 8 microdiluciones del mismo polímero (cada vez que se realiza la mezcla, se diluye a la mitad).

Posteriormente, en una microplaca de 96 pocillos, se procede a colocar las diferentes microdiluciones. En cada microplaca, se trabajaron 2 polímeros experimentales, utilizando un total de 6 microplacas, los que se dispusieron de la siguiente forma, como se muestra en (fig.2):

- Microplaca 1: polímero PB, variante Cu I y polímero PB, variante Cu II
- Microplaca 2: polímero PB, variante Cu I + Zn y polímero PB, variante Cu II + Zn
- Microplaca 3: polímero XP, variante Cu I y polímero XP, variante Cu II
- Microplaca 4: polímero XP, variante Cu I + Zn y polímero XP, variante Cu II + Zn
- Microplaca 5: polímero PBU, variante Cu I y polímero PBU, variante Cu II
- Microplaca 6: polímero PBU, variante Cu I + Zn y polímero PBU, variante Cu II + Zn

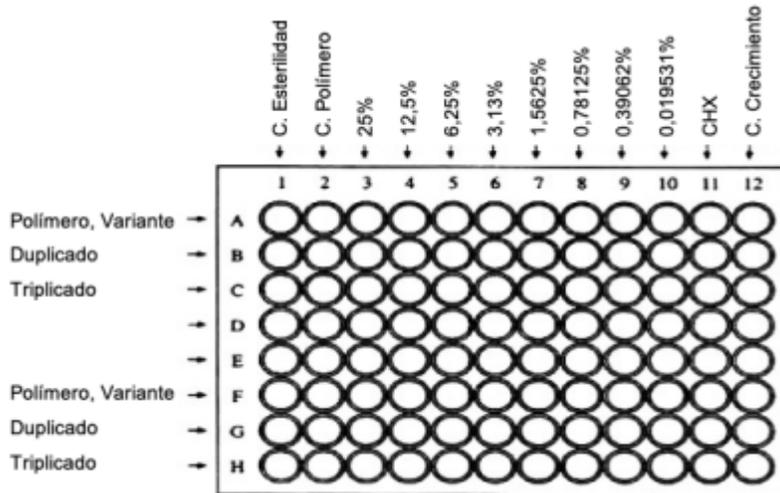


Figura 2. Distribución de microdiluciones por microplaca.

Los conceptos mencionados en (fig.2) corresponden a lo siguiente:

A) Columnas:

- Columna 1: control de esterilidad o control negativo, correspondiente a 100  $\mu$ L de caldo BHI.
- Columna 2: control polímero, correspondiente a 50  $\mu$ L de polímero convencional con 50  $\mu$ L de inóculo de *S. Mutans*.
- Columna 3 a 10: 50  $\mu$ L de la microdilución de polímero experimental (dispuestos de mayor a menor concentración) con 50  $\mu$ L de inóculo de *S. Mutans*.
- Columna 11: CHX (control clorhexidina), correspondientes a 50  $\mu$ L de clorhexidina al 0,4% con 50  $\mu$ L de inóculo de *S. Mutans*.
- Columna 12: control de crecimiento o control positivo, correspondiente a 50  $\mu$ L de inóculo de *S. Mutans* y 50  $\mu$ L de caldo BHI.

B) Filas:

- A, B, C: polímero, variante, por triplicado
- D, E: vacíos
- F, G, H: polímero, variante, por triplicado

Una vez completadas las 6 microplacas, se incubaron por 48 horas a 37°C en una estufa de cultivo. Finalmente, a través de examen visual se analizó la presencia de crecimiento de la cepa de *S. Mutans*, mediante el uso de microscopio óptico Carl Zeiss, a una magnificación de 20x. Para ello, se contó con 5 observadores calibrados, quienes llegaron a consenso en lo observado.

## 6.5 Extracción de ADN

Para esta prueba, se siguieron las directrices efectuadas en la investigación de De Melo et al<sup>(44)</sup>. La finalidad de ésta es cuantificar el crecimiento del microbioma sobre los polímeros adhesivos experimentales en discos de prueba, sometidos al medio bucal.

Para dicha prueba, se llevó a cabo la confección de dispositivos intraorales, para lo cual, se reunieron a 10 personas voluntarias para participar en esta prueba; los sujetos eran estudiantes de odontología, pertenecientes a la Universidad de Valparaíso, cuyo rango etario oscilaba entre 18 y 29 años, de los cuales 3 participantes correspondían a hombres y 7 a mujeres.

A dichos participantes, se les tomó una impresión de maxilar superior con alginato y cubeta tipo Rimlock, del tamaño necesario para cada participante. Una vez obtenida la impresión, se realizó el posterior vaciado con yeso extraduro. Una vez obtenidos los modelos en yeso, se efectuó un estampado con una lámina de acetato flexible de 2 mm de espesor, en una estampadora, el cual se recortó con una tijera metálica recta, a aproximadamente 2 mm del margen gingival sin seguir el festoneado, mientras que la zona del paladar fue recortada en forma de herradura.

En los dispositivos obtenidos, se realizaron perforaciones a cada lado (derecho e izquierdo) sobre las superficies palatinas del dispositivo, ubicadas lo más distal posible, donde posteriormente irían ubicados discos de polímero.

Para la confección de los discos de polímero, se utilizó una matriz de silicona pesada Spedeex (Coltene®, Altstätten, Suiza), en la cual se aplicó una base de resina compuesta Opallis® (FGM®, Joinville, Brasil) de 1 mm de espesor por 6 mm de diámetro, la cual que se fotopolimerizó por 40 segundos con una lámpara de fotocurado Woodpecker® (Guilin, República Popular China); posteriormente se colocaron dos gotas del polímero experimental, dejándolas 60 segundos sin fotopolimerización para volatilizar el solvente, para finalmente fotocurar por 80 segundos.

Una vez obtenidos los discos de prueba, se posicionaron en los orificios previamente realizados en el dispositivo intraoral y se adhirieron a través de un adhesivo instantáneo, correspondiente a cianoacrilato de metilo.

Con los dispositivos confeccionados, se realizó la entrega de los mismos a los voluntarios, en un contenedor desinfectado con alcohol al 70%, junto con las instrucciones para el uso del dispositivo (anexo 1). Asimismo, los voluntarios firmaron un consentimiento informado, el cual también se adjunta en el anexo 1.

Para el uso del dispositivo, se solicitó a los sujetos que lo utilizaran durante 8 horas diarias, durante el transcurso de la noche por 10 días; los sujetos debían cepillarse por última vez después de almuerzo; la remoción del dispositivo debía efectuarse en un lugar con puertas y ventanas cerradas y sin que el dispositivo tocara superficie alguna entre el trayecto de boca a la caja contenedora; la higienización del dispositivo debía ser exclusivamente bajo un chorro de agua. Cabe señalar que el equipo de investigación les recordaba a los participantes el momento de instalación del dispositivo vía mensaje personal, durante todo el proceso.

Dentro de los participantes, es preciso mencionar que uno de ellos presentó molestias de origen articular durante la primera noche de uso, por lo cual se contactó a otro

voluntario para que lo reemplazase, siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito, con un desfase de 24 días versus los otros participantes. Respecto a la proporción hombres : mujeres no hubo variación, pues el sujeto desertor era mujer, y fue reemplazada por otra mujer.

En relación a la distribución de los discos de prueba en los dispositivos, ésta se efectuó aleatoriamente, como se muestra en (fig.3) y tabla III.

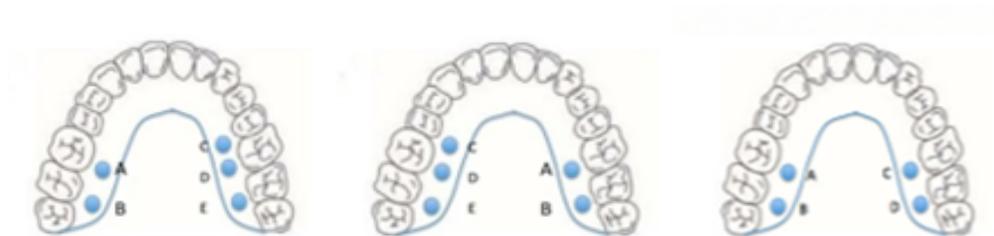


Figura 3. Distribución de muestras por dispositivo intraoral.

Placa	A	B	C	D	E	Distribución de muestras
1	PB	XP Cu I	PB Cu I	XP Cu II + Zn	PBU Cu I	Figura 2
2	XP	PB Cu II	XP Cu II	PBU Cu II	PBU Cu I + Zn	Figura 1
3	PB	XP Cu I + Zn	PB Cu I + Zn	PBU Cu I + Zn	PBU Cu I	Figura 2
4	XP	XP Cu II + Zn	PB Cu II + Zn	PBU Cu II + Zn	PBU Cu II	Figura 2
5	PB	XP Cu I	PB Cu I	PBU Cu I	PBU Cu II + Zn	Figura 2
6	XP	PB Cu II	XP Cu II	PBU Cu II		Figura 3
7	PB Cu I	XP Cu I	PB Cu II	PBU		Figura 3
8	XP Cu II	PB Cu I + Zn	XP Cu I + Zn	PBU		Figura 3
9	PB Cu I + Zn	XP Cu I + Zn	PB Cu II + Zn	PBU		Figura 3
10	XP Cu II + Zn	PB Cu II + Zn	PBU Cu I + Zn	PBU Cu II + Zn		Figura 3

Tabla III. Distribución de muestras por dispositivo intraoral.

La recolección de dispositivos se realizó a primera hora el día después a la última noche de uso, para lo cual se les solicitó a los voluntarios llegar utilizando el dispositivo intraoral.

Para la extracción de los discos desde el dispositivo, ésta se efectuó inmediatamente recibido el dispositivo por parte del voluntario. Para esto, se utilizó una espátula de cera n°7 calentada en mechero. Luego los discos fueron almacenados en tubos Eppendorf de 1.5 mL, previamente rotulados, sobre los cuales se pipeteó 1 mL de agua milli-Q; finalmente las muestras se congelaron a -80°C, en espera del kit de extracción de DNA.

