



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Ciencias de la Conducta

Doctorado en Ciencias de la Salud

**Estudio de adherencia bacteriana de *Streptococcus mutans* y
Streptococcus sobrinus a brackets ortodónticos y su
resistencia al descementado: estudio *in vitro***

TESIS

Para Obtener el Grado de:
Doctor en Ciencias de la Salud

Presenta:

Mtra. Irania Jasso Ruiz

Comité Tutorial:

Dr. Ulises Velázquez Enríquez.

Director de Tesis

Dr. Rogelio José Scougall Vílchis.

Tutor Interno

Dr. Raúl Alberto Morales Luckie

Tutor Externo



Toluca, México, Octubre 2021.

Índice

Formato Acta de Votos probatorios	2
Formato Dictamen de votos	3
Agradecimientos	4
Resumen	6
Introducción	7
1. Antecedentes	10
1.1 Esmalte dental	10
1.2 Caries dental y lesión de mancha blanca	15
1.3 Adherencia bacteriana	17
1.4 Tipos de brackets ortodónticos	18
1.5 Cuantificación bacteriana	19
1.6 Resistencia del cementado	21
2. Planteamiento del problema	23
3. Justificación	24
4. Hipótesis	25
5. Objetivos: general y específicos	26
6. Diseño metodológico	27
6.1 Diseño del estudio	27
6.2 Universo y Muestra	27
6.3 Procedimientos	28
6.4 Criterios de inclusión	40
6.5 Criterios de exclusión	40
6.6 Criterios de eliminación	40
6.7 Recolección de datos	41
6.8 Análisis de datos	42
7. Resultados	43
7.1 Primer artículo	43
7.1.1 Carta de aceptación	47
7.1.2 Portada del primer artículo publicado	48
7.2 Segundo artículo	49
7.2.1 Carta de aceptación	52
7.2.2 Portada del segundo artículo publicado	53
7.3 Tercer artículo	54
7.3.1 Carta de envío	58
7.3.2 Portada de envío del tercer artículo	59
7.4 Carta de aceptación de Capitulo de libro	60
7.4.1 Capitulo de libro	61
8. Discusión	62
9. Conclusiones	71
10. Bibliografía utilizada	72
11. Anexos	81

Resumen

Los brackets de ortodoncia son aditamentos fijos que se colocan en los órganos dentales para la corrección de las maloclusiones dentales, estando en contacto directo con la superficie del esmalte dental y, debido a varios factores como su complejo diseño, la duración del tratamiento y la dificultad en la higiene bucal del paciente, producen una mayor acumulación de biofilm oral, aumentando los niveles de bacterias acidógenas, más notablemente el *S. mutans* y el *S. sobrinus*; logrando reducir el pH de la biopelícula en pacientes con ortodoncia, provocando lesiones de mancha blanca alrededor del bracket, siendo la lesión inicial de caries dental. Gorelick informó que la desmineralización del esmalte ocurre desde el primer mes después de la colocación de aparatos fijos, y se estima que la prevalencia de la lesión de mancha blanca en el esmalte de los pacientes tratados con ortodoncia varía de 12.6% a 50%.

En este estudio el método de agregación de AgNPs desarrollado por Bala permitió observar una síntesis efectiva y una distribución homogénea de las mismas sobre la superficie de los brackets de ortodoncia, tanto de brackets estéticos como metálicos, así como un potente efecto antibacteriano logrando la formación de halos estables y bien definidos en las pruebas microbiológicas por contacto directo con cepas tanto Gram positivas como Gram negativas. De igual manera disminuyó la adhesión de *S. mutans* y *S. Sobrinus* a los brackets de ortodoncia, lo que demuestra sus propiedades antibacterianas.

La modificación de la superficie de los brackets de ortodoncia con nanopartículas de plata puede prevenir el desarrollo de placa dental y caries dentales durante el tratamiento de ortodoncia ayudando a reducir eficazmente la incidencia y prevalencia de lesiones de manchas blancas, sin embargo, es necesario realizar más investigaciones in vivo en pacientes tratados con ortodoncia.

La incorporación de nanopartículas de plata disminuyó la resistencia al descementado, sin embargo, la mayoría de los grupos cumplieron con los criterios necesarios para una adecuada resistencia al descementado en ortodoncia.

Es importante resaltar la implementación de estudios posteriores para encontrar el tipo de nanopartícula que garantice efecto antibacterial, una adecuada fuerza de adhesión y evite la decoloración en brackets estéticos.

Introducción

El ambiente de la cavidad bucal proporciona ciertas características esenciales para la proliferación de bacterias que son capaces de generar ácidos que ocasionan la pérdida de sustancias minerales en la superficie del esmalte dental.¹ La biopelícula tiene un papel crucial en la adhesión de estos microorganismos a la superficie dental.²

La desmineralización del esmalte es causada por los ácidos orgánicos producidos por diversos microorganismos, principalmente *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, que se identifican como los principales patógenos en la caries dental.^{3,4}

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido la caries dental como un proceso localizado cuyo origen es debido a múltiples factores; esto comienza como una desmineralización, que es el ablandamiento del tejido duro del diente y evoluciona hacia la formación de una cavidad. La OMS informa que existe una prevalencia en el 60% al 90% de los niños en edad escolar y que casi el 100% de los adultos tiene caries dental en todo el mundo, coincidiendo con el informe de la Norma Oficial Mexicana 013, donde se menciona que existe una prevalencia del 90% en México.⁵

El tratamiento de ortodoncia, utilizando aparatos fijos (brackets, bandas, arcos, ligaduras y otros aditamentos), proporciona condiciones adecuadas para la colonización de microorganismos cariogénicos. Debido a que los aparatos fijos promueven la retención y adhesión de la biopelícula, la higiene dental se vuelve más complicada y los microorganismos aumentan el riesgo de desmineralización del esmalte.

Se ha afirmado que entre el 50% y el 70% de los pacientes sometidos a terapia con aparatología fija tuvieron una desmineralización del esmalte alrededor de los brackets (lesiones de mancha blanca o cavidades).^{4,5} Esto ha sido reportado desde el primer mes después de la colocación de los brackets. Con una prevalencia del 12,6% al 50%.⁶⁻⁸

Los niveles de pH oral y los diversos microorganismos presentes normalmente en la cavidad oral pueden influir en la capacidad de adhesión de las bacterias, generando la formación de biofilm que aumenta el riesgo de desmineralización en el esmalte, y el desarrollo de caries, en particular alrededor del bracket.⁹

Las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas causan principalmente la primera afinidad de las bacterias a las superficies sólidas. Las superficies con alta energía libre atraen a las bacterias como *S. mutans*, más fácilmente.⁹

En un estudio de Eliades *et al.*,¹⁰ el acero inoxidable presentó la mayor tensión superficial crítica y se puede esperar que tenga una mayor capacidad de retención de placa dentobacteriana. Se ha encontrado que los brackets metálicos de ortodoncia inducen cambios específicos en el ambiente oral, como niveles reducidos de pH, aumento de la acumulación de placa y elevación de la colonización por *S. mutans* y *S. sobrinus*. Sin embargo, estudios recientes sobre posibles diferencias en la afinidad inicial y la adherencia de las bacterias en los brackets de metal, cerámica y plástico a lo largo del tiempo no fueron concluyentes.^{1,10,11}

La prevención de las lesiones de la mancha blanca, la caries y los problemas periodontales durante el tratamiento de ortodoncia es un desafío importante para el ortodoncista y el paciente. Se han propuesto y desarrollado muchas estrategias para

minimizar estas consecuencias biológicas, que pueden incluir barnices o mousses de fluoruro, pastas dentales diferentes y enjuagues bucales.¹²

Desafortunadamente, solo menos del 15% de los pacientes de ortodoncia siguen instrucciones.¹²

Para la prevención de la caries, se han desarrollado nuevas estrategias, como la incorporación de nanopartículas de plata (AgNPs), que se han incorporado en los adhesivos ortodónticos para controlar la biopelícula oral y reducir la desmineralización alrededor de los brackets. Al agregar AgNPs a los adhesivos y aparatos de ortodoncia convencionales, el problema crítico es que las propiedades físicas y químicas no deben verse afectadas negativamente, lo que lleva al rendimiento clínico ideal. Además, las propiedades antimicrobianas y la seguridad de los nuevos nanoadhesivos deben garantizarse durante un período de tiempo clínicamente relevante.¹³⁻²⁰

La literatura científica y los estudios sobre el uso de AgNPs son limitados, es por esta razón que el propósito de esta investigación fue sintetizar y caracterizar las AgNPs sobre brackets ortodónticos, determinar y comparar la colonización bacteriana independiente de *S. mutans* y *S. sobrinus* en cinco tipos diferentes de materiales de brackets ortodónticos verificando su efectividad antibacterial y la resistencia al descementado.

1. Antecedentes

1.1 Esmalte dental

Los dientes son los órganos más duros del cuerpo humano, se encuentran alojados en los alvéolos del maxilar y de la mandíbula. Cada órgano dentario está formado por cuatro tejidos: esmalte, cemento, dentina y pulpa.²¹

El esmalte dental es el tejido adamantino que en su porción coronaria cubre en forma de casquete a la dentina y proporciona la principal barrera contra el proceso carioso.

El esmalte se encuentra constituido estructuralmente por millones de prismas de forma hexagonal, altamente mineralizados y que lo recorren en todo su espesor, desde la unión amelodentinaria hasta la superficie externa o libre en contacto con la superficie bucal y se encuentran suspendidos en la sustancia interprismática.^{21,22}

Características

Se desarrolla embriológicamente del ectodermo y se forma a partir del órgano del esmalte, el cual a su vez se origina de una proliferación localizada del epitelio bucal.

Los cristales de hidroxiapatita del esmalte se hallan densamente engrosados y presentan un tamaño mayor que el de otros tejidos mineralizados.²¹

Propiedades físicas

Dureza

Es la oposición superficial que presentan una sustancia a ser rayada o a sufrir alteraciones en su condición física, generadas por compresión. Presenta una dureza que corresponde a cinco en la escala de Mosh (escala de uno a diez que establece la dureza de ciertas sustancias) y equivale a la apatita de los cristales.

La dureza adamantina disminuye desde la superficie libre a la unión amelodentinaria, estando en relación directa con el grado de mineralización.

Su dureza y estructura lo tornan fácil de romper como el vidrio, lo cual se sucede sobre todo cuando el esmalte pierde su base dentinaria sana.^{21,22}

Su dureza es generada por su:

-Alto contenido de sales minerales.

-Disposición cristalina.

Espesor

Es adelgazado en el cuello del órgano dentario y amplía su espesor en las cúspides.

El espesor máximo es de 2 a 2.5 mm (en molares y premolares), protegiendo al diente del desgaste de la masticación.

Elasticidad

Es muy limitada pues esta depende de la proporción de agua y de sustancia orgánica que posee. Por esta razón es un tejido frágil, con tendencia a las macro y microfracturas, cuando no dispone de un soporte dentinario flexible.²¹

Color y Transparencia

El esmalte es translúcido, el color varía entre un blanco amarillento a un blancogrisáceo, pero dicho color no es propio del esmalte, sino que resulta de las estructuras profundas, en especial de la dentina.

Permeabilidad

Es demasiado limitada y se ha observado por medio de marcadores radioactivos o radioisótopos que el esmalte puede funcionar como una membrana semipermeable, permitiendo el intercambio de agua y de algunos iones presentes en el medio bucal.

Radiopacidad

Es muy alta en el esmalte, ya que es un tejido muy mineralizado.

Propiedades químicas

Esta conformado químicamente por una matriz orgánica (1-2%), una matriz inorgánica (95%) y agua (3-5%).

Matríz orgánica

Está compuesta de proteínas no colágenas llamadas proteínas del esmalte; estas son polipéptidos glucosilados sintetizados y secretados por los ameloblastos llamadas amelogeninas y enamelinas.

En la matriz orgánica del esmalte también se encuentran glucosaminoglucanos, proteoglucanos y diversas clases de lípidos.

Matríz inorgánica

Esta formada por sales minerales cálcicas básicamente fosfato y carbonato. Estas sales se colocan en la matriz del esmalte, originando rápidamente un proceso de cristalización que modifica la masa mineral en cristales de hidroxiapatita, encontrándose estos organizados en prismas hexagonales fuertemente yuxtapuesto, carbonato, magnesio, flúor, sodio y potasio. Dicha mineralización comienza al momento de ser secretada.

Agua

Se localiza en la periferia del cristal formando la denominada capa de hidratación o capa de agua absorbida. El porcentaje de agua en el esmalte decrece gradualmente al avanzar la edad.^{21,22}

Estructura histológica del esmalte

Prismas o bastoncillos del esmalte

La unidad estructural básica son los prismas del esmalte, son estructuras hexagonales alargadas, que presentan una apariencia cristalina clara, permitiendo que la luz los atraviese libremente, compuestas por cristales de hidroxiapatita.²²

La cantidad de estos prismas es de los cinco millones en incisivos inferiores laterales hasta los doce millones en los primeros molares, estos se encuentran fuertemente yuxtapuestos tienen 4 μ m de diámetro y algunos miden 8 μ m. Cada prisma se amplía a lo largo de todo el espesor del esmalte, con orientación oblicua y con un desplazamiento ondulado. En las cúspides los prismas son de tamaño más largo, siendo translucidos al permitir el paso de la luz. Los pequeños espacios entre los prismas contiguos están ocupados por cristales de hidroxiapatita que se encuentran dispuestos casi paralelamente al eje longitudinal del prisma desviándose 65° de este eje hasta encontrarse dentro de las “colas” de los prismas. Estos cristales son irregulares y su espesor promedio de 30 nanómetros y un ancho de 90 nanómetros.

Esmalte interprismático

La consistencia de los cristales es semejante a la de los prismas, pero están dispuestos diferentes ejes (40°- 60°).

Estrías transversales

Cada prisma está formado por segmentos separados por líneas oscuras que le dan una apariencia estriada. Estas estrías son más marcadas en el esmalte descalcificado, y al alcanzar a la superficie del esmalte, originan ligeras concavidades de la superficie del esmalte; entre una concavidad y la siguiente el esmalte sobresale ligeramente formando las periquematías, siendo muy perceptibles en la zona cervical de dientes jóvenes.

Existe una periquematía principalmente más marcada que representa el momento del nacimiento del individuo.^{23,24,25}

Dirección de los prismas

Los prismas están dirigidos en ángulo recto hacia la superficie de la dentina. En un diente decíduo son horizontales en el área cervical y central de la corona. Los prismas cerca del borde incisal cambian progresivamente hacia una trayectoria cada vez más oblicua hasta que en el borde son casi verticales. En los dientes permanentes los prismas en los dos tercios oclusales de la corona son semejantes, y en la región cervical estos se desvían hacia una trayectoria apical. Los prismas rara vez son rectos, en su mayoría siguen una dirección ondulada de la dentina hasta la superficie del esmalte.^{23,24}

1.2 Caries dental y lesión de mancha blanca

Caries Dental

La caries dental es una enfermedad infectocontagiosa multifactorial que se caracteriza por la destrucción de los tejidos duros del diente como consecuencia de la desmineralización provocada por los ácidos producto de desecho de las bacterias presentes en la placa dental.^{8,26}

La Placa Dental o Biofilm Oral es un depósito microbiano formado por flora aeróbica y anaeróbica rodeada por una matriz intercelular de polímeros de origen salival y microbiano.

