



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

PROPIEDADES BIOLÓGICAS Y
MECÁNICAS DE UN CEMENTO
ORTODÓNTICO MODIFICADO CON
NANOPARTÍCULAS DE PLATA PARA
LA PREVENCIÓN DE LESIONES DE
MANCHA BLANCA - ESTUDIO IN
VITRO

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN ESTOMATOLOGÍA

MARCO ANTONIO SANCHEZ TITO

LIMA – PERÚ

2022

ASESORA

Dra. Lidia Yileng Tay Chu Jon

Departamento Académico de Clínica Estomatológica - UPCH

JURADO DE TESIS

Dra. Marisol Castilla Camacho

PRESIDENTE

Dr. Jorge Luis Castillo Cevallos

VOCAL

Dr. Manuel Oscar Lagraverre Vich

VOCAL

Dra. Rosa Ana Melgar Hermoza

SECRETARIO

DEDICATORIA

A la memoria de mis padres, Margarita y Florencio por su esfuerzo, perseverancia y el no doblegarse ante las dificultades, les estaré eternamente agradecido.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lidia Yileng Tay Chu Jon, por su constante apoyo durante todo los años del doctorado.

A Vanessa Montoya Samanés por su colaboración en la realización de esta investigación.

A Copérnico, Calliope y Maximiliano por su incondicional compañía.

FUENTE DE FINANCIAMIENTO

Fondo de Apoyo a la Investigación Facultades de Medicina, de Estomatología y de Enfermería – UPCH, 2019.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

	Pág.
I. Introducción	1
II. Objetivos	5
III. Materiales y métodos	6
IV. Resultados	23
V. Discusión	35
VI. Conclusiones	49
VII. Recomendaciones	50
VIII. Referencias bibliográficas	51
IX. Anexos	

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Materiales empleados para la preparación de la resina modificada.	7
Tabla 2. Evaluación del cambio de color (ΔE_{00}) del esmalte expuesto a los cementos experimentales con diferentes concentraciones de NPsAg luego de seis meses de almacenamiento.	25
Tabla 3. Cambios de L^* , a^* y b^* del esmalte expuesto a los cementos experimentales con diferentes concentraciones de NPsAg luego de seis meses de almacenamiento.	26
Tabla 4. Comparación de la Resistencia al cizallamiento de brackets adheridos con cementos experimentales con diferentes concentraciones de NPsAg (MPa).	27
Tabla 5. Comparación del Índice Remanente Adhesivo (IRA) para las muestras con brackets adheridos con cementos con diferentes concentraciones de NPsAg.	29
Tabla 6. Comparación de la área inicial y la zona de desmineralización del esmalte (mm^2) para las muestras donde se empleó un cemento ortodóntico con diferentes concentraciones de NPsAg.	30
Tabla 7. Áreas de prevención de la desmineralización del esmalte (mm^2) para las muestras donde se empleó un cemento ortodóntico con diferentes concentraciones de NPsAg.	31

Tabla 8.	Comparación de la cantidad relativa (%) del ion fosfato en las muestras donde se empleó un cemento ortodóntico con diferentes concentraciones de NPsAg.	32
Tabla 9.	Profundidad de la zona de desmineralización entre los grupos donde se empleó un cemento ortodóntico con diferentes concentraciones de NPsAg (μm).	34

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1. Zonas de inhibición por las concentraciones de NPsAg. Prueba ANOVA seguida de prueba post hoc de Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas.	23
Gráfico 2. Unidades formadoras de colonias (Log UFC/mL) de <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Lactobacillus acidophilus</i> .	24
Gráfico 3. Frecuencia y distribución de las puntuaciones del Índice Remanente Adhesivo (IRA) para las muestras con diferentes concentraciones de NPsAg.	28
Gráfico 4. Variación de intensidad relativa del pico 961 cm ⁻¹ del ion fosfato entre los grupos donde se empleó un cemento ortodóntico con diferentes concentraciones de NPsAg.	33

LISTA DE ABREVIATURAS

LMB	:	Lesión de mancha blanca
NPsAg	:	Nanopartículas de plata
BHI	:	Infusión cerebro-corazón
BHA	:	Agar cerebro-Corazón
MRS	:	Medio de cultivo Man, Rogosa y Sharpe
ATCC	:	American Type Culture Collection
<i>S. mutans</i>	:	<i>Streptococcus mutans</i>
<i>L. acidophilus</i>	:	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
ΔE_{00}	:	CIEDE2000
MPa	:	Megapascal
IRA	:	Índice remanente adhesivo
CPP-ACPF	:	Fosfato de calcio amorfo asociado a flúor

RESUMEN

Objetivo: Evaluar las propiedades biológicas y mecánicas de un cemento ortodóntico modificado con nanopartículas de plata y su efecto preventivo en la formación de lesiones de mancha blanca.