Para la rotulación de los tubos tipo Eppendorf, se utilizó la tabla previamente expuesta, combinando filas y columnas, obteniendo número de placa y polímero de la siguiente forma: 1A a 1E, 2A a 2E, 3A a 3E, etc. Dicho rotulado se efectuó con lápiz indeleble.

Para la extracción de ADN, se descongelaron los tubos tipo Eppendorf a temperatura ambiente, obteniendo las muestras rotuladas, correspondientes a los siguientes polímeros que se aprecian en la tabla IV.

<b>Polímeros adhesivos</b>	<b>Muestras</b>
PB	1A-3A
PB Cu I	7A-1C-5C
PB Cu II	2B-6B-7C
PB Cu I + Zn	9A-8B-3C
PB Cu II + Zn	10B-4C-9C
XP	2A-4A-6A
XP Cu I	1B-7B-5B
XP Cu II	8A-2C-6C
XP Cu I + Zn	3B-9B-8C
XP Cu II + Zn	10A-4B
PBU	7D-8D-9D
PBU Cu I	3E
PBU Cu II	2D-6D-4E
PBU Cu I + Zn	10C-3D-2E
PBU Cu II + Zn	4D-10D

Tabla IV. Muestras disponibles por tipo de polímero.

Cabe señalar que los discos 5A, 5D y 5E no formaron parte de este estudio, puesto a que se extraviaron en la etapa de uso de dispositivo por parte de los voluntarios. Los discos 1D y 1E se rotularon erróneamente bajo el nombre de “1D”, por lo que al desconocer de qué polímero se trataba, se decidió descartar ambas muestras.

Para la realización de la siguiente etapa, se siguieron las indicaciones del kit de extracción DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen®, Germantown, EE.UU)<sup>(45)</sup>.

Una vez descongelados los tubos Eppendorf, se unieron en un mismo tubo aquellas muestras que correspondían al mismo tipo de polímero, con tal de obtener una mayor cantidad de ADN; luego se procedió a agitar en vórtex cada tubo por 20 minutos.

A continuación, se procedió a preparar la base del buffer de lisis enzimático, el cual consistió en 108 µL de Tritón X-100, 0.0052 g de EDTA (2 mM), 0.0283 g de Tris-HCl (20 mM) y 8.892 µL de agua ultrapura. Para dicho preparado, justo antes de usarlo, se agregaron 0.18 g de lisozima y esterilizó por filtración. Ya finalizada la etapa de vórtex, se rotuló un tubo cónico por polímero y se juntaron las muestras seleccionadas. Se sometieron los tubos cónicos centrifugación a 7.500 rpm por 10 minutos; se descartó

el sobrenadante, cuidando dejar 200  $\mu\text{L}$  para resuspender el pellet y traspasarlo a un tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL.

Se procedió a terminar la preparación del buffer de lisis enzimático, agregando la lisozima y filtrando. Una vez listos todos los traspasos a tubos tipo Eppendorf de 1.5 mL, se agregó a cada uno de ellos, 180  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis enzimático y se dejó incubar por 30 minutos a 37 ° C, en una estufa de cultivo.

A continuación, se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de proteinasa K y 200  $\mu\text{L}$  de buffer AL (sin etanol), resuspendiendo. Se mezcló en vórtex y se dejó incubar por 30 minutos a 56 °C; se realizó Spin.

Se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (grado molecular) y se mezcló en vórtex por 15 segundos; se realizó Spin.

Se agregó la mezcla a la columna, se centrifugó a 8.000 rpm por 1 minuto y se descartó el fluido. Se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección y se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de buffer AW1. Se centrifugó a 8.000 rpm por 1 minuto y se descartó el fluido.

Se colocó la columna en un nuevo tubo de recolección y se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de buffer AW2, se centrifugó a 14.000 rpm por 3 minutos y se descartó el fluido y tubo de recolección.

Se sacó la columna cuidadosamente sin que la membrana entrara en contacto con el fluido, se eliminó el fluido y volvió a centrifugar a 14.000 rpm por 1 minuto. Se descartó el fluido y el tubo de recolección.

Se dispone la membrana en un tubo tipo Eppendorf limpio de 1.5 mL y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de buffer AE a la membrana, se dejó incubar por 1 minuto a temperatura ambiente y luego se centrifugó por 1 minuto a 8.000 rpm.

Antes de guardar el extracto, se extrajo una alícuota de 5  $\mu\text{L}$  en un tubo de 0.2 mL para la posterior medición del ADN mediante fluorescencia. Se almacenó esta alícuota a 4 °C. El extracto se guardó a -80 °C.

## **6.6 Sorción y solubilidad**

Para la ejecución de esta prueba, se recurrió a la especificación ISO 4049:2000<sup>(46)</sup>, la cual permitió determinar el protocolo para valorar la capacidad de sorción y solubilidad, en medio agua, para los polímeros adhesivos experimentales, y de esta manera, evaluar la estabilidad en medio acuoso de la matriz polimérica formada.

Para dichos efectos, se utilizaron los polímeros adhesivos PB y XP (tanto convencionales como aquellos modificados con nanopartículas), con los cuales se confeccionaron discos de prueba de 15 mm de diámetro y de 1 mm de espesor, mediante el uso de una matriz de metal. Para esta confección, los polímeros adhesivos fueron fotopolimerizados por 80 segundos con una lámpara de fotocurado Woodpecker® (Guilin, República Popular China).

Los discos fueron llevados a un desecador que contenía gel sílica (previamente desecada) y se mantuvieron dentro del desecador a 37 °C. Transcurridas 22 horas, se retiraron los discos de prueba y se llevaron a un segundo desecador a 23 °C, por 2 horas, para proceder a pesarlos.

Se repitió el ciclo anterior hasta que se obtuvo una masa constante para los discos de prueba, correspondiente a  $m_1$  (pérdida de masa no mayor a 0.1 mg).

Luego del secado final, se hicieron dos mediciones del diámetro de cada disco y se calculó el promedio del diámetro. Se midió el espesor del disco en el centro del mismo en 4 puntos equidistantes de la circunferencia, se calculó el área en mm<sup>2</sup> desde el diámetro promedio, y luego, usando el promedio de espesor, se calculó el volumen ( $V$ ) en milímetros cúbicos.

A continuación, se sumergieron los discos de prueba en agua a 37 °C por 7 días, en posición vertical y con una separación de al menos 3 mm entre cada uno, con un volumen para cada disco de al menos 10 mL.

Al pasar los 7 días, se sacaron los discos de prueba, se lavaron con agua, se eliminó el agua superficial de ellos hasta que no se observó humedad superficial, se airearon por 15 segundos y se pesaron durante 1 minuto luego de remover toda el agua; esta medición es correspondiente a  $m_2$ .

Después de este pesaje, se reacondicionaron los discos hasta llegar a una masa constante en el desecador, utilizando el protocolo antes mencionado, llegando a una masa constante, correspondiente a  $m_3$ .

Para el cálculo de los valores para sorción de agua ( $W_{sp}$ ), en microgramos por milímetro cúbico para cada disco de prueba, se realizó con la siguiente ecuación:

$$W_{sp} = \frac{m_2 - m_3}{V}$$

Para el cálculo de los valores para solubilidad ( $W_{sl}$ ), en microgramos por milímetro cúbico para cada disco de prueba, se realizó con la siguiente ecuación:

$$W_{sl} = \frac{m_1 - m_3}{V}$$

## 6.7 Citotoxicidad

Respecto al protocolo realizado, se siguieron las directrices empleadas en la investigación efectuada por El-kholany et al<sup>(8)</sup>, la norma ISO 10993-12<sup>(47)</sup> y las instrucciones del fabricante de DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega®, Madison, EE.UU.)<sup>(48,49)</sup>, para evaluar el potencial citotóxico de los polímeros adhesivos experimentales frente a odontoblastos.

Para esta prueba, se utilizaron 3 de los 15 polímeros disponibles, correspondiendo 2 de ellos a polímeros adhesivos modificados con nanopartículas, y el último, a un polímero adhesivo convencional, los cuales son:

- XP Cu I
- XP Cu I + Zn
- XP

Primeramente, se dispusieron tubos de ensayos estériles y se pipetearon en ellos 5  $\mu$ L de polímero a testear, que luego se fotopolimerizaron por 40 segundos a 2 mm de la superficie externa del tubo de ensayo, mediante el uso de una lámpara de fotocurado Woodpecker® (Guilin, República Popular China). Una vez lograda la fotopolimerización, se agregaron 5 mL de medio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) y se dejó incubar durante 24 horas a 37 °C en una estufa de cultivo humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%. Transcurrido dicho tiempo, se obtuvo este medio de cultivo proveniente del contacto directo de DMEM con el polímero trabajado, al que llamaremos “suero de polímero”.

Para la obtención de los cultivos celulares, se utilizó una línea celular de odontoblastos, provenientes de la papila apical dental de terceros molares humanos inmaduros. Se utilizaron gérmenes dentales en estado de campana, se extrajo la papila de ellos y se colocó en un medio de cultivo de solución salina balanceada de Hank (HBSS) con tripsina al 0,25% y se dejó a 37 °C por 30 minutos en estufa de cultivo, provocando la disociación del tejido.

Una vez logrado lo anterior, se centrifugó a 300 rpm por 5 minutos y se cultivaron las células obtenidas en 24 placas de cultivo a una densidad de 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> por placa de cultivo. Se realizó la preparación del medio DMEM junto con 10% de suero fetal de bovino, 1% de glutamina, 3% de penicilina/estreptomicina y 50  $\mu$ L/mL de ácido ascórbico. Cada cultivo celular recibió 1 mL de este medio preparado; luego, dichos cultivos fueron colocados en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5% a 37 °C; el medio de las células fue recambiado cada 2 a 3 días.

Luego de 7 días de cultivo, las células fueron tripsinizadas, para luego realizar un subcultivo de las mismas a la mitad de la densidad inicial. Posteriormente, se realizó un proceso de inmortalización celular, utilizando un régimen de 3T6.