Los principales microorganismos presentes en la placa dentobacteriana son:

***Streptococcus sanguis* (1ª en colonizar la película dental).**

Streptococcus sobrinus.

Streptococcus mitis.

Streptococcus salivarius.

***Streptococcus mutans* (predominan 7 días después de la colonización bacteriana).**

Actinomyces viscosus.

Actinomyces naeslundii.

Streptococcus oralis.

Actinomyces spp.

Haemophilus.

Lactobacillus acidophilus.

Neisseria flava, Bifidobacterium, Rothias, Clostridium, Propionibacterium y

Eubacterium, poseen un potencial acidógeno y acido-tolerante, pero no como el *S. mutans*, y por lo tanto tienen un bajo potencial cariogénico.²³

Lesión de mancha blanca

Es una mancha blanca, opaca y con aspecto de tiza, considerada la primera manifestación clínica de la caries dental y el inicio de la enfermedad, también es conocida como lesión incipiente de caries dental o lesión precariosa. En esta lesión el esmalte pierde su brillo y se observa ligeramente poroso y áspero, pero sin presencia de cavitación.²³

Aparatología fija en ortodoncia

En el transcurso del tratamiento de Ortodoncia, la formación de lesiones incipientes de mancha blanca es el efecto indeseable más frecuente y difícil de prevenir. Esto ocurre debido a que existe un mayor acumulo bacteriano ocasionado por la aparatología fija.

En la actualidad, esta formación de lesiones incipientes de mancha blanca es una de las principales inquietudes de los clínicos y esto se ve evidenciado en numerosas investigaciones de relevancia a nivel internacional.¹

Gorelick ha reportado que la desmineralización del esmalte ocurre desde el primer mes después de la colocación de la aparatología fija y se estima que la prevalencia de lesión de mancha blanca en el esmalte en pacientes tratados ortodónticamente varía entre un 12.6% a un 50%.^{8,27,28}

1.3 Adherencia bacteriana

Cualquier sólido que esté inmerso en un flujo de agua corriente tiene sobre su superficie una abundante y variada actividad de microorganismos. En el organismo humano, la única superficie dura natural que se encuentra sumergida en un fluido son los dientes.²⁹ Los microorganismos mantienen su actividad debido a su capacidad de adhesión, y también de esta depende el que puedan fijarse a la superficie, nutrirse, multiplicarse y que sean renovados. Por tanto, este dinamismo en su composición hace que a estos sistemas ecológicos se les denomine abiertos.

Los Mecanismos de adhesión bacterianas pueden ser por tres vías principalmente:

Puentes de hidrógeno

Fuerzas de Van der Waals

Enlaces electroestáticos.

Para la adhesión bacteriana, intervienen cuatro elementos: Material, Microorganismos, antimicrobianos y mecanismos de defensa.

El tipo de material es más importante en los estadios iniciales de la adhesión, pudiendo influir su rugosidad o su energía superficial, y la influencia reside específicamente en las características de la placa dentobacteriana y en la especificidad de las proteínas salivares adsorbidas (receptores), que puedan ser condicionadas por la composición del material o por las características de superficie de este.²⁹

1.4 Tipos de brackets ortodónticos

Los brackets por su composición pueden ser metálicos o estéticos y van adheridos al diente, su función es soportar el arco, el cual es el elemento activo que nos ayuda a corregir las maloclusiones dentales.

Metálicos

Los Brackets metálicos fundidos se realizan por inyección de acero inoxidable, con lo que se consigue una exactitud muy detallada, principalmente en su slot.

Los Brackets maquinados se desarrollan a partir de un bloque sólido de acero inoxidable, sobre el cual mediante fresas y tornos se talla hasta obtener la forma adecuada.

El material del que principalmente están fabricados es:

Acero inoxidable

Aleaciones: cromo-cobalto.^{30,31}

Estéticos

Son de óxido de aluminio policristalino llamados cerámicos, no se modifica su color y otros son de una combinación de óxidos de aluminio, hierro y titanio.

Zafiro: es conocido como bracket de cristal, compuesto de microcristales de zafiro, la una mezcla de óxidos de aluminio, hierro y titanio, el cual le da su color característico.

Cerámicos de porcelana: son de óxido de aluminio policristalino.^{30,31}

1.5 Cuantificación bacteriana

Los marcadores radioactivos son uno de los elementos esenciales de las técnicas predictivas de imagen, identificación de compuestos, así como cuantificación de elementos químicos de acuerdo a sus niveles o cantidades de radiación. Son moléculas a las que se añade o sustituye un átomo radioactivo que se fija de forma específica a una célula o molécula. Cuando su átomo radioactivo se desintegra, emiten una radiación que puede seguirse mediante detectores externos. Uno de los principales retos de las técnicas predictivas de imagen es encontrar y luego sintetizar marcadores cada vez más específicos de un parámetro biológico dado.^{9,32}

En la actualidad existen diversas técnicas para la aplicación de marcadores radioactivos para la cuantificación de microorganismos adheridos a las superficies de los materiales dentales, entre las que encontramos la adición del hidrógeno (^3H) y el carbono (^{14}C).

Asimismo, la microscopía fluorescente se ha convertido en otra herramienta importante de investigación para observar y cuantificar el número de microorganismos existentes en una superficie determinada en la que se asigna un color al microorganismo en observación.^{9,32}

Sistemas de cuantificación microbiológica

En el mercado actual existen diversos sistemas para cuantificación como son las siguientes:

Las placas 3MT PetrifilmT maximizan la productividad en el laboratorio.

Estas placas están listas para usarse, reduciendo el tiempo y optimizando el espacio.

El sistema Dip N´Count frascos con esponjas cuadrículadas con agar que permiten contar diferentes tipos de organismos, sin embargo, los resultados obtenidos con ellas no son exactos, son aproximaciones.

El sistema Simplate es utilizado para realizar recuento de organismos selectos: Cuenta total, coliformes totales y fecales, hongos, levaduras y *Campylobacter*.

La compañía Spiral Biotechnology ofrece el sistema autoplate 4000 , usado para enumeración bacteriana, análisis de susceptibilidad antimicrobiana y ensayos de mutagenicidad.

El sistema protocol es un sistema modular que abarca desde un sistema para la cuenta de las colonias, hasta el cálculo de las diluciones.

Placas tipo espiral, ahorrando medio de cultivo, se conecta a una computadora básica y funciona con sistema operativo Windows.

El sistema Rabbit Impedance Detection y el Lactómetro que se basan en el concepto de impedancia (resistencia al flujo de una corriente alternante que pasa a través de un material conductor).

El sistema Malthus para cuantificar microorganismos basado en cambios de conductancia.

Otros métodos más sofisticados que incluyen al sistema ChemScan RDI, Sistema D Count (se basa en una combinación de marcaje celular, excitación láser y procesamiento digital).

1.6 Resistencia al Descementado

Desde la introducción de la técnica de grabado con ácido del esmalte por Buonocore³³ en 1955 y la unión de brackets de ortodoncia por Newman³⁴, la unión directa de brackets de ortodoncia se ha vuelto ampliamente utilizada por los ortodontistas.

El proceso de adhesión de los brackets sobre la superficie dental es una actividad diaria y fundamental para conseguir los objetivos del tratamiento de ortodoncia. El cemento resinoso con el que se adhieren los brackets requiere una resistencia al diente lo suficientemente alta como para soportar las fuerzas aplicadas por los alambres de ortodoncia; Reynolds y *col.* sugieren que las resistencias mínimas de adherencia de los brackets oscilan entre 5,9 a 7,8 Mpa,³⁵ y que los valores necesarios para soportar fuerzas biomecánicas oscilan entre 6 y 8 Mpa³⁶.

Estos valores son necesarios independientemente del material de fabricación y diseño de los brackets de ortodoncia, ya que existe una gran variedad en el mercado. En su composición se encuentran aceros inoxidable metálicos y otras aleaciones; así como estéticos, siendo los más utilizados los de cerámica y zafiro.³⁷

Para evaluar estos valores mínimos requeridos respecto a la fuerza de adhesión se realiza una prueba de Resistencia al cizallamiento, la cual consiste en aplicar una carga oclusogingival a nivel de la interfaz bracket-diente para producir el desprendimiento del bracket, mediante una máquina de ensayos universal. Los valores de la resistencia al desprendimiento se miden a una velocidad de 0.5 mm / min, y la carga aplicada al desprendimiento se registra en megapascales (MPa). La prueba de unión por cizallamiento es ampliamente aceptada para determinar la resistencia a la adhesión de los brackets ortodónticos adheridos.³⁸

Además, cuando se evalúa la resistencia al desprendimiento de la unión, puede producirse un fallo en la interfaz del bracket / adhesivo cuando se retira un bracket, igualmente en la interfaz de adhesivo / esmalte, en la capa adhesiva o en ambos. Las fallas en el interfaz adhesivo / esmalte conducen a un mayor riesgo de que se eliminen fragmentos de esmalte junto con la resina de la base del soporte.³⁹

Para conocer y evaluar estos fallos y de que tipo se presentan en mayor porcentaje se realiza una prueba de Índice de adhesivo remanente (ARI), en la cual una vez que los brackets se despegan, se examinan bajo un microscopio óptico para determinar la cantidad de adhesivo residual que queda en cada diente y se utiliza para evaluar la puntuación original del ARI⁴⁰, a través de la siguiente escala: 0 = ausencia de adhesivo residual en el diente 1 = menos del 50% de adhesivo residual en el diente; 2 = más del 50% de adhesivo residual en el diente; 3 = todo el adhesivo residual en el diente, con la impresión de la base del bracket.

2. Planteamiento del Problema

La caries ha sido y sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial, principalmente en países subdesarrollados. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Norma Oficial Mexicana 013 (NOM 013 SSA) para la prevención y control de las enfermedades bucales, México tiene una prevalencia de caries dental del 90% en su población.

La caries dental es una enfermedad multifactorial sin embargo existen otros agentes causales adicionales que ocasionan la retención y proliferación de microorganismos como es la aparatología fija usada en ortodoncia debido a la duración del tratamiento y a la complejidad de los aparatos creando zonas de retención ocasionando un cambio en la microbiota por acumulación de PDB la cual es utilizada por las bacterias para generar ácidos causando la disolución del esmalte y en consecuencia lesiones de mancha blanca alrededor de los brackets, siendo el organismo principalmente involucrado el *Streptococcus mutans* y el *S. sobrinus*.

Existen algunos estudios acerca de la adherencia de microorganismos a algunos materiales de aparatología fija usada en ortodoncia, sin embargo, la comparación de la adherencia bacteriana a diversos materiales de fabricación de los brackets y su relación con su fuerza de adhesión han sido poco estudiadas.

Por lo tanto, surge la siguiente pregunta de Investigación:

¿Cuál será el nivel de colonización bacteriana a los diferentes brackets y su relación con la resistencia al descementado?

3. Justificación

La boca esta colonizada de manera normal, y el uso de la aparatología fija en ortodoncia complica la remoción de restos alimenticios, lo cual ocasiona el acúmulo de placa dentobacteriana, que a su vez produce ácidos orgánicos que causan la disolución de los iones de calcio y de fosfato de la superficie del esmalte.

Gorelick menciona que esta disolución puede causar lesiones de mancha blanca sobre el esmalte o lesiones cariosas tempranas después de tan solo cuatro semanas de haberse colocado la aparatología. Si la difusión de iones continúa el resultado será la cavitación del esmalte.^{6,9,10}

Por lo que el presente trabajo de investigación aportaría datos de importancia clínica al ortodoncista, orientándolo en el tipo de materiales a utilizar en su práctica profesional, para no solo enfocarse en el éxito del tratamiento ortodóncico, sino también en mantener la salud bucal del paciente disminuyendo el desarrollo de lesiones de mancha blanca durante el tratamiento; así como mantener una adecuada fuerza al descementado.

4. Hipótesis

Hipótesis de trabajo

Los brackets metálicos con nanopartículas de plata (AgNPs) presentarán la menor adherencia bacteriana de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* y la mayor resistencia al descementado en comparación a los brackets estéticos con nanopartículas de plata (AgNPs).

Hipótesis nula

Los brackets metálicos con nanopartículas de plata (AgNPs) no presentarán la menor adherencia bacteriana de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* y la mayor resistencia al descementado en comparación a los brackets estéticos con nanopartículas de plata (AgNPs).

5. Objetivos

a) Objetivo general

Analizar cuantitativamente el grado de colonización bacteriana en brackets ortodóncicos y su relación con la resistencia al descementado.

b) Objetivos específicos

- Sintetizar y caracterizar con nanopartículas los diferentes tipos de brackets.
- Cuantificar la adherencia de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* mediante el uso de marcadores radiactivos.
- Identificar el tipo de bracket con mayor colonización bacteriana a *Streptococcus mutans*.
- Determinar el tipo de bracket con mayor colonización bacteriana a *Streptococcus sobrinus*.
- Identificar el tipo material adicional o recubrimiento adicional al bracket que pueda inhibir en pequeña o gran medida la colonización bacteriana.
- Evaluar la resistencia al descementando de los diferentes tipos de brackets.

6. Diseño metodológico

6.1 *Diseño del estudio*: Experimental, cuantitativo, comparativo, transversal.

6.2 *Universo*: Brackets ortodónticos divididos en tres fases experimentales.

6.2 *Muestra*: muestreo por conveniencia con un total de 650 brackets ortodónticos.

El total de las muestras fue de 650 diferentes tipos de brackets incluyendo grupos control, primeramente, todos fueron sonicados para eliminar impurezas y esterilizados a 121°C, posteriormente solo se le añadieron nanopartículas de plata (AgNPs) a la mitad de ellos que fueron 325 brackets; de los cuales 25 fueron para la primera fase, 150 para la segunda fase y 150 para la tercera fase).

El estudio se realizó en tres fases:

1.- Primera fase: Síntesis y Caracterización de nanopartículas de plata: El total de muestras en esta fase del estudio fue de 50 (25 muestras con AgNPs y 25 muestras sin tratamiento) y se evaluó su efecto antibacterial con *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

2.- Segunda fase: Adherencia bacteriana. (150 muestras con AgNPs y 150 muestras sin tratamiento), y se evaluó su efecto antibacterial con *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.

3.- Tercera fase: Resistencia al descementado. (150 muestras con AgNPs y 150 sin tratamiento).

Para la tercera fase se utilizaron también premolares extraídos por razones ortodónticas.

6.3 Procedimientos

Cinco grupos de diferentes brackets ortodónticos fueron seleccionados dentro de los materiales más actuales para realizar el análisis de todas las fases, los cuales fueron: InVu-Roth (GIn), System-Alexander LTS (GIIn), Gemini-Roth (GIIIIn), NuEdge-Roth (GIVn), Radiance plus-Roth (GVn), InVu-Roth sin agregación de AgNPs (GVI), System-Alexander LTS sin agregación de AgNPs (GVII), Gemini-Roth sin agregación de AgNPs (GVIII), NuEdge-Roth sin agregación de AgNPs (GIX) y Radiance plus-Roth sin agregación de AgNPs (GX) (Figura 1).