Material y métodos: Se empleó un cemento ortodóntico modificado con 0.05%, 0.1%, 0.5% y 1% de NPsAg (p/p). La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método de difusión en agar y por conteo de UFC transformadas a log UFC/mL empleando cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. La evaluación del cambio del color del esmalte de las muestras luego de seis meses de almacenaje se calculó empleando la fórmula CIEDE2000 (ΔE_{00}). La prueba de resistencia al cizallamiento se realizó en una máquina universal de ensayos con una velocidad del cabezal de 1 mm/min, los datos fueron registrados en MPa. El patrón de falla de adhesión se evaluó mediante el índice remanente adhesivo. Se realizó una inducción microbiológica de formación de lesiones de mancha blanca sobre la superficie del esmalte. Los dientes fueron fotografiados de manera estandarizada y las áreas de formación de las lesiones (mm²) se calcularon con el programa Image J. Las muestras fueron seccionadas transversalmente y se midió la cantidad relativa de iones fosfatos (PO₄³⁻) a 960 cm⁻¹ empleando un sistema de microscopía Raman confocal con un modo de adquisición lineal de 136 µm, con mediciones cada 5 µm en la zona de la lesión. La longitud de las lesiones de mancha blanca se midieron a partir de las microfotografías con el programa Image J.

Resultados: Los grupos con 0.5% y 1% promovieron la formación de zonas de inhibición para *S. mutans* y fueron significativas respecto a los otros grupos ($p < 0.05$). No se observaron diferencias significativas para *L. acidophilus* ($p > 0.05$). Todos los cementos experimentales mostraron una menor formación de UFC que el cemento convencional para *S. mutans* y *L. acidophilus* ($p < 0.05$). El mayor cambio de color fue observado en el grupo con 1% de NPsAg (8.04 ± 1.48); sin embargo, no hubieron diferencias significativas cuando se realizó una comparación múltiple con los grupos de 0.5% y 0.1% de NPsAg ($p > 0.05$). La incorporación de las NPsAg en el cemento ortodóntico disminuyó la resistencia al cizallamiento en todos los grupos. No se observaron diferencias significativas en la reducción de la resistencia al cizallamiento entre los grupos con concentraciones de 1%, 0.5% y 0.1% de NPsAg ($p > 0.05$). Las puntuaciones del IRA en el grupo con 1% de NPsAg fueron principalmente valores de 0 y 1. Todos los grupos donde se usaron los cementos con las NPsAg presentaron una menor área de desmineralización que el grupo control ($p < 0.05$). El grupo de 1% de NPsAg promovió la mayor prevención de formación de LMB ($3.21 \pm 0.56 \text{ mm}^2$). En las muestras del grupo de 1% de NPsAg, la cantidad relativa de iones fosfato (PO_4^{3-}) se mantuvo cercana al 70.41% respecto a los valores medidos en el esmalte sano.

Conclusión: La incorporación de 0.5% y 1% de NPsAg en el cemento ortodóntico provee importante actividad antibacteriana. Las concentraciones mayores a 0.1% de NPsAg afectan el color del esmalte. A mayor concentración de NPsAg mayor la disminución de la resistencia al cizallamiento, con un patrón de falla principalmente en la interfase resina-esmalte. La concentración de 1% de NPsAg promovió mayor

prevención de formación de LMB y presentó un potencial de mantener la cantidad de iones fosfato (PO_4^{3-}) cercana a los valores medidos en el esmalte sano.

Palabras clave: Lesiones de manchas blancas, esmalte dental, antibacterianos, nanopartículas de plata, prevención & control.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the biological and mechanical properties of an orthodontic cement modified with silver nanoparticles and its preventive effect on the formation of white spot lesions.