Las células inmortalizadas se colocaron en un medio estéril con DMEM modificado con 10% de suero fetal bovino, glutamina, penicilina/estreptomicina y 50  $\mu$ L/mL de ácido ascórbico. Se aplicaron 10 mL de este medio a las células, el cual fue reemplazado cada 2 a 3 días. Las células fueron incubadas a 37 °C en incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%.

Una vez obtenidos los cultivos con una buena densidad celular, se eliminó el medio de cultivo de las células y se agregó 1 mL de medio de cultivo DMEM a placas de cultivo de 35 mm de diámetro, y 3 mL a placas de 60 mm de diámetro, para posteriormente agregar 100  $\mu$ L de suero de polímero por cada mL de DMEM presente por placa de

cultivo. Finalmente se dejó incubando por 24, 48 y 72 horas en incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%.

Para cada momento de extracción mencionado (24, 48 y 72 horas), se extrajeron dos cubreobjetos, que fueron fijados con formaldehído al 4% libre de alcohol, dejándolos durante 30 minutos; a continuación, se realizaron 2 lavados con buffer fosfato salino (PBS) durante 5 minutos por cada cubreobjeto.

Para la observación de las muestras, éstas fueron preparadas mediante permeabilización con Tritón X-100 al 1% durante 10 minutos. De ahora en adelante, se llevó a cabo la aplicación de DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega®, Madison, EE.UU.)<sup>(48,49)</sup>. Respecto a dicho protocolo, se hicieron algunas variaciones, las que consistieron en:

- En lugar de usar 100 µL de buffer de equilibración, se ocuparon 50 µL por cubreobjeto.
- Para la obtención de 2X de citrato de sodio salino (SSC) se diluyeron 2 mL de este compuesto (SSC) en 18 mL de agua desionizada.
- Para la preparación del reactivo se utilizó la siguiente fórmula:
  - Buffer de equilibración: 45 µL x 18 µL = 810 µL
  - Mix de nucleótidos: 5µL x 18 µL = 90 µL
  - Enzima transferasa terminal (rTdT): 1µL x 18 µL = 18µL
  - Total = 918 µL

Una vez realizados todos los pasos previamente mencionados, el examinador previamente calibrado, se dispuso a analizar las muestras mediante la detección de fluorescencia verde localizada de células apoptóticas bajo un fondo azul. Dicha visualización se efectuó bajo microscopio de fluorescencia, a una magnificación de 40x, donde se realizó la observación de 10 campos por muestra, de forma aleatoria, observándose 100 células por campo.

## **6.8 Análisis estadístico**

Para la prueba de difusión en agar, se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y test de Fischer, para detectar los efectos significativos de las variables estudiadas, con un p-valor de 0.05.

## 7. Resultados

### 7.1 Difusión en agar

En relación a lo examinado por los investigadores, los resultados obtenidos fueron consignados en la siguiente tabla, donde se expresa el tamaño del halo inhibitorio observado en cada uno de los compuestos trabajados, expresado en milímetros (mm), tanto para polímeros experimentales como convencionales, incluyendo como control positivo la clorhexidina. De esta forma, se considera que mientras mayor sea el tamaño de halo inhibitorio, mayor es el efecto inhibitorio del compuesto sobre el crecimiento bacteriano.

Compuesto	Tamaño halo inhibitorio (mm)		
	Muestra	Duplicado	Triplicado
PB	0	0	0
PB Cu I	0	0	0
PB Cu II	0	0	0
PB Cu I + Zn	0	0	0
PB Cu II + Zn	0	0	0
XP	12	12	12
XP Cu I	16	16	16
XP Cu II	12	12	12
XP Cu I + Zn	16	16	16
XP Cu II + Zn	12	12	12
PBU	7	5	7
PBU Cu I	16	8	16
PBU Cu II	16	15	14
PBU Cu I + Zn	15	13	16
PBU Cu II + Zn	16	17	18
Clorhexidina al 0,2%	19	19	19

Tabla V. Resultados de prueba difusión en agar por triplicado.

En la tabla V, se muestran los resultados obtenidos de cada triplicado, sólo observándose resultados dispares en la medición de los triplicados del halo inhibitorio en los polímeros PBU y todas sus variantes.

Se observa que el control positivo, correspondiente a la clorhexidina, generó el halo inhibitorio de mayor tamaño, mientras que en el polímero PB y en todas sus variantes no se observó halo inhibitorio alguno.

De los resultados, los más consistentes corresponden a los observados en el polímero XP y a sus variantes, pues en ellos los valores observados fueron los mismos en cada triplicado según la muestra.

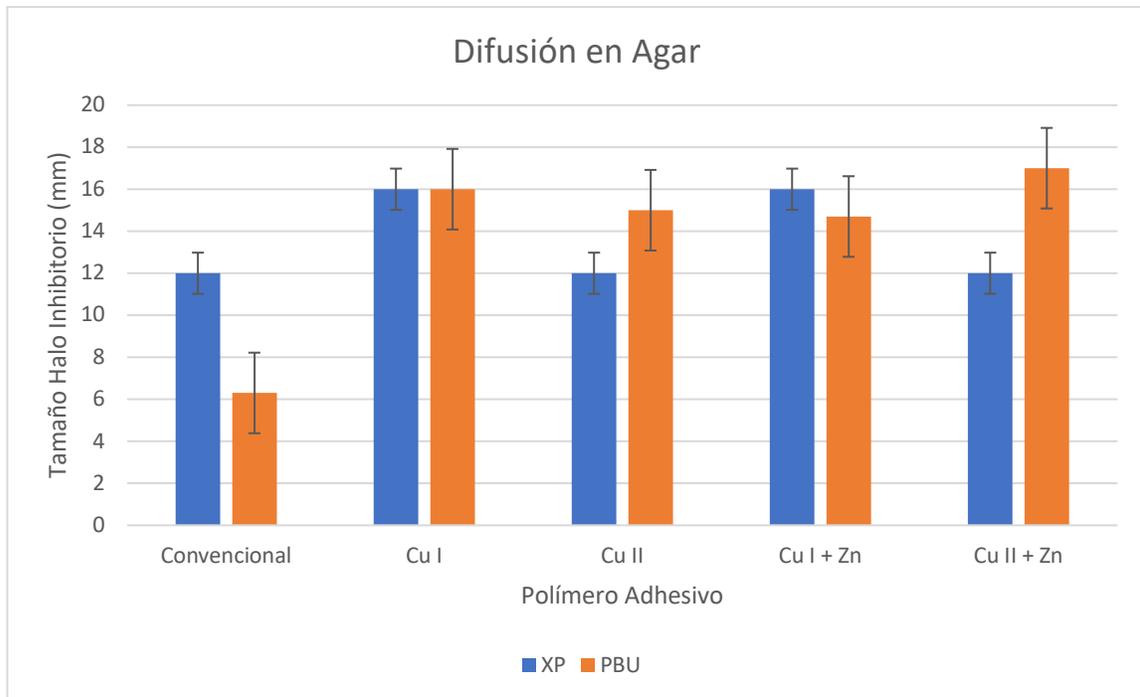


Figura 4. Gráfico de difusión en agar, que expresa el tamaño del halo inhibitorio en milímetros (mm), observado en cada polímero adhesivo.

En relación al análisis de los datos (fig.4), no existe una diferencia estadísticamente significativa entre usar como polímero de base XP o PBU, pues la media obtenida de los tamaños de halo inhibitorio es la misma para cada polímero ( $p > 0.05$ ). En relación a las nanopartículas añadidas a cada polímero base, dicha modificación sí es estadísticamente significativa en relación a los resultados obtenidos, demostrando de esta forma que no todas las nanopartículas y sus combinaciones tienen los mismos efectos ( $p < 0.05$ ). Al analizar los dos factores (polímero base y nanopartículas añadidas), se observa que estadísticamente sí existe una interacción entre ellos ( $p < 0.05$ ). Es preciso mencionar que para dicho análisis los datos recogidos en los polímeros PB y todas sus variantes, fueron excluidos por ser considerados datos anómalos.

## 7.2 Microdilución

En relación a lo observado, los resultados fueron consignados (fig. 5), donde se muestra la concentración inhibitoria mínima (CIM) expresada en porcentaje (%) de los polímeros experimentales y cada una de sus variantes, obtenida a las 48 horas. La concentración inhibitoria mínima expresa la menor concentración de polímero en la cual no se observó crecimiento bacteriano, lo que implica que a menor CIM, mayor es la potencia antimicrobiana del polímero adhesivo.

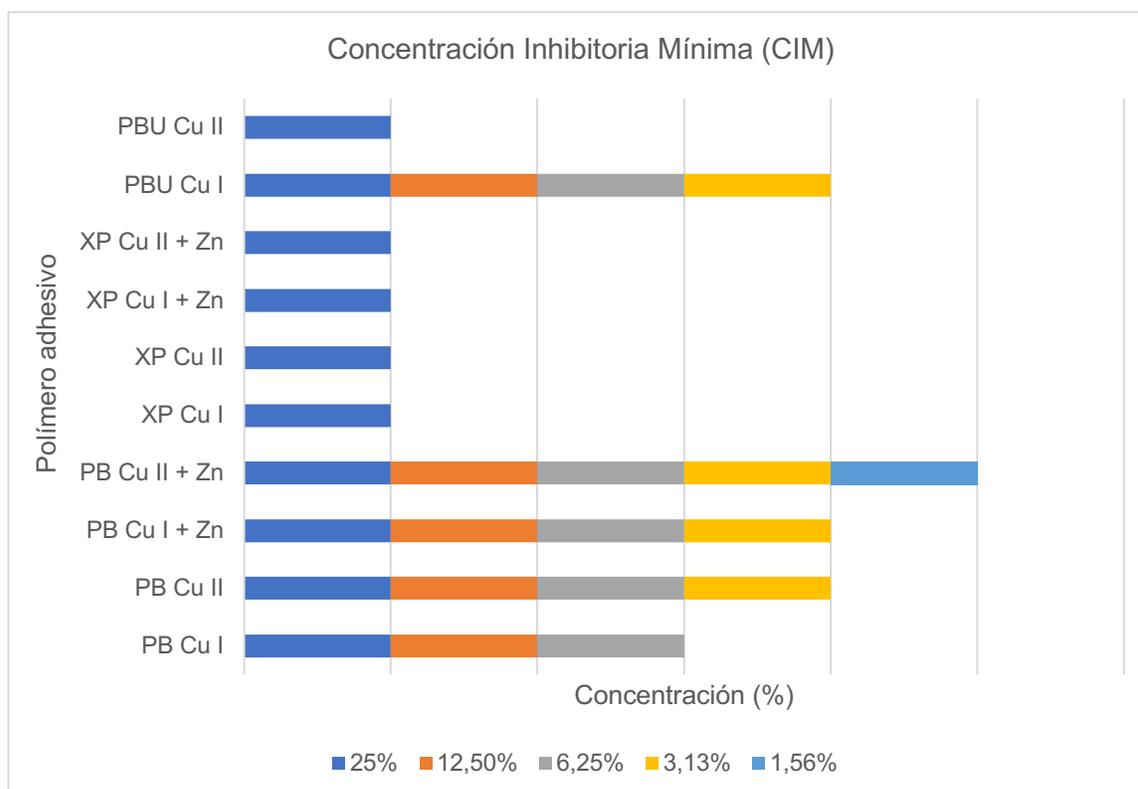


Figura 5. Gráfico de concentración inhibitoria mínima (CIM), expresada en porcentaje (%) por polímero adhesivo.