Figura 1. Imagen representativa de los diferentes grupos de brackets ortodónticos.

6.3.1 Primera fase

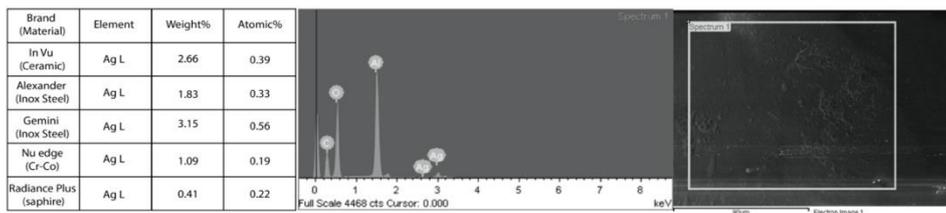
6.3.1.1 Síntesis y Caracterización de nanopartículas de plata

Esta fase fue realizada en el CCIQS (Centro-Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM), siguiendo el método propuesto por T. Bala.⁴¹

Primeramente, los brackets se limpiaron ultrasónicamente durante un minuto para eliminar impurezas. Se dejaron secar las muestras por 12hrs, y enseguida todas las muestras fueron esterilizadas a 121°C, se almacenaron solo los paquetes esterilizados de las muestras sin tratamiento, y en las demás muestras se realizó la coagregación de nanopartículas de plata a los grupos correspondientes de la siguiente manera:

Cada grupo de brackets de diferente material de fabricación fue colocado en una disolución de $10^{-2}M$ de Ácido Oleico en Metanol, la cual se agitó a 500rpm hasta la evaporación total del metanol. Después se agregó una disolución acuosa de $AgNO_3$ en una concentración de $10^{-2}M$ permaneciendo en la disolución por 24 horas. La reducción se logró al añadir una disolución acuosa de $NaBH_4$ al 0.04M dejándolo reaccionar durante 30 min.

Por último, cada bracket fue lavado con agua deionizada para eliminar excedentes, secados en una estufa a 100°C durante 1 hora y posteriormente fueron observados y analizados mediante EDS en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM). (Figura 2).



EDS

Figura 2. Síntesis y Caracterización de nanopartículas de plata EDS/SEM).

Para evaluar este método químico en la síntesis y caracterización de AgNPs en la superficie de diferentes brackets ortodónticos (metálicos y estéticos), fueron tomadas 50 muestras (25 muestras con AgNPs y 25 muestras sin tratamiento).

Microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (SEM / EDS)

La distribución y el análisis elemental de los brackets impregnados con AgNPs se evaluaron mediante microscopía electrónica de barrido.

Cada muestra se colocó en una cinta conductora recubierta de carbono y se observó bajo un microscopio SEM (JEOL, JSM-6510LV a 20kV, Tokio, Japón) con electrones secundarios a 100 ×, 500 × y 2500 × aumentos, operando a 20kV. El análisis químico se realizó mediante dispersión de energía (EDS; Oxford Abingdon, Reino Unido), con una resolución de 137 eV.

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las micrografías se obtuvieron utilizando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2100 (Tokio, Japón) a 200keV con filamento LaB⁶ (hexaboruro de lantano) con una resolución de 0.23nm punto a punto y 0.14nm línea a línea. La adquisición de las micrografías se realizó digitalmente a través de una cámara de dispositivo de carga acoplada (CCD) Gatan (Pleasanton, CA, EE. UU.), Modelo SC200.

Se empleó TEM para caracterizar el tamaño, la forma y la morfología de los AgNPs sintetizadas. La preparación de los brackets para TEM fue la siguiente, se sonicaron durante 4h para desprender las nanopartículas de los brackets; luego, se colocó

cuidadosamente una gota de la suspensión sobre una rejilla de cobre (malla 300) recubierta con una película de carbono y se dejó secar al aire ambiente.

Evaluación del efecto antimicrobiano

Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio se obtuvieron de la colección de cultivos madre del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM, México). Las pruebas de actividad antimicrobiana se llevaron a cabo según lo prescrito por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio.

Estas cepas incluían bacterias Gram-positivas y Gram-negativas que se utilizan comúnmente como estándares. La actividad antimicrobiana de los AgNPs sintetizadas se evaluó contra las bacterias patógenas humanas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* siguiendo el método de difusión en disco de Kirby-Bauer contra los microorganismos grampositivos y gramnegativos y la levadura. Las inoculaciones se prepararon diluyendo las colonias con NaCl al 0,9% a 0,5 según la escala de McFarland, antes de aplicarlas a placas de agar Muller-Hinton utilizando hisopos de algodón estériles. Los brackets impregnados con AgNPs se colocaron en cada caja, colocando un bracket no impregnado en el centro como control positivo. Luego de 48hrs de incubación a 37°C, la susceptibilidad microbiana fue determinada por las zonas de inhibición. Los ensayos se realizaron por triplicado.⁴²

6.3.2 Segunda fase

6.3.2.1 Adherencia bacteriana

Esta fase fue realizada en la Universidad de Asahi, Japón.

- Se realizó el análisis cuantitativo de bacterias mediante el marcaje con isopos radiactivos (³hidrogeno o Tritio).
- Se realizó la medición in vitro de halos de inhibición en medios de cultivo con bacterias (TBS) para determinar la cantidad de UFC (unidades formadoras de colonias) y dpm (desintegración por minuto).

Muestras (Brackets de ortodoncia)

Se utilizaron un total de 300 brackets de ortodoncia comerciales (n = 30 por grupo) en 10 grupos de brackets de ortodoncia (5 grupos con nanopartículas de plata y 5 grupos sin nanopartículas de plata) de material diferente de fabricación de la siguiente manera: GI n InVu-Roth, (TP Ortodoncia, LaPorte, Ind., EE. UU.), GII n System Alexander LTS (AO. American Orthodontics, Wisconsin., EE. UU), GIII n Gemini-Roth (3M Unitek, Monrovia, California, EE. UU.), GIV n Nu-Edge Roth (TP Orthodontics, LaPorte, Ind., EE. UU.), GV n Radiance plus-Roth (AO. American Orthodontics, Wisconsin., EE. UU), GVI n InVu-Roth (TP Orthodontics, LaPorte, Ind., EE. UU.), GVII Sistema Alexander LTS (AO. American Orthodontics, Wisconsin, EE. UU), GVIII Gemini-Roth (3M Unitek, Monrovia, California, EE. UU.), GIX Nu-Edge Roth (TP Ortodoncia, LaPorte, Indiana, EE. UU.), GX Radiance plus-Roth (AO. American Orthodontics, Wisconsin., EE. UU).

Preparación de muestras

El total de muestras para esta fase fue de 300 brackets de ortodoncia (150 brackets para *S. mutans*, 150 brackets para *S. sobrinus*). Los brackets sin nanopartículas de plata se limpiaron de nuevo ultrasónicamente durante un minuto para eliminar impurezas y posteriormente colocados en casetes para su esterilización con Oxido de gas de etileno. Los brackets con nanopartículas de plata solo se colocaron en casetes y fueron envueltos en dos capas de papel aluminio (para protegerlos de la luz ya que produce oxidación de la plata y reducción de sus propiedades) y se colocaron en la Clean Beach con luz ultravioleta junto con las muestras sin plata previamente esterilizadas para mantenerse libres de microorganismos antes de realizar el análisis de adherencia bacteriana.

Cultivo de Microorganismos

Se utilizaron Cepas certificadas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), cultivadas con métodos convencionales para su reproducción en cajas Petri con medios a base de agar con caldo de cultivo tripticaseína de soya (BD Diagnostic Systems, USA, Becton, Dickinson and Company) suplementado con levadura (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A).

Después los microorganismos fueron anaeróbicamente inoculados cada uno por separado en TSBY semi-sólido dejándolos en incubación de 24 a 48 horas a 37°C y enseguida fueron transferidos a un medio de cultivo líquido dejándolos de nuevo 24 horas incubados anaeróbicamente a 37°C.^{9,12,43-44} (Figura 3).

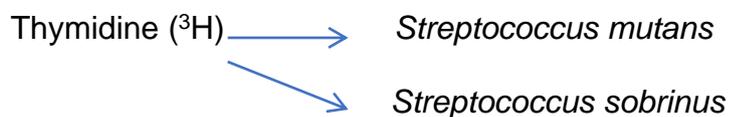


TSBY

Figure 3. Preparación de medio de cultivo e Incubación.

Radiomarcaje de Microorganismos

A continuación, se realizó el marcaje con isopos radiactivos a una concentración de 74 kBq of [6-³H] de thymidine (Tritio) en estos caldos de cultivo líquido de *Streptococcus* para codificar cada microorganismo, y fueron cultivados anaerobicamente por 18 horas a 37°C.



Enseguida, las bacterias fueron recolectadas por centrifugación a 12000 rpm por 15 minutos dentro de 0.05M de solución salina buffer (PBS) ajustada en un ph de 7.0, y lavadas tres veces con PBS. La concentración de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* fue de 10⁵ CFU/ml.

Análisis de las muestras

Los brackets fueron suspendidos dentro de una tapa de un molde de vidrio y sumergidos en 500ml de *Streptococcus mutans* (150 muestras) y *Streptococcus sobrinus* (150 muestras) de forma independiente respectivamente, con fluido de

radiomarcaje a 37°C por 2 horas en movimiento constante. Para eliminar las bacterias no adheridas, fueron removidos los brackets del molde de vidrio, lavados tres veces con una solución de PBS y colocados en pequeños recipientes de papel.

Las bacterias radiomarcadas adheridas a las muestras fueron recolectadas usando un equipo de combustión automático de muestras (ACS-113, Aloka, Tokyo, Japan), el Tritio fue recolectado como una sustancia de ecuasol (Packard, National Diagnosis USA) y la radioactividad fue promedida usando una máquina de centelleo líquido (LSC-900, Aloka), la cual realizó el análisis cuantitativo de bacterias en cada una de las muestras, cuyos valores fueron registrados en desintegración por minuto, siendo proporcional la cantidad de radiación al nivel de colonización bacteriana. Este promedio fue repetido para respetar la fiabilidad de los resultados.^{9,45-46}(Figura 4)

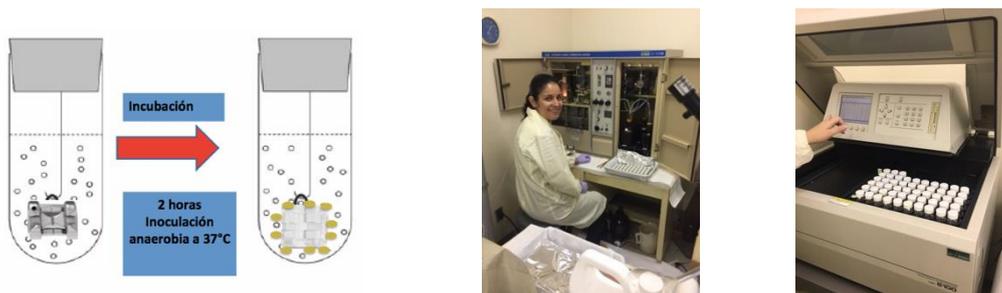


Figura 4. A) Imágenes del procedimiento experimental. B) Máquina de combustión (ACS-113B Hitachi-Aloka, Tokyo, Japan). C) Máquina de centelleo (LSC-900, Aloka, Tokyo, Japan).

El aspecto cualitativo fue evaluado en microscopio electrónico de barrido (SEM) para ambos microorganismos con una magnificación de 2500 y 5000x, después de sumergir las muestras por 2 horas a 37°C en la solución de cultivo de microorganismos con agitación constante. Para la observación del SEM, las muestras fueron retiradas de esta solución de microorganismos, lavadas tres veces en solución de PBS y colocadas en celdillas para ser químicamente fijadas con glutaraldehído y fijadas con tetraóxido de osmio, posteriormente deshidratadas con una serie ascendente de

alcohol y etanol, secadas por congelamiento y finalmente cubiertas con una delgada capa de osmio para ser observadas en el SEM.^{9,12, 43-46}

Los datos obtenidos fueron registrados y examinados con un software para análisis estadísticos (SPSS versión 18, International Business Machines Corp, New York, USA). Las diferencias en los valores promedio entre los brackets fue mediante un análisis de varianza (ANOVA), con una prueba de un factor post hoc de sheffé para comparaciones múltiples.

6.3.3 Tercera fase

Resistencia al descementado

Para esta fase fueron utilizados 300 premolares extraídos por razones ortodónticas, a los cuales se les realizó profilaxis con copas de hule y pasta profiláctica libre de flúor.

Los brackets ortodónticos utilizados fueron clasificados en diez grupos (5 grupos con nanopartículas de plata y 5 grupos sin nanopartículas de plata) de la siguiente manera: InVu-Roth (GIn), System-Alexander LTS (GIIn), Gemini-Roth (GIIIIn), NuEdge-Roth (GIVn), Radiance plus-Roth (GVn), InVu-Roth (GVI), System-Alexander LTS (GVII), Gemini-Roth (GVIII), NuEdge-Roth (GIX) y Radiance plus-Roth (GX), 30 brackets por cada grupo (300 brackets en total). El área de la base del bracket se calculó en 14.1 mm².

Posterior a la profilaxis de los órganos dentarios extraídos se les colocaron los brackets ortodónticos siguiendo el protocolo normal de adhesión y siguiendo las indicaciones del fabricante estandarizando el uso de una sola resina de ortodoncia (Resina Enlight / adhesivo Orho-Solo,Ormco).

Los brackets se adhirieron al esmalte dental de los premolares de la siguiente manera:

La superficie del esmalte dental se grabó primero durante 15 segundos con ácido ortofosfórico al 35% y luego se lavó con agua durante 10 segundos , posteriormente se secó con aire comprimido durante 10 segundos, se colocó el adhesivo sobre la superficie del esmalte y se colocó aire comprimido por 2 segundos; enseguida se colocó la resina en la base del bracket sujetando el bracket con una pinza para colocar

brackets posicionándolo en la posición correcta sobre el diente, se retiraron los residuos con un explorador dental y finalmente se fotocuró durante 20s.^{47,48} (3M, Unitek, luz de curado luminosa Ortholux)

Se les colocó enseguida un segmento de alambre de acero inoxidable calibre .017 x .025 junto con un módulo elástico con la finalidad de reducir cualquier alteración durante el proceso de descementado, y los órganos dentarios fueron empotrados por su raíz en barras de acrílico y colocados en frascos con agua destilada para ser incubados por 24hrs a 37°C.

Se aplicó una carga oclusogingival a nivel de la interfase bracket-diente para producir una fuerza de desprendimiento con ayuda de una barra de acero unida a la máquina de ensayos universal (EZ Graph, Shimadzu, Kyoto, Japón). Los valores de la resistencia al desprendimiento se midieron a una velocidad de 0.5 mm / min, la carga aplicada al desprendimiento se registró en megapascales (MPa). El análisis de estadística descriptiva se realizó para calcular la media, desviación estándar y los valores máximos y mínimos. Asimismo, la prueba ANOVA para comparar grupos. (Figura 5)

Una vez que los brackets se despegaron, se analizaron bajo un microscopio óptico para evaluar la cantidad de adhesivo residual que quedaba en cada diente según la puntuación original del ARI, utilizando la siguiente escala: 0 = ausencia de adhesivo residual en el diente 1 = menos del 50% de adhesivo residual en el diente; 2 = más del 50% de adhesivo residual en el diente; 3 = todo el adhesivo residual en el diente, con la impresión de la base del bracket.