Material and methods: An orthodontic cement modified with 0.05%, 0.1%, 0.5% and 1% NPsAg (w/w) was used. The antibacterial activity was evaluated by the agar diffusion method and by counting transformed CFUs at log CFU/mL using *Streptococcus mutans* ATCC 25175 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 strains. The evaluation of the color change of the enamel after six months of storage was calculated using the CIEDE2000 formula (ΔE_{00}). Shear bond strength testing was performed on a universal testing machine with a head speed of 1 mm/min, data was recorded in MPa. The pattern of adhesion failure was evaluated by the adhesive remnant index. A microbiological induction of white spot lesion formation was performed on the enamel surface. The teeth were photographed in a standardized way and the areas of lesion formation (mm²) were calculated with the Image J program. The samples were cross-sectioned and the relative amount of phosphate ions (PO₄³⁻) was measured at 960 cm⁻¹ using a confocal Raman microscopy system with a linear acquisition mode of 136 μm, with measurements every 5 μm in the area of the lesion. The length of the white spot lesions was measured from the photomicrographs with the Image J program.

Results: The groups with 0.5% and 1% promoted the formation of inhibition zones for *S. mutans* and were significant compared to the other groups ($p < 0.05$). No significant differences were observed for *L. acidophilus* ($p > 0.05$). All the modified

cements showed lower CFU formation than the conventional cement for *S. mutans* and *L. acidophilus* ($p < 0.05$). The greatest color change was observed in the group with 1% NPsAg (8.04 ± 1.48); however, there were no significant differences when multiple comparison was made with the 0.5% and 0.1% NPsAg groups ($p > 0.05$). The incorporation of the NPsAg in the orthodontic cement decreased the shear bond strength in all groups. No significant differences were observed in the shear bond strength reduction between the groups with concentrations of 1%, 0.5% and 0.1% of NPsAg ($p > 0.05$). The ARI scores in the group with 1% NPsAg were mainly values of 0 and 1. All the groups where the modified cements with NPsAg were used presented a smaller area of demineralization than the control group ($p < 0.05$). The 1% NPsAg group promoted the greatest prevention of LMB formation ($3.21 \pm 0.56 \text{ mm}^2$). In the samples of the 1% AgNP group, the relative amount of phosphate ions (PO_4^{3-}) remained close to 70.41% compared to the values measured in healthy enamel.

Conclusion: The incorporation of 0.5% and 1% of NPsAg in an orthodontic cement provides important antibacterial activity. Concentrations greater than 0.1% of NPsAg affect the color of the enamel. The higher the concentration of NPsAg, the greater the decrease in shear bond strength, with a failure pattern mainly at the resin-enamel interface. The 1% concentration of NPsAg promoted greater prevention of WSL formation and had the potential to maintain the amount of phosphate ions (PO_4^{3-}) close to the values measured in healthy enamel.

Keywords: White spot lesions, dental enamel, anti-bacterial agents, silver nanoparticles, prevention & control.

I. INTRODUCCIÓN

La complicación más común en el tratamiento de ortodoncia con aparatos fijos es la alta prevalencia de desmineralización del esmalte causado por la acumulación de *biofilm* bacteriano alrededor de los brackets, particularmente en la región cervical, que puede alcanzar hasta el 70% de los pacientes ortodónticos ^(1,2). La pobre higiene oral puede incrementar la colonización de bacterias como *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*, reduciendo los valores de pH a niveles críticos menores a 5.5. Consecuentemente se promueve el proceso de desmineralización, llevando al desarrollo de lesiones de mancha blanca (LMB) ⁽³⁾. En condiciones de pobre higiene oral, las LMB pueden aparecer tan pronto como luego de un mes de la instalación de la aparatología ortodóntica, comprometiendo la estética del paciente ^(3,4).

Una apropiada higiene oral es el procedimiento preventivo más importante para reducir el riesgo de formación de LMB, sin embargo se sabe que existe una deficiencia en gran parte de los pacientes en seguir las recomendaciones e instrucciones relacionadas a la higiene oral y control de formación del *biofilm*, brindadas por el odontólogo ⁽⁵⁾. Otras estrategias preventivas incluyen la aplicación tópica de barniz de flúor y la incorporación de agentes antibacterianos en enjuagues bucales y pastas dentales; sin embargo, estas estrategias dependen directamente de la colaboración del paciente ^(6,7). Con la intención de lidiar con este aspecto, se ha propuesto la adición de componentes antibacterianos en los materiales empleados para la adhesión de los brackets como las resinas y *primers*. Esta estrategia se enfoca en el mínimo requerimiento de colaboración por parte del paciente ⁽⁸⁾.