Se aprecia que en todas las variantes de polímero XP, se obtuvo una CIM de 25%, correspondiendo a aquel valor con menor potencia antibacteriana. En las variantes PB, aquel polímero experimental modificado con Cu II + Zn, fue el que arrojó los mejores resultados, mostrando una CIM de 1,56%.

En relación a las variantes PBU, los polímeros modificados con Cu I + Zn y Cu II + Zn, no fueron considerados, debido a que no se lograron obtener resultados medibles.

### 7.3 Extracción de ADN

Los resultados de esta prueba, se muestran en (fig. 6), donde se muestra la cantidad de ADN extraída, expresada en nanogramo por microlitro ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ), por cada variante de polímero adhesivo.

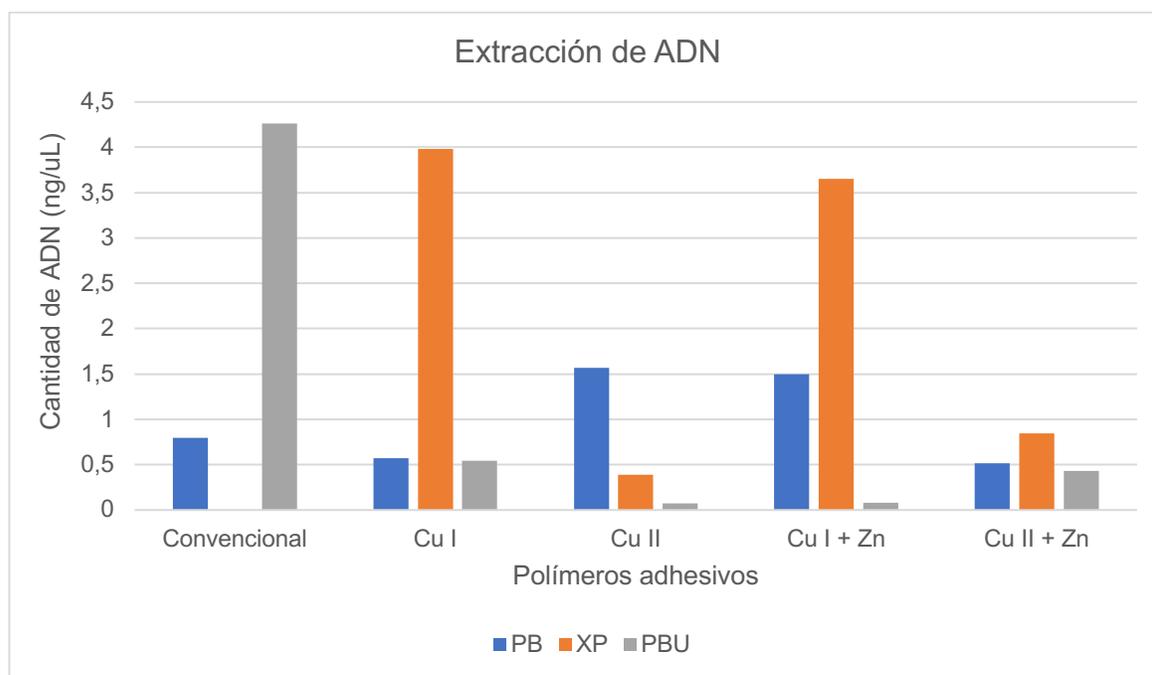


Figura 6. Gráfico de cantidad de extracción de ADN, expresada en nanogramo/microlitro ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ).

La mayor cantidad de ADN que se extrajo fue de  $4.26 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , la que correspondía a los discos de polímero adhesivo PBU convencional.

Por otro lado, la menor cantidad registrada se observó en el polímero adhesivo PBU modificado con Cu II, obteniendo un recuento de  $0.074 \text{ ng}/\mu\text{L}$ . Respecto al polímero adhesivo XP convencional, los resultados no fueron considerados, por encontrarse fuera de rango de medición.

## 7.4 Sorción y solubilidad

Los resultados obtenidos para la prueba de sorción y solubilidad se observan a continuación en las figuras 7, 8 y 9.

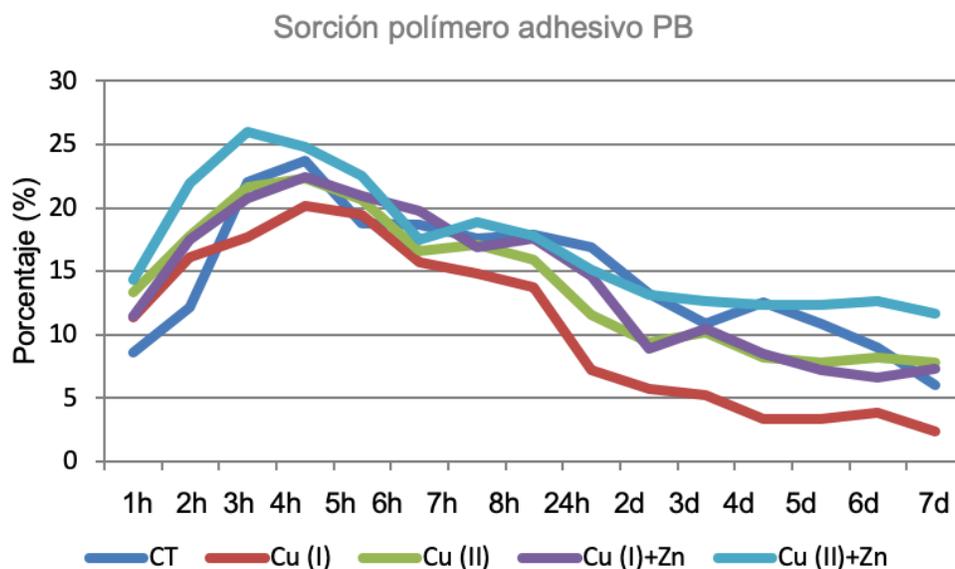


Figura 7. Curva de evaluación del potencial de sorción de la serie de polímeros adhesivos PB en función del tiempo, expresado en horas (h) y días (d), donde CT corresponde al polímero adhesivo convencional.

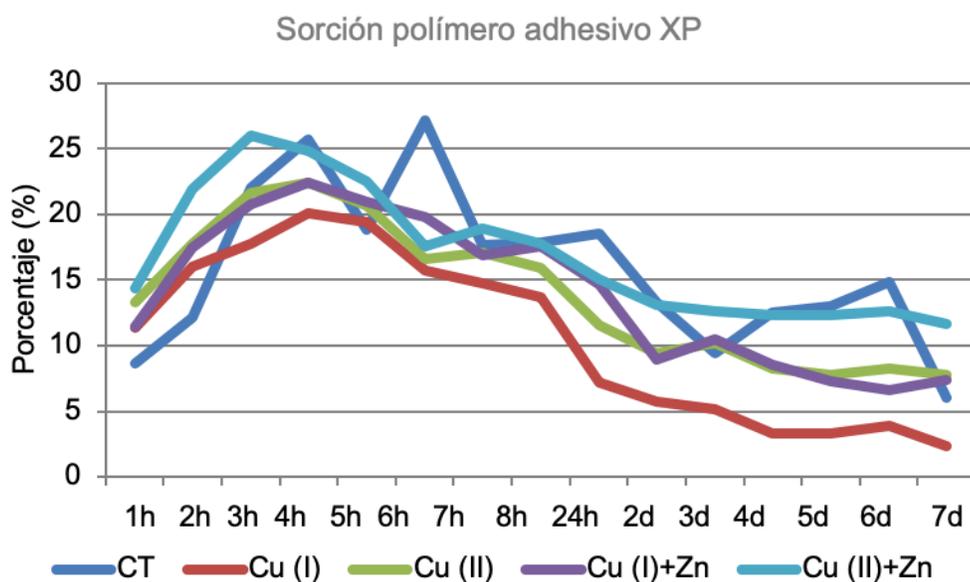


Figura 8. Curva de evaluación del potencial de sorción de la serie de polímeros adhesivos XP en función del tiempo, expresado en horas (h) y días (d), donde CT corresponde al polímero adhesivo convencional.