Finalmente se procedió hacer el análisis de los datos y realizando las pruebas estadísticas Chi x^2 para el índice de adhesivo remanente (ARI), ANOVA para comparación entre grupos con el programa estadístico SPSS versión 21.



Figure 5. Preparación de muestras y aplicación de carga oclusogingival con máquina de ensayos universal.

6.4 Criterios de Inclusión:

- Brackets con prescripción Técnica Roth y Alexander
- Brackets slot 0.018".
- Brackets nuevos.
- Bracket prescrito para premolar.

6.5 Criterios de Exclusión:

- No cumplen las características mencionadas anteriormente.
- Brackets de reciclaje.
- Empaque con defecto físico.

6.6 Criterios de Eliminación:

Brackets ortodóncicos con fracturas o contaminación durante el procedimiento.

6.7 Recolección de datos

Primera fase: -A través del SEM/ EDS y TEM.

- Por medio de la inhibición de los halos antibacterianos generados en las placas de agar y con ayuda del programa de software ImageJ (versión 1.47e, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU).

Segunda fase: -El análisis cuantitativo de la adherencia de los microorganismos fue mediante un sistema de combustión (ACS-113, Aloka, Tokyo, Japan).

- La radioactividad fue promediada por medio de una máquina de centelleo líquido (LSC-900, Aloka).

-La medición in vitro de halos de inhibición en medios de cultivo con bacterias para determinar la cantidad de UFC y dpm.

-El análisis cualitativo fue través del SEM/EDS.

-Programa estadístico SSPS versión 21.

Tercera fase: -Medición en Mpa (megapascales) mediante una barra de acero unida a la máquina de ensayos universal (EZ Graph, Shimadzu, Kyoto, Japón).

-Programa estadístico SSPS versión 21.

6.8 Análisis de datos

En la primera fase se realizó el análisis cualitativo de los datos e imágenes obtenidas mediante el SEM/EDS y el TEM, además los datos generados de la medición de la inhibición de los halos antibacterianos generados en las placas de agar usando luz reflejada sobre la placa de agar, estas distancias medidas se redondearon al milímetro más cercano con el uso del programa de software ImageJ (versión 1.47e, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EE. UU.), dándonos un promedio del tamaño logrado en las nanopartículas.

Los datos de las dos últimas fases del estudio se registraron y analizaron en el programa estadístico SPSS versión 21, y se calcularon múltiples comparaciones entre los grupos con la prueba de ANOVA (Sheffé Post-hoc) tanto para conocer el efecto antibacterial en *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, como en la resistencia a la descementado y adicionalmente en la tercera fase también se realizó Chi x^2 para índice ARI (índice de adhesivo remanente).

7. Resultados

7.1 Primer artículo

Primera Fase

Microscopía electrónica de barrido y espectroscopía de dispersión de energía de rayos X (SEM/ EDS)

En las micrografías realizadas mediante SEM (Figura 1), se determinó la composición del material de cada brackets de ortodoncia. El análisis se realizó con la técnica SEM /EDS, a través de la cual se comprobó el anclaje en la superficie del bracket. La presencia de plata se confirmó mediante este método de síntesis de T. Bala, obteniendo una mayor concentración.⁴¹

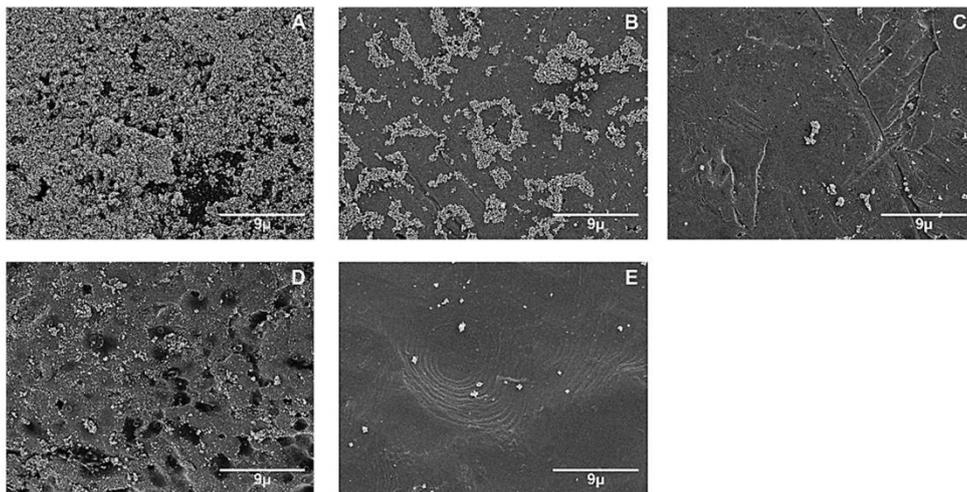


Figura 1. Micrografías representativas del SEM de brackets de ortodoncia con nanopartículas de plata a través del método propuesto por T. Bala (aumento de 2500X): (A) GI, (B) GII, (C) GIII, (D) GIV, (E) GV.

La técnica de caracterización fue consistente con el análisis de mapeo químico elemental de nanopartículas de plata, mostrando picos de absorción de aproximadamente 3kv. La Figura 2 muestra los puntos blancos en la superficie. El mapeo químico permitió ver la distribución de los diferentes elementos que componen el soporte, así como la plata que se adhiere a la superficie.

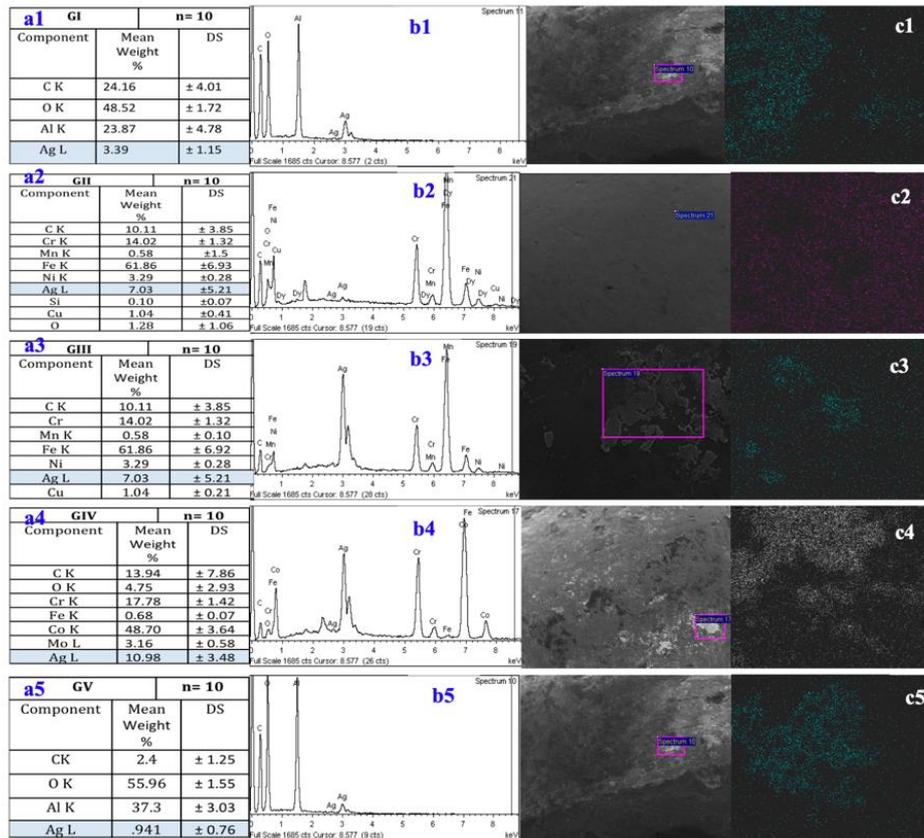


Figure 2. (a1–a5) Media y desviación estándar por grupo: GI, GII, GIII, GIV y GV; (b1–b5) espectro representativo de la muestra de nanopartículas de plata obtenidas por espectroscopia de dispersión de energía (EDS); (c1–c5) análisis de mapeo basado en SEM de las nanopartículas de plata en los brackets sintetizadas mediante el método propuesto por T. Bala.

Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución (HRTEM)

En las micrografías, la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) mostró AgNPs de 4.44nm, representativo del tamaño medio obtenido mediante el método de síntesis descrito anteriormente. Este correspondía a 4.69 nm en el que pudimos observar la distancia interplanar de 0.241 nm, correspondiente al plano (111) según JCPDS-04-0783; la forma de las AgNPs tendía a ser esférica (Figura 3).

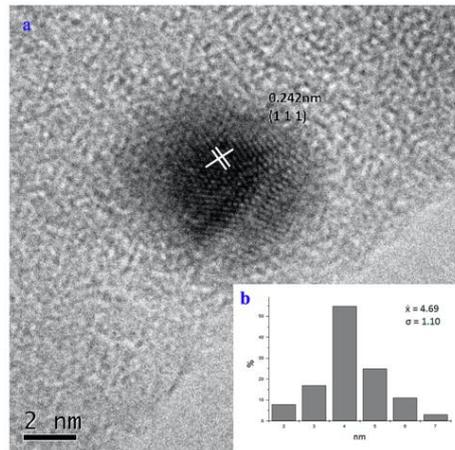


Figura 3. (a) Micrografía TEM de alta resolución (HRTEM), donde se puede observar que las nanopartículas de plata sintetizadas (AgNPs) obtuvieron una forma esférica con una distancia interplanar de 0.242 nm, correspondiente al plano (111). (b) El histograma de frecuencia informa que el tamaño medio alcanzado fue de 4.69 nm con una desviación estándar de ± 1.10 .

Evaluación de efecto antimicrobiano

Los brackets impregnados con nanopartículas de plata (grupo experimental) se probaron contra microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, presentando zonas de inhibición similares en todos los cultivos. Los brackets sin impregnación de nanopartículas de plata (grupo control) no mostraron efecto antimicrobiano *in vitro* con *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Figura 4).

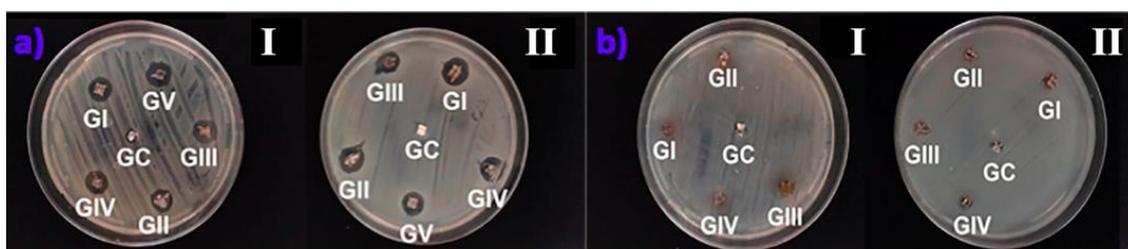


Figura 4. Imagen representativa de la evaluación microbiológica (a) brackets con AgNPs (grupo experimental) y (b) brackets sin AgNPs (grupo control) cuando se evalúa *in vitro* con cepas de *Staphylococcus aureus* (I) y *Escherichia coli* (II).

Los halos inhibidores obtenidos por la evaluación *in vitro* del efecto antibacteriano, en términos de brackets con nanopartículas de plata con *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, mostraron una excelente inhibición del crecimiento microbiano en comparación con los brackets control, con un diámetro entre 9 y 10 mm (promediado con el programa Imagen J), como se muestra en la Tabla 1.

Microorganism	Halos of Inhibition (mm, Mean \pm SD)				
	GI	GII	GIII	GIV	GV
(A) <i>S. aureus</i>	9.77 \pm 0.003	9.55 \pm 0.003	9.72 \pm 0.004	9.47 \pm 0.004	9.98 \pm 0.004
(B) <i>E. coli</i>	11.4 \pm 0.002	10.5 \pm 0.005	9.51 \pm 0.012	10.0 \pm 0.006	9.44 \pm 0.003

Tabla 1. Resultados de la prueba de difusión en disco contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en contacto con nanopartículas de plata (AgNPs) (media y desviación estándar).

7.1.1 Carta de aceptación.

← [Coatings] Manuscript ID: coatings-523675; doi: 10.3390/coatings9080480. Paper has been published.

 Traducir mensaje a: Español | No traducir nunca de: Inglés

 coatings@mdpi.com     
Lun 29/07/2019 05:43 AM

Para: Usted; ulisesvelazqu@hotmail.com; rogelio_scougall@hotmail.com; laracaedith@hotmail.com; toralrizo@hotmail.com **y 2 más**
CC: billing@mdpi.com; website@mdpi.com; coatings@mdpi.com; verna.yu@mdpi.com

Dear Authors,

We are pleased to inform you that your article "Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles on Orthodontic Brackets: A New Alternative in the Prevention of White Spots" has been published in **Coatings** as part of the Special Issue Surface Coating for Biomedical Applications and is available online:

Abstract: <https://www.mdpi.com/2079-6412/9/8/480>
PDF Version: <https://www.mdpi.com/2079-6412/9/8/480/pdf>

The meta data of your article, the manuscript files and a publication certificate are available here (only available to corresponding authors after login):
https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/f71c61f65e1160b3099f18e0956632ad

Special Issue:
https://www.mdpi.com/journal/coatings/special_issues/surf_coat_biomed_appl

Please take a moment to check that everything is correct. You can reply to this email if there is a problem. Note that at this stage we will not accept further changes to the manuscript text.

To encourage open scientific discussions and increase the visibility of published articles, MDPI recently implemented interactive commenting functionalities on all article webpages (side bar on the right). We encourage

Article

Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles on Orthodontic Brackets: A New Alternative in the Prevention of White Spots

Irania Jasso-Ruiz ¹, Ulises Velazquez-Enriquez ², Rogelio José Scougall-Vilchis ², Edith Lara-Carrillo ², Victor Hugo Toral-Rizo ², Rafael López-Castañares ³ and Raúl Alberto Morales-Luckie ^{3,*}

¹ Department of Health Sciences, School of Nursing, Autonomous University State of Mexico, Paseo Tollocan S/N, esq. Jesús Carranza, Moderna de la Cruz, Toluca City 50180, Mexico

² Dental Research Center (CIEAO), Autonomous University State of Mexico (UAEMex), Paseo Tollocan S/N, Jesús Carranza esq., Universidad, Toluca City 50130, Mexico

³ Department of nanomaterials, Sustainable Chemistry Research Center/National Autonomous University of Mexico, Highway Km. 14.5, San Cayetano Unit, Toluca-Atlaconulco, Toluca City 50200, Mexico

* Correspondence: rmorales@uaemex.mx

Received: 24 May 2019; Accepted: 25 July 2019; Published: 29 July 2019



Abstract: Silver nanoparticles (AgNPs) are used for their powerful antibacterial effect and their ability to adhere to surfaces due to their size; they are used in different areas of life, mainly in the area of health as medicine. More recently, in dentistry, the synthesis and characterization of AgNPs attracted significant attention due to their antibacterial properties. In this study, the AgNPs were synthesized using the most effective method on different orthodontic brackets (metallic and esthetic) and characterized by scanning electron microscopy/energy-dispersive spectroscopy (SEM/EDS) and transmission electron microscopy (TEM). Their antimicrobial effect was tested against the widely used standard human pathogens *Staphylococcus aureus* (Gram-negative) and *Escherichia coli* (Gram-positive). Our results showed that, via a simple chemical method, AgNPs can be synthesized on the surface of orthodontic brackets with good antimicrobial activity and the possibility of reducing dental decay, periodontal disease and white spots generated during orthodontic treatment.