Estos compuestos antibacterianos incluyen el uso de cloruro de benzalconio, sales de amonio cuaternario, nanopartículas sintetizadas a partir de la plata, óxido de zinc, óxido de cobre, dióxido de titanio, nanopartículas derivadas de productos naturales, entre otros ⁽⁹⁻¹⁴⁾.

El uso de nanopartículas metálicas se ha propuesto como un recurso importante para combatir la formación del *biofilm* bacteriano. Su efectividad antibacteriana se ha relacionado a la interacción con la membrana de la bacteria debido a su tamaño y la alta relación entre la superficie-volumen de las nanopartículas ⁽¹⁵⁾, y no solo a la liberación de los iones metálicos. Además, las bacterias han mostrado ser menos susceptibles al desarrollo de resistencia a las nanopartículas metálicas que a otros agentes antibacterianos ^(16,17).

Las nanopartículas de plata (NPsAg) han sido usadas debido a sus propiedades antibacterianas y baja toxicidad a las células humanas. El mecanismo exacto de la actividad antibacteriana de las NPsAg no se ha clarificado del todo, se ha descrito que la carga positiva de los iones de Ag^+ liberados por las NPsAg generan una atracción con la carga negativa de la superficie de la bacteria, lo que afectaría los componentes de la pared celular y de la membrana citoplasmática ^(17,18). Adicionalmente, las NPsAg y sus iones pueden ingresar al citoplasma y producir una desestabilización de las organelas, principalmente los ribosomas, inactivando la producción de ATP; las NPsAg pueden afectar las propiedades de replicación del ADN bacteriano, consecuentemente llevando a la muerte celular ⁽¹⁸⁾.

Estudios previos han mostrado que la incorporación de NPsAg en un cemento ortodóntico genera un importante efecto antibacteriano, inhibiendo el crecimiento de *S. mutans* en modelos *in vitro* ^(11,12,19). Sin embargo, a nuestro entender, su efecto preventivo frente a la formación de las lesiones de mancha blanca no ha sido previamente reportado.

A pesar de las importantes propiedades antibacterianas de las NPsAg, algunos autores han observado que su adición en los cementos o materiales ortodónticos podrían estar asociados a la reducción de sus propiedades mecánicas; principalmente sobre la reducción de fuerza de adhesión necesaria para mantener los brackets adheridos a la superficie del esmalte. Sin embargo, aún existen resultados contradictorios respecto a este punto. Algunos de los factores que podrían contribuir a esta disparidad en los hallazgos reportados, son la concentración y tamaño de las NPsAg agregadas en la matriz de la resina. Al respecto, Reddy *et al.* ⁽²⁰⁾ encontraron que la adición de 1% de NPsAg en un cemento ortodóntico reduce la fuerza de adhesión comparada con un cemento sin modificar. Eslamian *et al.* ⁽¹⁹⁾ sugiere que la fuerza de adhesión de un cemento ortodóntico disminuyó luego de la incorporación de 0.3% de NPsAg, aunque los valores de resistencia al cizallamiento permanecieron por encima de los valores mínimos recomendados en la literatura. Por otro lado, akhavan *et al.* ⁽²¹⁾ mostraron que la adición de una combinación de NPsAg con hidroxiapatita a concentraciones de 5% y 1% en un adhesivo ortodóntico se mantuvo y aumentó, respectivamente.

Materiales dentales que contienen iones de plata son efectivos para la prevención de la formación de caries ^(22,23); sin embargo, cuando estos iones se liberan, son reducidos, se agregan, precipitan y penetran la superficie del esmalte hasta 25 µm, resultando en la formación de manchas oscuras, ocasionando problemas estéticos ^(24,25). Aunque la incorporación de NPsAg ha mostrado importantes efectos antimicrobianos contra bacterias promotoras de las lesiones de caries, existe poca información relacionada sobre el efecto pigmentante de los cementos ortodónticos modificados con NPsAg sobre el esmalte dentario.