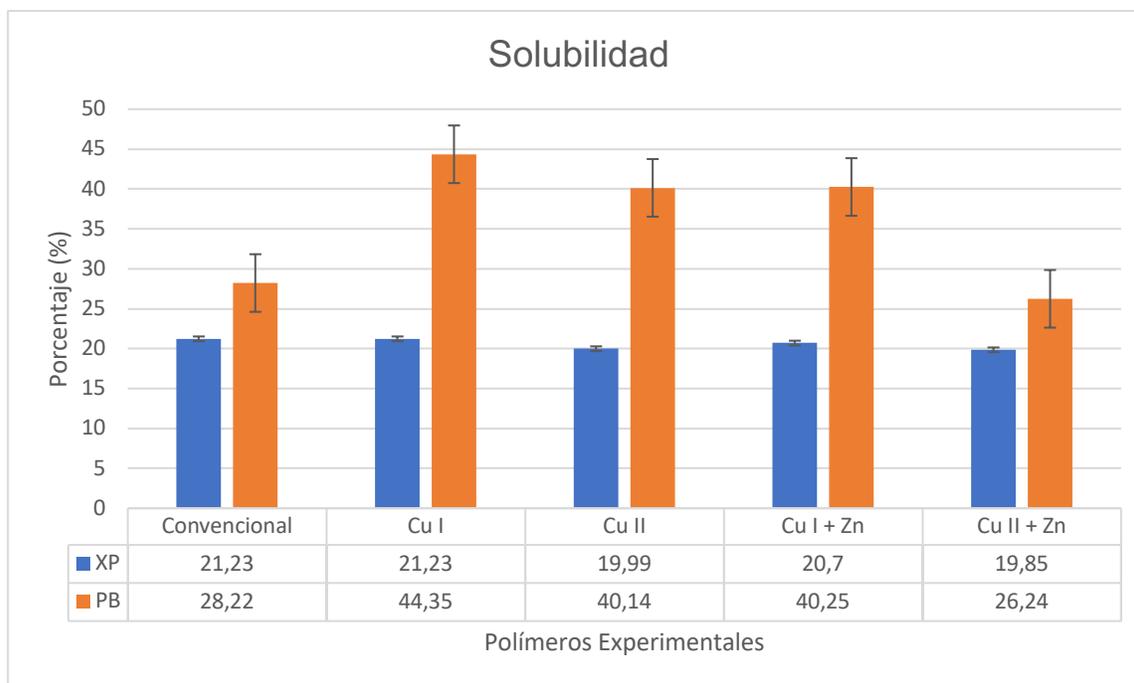


Figura 9. Gráfico de solubilidad total posterior al desafío de sorción acuosa, donde se expresa el porcentaje de masa perdido por cada polímero adhesivo modificado con nanopartículas, en comparación al convencional.

Mediante la obtención de  $m_1$  y  $m_2$  para cada polímero adhesivo, fue posible observar en la curva de sorción (fig. 7 y 8), que aquellos polímeros adhesivos modificados con nanopartículas presentaron un comportamiento más uniforme en relación a la cantidad de solución que se fue incorporando de manera progresiva al cuerpo de prueba, en comparación al polímero adhesivo convencional (CT), el cual presentó un comportamiento mucho más fluctuante a lo largo del tiempo, mostrando variaciones que fueron mucho más marcadas en el polímero adhesivo XP convencional.

Los polímeros adhesivos modificados con nanopartículas, mostraron peaks de sorción en las primeras 7 horas, mientras que a medida que pasaba el tiempo (3 a 7 días) presentaban una mayor estabilidad, destacando aquellos modificados con nanopartículas de Cu II y Cu II + Zn.

Desde el punto de vista de la solubilidad, fue posible determinar el porcentaje de masa que fue lixiviado al medio de cada polímero adhesivo (fig. 9). Existe una marcada diferencia al comparar los polímeros adhesivos PB con los XP, donde estos últimos son los que presentan una mayor estabilidad, cuya solubilidad no excede el 22%, a diferencia de los PB, donde se aprecia el valor más alto, alcanzando un 44.3%.

Respecto a los polímeros adhesivos modificados con nanopartículas, aquellos que contienen Cu II y Cu II + Zn fueron los que presentaron mayor estabilidad al finalizar el desafío, presentando una menor pérdida de masa, versus los demás polímeros adhesivos ( $p < 0,05$ ).

## 7.5 Citotoxicidad

Los resultados de esta prueba, se muestran en la tabla VI y fig. 10, donde se expresa la cantidad de odontoblastos (viables y apoptóticos), junto con el porcentaje de viabilidad celular, en relación a unidad de tiempo; dicha visualización se llevó a cabo en 3 momentos, los cuales corresponden a 24, 48 y 72 horas. Así, a mayor viabilidad celular, mayor será la biocompatibilidad del material.

Polímero Experimental	Tiempo (horas)	Nº Células Apoptóticas	Nº Células Viables	Total Células Observadas	Viabilidad Celular (%)
XP	24	0	1000	1000	100
	48	0	1000	1000	100
	72	4	996	1000	99.6
XP Cu I	24	19	981	1000	98.1
	48	29	971	1000	97.1
	72	49	951	1000	95.1
XP Cu I + Zn	24	5	995	1000	99.5
	48	27	973	1000	97.3
	72	40	960	1000	96

Tabla VI. Cuadro resumen de cantidad de odontoblastos viables y apoptóticos por tiempo, según polímero experimental.

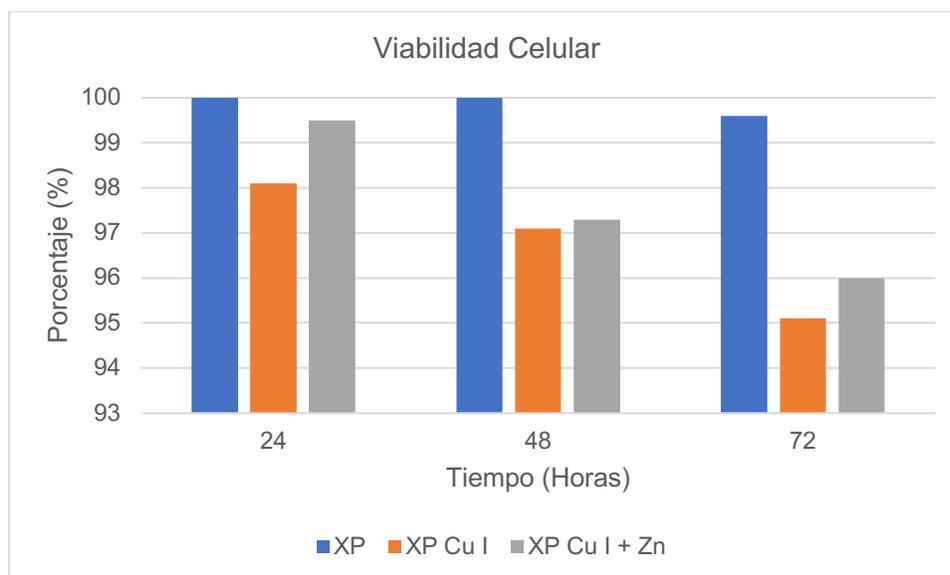


Figura 10. Gráfico de porcentaje de viabilidad celular de odontoblastos en el tiempo.

Respecto a lo observado, la mayor viabilidad celular se registró en el polímero XP, encontrándose un 100% de viabilidad a las 24 y 48 horas, y de 99.6% a las 72 horas. Por otro lado, aquel que presentó un menor porcentaje de viabilidad fue el polímero XP Cu I, obteniéndose el valor más bajo a las 72 horas (95.1%).

Cabe señalar, que la mayor diferencia porcentual entre los valores más altos y bajos obtenidos, corresponden a un 4.9%

## 8. Discusión

A través del presente estudio y mediante todas las pruebas y test llevados a cabo, ha sido posible determinar que los polímeros adhesivos modificados con nanopartículas de cobre y zinc, presentan un mejor rendimiento en cuanto a potencial antimicrobiano y de citotoxicidad, en comparación a los polímeros convencionales no modificados, evidencia que nos permite aceptar la hipótesis planteada.

En relación a la prueba de difusión en agar, no se observó un halo de inhibición en los polímeros adhesivos PB (libres de HEMA), tanto para el convencional como para los modificados con nanopartículas, lo que pudo deberse a la presencia de acetona como solvente orgánico dentro de los componentes de este sistema. La acetona es una sustancia altamente volátil e hidrófoba<sup>(27)</sup>, característica que pudo haber sido responsable de su baja capacidad de difusión en el agar, y que de esta manera, el área de contacto no fuera efectiva para su medición en comparación con los demás sistemas.

Respecto a los polímeros adhesivos XP y PBU, se observa un incremento en el potencial antimicrobiano en todos aquellos polímeros adhesivos modificados con nanopartículas, en comparación con los polímeros convencionales no modificados. Con esto, se demuestra que la presencia de nanopartículas mejora la capacidad de impedir el crecimiento bacteriano; dicho atributo es propio del cobre y zinc, los cuales poseen propiedades bactericidas y bacteriostáticas que han sido comprobadas previamente en otros estudios<sup>(32,35,38)</sup>.

En el test de microdilución, cabe mencionar, que respecto a los polímeros adhesivos PBU modificados con Cu I + Zn y con Cu II + Zn, se presentaron dificultades en la manipulación, lo que impidió obtener resultados reproducibles, por lo que los datos obtenidos para esas dos variantes no fueron concluyentes.

En relación a los polímeros adhesivos XP, se obtuvieron los mismos resultados para todas sus formulaciones, no observándose diferencias entre las distintas nanopartículas presentes y sus concentraciones. Lo anterior podría deberse a que en el momento de homogeneizar los polímeros adhesivos con el caldo BHI, se formó un precipitado color rojizo, lo cual pudo impedir la medición de la real efectividad de esta variante.

Las formulaciones correspondientes a los polímeros adhesivos PB (sin HEMA), presentaron la mayor potencia antimicrobiana y biocida frente a *S. mutans*, observándose el mejor resultado para aquel modificado con Cu II + Zn. Este sistema adhesivo, al poseer un alto contenido de acetona<sup>(27)</sup>, la cual fue descrita anteriormente, pudo permitir la dispersión, no sólo de las partículas en el sistema, sino que también su difusión en el medio acuoso de caldo BHI, a diferencia del test de difusión en agar, permitiendo que se expresase mayormente su capacidad antimicrobiana.

Sin embargo, es necesario destacar que todos los polímeros modificados con nanopartículas, demostraron en diferentes grados, un potencial antimicrobiano, característica que coincide con lo observado en otras investigaciones, donde fue comprobada la actividad de estas partículas como agentes antimicrobianos<sup>(32,35,38)</sup>.