Keywords: synthesis; silver nanoparticles; orthodontic brackets; antimicrobial effect; white spot lesions

1. Introduction

The oral microbiota has an environment that provides the proliferation of bacteria capable of producing acids, which demineralize the surfaces of tooth enamel [1]. Biofilm has a crucial role in the adhesion of these microorganisms to the dental surface in such a way that the demineralization of the enamel originates with the organic acid production of microorganisms. *Streptococcus mutans* is classified as the most cariogenic bacteria [1,2].

The presence of fixed orthodontic appliances, specifically brackets, bands, archwires and ties, makes dental brushing difficult and generates suitable conditions for dental biofilm accumulation and the colonization of cariogenic microorganisms, increasing the risk of enamel demineralization mainly around the brackets [3].

These acids produced by the bacteria when in contact with the surface of the tooth, if left for enough time with nutrients and an adequate environment, generate the demineralization of the enamel and the development of white spot lesions (WSL), which are considered as the first sign of caries. These lesions are characterized by their opacity, mineral loss and a decrease in fluorescence radiance

7.2 Segundo artículo

Segunda Fase

Adhesión de *Streptococcus mutans*

La adherencia de *S. mutans* radiomarcado a los brackets de ortodoncia fue significativamente diferente entre los grupos ($p \leq 0.05$). Los puntajes se expresaron en dpm como se muestra en la Tabla 1. Los valores en dpm de los brackets de ortodoncia con mayor adherencia de *S. mutans* fueron etiquetados como grupo GVI (3153.83 dpm), seguido del grupo GVIII (2203.94 dpm), y finalmente grupo GIX (2186.23 dpm), no se añadieron nanopartículas de plata a estos grupos. Además, los grupos con menor adherencia bacteriana fueron aquellos con coagregación de nanopartículas de plata; estos grupos son los siguientes: grupo GVn (687.33 dpm), seguido del grupo GIIIn (599.13 dpm) y el grupo GIIIIn (563.01 dpm).

Table 1.- Análisis Cuantitativo de *S. mutans* con radiomarcaje (^3H)

Bracket	DPM ^a	SD ^b	Sheffè test ^c
GIn In Vu Ag	707.78	(265.29)	A
GIIIn Alexander Ag	599.13	(260.85)	A
GIIIIn Gemini Ag	563.01	(287.71)	B
GIVn Nu-Edge Ag	775.39	(520.47)	B
GVn Radiance Ag	687.33	(284.24)	B
GVI In Vu	3153.83	(1071.06)	C
GVII Alexander	2044.00	(904.52)	D
GVIII Gemini	2203.94	(868.32)	C
GIX Nu-Edge	2186.23	(568.11)	C
GX Radiance	1714.01	(375.42)	C, D

DPM^a (Desintegración por minuto).

**SD^b (Desviación estándar).

***Brackets de ortodoncia con diferentes letras son significativamente diferentes entre sí.

Adhesión de *Streptococcus sobrinus*

La adherencia de *S. sobrinus* radiomarcado a los brackets de ortodoncia fue significativamente diferente entre los grupos ($p \leq 0.05$). Los puntajes se expresaron en dpm como se muestra en la Tabla 2. Para los valores de dpm, los brackets de ortodoncia con mayor adherencia de *S. sobrinus* se agruparon de la siguiente manera: grupo GIX (8197.32 dpm), grupo GVIII (7518.39 dpm) y grupo GVI (7256.29 dpm), las nanopartículas de plata no se agregaron a estos grupos. Así mismo, los grupos con menor adherencia bacteriana fueron aquellos con coagregación de nanopartículas de plata; los grupos fueron los siguientes: grupo GVn (1085.67 dpm), grupo GIVn (1084.31 dpm) y grupo GIII n (1044.08 dpm).

Table 2.- Análisis Cuantitativo de *S. sobrinus* con radiomarcaje (^3H)

Bracket	DPM ^a	SD ^b	Sheffè test ^c
GIn In Vu Ag	1906.48	(1037.91)	A
GII n Alexander Ag	1513.64	(882.12)	A
GIII n Gemini Ag	1044.08	(415.86)	B, C
GIVn Nu-Edge Ag	1084.31	(415.44)	B, C
GVn Radiance Ag	1085.67	(303.03)	B, C
GVI In Vu	7256.29	(1421.48)	D
GVII Alexander	5457.09	(1550.05)	E
GVIII Gemini	7518.39	(1494.52)	D
GIX Nu-Edge	8197.32	(2174.98)	D
GX Radiance	6660.28	(1436.74)	D,E

DPM^a (Desintegración por minuto).

SD^b (Desviación estándar).

***Brackets de ortodoncia con diferentes letras son significativamente diferentes entre sí.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las imágenes SEM representativas de los materiales de los brackets obtenidos después de 2h de inmersión en soluciones de *S. mutans* y *S. sobrinus* se muestran en las Figs. 1 y 2. Los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo son consistentes con la observación cualitativa en SEM.

Según los valores de dpm, para todos los grupos de brackets con adición de nanopartículas de plata (AgNPs), la adherencia bacteriana de ambos microorganismos fue menor que en los grupos de brackets sin adición de nanopartículas de plata.

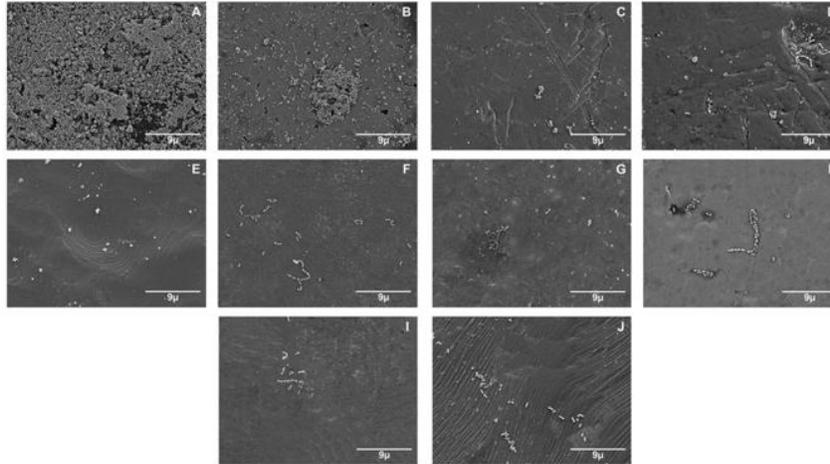


Figura 1. Imágenes representativas del SEM de brackets de ortodoncia con nanopartículas de plata expuestos a *S. mutans* (aumento de 2500X): **a** GIn, **b** GIIn, **c** GIIIIn, **d** GIVn, **e** GVn, **f** GVI, **g** GVII, **h** GVIII, **i** GIX, **j** GX.

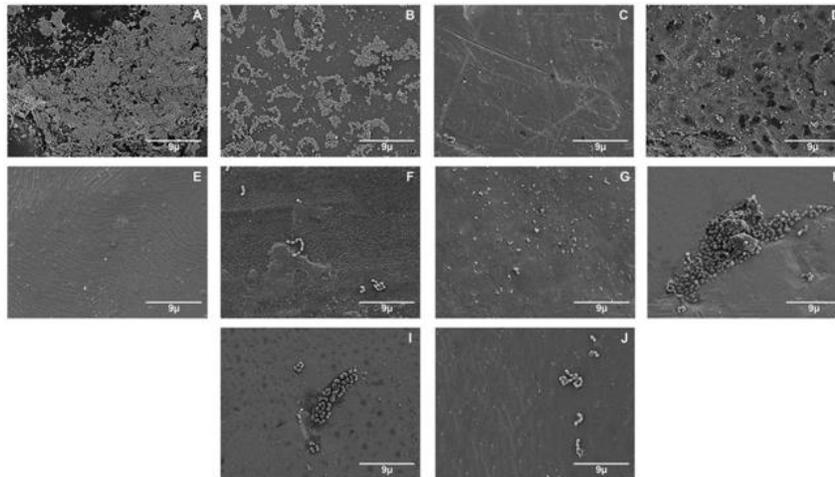


Figura 2. Imágenes representativas del SEM de brackets de ortodoncia con nanopartículas de plata expuestos a *S. sobrinus* (aumento de 2500X): **a** GIn, **b** GIIn, **c** GIIIIn, **d** GIVn, **e** GVn, **f** GVI, **g** GVII, **h** GVIII, **i** GIX, **j** GX.

7.2.1 Carta de aceptación.

RV: Awaiting your response on the proofs for your article 'Silver nanoparticles in orthodontics..' (PIOR-D-20-00023R1) in **Progress** in Orthodontics (324)

Learn. Discover. Achieve

SPRINGER NATURE

Article Title : Silver nanoparticles in orthodontics, a new alternative in bacterial inhibition: in vitro study

DOI : 10.1186/s40510-020-00324-6
40510_2020_324

Dear Author,

We are pleased to inform you that your paper is nearing publication. Your article proofs are available at:

https://eproofing.springer.com/journals_v2/index.php?token=MmygNZnTDtxuNxwS9zuFOkbBhF79Ncawtk0TiXNSNUY

The URL is valid only until your paper is published online. It is for proof purposes only and may not be used by third parties.

Silver nanoparticles in orthodontics, a new alternative in bacterial inhibition: in vitro study



Irania Jasso-Ruiz¹, Ulises Velazquez-Enriquez^{2*} , Rogelio José Scougall-Vilchis², Raúl Alberto Morales-Luckie³, Toshiko Sawada⁴ and Ryozo Yamaguchi⁵

Abstract

Background: The purpose of the study is to assess the antiadherent and antibacterial properties of surface-modified different orthodontic brackets with silver nanoparticles against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, using radiomarker.

Methods: In this study evaluated quantitatively the adherence of *Streptococci* to orthodontic brackets, 300 samples of orthodontic brackets were selected and classified in to 10 groups as follow: Gln (InVu-Roth), Glln (System-AlexanderLTS), Glln (Gemini-Roth), GIVn (NuEdge-Roth), GVn (Radiance plus-Roth), GVI (InVu-Roth), GVII (System-AlexanderLTS), GVIII (Gemini-Roth), GIX (NuEdge-Roth), GX (Radiance plus-Roth). All the samples were sonicated and *Streptococci* were cultivated by gender. A radioactive marker (³H) was used to codify the bacteria and measure them. After that, the brackets were submerged in a radiolabelled solution, and the radiation was measured. The statistical analysis was calculated with ANOVA test (Sheffè post hoc).

Results: The results showed significant differences were found among the groups. Glln shown the lowest scores for both bacteria; in contrast, GIX for *Streptococcus mutans* and GVI for *Streptococcus sobrinus* were the highest values.

Conclusions: Surface modification of orthodontic brackets with silver nanoparticles can be used to prevent the accumulation of dental plaque and the development of dental caries during orthodontic treatment.

Keywords: Orthodontic brackets, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, Silver nanoparticles, White spot lesion

Background

The oral cavity environment provides certain essential characteristics for the proliferation of bacteria that are capable of producing acids that demineralize the surface of the tooth enamel [1]. Biofilm has a crucial role in the adhesion of these microorganisms to the dental surface [2, 3]. Enamel demineralization is caused by the organic acids produced by various microorganisms, mainly

Streptococcus mutans (*S. mutans*) and *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*), which are identified as the main pathogens in dental caries [4–7].

Dental caries has been defined by the World Health Organization (WHO) as a localized process of multifactorial origin; this begins as a demineralization, which is the softening of the hard tissue of the tooth and evolves into the formation of a cavity. WHO reports that there is a prevalence in 60% to 90% of school children and almost 100% of adults have dental caries around the world, coinciding with the Official Mexican Standard 013 report, where it is mentioned that there is a 90% prevalence in Mexico [8].

* Correspondence: uvelazqueze@uaemex.mx

²Department of Orthodontics, School of Dentistry, Autonomous University State of Mexico, Paseo Tollocan esq. Jesús Carranza S/N, Universidad, 50130 Toluca City, México

Full list of author information is available at the end of the article

7.3 Tercer artículo

Tercer Fase

Muestras (brackets ortodónticos)

Tabla 1.- Material empleado en el estudio

Group	Comercial brand / technique	Composition	Company	Treatment
GIn	InVu-Roth	Ceramic	Tp Orthodontics, Inc.	AgNPs incorporation
GIIa	System-Alexander LTS	Inox steel	American Orthodontics, Corp.	AgNPs incorporation
GIIn	Gemini-Roth	Inox steel	3M, Unitek Corp.,Monrovia, California, EE.UU.	AgNPs incorporation
GIVa	NuEdge-Roth	Chrome-cobalt alloy	Tp Orthodontics, Inc.	AgNPs incorporation
GIVb	Radiance plus - Roth	Sapphire	American Orthodontics, Corp.	AgNPs incorporation
GVI	InVu-Roth	Ceramic	Tp Orthodontics, Inc.	No treatment
GVII	System-Alexander LTS	Inox steel	American Orthodontics, Corp.	No treatment
GVIII	Gemini-Roth	Inox steel	3M, Unitek Corp.,Monrovia, California, EE.UU.	No treatment
GIX	NuEdge-Roth	Chrome-cobalt alloy	Tp Orthodontics, Inc.	No treatment
GX	Radiance plus - Roth	Sapphire	American Orthodontics, Corp.	No treatment

Análisis de Varianza (ANOVA)

La prueba ANOVA mostró que había una diferencia estadísticamente significativa en la fuerza de unión al cizallamiento ($p < 0.05$) entre los grupos de brackets con nanopartículas de plata (rango: 5.11-10.92 MPa) y sin nanopartículas de plata (rango: 8.10-14.77 MPa), siendo los brackets sin agregación de AgNPs los que presentaron mayor resistencia al descementado (valores establecidos como necesarios para soportar las fuerzas ortodónticas 6-8 MPa).

El grupo con mayores valores de resistencia al cizallamiento fue el GVII (14.77 ± 5.29 MPa), seguido del GVI (14.38 ± 5.96 MPa) con una diferencia muy marcada

con GX (11.54 ± 4.59), en contraste, los valores más bajos se identificaron en GIIIn (5.11 ± 1.93 MPa) y GIIn (6.34 ± 3.23 MPa) respectivamente.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la resistencia al descementado entre todos los grupos, específicamente más marcadas entre los grupos GIIn (con nanopartículas de plata) y GVI (sin nanopartículas de plata) del mismo material de fabricación y de la misma forma en los grupos GIIIn (con nanopartículas de plata) y GVII (sin nanopartículas de plata) del mismo material de fabricación, siendo los grupos con AgNPs en ambos casos los que presentaron una menor resistencia al descementado.