Respecto a la prueba de extracción de ADN, se encontró que el polímero adhesivo XP convencional, estaba fuera de rango medible, por lo que no fue considerado para ser comparado con su contraparte modificada con nanopartículas.

El mejor rendimiento observado en esta prueba se manifestó en aquellos polímeros adhesivos modificados con nanopartículas de Cu II + Zn, los cuales mostraron mejoras respecto a los otros polímeros adhesivos, expresando las propiedades antimicrobianas que ambas nanopartículas tienen por separado<sup>(38,50)</sup>.

En la prueba de sorción y solubilidad, fueron sometidas todas las variantes de los polímeros adhesivos PB y XP; sin embargo, las variantes del polímero adhesivo PBU no pudieron someterse a este test, debido a la imposibilidad técnica de fabricar los discos de prueba. Lo anterior se debe a la fragilidad que presentaron los discos al momento de ser fabricados, los que se fracturaron con facilidad, imposibilitando su uso. Este sistema (PBU) posee en su composición diferentes monómeros de acrilatos no especificados por el fabricante, los que difieren de los demás polímeros adhesivos testeados; se piensa que alguno de estos monómeros podría ser de alta rigidez posterior a la polimerización. La inclusión de monómeros de cadena larga, impide la flexibilidad de movimiento, lo que no es beneficioso para el sistema adhesivo, pues podría aumentar la tensión en la matriz polimérica, lo que explicaría lo observado durante su manipulación<sup>(16)</sup>.

Para la prueba de sorción, se observó que el polímero adhesivo XP convencional presentó la mayor fluctuación y los mayores peaks respecto a la captación de solución en el tiempo, lo que se debe a la composición propia de este polímero, pues posee HEMA en su formulación; este monómero de resina presenta dentro de sus propiedades la absorción de agua, siendo ésta una de sus grandes desventajas<sup>(16,23)</sup>. Aquellos polímeros adhesivos modificados con nanopartículas, tanto para la variante PB como XP, presentaron una mayor estabilidad ante la sorción. Esto se explica por la presencia de nanopartículas de cobre, las que al tener una funcionalidad fotoconductiva, potencian un mayor grado de conversión del polímero adhesivo<sup>(33)</sup>.

En la prueba de solubilidad, los polímeros adhesivos XP son los que mostraron un menor porcentaje de solubilidad, en comparación a los polímeros adhesivos PB. Esto se debe a que los primeros presentan HEMA dentro de su composición, el que le otorga a este polímero adhesivo un mayor grado de conversión, mejorando así la estabilidad de la matriz polimérica, disminuyendo la pérdida de masa<sup>(51-53)</sup>.

Por otro lado, la presencia de nanopartículas incrementó la estabilidad de los polímeros adhesivos, en especial aquel con Cu II + Zn. Se ha comprobado que la incorporación del zinc mejora las propiedades mecánicas de los sistemas adhesivos<sup>(54)</sup>, lo cual se condice con lo observado en nuestros resultados.

Es preciso señalar que la prueba de sorción y solubilidad pretende exponer al biomaterial, en este caso a polímeros adhesivos, a una situación extrema, para así llevarlo al límite de sus capacidades. Es de esperar que, en condiciones normales de funcionamiento, como lo es el medio bucal en este caso, su comportamiento sea más efectivo y eficiente.

Para el test de citotoxicidad, se decidió someter a esta prueba a los polímeros adhesivos de los que se obtuvo la mayor cantidad de resultados con las pruebas anteriormente mencionadas, los que corresponden a los polímeros adhesivos XP;

dentro de dicha variante, sólo se efectuó con el polímero adhesivo convencional y con aquellos modificados con nanopartículas de Cu I y Cu I + Zn. Los otros polímeros no fueron sometidos a experimentación por temas de tiempo.

El mayor porcentaje de viabilidad celular se observó en el polímero adhesivo convencional, mientras que el menor obtenido fue para el polímero adhesivo modificado con nanopartículas de Cu I, en todos los momentos para ambos casos. Es importante resaltar que la viabilidad celular más alta alcanzada es del 100% y que la diferencia porcentual entre el mayor y el menor valor fue de 4.9%, lo que no fue estadísticamente significativo.

El polímero adhesivo modificado con nanopartículas de Cu I + Zn mostró mejores resultados que aquel que sólo presentaba cobre, exhibiéndose un aumento en la viabilidad de los odontoblastos. Lo anterior, puede explicarse gracias a las propiedades del zinc, las que han sido estudiadas anteriormente en otras investigaciones<sup>(50)</sup>; el zinc tiene la capacidad de disminuir la citotoxicidad del cobre, lo que mejora las propiedades de biocompatibilidad del polímero adhesivo.

A pesar de que la viabilidad celular de los odontoblastos se vio comprometida en los polímeros adhesivos modificados con nanopartículas, ésta nunca descendió del 95%, dejando en evidencia la biocompatibilidad de estos polímeros adhesivos. Junto con ello, es relevante decir que el uso de estos polímeros está pensado para ser aplicado en cavidades dentarias moderadas<sup>(21)</sup>, es decir, cuyo espesor remanente mínimo de dentina sea de 2 mm, por lo que no está diseñado para ser utilizado como recubrimiento pulpar directo, por ende, no estaría en contacto con los odontoblastos, reduciéndose al mínimo su citotoxicidad<sup>(21)</sup>. En sumatoria a lo anterior, cabe señalar que, a pesar que las nanopartículas de cobre y zinc, debido a su tamaño, eventualmente podrían atravesar los túbulos dentinarios, éstas no se encuentran libres en el medio, sino que se encuentran inmersas en una matriz polimérica, lo que impide su paso directo a través de los túbulos.

Gracias al desarrollo de todas las pruebas y considerando los resultados obtenidos por medio de las mismas, podemos decir que las nanopartículas son capaces de conferir características bioactivas, antimicrobianas y de biocompatibilidad a los polímeros adhesivos modificados, donde la combinación de cobre y zinc toma vital relevancia, manteniéndose sus propiedades individuales, y al mismo tiempo, potenciándose entre ellos, evidenciando un mejor rendimiento antimicrobiano y disminuyendo el potencial citotóxico. Asimismo, se comprueba que aquellas formulaciones que presentan HEMA en su composición, son los polímeros adhesivos que figuran como fuertes candidatos potenciales a continuar con la investigación, debido a su alta estabilidad en la matriz polimérica, propiedad que se convierte en una ventaja al momento de la elección de este tipo de biomateriales.

## 9. Conclusión

La incorporación de nanopartículas en los biomateriales parece ser una opción viable dentro del ámbito odontológico, pues éstas potencian las características intrínsecas de los mismos, y simultáneamente, expresan sus propiedades individuales, obteniéndose una complementariedad entre ellos, la que permite obtener lo mejor de cada uno. Junto con lo anterior, cabe destacar que, tanto el cobre como el zinc, son materiales de fácil obtención y de bajo costo, por lo que su aplicación es bastante plausible de realizar.

Enmarcado en lo anterior y de validarse su aplicación clínica, los polímeros adhesivos modificados con nanopartículas de cobre y zinc se perfilan como una excelente opción para ser implementados en sustratos dentinarios de alto riesgo cariogénico.

Es por ello, que estos polímeros adhesivos no sólo se vuelven aplicables para pacientes irradiados por cáncer de cabeza y cuello, sino que para todo tipo de pacientes cuyo riesgo cariogénico sea alto y difícil de controlar, como en el caso de adultos mayores con caries radiculares, niños con caries de inicio precoz y pacientes con xerostomía.

## 10. Sugerencias

Respecto a la utilización de los polímeros adhesivos modificados con nanopartículas de cobre y zinc, se sugiere la sonicación previa al uso de los mismos, y que dicho paso sea parte del protocolo para la realización de pruebas y evaluaciones futuras. La sonicación es una etapa clave, ya que permite una adecuada homogeneización de las nanopartículas y su dispersión dentro de la matriz polimérica, pudiendo mejorar la manipulación y permitiendo una mayor expresión del potencial antimicrobiano.

Se propone modificar el protocolo de la prueba de difusión en agar, de manera que el disco de papel filtro embebido con el polímero adhesivo quede en contacto directo con el agar, y así obtener resultados atribuibles a la real efectividad de los polímeros.

Sobre la prueba de microdilución, se recomienda aplicar el mismo protocolo a los polímeros adhesivos convencionales y así obtener la concentración inhibitoria mínima para cada uno de ellos. De esta manera, dichos resultados pueden ser contrastados con los ya recolectados, y así comparar la efectividad antimicrobiana de los polímeros adhesivos modificados con nanopartículas en comparación a lo que ofrece actualmente el mercado.

Respecto a la prueba de extracción de ADN, se sugiere realizar un aumento en el diámetro de los discos de prueba para obtener un mayor recuento de ADN. En el estudio de De Melo et al<sup>(44)</sup>, en el cual se basó dicha prueba, se utilizó un disco que es 2.6 veces mayor al diámetro utilizado en nuestro estudio, logrando así una mayor área para la formación de biofilm, y posteriormente, una recolección mayor de ADN. Respecto a esto mismo, se propone aumentar el número de participantes en esta prueba y, por ende, el número de discos, con el objetivo de lograr lo anteriormente mencionado.

Sobre el protocolo de mantenimiento de los dispositivos, se sugiere modificar el mismo, ya que en él no se especifica el tiempo de lavado de los dispositivos por parte de los usuarios. Asimismo, el presente estudio estableció el lavado bajo un chorro de agua potable, la cual varía en su composición de acuerdo a la zona de residencia de cada uno de los participantes, junto con la potencia de dicho chorro; ambos factores pudieron incidir en la variación de los resultados.

Se propone también agregar muestras de discos que no contengan polímero alguno, ya sea convencional o modificado, con la finalidad de contar con un grupo control de microbiota oral, lo que ayudaría a mejorar la interpretación de resultados.

Sobre el test de sorción y solubilidad, se propone ejecutar dicha prueba también en los polímeros adhesivos, convencional y modificados, de la variante PBU, para poder recabar más datos y hacer una comparación con los ya obtenidos.