Por otro lado, en el grupo GIVn (con nanopartículas de plata) y GIX (sin nanopartículas de plata) del mismo material de fabricación (aleación de cromo-cobalto), fue el único caso en el que el grupo con nanopartículas de plata presentó mayor fuerza de adhesión, por lo que sería necesario investigar en estudios posteriores porque ocurre específicamente en este material de fabricación de brackets de ortodoncia.

Sin embargo, si bien la mayoría de los grupos con agregación de AgNPs mostraron menores niveles de fuerza de adhesión, cumplieron con los criterios necesarios para soportar las fuerzas ortodóncicas establecidas por Reynolds¹⁰⁻¹² con excepción del grupo GIIIn que presentó una fuerza de adhesión de 5.11 ± 1.93 MPa.

Tabla 2. Resistencia al descementado de los brackets de ortodoncia probados (MPa).

Groups	N	Mean (MPa)*	SD**	p≤0.05***
GIn	30	6.34	3.23	A
GIIIn	30	5.11	1.93	A
GIIn	30	7.364	3.71	A
GIVn	30	10.92	3.33	B
GVn	30	7.03	3.01	A
GVI	30	14.38	5.96	C
GVII	30	14.77	5.29	D, C
GVIII	30	9.67	3.74	A, B
GIX	30	8.10	4.19	A, B
GX	30	11.54	4.59	E, C
Total	300	9.52	5.09	

*Mean MPa (Promedio de Resistencia al cizallamiento en MPa)

**SD (Desviación estándar)

*** Diferentes letras son significativamente diferentes entre sí.

Índice de Adhesivo Remanente (ARI)

Las puntuaciones de ARI para los brackets con AgNPs y sin agregación de AgNPs mostraron diferencias estadísticamente significativas. La comparación de los resultados con la prueba $\chi^2 = 28.33$ indicó que los grupos son significativamente diferentes ($p = 0.0521$), específicamente en los grupos GIn, GIVn, GVn, GVI, GVIII y GIX.

Los grupos con agregación de AgNPs mostraron mayor frecuencia de valor 3, lo que revela que las fallas ocurrieron principalmente en la interfase adhesivo-bracket. Los grupos sin agregación de AgNPs mostraron una ausencia de adhesivo residual en el diente o menos del 50% de adhesivo residual en el diente. (0 y 1) esto significa

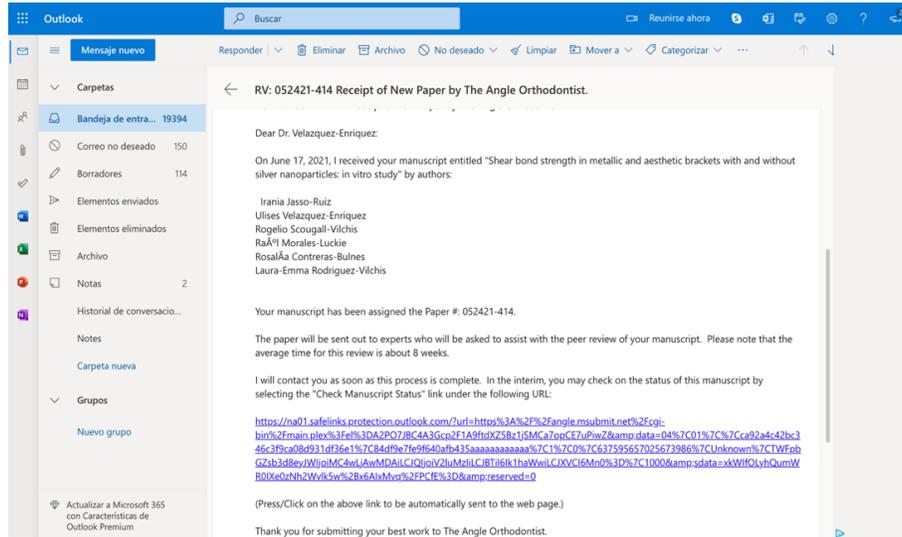
que la falla ocurrió predominantemente en la interfaz esmalte-adhesivo, mostrando menos cantidad de adhesivo restante en la superficie del esmalte.

La cantidad de adhesivo residual en las superficies de las muestras según lo evaluado por las puntuaciones de ARI se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Puntuaciones del índice de adhesivo remanente (ARI) de los brackets probados.

Groups	0	1	2	3	n	Valor p
<u>GIn</u>	3	0	5	22	30	.001
<u>GIIIn</u>	0	0	0	30	30	.001
<u>GIIn</u>	6	6	5	13	30	.141
<u>GIVn</u>	5	6	0	19	30	.002
<u>GVn</u>	9	1	9	11	30	.049
GVI	12	7	10	1	30	.027
GVII	14	11	5	0	30	.122
GVIII	23	4	2	1	30	.001
GIX	15	12	1	2	30	.001
GX	11	5	10	4	30	.177
Total	98	52	44	103	300	

7.3.1 Carta de envío



7.3.2 Portada de envío

24/5/2021 The Angle Orthodontist

THE ANGLE ORTHODONTIST
 ONLINE MANUSCRIPT SUBMISSION AND PEER REVIEW

IMPORTANT: To ensure proper functionality of this site, both JavaScript and **Cookies** MUST be enabled.

[Home](#)

Detailed Status Information

Manuscript #	052421-414
Current Revision #	0
Submission Date	2021-05-24 12:34:19
Current Stage	Initial QC Started
Title	Shear bond strength in metallic and aesthetic brackets with and without silver nanoparticles: in vitro study
Running Title	Shear bond strength in brackets with AgNPs
Manuscript Type	Original Article
Special Section	N/A
Corresponding Author	Ulises Velazquez-Enriquez (Autonomous University State of Mexico)
Contributing Authors	Irania Jasso-Ruiz , Rogelio Scougall-Vilchis , Raúl Morales-Luckie , Rosalia Contreras-Bulnes , Laura-Emma Rodriguez-Vilchis
Financial Disclosure	I have no relevant financial interests in this manuscript.
Abstract	<p>Objective: To evaluate the shear bond strength of five different orthodontic supports with and without silver nanoparticles (AgNPs) and compare the results. Materials and Methods: 300 samples of orthodontic supports were selected and classified into 10 groups as follows: Gln (InVu-Roth), Glln (System-AlexanderLTS), Gllln (Gemini-Roth), GIVn (NuEdge-Roth), GVn (Radiance plus - Roth), GVI (InVu-Roth), GVII (System-AlexanderLTS), GVIII (Gemini-Roth), GIX (NuEdge-Roth), GX (Radiance plus-Roth). All the samples were joined to 300 human premolars extracted for orthodontic reasons, standardizing the use of an orthodontic resin, and brackets were placed following the adhesion protocol according to the manufacturer, subsequently introduced in acrylic bars along the longitudinal axis of the tooth and stored in containers with distilled water in the incubator at 37 (degree sign) C for 24 hours, to be placed to the universal testing machine finally. The statistical analysis was calculated with ANOVA test and x2 to ARI index. Results: Significant differences were found between most of the groups. The group with the highest shear bond strength was the GVII (14.7729..) and the group with the lowest shear bond strength was the Glln (5.11.93). Statistically significant differences were also found in the ARI index $\chi^2=28,33$ ($p=0,0521$). Conclusion: The incorporation of silver nanoparticles decreased the shear bond strength, however, most of the groups complied the necessary criteria for an adequate shear bond strength in orthodontics.</p>
Associate Editor	Not Assigned
Key Words	Orthodontic brackets, Silver nanoparticles, Shear-bond strength
Conflict of Interest	I have no conflict of interest that I should disclose.

Stage	Start Date	End Date	Approximate Duration
Initial QC Started	2021-05-24 12:56:18		
Author Approved Converted Files	2021-05-24 12:56:18		
Waiting for Author Approval of Converted Files	2021-05-24 12:47:54		
File Conversion Complete	2021-05-24 12:47:54		

7.4 Carta de aceptación de Capítulo de libro

The screenshot shows the Outlook web interface. The left sidebar contains a 'Carpetas' (Folders) section with 'Bandeja de entr...' (20368), 'Correo no deseado' (76), 'Borradores' (121), 'Elementos enviados', 'Elementos eliminados' (7), 'Archivo', 'Notas' (2), 'Historial de conversaci...', and 'Notes'. Below this is a 'Carpeta nueva' (New folder) button and a 'Grupos' (Groups) section. The main content area displays an email with the subject 'Rv: RV: Aceptación y revisión galeras capítulo de libro'. The sender is 'cd_jasso@hotmail.com'. The email body contains the following text:

Para: cd_jasso@hotmail.com <cd_jasso@hotmail.com>
Asunto: Aceptación y revisión galeras capítulo de libro

Dra. Irania Jasso-Ruiz

Nos es grato dirigimos a usted para hacer de su conocimiento que, con base a la revisión editorial y a la calidad del manuscrito titulado:
TÍTULO: Incorporación de Nanopartículas de plata en brackets de Ortodoncia: Una Revisión de la literatura
AUTORES:
Irania Jasso-Ruiz,¹ Ulises Velazquez-Enriquez,² Rogelio José Scougall-Vilchis,³ Raúl Alberto Morales-Luckie,⁴ Edith Lara-Carrillo,² Víctor Hugo Toral-Rizo.⁵

¹Facultad de Enfermería de la Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México. ²Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México. ³Centro de Investigación de Estudios Avanzados en Odontología de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México. ⁴Departamento de Nanomateriales, Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM/UNAM, Toluca, México. ⁵Ciencias Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.

Ha sido **ACEPTADO**, para ser incluido en el libro que estamos editando. Para finalizar, por favor le pedimos:

- Leer con detenimiento el manuscrito que se encuentra adjunto al correo para eliminar algún error que pudo ser introducido durante la edición del mismo por el equipo editorial.
- Compruebe si el texto está completo y si las figuras, tablas y sus leyendas están incluidas.
- Revisar las referencias que se encuentren en estilo Vancouver.
- Realice sus correcciones insertando los comentarios con la herramienta "control de cambios" del programa Word o resaltando los cambios en color rojo.
- La publicación de datos erróneos, como dosis y unidades pueden tener serias consecuencias. Por favor tenga particular cuidado que todos esos detalles sean correctos.
- Conteste, además, si existiera, algún comentario introducido por los editores sobre algún dato o frase que no quedó claro.
- Las galeras (pruebas de imprenta) corregidas deben ser devueltas en un lapso no mayor de 15 días.

Debido al problema mundial que atravesamos con la epidemia de COVID-19, nos disculpamos por la tardanza en el proceso editorial.

Gracias por contribuir con nosotros. Esperamos contar nuevamente con su valiosa colaboración en los proyectos que tenemos a futuro. Sin otro

At the bottom of the email, there is a status bar showing 'Rv: RV: Aceptación y revisi...' and '(Sin asunto)'.

7.4.1 Capitulo del Libro

INCORPORACIÓN DE NANOPARTICULAS DE PLATA EN BRACKETS DE ORTODONCIA: UNA REVISIÓN DE LA LITERATURA

Irania Jasso-Ruiz¹, Ulises Velazquez-Enriquez², Rogelio José Scougall-Vilchis³,
Raúl Alberto Morales-Luckie⁴, Edith Lara-Carrillo⁵, Victor Hugo Toral- Rizo⁶

¹ Alumna del Doctorado en Ciencias de la Salud. Facultad de Enfermería de la Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.

² Profesor-Investigador. Subdirector Académico de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México.

³ Profesor-Investigador. Coordinador del Centro de Investigación de Estudios Avanzados en Odontología de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México.

⁴ Profesor-Investigador. Departamento de Nanomateriales, Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM/UNAM, Toluca, México.

⁵ Profesor-Investigador. Directora de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México.

⁶ Profesor-Investigador. Coordinador de la Maestría en Ciencias Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México.

8. Discusión

Los brackets de ortodoncia son aditamentos fijos que se colocan en los órganos dentales para la corrección de las maloclusiones dentales, estando en contacto directo con la superficie del esmalte dental y, debido a varios factores como su complejo diseño, la duración del tratamiento y la dificultad en la higiene bucal del paciente, producen una mayor acumulación de biofilm oral, aumentando los niveles de bacterias acidógenas, más notablemente el *S. mutans* y el *S. sobrinus*; estas bacterias son capaces de reducir el pH de la biopelícula en pacientes con ortodoncia en mayor grado que en pacientes sin ortodoncia, provocando lesiones de mancha blanca alrededor del bracket, debido a los ácidos orgánicos segregados por estas bacterias, por lo que son reconocidos como los principales organismos causantes de la caries dental.¹² Gorelick informó que la desmineralización del esmalte ocurre desde el primer mes después de la colocación de aparatos fijos, y se estima que la prevalencia de la lesión de mancha blanca en el esmalte de los pacientes tratados con ortodoncia varía de 12.6% a 50%.^{6-8,28}

Las aplicaciones tópicas de fluoruro de sodio en enjuagues y barnices, así como el fortalecimiento de la técnica del cepillado, no son suficientes para reducir la alta prevalencia de estas lesiones; este fenómeno dio lugar a esta investigación encaminada a descubrir nuevos métodos alternativos.

La nanotecnología se ha utilizado ampliamente con fines biomédicos, que van desde el diagnóstico, el tratamiento, la administración de medicamentos hasta el revestimiento de dispositivos médicos y el cuidado de la salud personal. Con la mayor aplicación de las Nanopartículas (NPs) en el contexto médico, es necesario tener una mejor comprensión de los mecanismos de las interacciones biológicas de las NPs y su potencial toxicidad, así como de las propiedades fisicoquímicas únicas de las NPs, como antibacterianas, antifúngicas, antivirales y actividad antiinflamatoria.¹³⁻²⁰

Durante muchos años, la plata ha sido reconocida por su actividad antimicrobiana contra bacterias grampositivas / negativas, hongos, protozoos, algunos virus y cepas resistentes a los antibióticos.

Las nanopartículas de plata (AgNPs) son materiales nanoestructurados cuya base son las sales de plata. Tiene diferentes aplicaciones biomédicas por su alto efecto antibacteriano, además de producir una nula toxicidad en los tejidos humanos cuando se utiliza en bajas concentraciones, por lo que es muy utilizado en áreas médicas, como materiales de recubrimiento, apósitos para heridas, cemento óseo, complementos alimenticios, catéteres, y en odontología, se utilizan en algunos materiales dentales, como pastas, cemento, adhesivos, resinas e implantes dentales.¹³⁻²⁰

Existen varios estudios informando los efectos antimicrobianos de las AgNPs sobre los materiales de odontológicos y de ortodoncia; específicamente en resinas y adhesivos de uso ortodóntico, sin embargo, no se ha estudiado la incorporación de nanopartículas de plata sobre brackets de ortodoncia para conocer el método más efectivo para la síntesis de AgNPs *in situ*, además de evaluar su efecto antimicrobiano frente a las principales cepas Gram positivas y Gram negativas, así como su resistencia al descementado, siendo los principales motivos para la realización de esta investigación.

Para realizar esta coagregación de AgNPs existen diferentes rutas que conducen a diferentes tamaños, formas, morfología e incluso estabilidad variable. Generalmente, estos métodos se pueden clasificar en tres categorías amplias: síntesis física, química y biológica (o ecológica).