En relación a la prueba de citotoxicidad, cabe señalar que, por temas de tiempo, ésta no pudo ser completada. Se sugiere seguir el mismo protocolo, pero que sea aplicado a todos los polímeros, tanto convencionales como modificados de las otras variantes. Se sugiere además realizar esta prueba por triplicado.

Se recomienda continuar con esta línea de investigación, puesto que los resultados obtenidos son prometedores, y de comprobarse una plausibilidad clínica, podría favorecer enormemente a la población de riesgo.

### **11. Conflictos de interés**

La presente investigación no está asociada a ninguna marca o empresa en particular, por lo que no posee conflictos de interés.

## 12. Resumen

**Background:** El cáncer de cabeza y cuello representa el 4% de cáncer a nivel mundial<sup>1,2</sup>. Su tratamiento suele incluir radioterapia, provocando efectos colaterales negativos en los tejidos sanos intraorales. Una de las lesiones más prevalentes es la caries de radiación<sup>1-4</sup>, la que al ser restaurada debe ser recambiada en el tiempo por la degradación del margen diente-restauración por efecto de esterasas bacterianas<sup>6</sup>. Es por esto que es menester encontrar un polímero adhesivo biocompatible con propiedades antimicrobianas.

**Objetivos:** Determinar el potencial antimicrobiano y citotóxico de polímeros adhesivos modificados con nanopartículas de cobre y zinc, en comparación al polímero adhesivo convencional.

**Materiales y métodos:** Se llevó a cabo un estudio experimental in vitro donde se efectuaron pruebas de halo inhibitorio, citotoxicidad, concentración inhibitoria mínima (CIM) y conteo de ADN, para lo anterior se utilizó la prueba ANOVA y Test de Fisher para análisis estadístico.

**Resultados:** Los polímeros modificados con nanopartículas mostraron mejores resultados frente a la inhibición de crecimiento bacteriano; el polímero convencional es el que presenta el menor potencial citotóxico versus los polímeros modificados; respecto a CIM de los polímeros modificados, el que expresó mejor resultado es Prime And Bond 2.1®, Dentsply® modificado con nanopartículas de Cu II + Zn.

**Discusión y Conclusiones:** Se ha demostrado que la adición de nanopartículas incrementa las propiedades antimicrobianas de los polímeros convencionales. La sonicación debe ser una etapa fundamental en el protocolo de aplicación de los polímeros experimentales. Creemos necesario seguir con la investigación en base a los resultados obtenidos.

### 13. Referencias Bibliográficas

1. Carneiro-Neto J-N, de-Menezes J-D-S, Moura L-B, Massucato E-M-S, de-Andrade C-R. Protocols for management of oral complications of chemotherapy and/or radiotherapy for oral cancer: Systematic review and meta-analysis current. *Med Oral Patol Oral Cirugia Bucal*. 1 de enero de 2017;22(1):e15-23.
2. González-Arriagada WA, Santos-Silva AR, Carvalho de Andrade MA, Elias R de A, Lopes MA. Criterios de Evaluación Odontológica Pre-Radioterapia y Necesidad de Tratamiento de las Enfermedades Orales Post-Radioterapia en Cabeza y Cuello. *Int J Odontostomatol*. diciembre de 2010;4(3):255-66.
3. da Cunha SR de B, Ramos PAMM, Haddad CMK, da Silva JLF, Fregnani ER, Aranha ACC. Effects of Different Radiation Doses on the Bond Strengths of Two Different Adhesive Systems to Enamel and Dentin. *J Adhes Dent*. 2016;18(2):151-6.
4. Bascones-Martínez A, Muñoz-Corcuera M, Gómez-Font R. Efectos secundarios bucales de la radioterapia y quimioterapia en el cáncer en la región cervicofacial. *Med Clínica*. 21 de julio de 2013;141(2):77-81.
5. Deng J, Jackson L, Epstein JB, Migliorati CA, Murphy BA. Dental demineralization and caries in patients with head and neck cancer. *Oral Oncol*. septiembre de 2015;51(9):824-31.
6. Liang X, Zhang JY, Cheng IK, Li JY. Effect of high energy X-ray irradiation on the nano-mechanical properties of human enamel and dentine. *Braz Oral Res*. 2016;30.
7. Cheng L, Weir MD, Zhang K, Arola DD, Zhou X, Xu HHK. Dental primer and adhesive containing a new antibacterial quaternary ammonium monomer dimethylaminododecyl methacrylate. *J Dent*. abril de 2013;41(4):345-55.
8. El-kholany NR, Abielhassan MH, Elembaby AE, Maria OM. Apoptotic effect of different self-etch dental adhesives on odontoblasts in cell cultures. *Arch Oral Biol*. junio de 2012;57(6):775-83.
9. Schmalz G, Bindsvlev DA. *Biocompatibility of Dental Materials*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2009.
10. Palmier NR, Ribeiro ACP, Fonsêca JM, Salvajoli JV, Vargas PA, Lopes MA, et al. Radiation-related caries assessment through the International Caries Detection and Assessment System and the Post-Radiation Dental Index. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. diciembre de 2017;124(6):542-7.
11. Sroussi HY, Epstein JB, Bensadoun R-J, Saunders DP, Lalla RV, Migliorati CA, et al. Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis. *Cancer Med*. diciembre de 2017;6(12):2918-31.
12. Abdalla R, Omar A, Eid K. Detecting demineralization of enamel and cementum after gamma irradiation using radiographic densitometry. *Radiat Environ Biophys*. agosto de 2018;57(3):293-9.
13. Osorio R, Yamauti M, Ruiz-Requena ME, Toledano M. MMPs activity and bond strength in deciduous dentine-resin bonded interfaces. *J Dent*. junio de 2013;41(6):549-55.
14. Toledano M, Yamauti M, Osorio E, Osorio R. Zinc-inhibited MMP-mediated collagen degradation after different dentine demineralization procedures. *Caries Res*. 2012;46(3):201-7.

15. Toledano M, Osorio E, Cabello I, Aguilera FS, López-López MT, Toledano-Osorio M, et al. Nanoscopic dynamic mechanical analysis of resin-infiltrated dentine, under in vitro chewing and bruxism events. *J Mech Behav Biomed Mater.* 1 de febrero de 2016;54:33-47.
16. Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, et al. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials.* septiembre de 2007;28(26):3757-85.
17. Bedran-Russo A, Leme-Kraus AA, Vidal CMP, Teixeira EC. An Overview of Dental Adhesive Systems and the Dynamic Tooth-Adhesive Interface. *Dent Clin North Am.* 2017;61(4):713-31.
18. Kugel G, Ferrari M. The science of bonding: from first to sixth generation. *J Am Dent Assoc* 1939. junio de 2000;131 Suppl:20S-25S.
19. Parra Lozada M, Garzón Rayo H. Self-etching adhesive systems, bond strength and nanofiltration: a review. *Rev Fac Odontol Univ Antioquia.* diciembre de 2012;24(1):133-50.
20. Nakabayashi N. The hybrid layer: a resin-dentin composite. *Proc Finn Dent Soc Suom Hammaslaakariseuran Toim.* 1992;88 Suppl 1:321-9.
21. Steenbecker O, Garone W, Da Sousa C, Uribe J, Nuñez. Principios y bases de los biomateriales en operatoria dental estética adhesiva: propiedades, principios, fundamentos. Universidad de Valparaíso - Editorial; 2006. 453 p.
22. Felizardo KR, Lemos LVFM, Carvalho RV de, Gonini Junior A, Lopes MB, Moura SK. Bond strength of HEMA-containing versus HEMA-free self-etch adhesive systems to dentin. *Braz Dent J.* 2011;22(6):468-72.
23. Yoshida Y, Nagakane K, Fukuda R, Nakayama Y, Okazaki M, Shintani H, et al. Comparative study on adhesive performance of functional monomers. *J Dent Res.* junio de 2004;83(6):454-8.
24. Luque-Martinez IV, Perdigão J, Muñoz MA, Sezinando A, Reis A, Loguercio AD. Effects of solvent evaporation time on immediate adhesive properties of universal adhesives to dentin. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater.* octubre de 2014;30(10):1126-35.
25. Martim GC, Kupfer VL, Moisés MP, dos Santos A, Buzzetti PHM, Rinaldi AW, et al. Physical-chemical properties of dental composites and adhesives containing silane-modified SBA-15. *J Mech Behav Biomed Mater.* abril de 2018;80:277-84.
26. Gajewski VES, Pfeifer CS, Fróes-Salgado NRG, Boaro LCC, Braga RR. Monomers used in resin composites: degree of conversion, mechanical properties and water sorption/solubility. *Braz Dent J.* octubre de 2012;23(5):508-14.
27. Cho B, Dickens S. Effects of the acetone content of single solution dentin bonding agents on the adhesive layer thickness and the microtensile bond strength. *Dent Mater.* 1 de febrero de 2004;20(2):107-15.
28. Benítez-Páez A, Belda-Ferre P, Simón-Soro A, Mira A. Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms. *BMC Genomics.* 27 de abril de 2014;15:311.
29. Simón-Soro A, Guillen-Navarro M, Mira A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *J Oral Microbiology.*
30. Ojeda-Garcés JC, Oviedo-García E, Salas LA. *Streptococcus mutans* and dental caries. 2013;(1):13.