Uno de los que ha resultado muy exitoso, efectivo y económico en la coagregación de nanopartículas de plata según sus resultados obtenidos es el método químico propuesto por Tanusheree Bala⁴¹, por lo cual decidió utilizarse en este estudio, revelando en los resultados en la mayoría de los grupos una agregación y

distribución homogénea en la superficie de los brackets aún cuando se incorporaron a materiales con distinta composición físico-química.

Los estudios tradicionales en la actualidad siguen siendo a través de medios de cultivo, considerándose de suma importancia como primeras evidencias o primeros hallazgos para comprobar la eficacia, los halos de inhibición han sido considerados por medio de la distancia milimétrica alrededor de la muestra, entre mas grande el halo inhibitorio formado mayor poder antibacterial, esto permitió obtener mediciones cuantitativas en este estudio, tomando en primera instancia ensayos con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; ya que son considerados específicamente como el gold standard más representativo de los microorganismos Gram+ y Gram- para determinar el efecto bactericida sobre ellos, obteniéndose halos de inhibición de 9 a 10 mm en promedio en todos los grupos evaluados con estas cepas, mientras que también disminuyó el recuento de colonias de todas las especies bacterianas, lo cual demuestra una alta eficacia bactericida de las AgNPs sobre las muestras experimentales observadas en comparación con los grupos control.⁴¹

Estos resultados son congruentes con lo reportado por Guadarrama Reyes⁴⁹ *et al.*, en su evaluación de hilos de sutura impregnados con AgNps, en el cual obtuvo halos de inhibición en promedio de 2.5mm para *E. coli* y *S. aureus* y de 5.0-7.4mm para *S. mutans* y *L. Casei*, de igual manera Hernandez-Gomora⁵⁰ *et al.*, reporto en módulos de ortodoncia impregnados con AgNps halos de inhibición de 2-3mm para *E. coli* y *S. aureus* y de 4-5mm para *S. mutans* y *L. casei*, estos resultados pueden ser atribuidos a los hallazgos de la granulometría de las nanopartículas obtenida en estos estudios siendo en promedio de 8-18nm, coincidiendo con lo reportado por Espinosa-Cristobal⁵¹ *et al* en su estudio probando dos tamaños de nanopartículas de plata a brackets metálicos y alambres de níquel-titanio, cobre-titanio y titanio obteniendo dos tamaños de 8 y 20nm ,respectivamente , siendo mas efectiva antibacterialmente la mas pequeña de ellas, así mismo en este estudio por medio de la microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) se

encontró una granulometría promedio de AgNPs de 4.44nm, y la forma de los AgNPs tendía a ser esférica, lo cual es muy relevante ya que como reporto García⁵² *et al.*, en su estudio previo, las AgNPs en rangos de tamaño de 1-20nm muestran una alta eficiencia en su efecto antimicrobiano para cepas Gram positivas y Gram negativas, mencionando que el tamaño pequeño de estas partículas facilita la penetración a través de las membranas celulares (inhibiendo la síntesis de ADN). Los estudios muestran que las cargas positivas de los iones metálicos son críticas para la actividad antibacteriana, permitiendo la acción electrostática entre la carga negativa de la membrana celular de las bacterias y la carga positiva de las nanopartículas.

Las moléculas de ADN se condensan y pierden su capacidad de replicación debido a una reacción que sigue al efecto de desnaturalización de los iones de plata. Además, los iones de plata interactúan con los grupos tiol de las proteínas, lo que induce la inactivación de las proteínas bacterianas ocasionando la muerte celular. Además, estas AgNPs pueden ser utilizadas por su baja toxicidad en tejidos humanos en bajas concentraciones, ya que estudios previos los reportaron como suficientes para obtener el efecto bactericida.⁵²

Por lo tanto, estos ensayos se llevaron a cabo mediante técnicas de cuantificación de marcadores radioactivos en cepas más específicas que están dentro de la cavidad bucal de la microbiota mas común que puede causar caries dental, siendo los mas acidúricos, acidófilos y acidogénicos el *Streptococcus mutans* y el *Streptococcus sobrinus*, ya que son unos de los principales causantes de los ácidos lácticos y propiónicos, pudiendo causar lesiones de mancha blanca, que son lesiones iniciales de la caries dental y son los principales formadores de la película inicial de coagregación bacteriana. Además, se usaron equipos y metodología ya comprobada en estudios previos por Hulsen⁴⁶ *et al.*, Saku *et al.*,⁴⁴ y Nagayama *et al.*,⁴⁵ siendo muy eficaz en la cuantificación bacteriana a través de radiomarcadores como el ³H y el ¹⁴C, usando la máquina automática de combustión de muestras y el dispositivo contador de centelleo líquido para medir ³H, así como los resultados

expresados y registrados en dpm. En este sentido, un valor más alto de dpm significa mayor radioactividad, por tanto, se encuentra una mayor adherencia de un microorganismo radiomarcado. Por el contrario, los valores más bajos de dpm indican una menor adherencia del microorganismo radiomarcado.

Como se menciona anteriormente resultó un hallazgo relevante el poder lograr esta agregación y distribución homogénea de las AgNPs sobre brackets ortodóncicos, en estudios previos se había logrado realizar solo en brackets estéticos por el mismo método de T. Bala⁴¹, sin embargo en este estudio con el mismo método se logró esta agregación en brackets estéticos (cerámicos y zafiro) y metálicos de diferente material de fabricación (acero inoxidable y Cromo-Cobalto), obteniendo en las pruebas de cultivo y radiomarcadores alta eficiencia bactericida que sugiere el que pueden ser muy útiles en evitar esa acumulación de la biopelícula en la conjunción bracket-arco-ligadura o bien en la base del bracket en la conjunción bracket-resina-diente y disminuir con ello el desarrollo de lesiones de mancha blanca y caries dental.

Es importante destacar que el bracket metálico con menor adherencia bacteriana para ambos microorganismos fue el del grupo GIIIIn (Gemini Roth), se sugiere que esto puede ser causado por varios factores. Primero, este grupo, en concreto, como se puede observar en las imágenes del SEM, presenta una superficie más lisa, con un mejor acabado, la superficie rugosa aumenta la superficie y los nichos, que son ambientes propicios para la adhesión bacteriana. Además, la literatura informa que las cargas positivas de los iones metálicos repelen las cargas negativas de la membrana bacteriana.⁵³ Esto podría deberse a la mayor coagregación de AgNPs por eso tiene el mayor potencial antibacteriano, y su importante reducción de la adhesión de microorganismos se ha convertido en una excelente opción para tratamientos de ortodoncia con una amplia posibilidad de evitar la caries dental y también el desarrollo de lesión de mancha blanca.

Estos datos son similares a los que reportó Moreira⁵⁴ *et al.*, en su estudio donde adhirió AgNPs a bandas de ortodoncia logrando una inhibición contra *S. mutans* de hasta 4 meses, así como también Espinosa-Cristobal⁵¹ *et al.*, logró adherir AgNPs con tamaño pequeño y distribución homogénea a brackets metálicos y alambres de ortodoncia de níquel-titanio, cobre-titanio y titanio logrando un excelente efecto antimicrobiano.

Así mismo, los brackets estéticos de cerámica tuvieron la mayor adherencia bacteriana para *S. mutans*, siendo el grupo GVI (3153,83 dpm) y los brackets metálicos de níquel-titanio, siendo el grupo GIX (8197,32 dpm) para *S. sobrinus*, esto probablemente pueda ser debido al tipo de enlaces entre el tipo de material y las bacterias; así como al terminado de la superficie del bracket.

Adicionalmente en otros estudios como el reportado por Velázquez-Enríquez⁹ *et al.*, realizado en resinas de prescripción ortodóntica comparando entre resinas para brackets metálicos y resinas para brackets estéticos; estas últimas han resultado con mayor coagregación bacteriana para *S. mutans* y *S. sobrinus*, siendo resultados congruentes a los obtenidos en este estudio para las mismas cepas, el bracket estético tiene más agregación bacteriana que el metálico así como también la resina para colocarlo, pudiendo representar este hallazgo un riesgo que el clínico debe considerar.

Las nanopartículas de plata no pueden ser tan favorecedoras para los brackets estéticos debido al cambio de coloración que sufren debido a la agregación de la Plata, por lo que los resultados de este estudio sugieren encontrar aquel agente de nanopartículas o alguna otra nanopartícula que no afecte el color de los brackets estéticos.

En general, la adherencia bacteriana tanto de *S. mutans* como de *S. sobrinus* fue significativamente mayor en los brackets de ortodoncia sin nanopartículas de plata, que para los que contenían las nanopartículas de plata. De igual manera, el nivel de

adhesión bacteriana a los materiales probados fue mayor para *S. sobrinus* que para *S. mutans*. Estos datos son consistentes a los mostrados por una serie de estudios que verifican la actividad antibacteriana de las nanopartículas, por ejemplo Alt *et al.*, ha demostrado que las nanopartículas de plata tienen actividad antibacteriana frente a bacterias multiresistentes, así como Ahn⁵⁵ y *cols.*, que descubrieron que un adhesivo compuesto experimental que contiene nanocargas de sílice y nanopartículas de plata puede ayudar a prevenir la desmineralización del esmalte alrededor de las superficies de los brackets sin comprometer las propiedades físicas.

Es importante mencionar que existen estudios que sugieren que el diseño metodológico para una evaluación bacteriana de materiales dentales debe realizarse emulando las condiciones reales, por lo que, debería emplearse saliva natural o artificial²⁸, sin embargo, otros estudios han descrito que el recubrimiento de saliva no modifica significativamente la adhesión de *S. mutans* y *S. sobrinus*, mostrando que la capa de saliva no altera significativamente la adhesión de *Streptococcus* en los materiales subyacentes.⁴⁸

Después de ser evaluado el efecto antibacterial de las muestras con nanopartículas de plata y sin nanopartículas de plata, se analizó la resistencia al descementado, ya que este aspecto en el área clínica también es de suma importancia durante el tratamiento de ortodoncia.

Es fundamental mencionar que en estudios similares sobre la adición de AgNPs a resinas y adhesivos de ortodoncia en los que se evaluó adicionalmente la resistencia al descementado como los realizados por Riad⁵⁷ *et al.*, Eslamian⁵⁸ *et al.*, y Degrazia⁵⁹ *et al.*, reportaron que la adición de estas AgNPs disminuyó efectivamente la carga bacteriana oral, pero tuvo efectos indeseables que afectaron sus propiedades físicas y consecuentemente disminuyeron la fuerza de adhesión al descementado. Sin embargo, no fue significativo ya que la mayoría de los grupos cumplieron con los parámetros reportados por Reynolds³⁵ *et al.*, el cual sugiere que

la fuerza mínima de adherencia para los brackets oscila en un rango entre 5.9 a 7.8 mpa, y debe cumplirse para obtener una resistencia adecuada al descementado en ortodoncia.

De manera similar a los presentes hallazgos, Reddy⁵⁹ *et al.*, incorporó 1% de AgNPs al adhesivo de ortodoncia (Transbond) e informó una reducción significativa en la fuerza de adhesión. Adición de 0.11%, 0.18% y 0.33% (p/p) de AgNPs, la imprimación adhesiva de ortodoncia (Transbond) se redujo de manera similar a la fuerza de adhesión del adhesivo experimental.⁵⁸

Así mismo existen algunos otros estudios *in vitro* que reportan que el efecto de la incorporación de AgNPs en adhesivos de ortodoncia no afecta significativamente la fuerza de adhesión.⁵⁹⁻⁶¹ Ahn y cols., informó que los adhesivos experimentales compuestos de 250 ppm y 500 ppm de AgNPs produjeron interesantes propiedades antibacterianas sin afectar adversamente la fuerza de adhesión.⁶⁰ Argueta⁶¹ *et al.*, en su estudio sobre la adición de nanopartículas de cobre como nanorelleno en adhesivos de ortodoncia, reporta un aumento en la fuerza de adhesión y un índice ARI con grupos significativamente diferentes.

Por otra parte, en estudios que incorporan AgNPs a otros aditamentos de ortodoncia han demostrado mejorar su propiedades físicas, como el realizado por Hernandez-Gomora⁵⁰ *et al.*, en módulos de ortodoncia, se observó que esta agregación de nanopartículas de plata inhibió considerablemente el crecimiento bacteriano y aumentó las propiedades físicas del módulo elastomérico para uso ortodóntico, así mismo, Moreira⁵⁴ *et al.*, incorporó los AgNPs en bandas de ortodoncia, informando que esta adición no afectó sus propiedades físicas, liberó plata hasta por 4 meses y disminuyó la carga bacteriana, de igual forma, Gil⁶² *et al.*, incorporó nanopartículas de plata en alambres para uso en ortodoncia, específicamente alambres de NiTi, reportando un efecto bactericida sobre las bacterias bucales y no afectando sus propiedades calorimétricas y mecánicas.

En este estudio pudimos observar que los brackets de acero inoxidable del grupo GVII reportó la mayor resistencia al descementado, en contraste con el grupo GIIIn siendo su grupo similar del mismo material de fabricación con la adición de nanopartículas de plata que presentó el nivel más bajo, no cumpliendo con los requisitos de fuerza de unión necesarios según Reynolds.³⁵

Es importante mencionar que los brackets metálicos de aleación de cromo-cobalto siendo el grupo GIVn con nanopartículas de plata y el grupo GIX sin nanopartículas de plata fueron el único caso de todos los grupos estudiados, en el que el grupo con nanopartículas de plata resultó en la mayor resistencia al descementado, por lo que se considera necesario realizar más estudios para conocer a que es debido y porque específicamente en este material para la fabricación de brackets de ortodoncia.

De igual manera Blöcher⁶³ y cols. examinaron el efecto de la adición de micropartículas de plata (0.1% y 0.3% (p / p) con tamaños de partículas de 3.5 a 18 μ m) y partículas de AgNP (0.11%, 0.18% y 0.33%(p / p) con tamaños de partículas de 12,6 a 18,5 nm) a la imprimación Transbond XT y no informó ningún efecto significativo en las puntuaciones de la fuerza de adhesión así como del ARI del adhesivo experimental a los incisivos bovinos. Es importante mencionar que el contraste con los resultados del presente estudio puede deberse a que el tipo de muestras utilizadas⁶³ o las concentraciones de las AgNPs fueron diferentes, en comparación con el presente estudio experimental.⁶⁰

Esta última parte de este estudio evaluó el comportamiento de su incorporación sobre el bracket respecto a su resistencia al descementado, ya que es uno de los aditamentos de la aparatología fija usada en ortodoncia más importante ya que ellos son los que imprimen el movimiento, siendo colocados sobre el diente y los que tienen mayor superficie.

Es importante resaltar la implementación de estudios posteriores para encontrar el tipo de nanopartícula que garantice efecto antibacterial, una adecuada fuerza de adhesión y evite la decoloración en brackets estéticos.

9. Conclusiones

-El método de agregación de AgNPs desarrollado por Bala permitió observar una síntesis efectiva y una distribución homogénea de las mismas sobre la superficie de los brackets de ortodoncia, así como un potente efecto antibacteriano logrando la formación de halos estables y bien definidos en las pruebas microbiológicas por contacto directo con cepas tanto Gram positivas como Gram negativas. De igual manera disminuyó la adhesión de *S. mutans* y *S. Sobrinus* a los brackets de ortodoncia, lo que demuestra sus propiedades antibacterianas.