31. Mira A, Simon-Soro A, Curtis MA. Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *J Clin Periodontol.* marzo de 2017;44 Suppl 18:S23-38.
32. Henao CPB, Montes VH, Sierra B. Nanopartículas para materiales antibacterianos y aplicaciones del dióxido de titanio. :16.
33. Ren G, Hu D, Cheng EWC, Vargas-Reus MA, Reip P, Allaker RP. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int J Antimicrob Agents.* 1 de junio de 2009;33(6):587-90.
34. Wang Z, von dem Bussche A, Kabadi PK, Kane AB, Hurt RH. Biological and Environmental Transformations of Copper-Based Nanomaterials. *ACS Nano.* 22 de octubre de 2013;7(10):8715-27.
35. Chatterjee AK, Chakraborty R, Basu T. Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology.* 4 de abril de 2014;25(13):135101.
36. Oh S, Jung H-S, Kim H-J, Jang J-H, Kim D-S, Choi K-K, et al. Effect of zinc on the collagen degradation in acid-etched dentin. *J Dent Sci.* junio de 2018;13(2):97-102.
37. Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, et al. Role of Dentin MMPs in Caries Progression and Bond Stability. *J Dent Res.* 1 de febrero de 2015;94(2):241-51.
38. Dutta RK, Nenavathu BP, Gangishetty MK, Reddy AVR. Studies on antibacterial activity of ZnO nanoparticles by ROS induced lipid peroxidation. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 1 de junio de 2012;94:143-50.
39. Raghupathi KR, Koodali RT, Manna AC. Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles. *Langmuir.* 5 de abril de 2011;27(7):4020-8.
40. Dentsply. Prime & Bond 2.1 Adhesivo dental monofrasco.
41. Dentsply Sirona. XP Bond Universal Total Etch Adhesive.
42. Dentsply Sirona. Prime&Bond universal™ Universal Adhesive.
43. Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater.* septiembre de 2003;19(6):449-57.
44. de Melo F, do Nascimento C, Souza DO, de Albuquerque RF. Identification of oral bacteria on titanium implant surfaces by 16S rDNA sequencing. *Clin Oral Implants Res.* junio de 2017;28(6):697-703.
45. QIAGEN GmbH. DNeasy® Blood & Tissue Handbook 2006.
46. ISO 4049:2000, Dentistry — Polymer-based filling, restorative and luting materials. Third edition. Switzerland: ISO; 2000. 34 p.
47. Wallin RF. A Practical Guide to ISO 10993-12: Sample Preparation and Reference Materials. :4.
48. Promega Corporation. DeadEnd(TM) Fluorometric TUNEL System Quick Protocol, FB055.
49. Promega Corporation. DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System Technical Bulletin, TB235 7/09.
50. Eskandarizadeh A, Sharokhi F, Hamze F, Kalantari M, Hoseiniffar R, Khaleghi M, et al. Antibacterial, physical and mechanical properties of bonding agent containing synthesized Zinc Dimethacrylate. *J Clin Exp Dent.* agosto de 2019;11(8):e686-94.
51. Muñoz MA, Concha C, Leiva H, Martínez M, Vergara C. Resistencia de unión de adhesivos experimentales Cu-Zn v/s adhesivos convencionales en dentina

irradiada in vitro [Tesis para optar a título de cirujano dentista]. Universidad de Valparaíso;

52. Sia CF, Levey C. HEMA-free or HEMA-containing adhesive systems for non-carious cervical lesions. *Evid Based Dent*. 2018;19(4):114-5.

53. Mahdan MHA, Nakajima M, Foxton RM, Tagami J. Combined effect of smear layer characteristics and hydrostatic pulpal pressure on dentine bond strength of HEMA-free and HEMA-containing adhesives. *J Dent*. octubre de 2013;41(10):861-71.

54. ALGhanem A, Fernandes G, Visser M, Dziak R, Renné WG, Sabatini C. Biocompatibility and bond degradation of poly-acrylic acid coated copper iodide-adhesives. *Dent Mater Off Publ Acad Dent Mater*. 2017;33(9):e336-47.

## 14. Anexos

### 14.1 Formulario de consentimiento informado



**Universidad  
de Valparaíso**  
CHILE

Facultad de Odontología

Cátedra de Materiales Dentales

### **FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO USO DE DISPOSITIVO INTRAORAL**

Este formulario tiene dos partes

1. La hoja informativa
2. El certificado de Consentimiento (para registrar su autorización)

Recibirá una copia de este formulario completo

#### **Parte 1. Hoja Informativa**

La facultad de Odontología de la Universidad de Valparaíso, además de dar la atención necesaria para diagnosticar y tratar enfermedades de la boca, realiza investigación que se publica en revistas científicas y se presenta en congresos, cursos y a los alumnos de la Facultad.

Parte de las investigaciones que se realizan, requieren del uso de aparatología intraoral, que incorpora biomateriales de uso cotidiano en la práctica odontológica, con el objetivo de extraer una muestra del biofilm bacteriano presente en boca.

A través de este documento queremos solicitar la disponibilidad para utilizar dicho dispositivo intraoral en investigaciones.

El tipo de investigación que se realizará con el dispositivo intraoral incluye:

1. Toma de impresión de maxilar superior para confección de placa intraoral
2. Confección de placa intraoral transparente, mediante estampado en modelo de yeso, la cual abarcará toda la zona dentada, cubriendo toda la corona dentaria hasta parte de encía adherida y que tendrá incorporadas 4 muestras de polímero adhesivo y resina compuesta.
3. Uso del dispositivo intraoral por un periodo de 10 días, 8 horas diarias (durante la noche), manteniendo higiene oral habitual y limpiando el dispositivo solo con

agua, sin frotar y almacenar en una caja que será proporcionada para proteger el dispositivo mientras no se encuentre en uso.

4. Devolución del dispositivo al equipo investigador.
5. Recolección de biofilm bacteriano presente en el dispositivo intraoral para análisis de recuento y tipo de biofilm bacteriano y cultivo del biofilm presente.

Si usted no desea utilizar el dispositivo y/o que sea analizada la muestra de biofilm bacteriano para algún tipo de estudio en especial o para ningún tipo de estudio, lo puede indicar más adelante y su decisión será respetada. Asimismo, podrá abandonar en cualquier momento la presente investigación, sin tener que dar explicación o cuenta de los motivos y razones que tenga para ello.

La exposición de los datos obtenidos será anónima, es decir, no se publicará a quién corresponde cada muestra de biofilm. A sí mismo, no se pagará ni se dará otro incentivo por la participación en la investigación, sólo se hará entrega del perfil bacteriano y riesgo cariogénico una vez obtenida la información.

Toda investigación que se realice con su muestra contará con la revisión del Comité de Ética de Investigación con Seres Humanos de la Facultad de Odontología, que se encarga de revisar todas las investigaciones que se realizan con seres humanos y se preocupa por que se protejan los derechos de quienes participan en investigación.

**Parte 2. Certificado de Consentimiento para uso de dispositivo intraoral.**

Marque con una X, el cuadro que corresponda

- |   |
|---|
| <input type="checkbox"/> No participaré en la investigación y no deseo utilizar el dispositivo intraoral  |
| <input type="checkbox"/> Participaré en la investigación y estoy dispuesto a utilizar el dispositivo en el tiempo especificado y a analizar las muestras obtenidas. |

**He leído la información, o se me ha leído. He tenido la oportunidad de hacer preguntas y se me ha respondido satisfactoriamente. Consiento de manera voluntaria a participar en la investigación de la manera y para los propósitos indicados previamente en este formulario.**

**Nombre del Paciente** \_\_\_\_\_

**Firma del Paciente** \_\_\_\_\_

**Fecha** \_\_\_\_\_  
**Día/mes/año**

## 14.2 Instrucciones de uso de dispositivo intraoral

### Instrucciones de uso dispositivo intraoral

- La remoción debe ser en un lugar con puertas y ventanas cerradas, así evitamos que se contamine.
- El dispositivo deberá ser utilizado por un tiempo de 8 horas diarias (noche), se les recordará a la hora que deben instalarla. El cepillado se suspende desde del almuerzo hasta el día siguiente ( no cepillado nocturno)
- Durante la remoción el dispositivo no puede tocar ninguna superficie, desde su boca a las cajas plásticas entregadas por el equipo.
- La higienización del dispositivo debe ser **SÓLO BAJO UN CHORRO DE AGUA**, no se debe pasar cepillo de dientes ni usar pastas.

## 14.3 Aprobación bioética



Comité Ético-Científico  
Universidad de Valparaíso  
CEC-UV

### ACTA DE EXTENSIÓN DE APROBACIÓN BIOÉTICA CEC126-16

**Título del protocolo:** "Study of the impact of radiation in dental hard tissues and in vitro evaluation Of restorative new strategies for rehabilitation of irradiated patients by head And neck cancer"  
**Protocolo número:** CEC126-16  
**Fuente de Financiamiento** FONDECYT REGULAR N° 1161435  
**Condición:** Aprobado.  
**Fecha de aprobación:** 22 de enero de 2019.  
**Fecha expiración aprobación:** 22 de enero de 2020.

El Comité Ético-científico de la Universidad de Valparaíso CEC-UV, revisa el protocolo "Study of the impact of radiation in dental hard tissues and in vitro evaluation Of restorative new strategies for rehabilitation of irradiated patients by head And neck cancer", del Prof. Miguel Muñoz, adscrito a la Facultad de Odontología.

Para su evaluación el Comité de Ética Científica revisó los siguientes antecedentes:

- Solicitud de extensión de aprobación bioética presentada por el investigador
- Protocolo de Investigación original presentado
- Resumen ejecutivo
- Consentimiento informado
- CV investigador

En la valoración bioética del proyecto, se consideraron los siguientes aspectos: Valor Social y Científico, Validez Científica, Relación Riesgo/Beneficio, selección justa de Sujetos, Consentimiento Informado, respeto por los Sujetos de Investigación y conflictos de interés.

**CONCLUSIÓN:** En base a los antecedentes evaluados, se acuerda que este proyecto respeta los criterios básicos contemplados en las Pautas Éticas para la Investigación Biomédica en Seres Humanos vigentes (CIOMS, 2002) y Guía de Buenas Prácticas Clínicas, así como la legislación vigente. Este protocolo se encuentra **APROBADO**, para continuar su ejecución, hasta el 22 de enero de 2020.

Félix Aguirre  
Vicepresidente

Raúl Escobar  
Representante de la Comunidad,  
Miembro Titular

Patricia Acuña  
Miembro Titular

Héctor Arancibia  
Miembro Titular

Marcelo Arancibia  
Miembro Titular

Amelia Bayo  
Miembro Titular

Manuel Cárdenas  
Miembro Titular

Martin Davis  
Abogado, Miembro Titular

Mariane Lutz  
Miembro Titular

Eva Madrid  
Miembro Titular