-La síntesis de AgNPs mediante el método mencionado anteriormente demostró tener un gran potencial para el desarrollo de diversos productos médicos y dentales.

-La modificación de la superficie de los brackets de ortodoncia con nanopartículas de plata puede prevenir el desarrollo de placa dental y caries dentales durante el tratamiento de ortodoncia ayudando a reducir eficazmente la incidencia y prevalencia de lesiones de manchas blancas, sin embargo, es necesario realizar más investigaciones in vivo en pacientes tratados con ortodoncia.

-La incorporación de nanopartículas de plata disminuyó la resistencia al descemetado, sin embargo, la mayoría de los grupos cumplieron con los criterios necesarios para una adecuada resistencia al descemetado en ortodoncia.

-Es importante resaltar la implementación de estudios posteriores para encontrar el tipo de nanopartícula que garantice efecto antibacterial, una adecuada fuerza de adhesión y evite la decoloración en brackets estéticos.

10. Bibliografía utilizada

1. Papaioannou, W., Gizani, S., Nassika, M., Kontou, E., & Nakou, M. (2007). Adhesion of *Streptococcus mutans* to different types of brackets. *The Angle Orthodontist*, 77(6), 1090-1095.
2. Huang, R., Li, M., & Gregory, R. L. (2011). Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence* 2: 435–444.
3. Jurela, A., Repic, D., Pejda, S., Juric, H., Vidakovic, R., Matic, I., & Bosnjak, A. (2013). The effect of two different bracket types on the salivary levels of *S mutans* and *S sobrinus* in the early phase of orthodontic treatment. *The Angle Orthodontist*, 83(1), 140-145.
4. Karpiński, T. M., & Szkaradkiewicz, A. K. (2013). Microbiology of dental caries. *J Biol Earth Sci*, 3(1), M21-4.
5. The World Health Organization. Dental Caries (2012). [cited 14 June 2017]. Available from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>. (14 June 2017, date last accessed).
6. Øgaard, B., Rolla, G., & Øgaard, B. (2001). Oral microbiological changes, long-term enamel alterations due to decalcification, and caries prophylactic aspects. *Orthodontic Materials: Scientific and Clinical Aspects*. Stuttgart, Thieme, 123-142.

7. Borzabadi-Farahani, A., Borzabadi, E., & Lynch, E. (2014). Nanoparticles in orthodontics, a review of antimicrobial and anti-caries applications. *Acta Odontologica Scandinavica*, 72(6), 413-417.
8. Gorelick, L., Geiger, A. M., & Gwinnett, A. J. (1982). Incidence of white spot formation after bonding and banding. *American journal of orthodontics*, 81(2), 93-98.
9. Velazquez-Enriquez, U., Scougall-Vilchis, R. J., Contreras-Bulnes, R., Flores-Estrada, J., Uematsu, S., & Yamaguchi, R. (2012). Quantitative analysis of *S. mutans* and *S. sobrinus* cultivated independently and adhered to polished orthodontic composite resins. *Journal of Applied Oral Science*, 20, 544-549.
10. Eliades, T., Eliades, G., & Brantley, W. A. (1995). Microbial attachment on orthodontic appliances: I. Wettability and early pellicle formation on bracket materials. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 108(4), 351-360.
11. Fournier, A., Payant, L., & Bouclin, R. (1998). Adherence of *Streptococcus mutans* to orthodontic brackets. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 114(4), 414-417.
12. Gonzalez-Perez, J. C., Scougall-Vilchis, R. J., Contreras-Bulnes, R., De La Rosa-Gómez, I., Uematsu, S., & Yamaguchi, R. (2012). Adherence of *Streptococcus mutans* to orthodontic band cements. *Australian dental journal*, 57(4), 464-469.
13. Alexander, J. W. (2009). History of the medical use of silver. *Surgical infections*, 10(3), 289-292.

14. Shinonaga, Y., & Arita, K. (2012). Antibacterial effect of acrylic dental devices after surface modification by fluorine and silver dual-ion implantation. *Acta biomaterialia*, 8(3), 1388-1393.
15. Vlachou, E., Chipp, E., Shale, E., Wilson, Y. T., Papini, R., & Moiemmen, N. S. (2007). The safety of nanocrystalline silver dressings on burns: a study of systemic silver absorption. *Burns*, 33(8), 979-985.
16. Øgaard, B., Rølla, G., Arends, J., & Ten Cate, J. M. (1988). Orthodontic appliances and enamel demineralization Part 2. Prevention and treatment of lesions. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 94(2), 123-128.
17. Øgaard, B., Rezk-Lega, F., Ruben, J., & Arends, J. (1992). Cariostatic effect and fluoride release from a visible light-curing adhesive for bonding of orthodontic brackets. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*, 101(4), 303-307.
18. Metin-Gürsoy, G., Taner, L., & Akca, G. (2017). Nanosilver coated orthodontic brackets: in vivo antibacterial properties and ion release. *European journal of orthodontics*, 39(1), 9-16.
19. Ryu, H. S., Bae, I. H., Lee, K. G., Hwang, H. S., Lee, K. H., Koh, J. T., & Cho, J. H. (2012). Antibacterial effect of silver-platinum coating for orthodontic appliances. *The Angle Orthodontist*, 82(1), 151-157.
20. Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology advances*, 27(1), 76-83.

21. Gomez de Ferraris ME, Campos MA. Histología y embriología bucodental 2a Edic. Madrid. Edit. Medica Panamericana, pp. 273-297.
22. Orban-Sicher H. Histología y embriología bucal. 1ªEd. Mexico, D.F. Editorial La prensa medica mexicana. 1990, pp.39-50.
23. Babaahmady, K. G., Challacombe, S. J., Marsh, P. D., & Newman, H. N. (1998). Ecological study of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus* spp. at sub-sites from approximal dental plaque from children. *Caries research*, 32(1), 51-58.
24. Hamada, S., & Slade, H. D. (1980). Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological reviews*, 44(2), 331-384.
25. Robinson C, Kirklan I, Briggs H, Atkinson P. Enamel proteins from secretion to maturation. *J Dent Res* 1982; 61: 1490-1494
26. Årtun, J., & Brobakken, B. O. (1986). Prevalence of carious white spots after orthodontic treatment with multibonded appliances. *The European Journal of Orthodontics*, 8(4), 229-234.
27. Ahn, S. J., Lim, B. S., & Lee, S. J. (2010). Surface characteristics of orthodontic adhesives and effects on streptococcal adhesion. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 137(4), 489-495.
28. Ahn, S. J., Lee, S. J., Lim, B. S., & Nahm, D. S. (2007). Quantitative

- determination of adhesion patterns of cariogenic streptococci to various orthodontic brackets. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 132(6), 815-821.
29. Ábalos, C. (2005). Adhesión bacteriana a biomateriales. *Avances en Odontoestomatología*, 21(1), 347-353.
30. Available from <http://www.tportho.com.mx> (14 June 2017, date last accessed).
31. Available from <http://www.ormco.com.mx> (14 June 2017, date last accessed).
32. Lim, B. S., Lee, S. J., Lee, J. W., & Ahn, S.J. (2008). Quantitative analysis of adhesion of cariogenic streptococci to orthodontic raw materials. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 133(6), 882-888.
33. Buonocore, M. G. (1955). A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *Journal of dental research*, 34(6), 849-853.
34. Newman, G. V. (1965). Epoxy adhesives for orthodontic attachments: progress report. *American journal of orthodontics*, 51(12), 901-912.
35. Reynolds, I. R., & Von Fraunhofer, J. A. (1976). Direct bonding of orthodontic attachments to teeth: the relation of adhesive bond strength to gauze mesh size. *British Journal of Orthodontics*, 3(2), 91-95.
36. Sánchez Tito, M. A., & Kuong Gómez, N. (2017). Efecto del peróxido de hidrógeno al 40% sobre la fuerza de adhesión de brackets metálicos. *Revista Estomatológica Herediana*, 27(2), 81-87.

37. Rocha, J. M. D., Gravina, M. A., Campos, M. J. D. S., Quintão, C. C. A., Elias, C. N., & Vitral, R. W. F. (2014). Shear bond resistance and enamel surface comparison after the bonding and debonding of ceramic and metallic brackets. *Dental press journal of orthodontics*, 19, 77-85.
38. Bennett, C. G., Shen, C., & Waldron, J. M. (1984). The effects of debonding on the enamel surface. *Journal of clinical orthodontics: JCO*, 18(5), 330-334.
39. Bishara, S. E., Ostby, A. W., Laffoon, J. F., & Warren, J. (2007). Shear bond strength comparison of two adhesive systems following thermocycling: a new self-etch primer and a resin-modified glass ionomer. *The Angle Orthodontist*, 77(2), 337-341.
40. Årtun, J., & Bergland, S. (1984). Clinical trials with crystal growth conditioning as an alternative to acid-etch enamel pretreatment. *American journal of orthodontics*, 85(4), 333-340.
41. Bala, T., Armstrong, G., Laffir, F., & Thornton, R. (2011). Titania–silver and alumina–silver composite nanoparticles: novel, versatile synthesis, reaction mechanism and potential antimicrobial application. *Journal of colloid and interface science*, 356(2), 395-403.
42. Gold, O. G., Jordan, H. V., & Van Houte, J. (1973). A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Archives of Oral biology*, 18(11), 1357-1364.
43. Méndez-Serrano, J., Velazquez-Enriquez, U., Contreras-Bulnes, R., De La Rosa-Gómez, I., Sawada, T., & Yamaguchi, R. (2020). Adhesion of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* to silver nanoparticle-modified polymethylmethacrylate. *Interciencia*, 45(1), 23-27.

44. Saku, S., Kotake, H., Scougall-Vilchis, R. J., Ohashi, S., Hotta, M., Horiuchi, S., ... & Yamamoto, K. (2010). Antibacterial activity of composite resin with glass-ionomer filler particles. *Dental materials journal*, 29(2), 193-198.
45. Nagayama, M., Sato, M., Yamaguchi, R., Tokuda, C., & Takeuchi, H. (2001). Evaluation of co-aggregation among *Streptococcus mitis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. *Letters in applied microbiology*, 33(2), 122-125.
46. Hülsen, W. (1970). A completely automatic sample combustion device for the technic of measuring H-3 and C-14 in the liquid scintillation spectrometer. *Experientia*, 26(12), 1406-1407.
47. Vilchis, R. J. S., Yamamoto, S., Kitai, N., Hotta, M., & Yamamoto, K. (2007). Shear bond strength of a new fluoride-releasing orthodontic adhesive. *Dental Materials Journal*, 26(1), 45-51.
48. Scougall, R., Zàrate, C., Hotta, M., & Yamamoto, K. Efectos de un nuevo agente de autograbado en la resistencia al descementado de las brackets ortodónticas. *Rev Esp Ortod* 2008;38:207-212.
49. Guadarrama-Reyes, S. C., Scougall-Vilchis, R. J., Morales-Luckie, R. A., Sánchez-Mendieta, V., & López-Castañares, R. (2018). *Antimicrobial Effect of Silk and Catgut Suture Threads Coated with Biogenic Silver Nanoparticles*. IntechOpen.
50. Hernández-Gómora, A. E., Lara-Carrillo, E., Robles-Navarro, J. B., Scougall-Vilchis, R. J., Hernández-López, S., Medina-Solís, C. E., & Morales-Luckie, R. A. (2017). Biosynthesis of silver nanoparticles on orthodontic elastomeric modules: evaluation of mechanical and antibacterial properties. *Molecules*, 22(9), 1407.

51. Espinosa-Cristóbal, L. F., Martínez-Castañón, G. A., Martínez-Martínez, R. E., Loyola-Rodríguez, J. P., Patino-Marin, N., Reyes-Macias, J. F., & Ruiz, F. (2009). Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Materials Letters*, 63(29), 2603-2606.
52. García-Contreras, R., Argueta-Figueroa, L., Mejía-Rubalcava, C., Jiménez-Martínez, R., Cuevas-Guajardo, S., Sanchez-Reyna, P. A., & Mendieta-Zeron, H. (2011). Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *International dental journal*, 61(6), 297-301.
53. Anhoury, P., Nathanson, D., Hughes, C. V., Socransky, S., Feres, M., & Chou, L. L. (2002). Microbial profile on metallic and ceramic bracket materials. *The Angle Orthodontist*, 72(4), 338-343.
54. Moreira, D. M., Oei, J., Rawls, H. R., Wagner, J., Chu, L., Li, Y., ... & Whang, K. (2015). A novel antimicrobial orthodontic band cement with in situ-generated silver nanoparticles. *The Angle Orthodontist*, 85(2), 175-183.
55. Ahn, S. J., Kho, H. S., Lee, S. W., & Nahm, D. S. (2002). Roles of salivary proteins in the adherence of oral streptococci to various orthodontic brackets. *Journal of dental research*, 81(6), 411-415
56. Riad, M., Harhash, A. Y., Elhiny, O. A., & Salem, G. A. (2015). Evaluation of the shear bond strength of orthodontic adhesive system containing antimicrobial silver nano particles on bonding of metal brackets to enamel. *Life Sci J*, 12(12), 27-34.
57. Eslamian, L., Borzabadi-Farahani, A., Karimi, S., Saadat, S., & Badiie, M. R. (2020). Evaluation of the shear bond strength and antibacterial activity of

orthodontic adhesive containing silver nanoparticle, an in-vitro study. *Nanomaterials*, 10(8), 1466.

58. Degrazia, F. W., Leitune, V. C. B., Garcia, I. M., Arthur, R. A., Samuel, S. M. W., & Collares, F. M. (2016). Effect of silver nanoparticles on the physicochemical and antimicrobial properties of an orthodontic adhesive. *Journal of Applied Oral Science*, 24, 404-410.
59. Reddy, A. K., Kambalyal, P. B., Patil, S. R., Vankhre, M., Khan, M. Y. A., & Kumar, T. R. (2016). Comparative evaluation and influence on shear bond strength of incorporating silver, zinc oxide, and titanium dioxide nanoparticles in orthodontic adhesive. *Journal of orthodontic science*, 5(4), 127.
60. Ahn, S. J., Lee, S. J., Kook, J. K., & Lim, B. S. (2009). Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dental Materials*, 25(2), 206-213.
61. Argueta-Figueroa, L., Scougall-Vilchis, R. J., Morales-Luckie, R. A., & Olea-Mejia, O. F. (2015). An evaluation of the antibacterial properties and shear bond strength of copper nanoparticles as a nanofiller in orthodontic adhesive. *Australian orthodontic journal*, 31(1), 42-48.
62. Gil, F. J., Espinar-Escalona, E., Clusellas, N., Fernandez-Bozal, J., Artes-Ribas, M., & Puigdollers, A. (2020). New bactericide orthodontic archwire: NiTi with silver nanoparticles. *Metals*, 10(6), 702.
63. Blöcher, S., Frankenberger, R., Hellak, A., Schauseil, M., Roggendorf, M. J., & Korbmacher-Steiner, H. M. (2015). Effect on enamel shear bond strength of adding microsilver and nanosilver particles to the primer of an orthodontic adhesive. *BMC oral health*, 15(1), 1-9.

11. Anexos

- Estancia Doctoral

- Participación en evento