El propósito de esta investigación fue evaluar las propiedades biológicas, mecánicas y el efecto preventivo en la formación de lesiones de mancha blanca de un cemento ortodóntico modificado con distintas concentraciones de nanopartículas de plata en un modelo *in vitro*.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar las propiedades biológicas y mecánicas de un cemento ortodóntico modificado con nanopartículas de plata y su efecto preventivo en la formación de lesiones de mancha blanca.

Objetivos específicos

1. Determinar la actividad antibacteriana de un cemento ortodóntico modificado con distintas concentraciones de nanopartículas de plata sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*.
2. Evaluar el efecto del uso de un cemento ortodóntico modificado con distintas concentraciones de nanopartículas de plata sobre el cambio de color del esmalte.
3. Evaluar la resistencia al cizallamiento y el índice remanente adhesivo de un cemento ortodóntico modificado con nanopartículas de plata.
4. Evaluar el efecto preventivo de un cemento ortodóntico modificado con distintas concentraciones de nanopartículas de plata sobre la formación de lesiones de mancha blanca.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se realizó una investigación experimental *in vitro*, prospectiva, analítica y comparativa.

Técnicas y/o procedimientos

Preparación del cemento ortodóntico experimental

Para la obtención del cemento ortodóntico experimental, se empleó un cemento ortodóntico fotopolimerizable (Transbond XT; 3M Unitek, Monrovia, California, USA) que se mezcló con nanopartículas de plata (US Research Nanomaterials, Inc. Houston, TX) en concentraciones de 0.05%, 0.1%, 0.5% y 1% (p/p). El detalle de los materiales se puede observar en la Tabla 1. La preparación del cemento modificado se realizó en un ambiente oscuro, usando una espátula plástica y una platina de vidrio ⁽¹¹⁾. Para obtener las diferentes concentraciones de nanopartículas de plata, en 3 g de cemento, se utilizó 0.03 g de NPsAg para 1%, 0.015 de NPsAg para 0.5%, 0.003 g de NPsAg para 0.1% y 0.0015 de NPsAg para 0.05%, la mezcla se realizó por 2 minutos para asegurar la distribución homogénea de las nanopartículas. Las cantidades de nanopartículas requeridas fueron pesadas en una balanza analítica de precisión (Entris 124-1S, Satorious Lab Instruments GmbH & Co. KG). Los cementos modificados fueron almacenados en jeringas negras estériles con el fin de prevenir la transmisión de luz.

Tabla 1. Materiales empleados para la preparación de la resina modificada.

Material	Tipo de material	Composición	Nro. Lot.
Transbond XT (3M Unitek, Monrovia, CA, USA)	Pasta adhesiva fotocurable	Cuarzo tratado con silano, bisfenol A diglicidil éter dimetacrilato, bisfenol A bis (2-hidroxietil éter) dimetacrilato, sílice tratada con silano, hexafluorofosfato de difenilodonio	N976370
Nanopartículas de plata (US Research Nanomaterials, Inc. Houston, TX, USA)	Nano-polvo	Tamaño promedio de las partículas: 20 nm, pureza: 99.99%, base metálica.	Stock#: US1038 CAS#: 7440-22-4

Evaluación de la actividad antibacteriana

Confección de discos de prueba

Se confeccionaron 96 discos de 5 mm de diámetro y 2 de grosor a partir de los cementos modificados con las concentraciones de NPsAg, siendo un total de 24 discos por grupo. Adicionalmente, se prepararon 24 discos con el cemento sin modificar que sirvieron como control. Los discos se prepararon agregando el cemento en un molde plástico que fue cubierto con una tira de acetato y fotopolimerizado por 20 s por cada lado, empleando una unidad Led (Elipar

DeepCure-L, 3M St. Paul, MN, USA). Los discos fueron removidos del molde y los excesos fueron pulidos con discos Sof-Lex™ (3M ESPE, St. Paul, USA). Finalmente, los discos fueron esterilizados con irradiación ultravioleta C (UVC) en una cámara de flujo laminar.

Suspensiones bacterianas

Para el ensayo microbiológico se emplearon cepas de *Streptococcus mutans* ATCC® 25175™ y *Lactobacillus acidophilus* ATCC® 4356™ (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). *S. mutans* fue cultivado en caldo cerebro-corazón (BHI) e incubado a 37 °C en condiciones de microaerofilia (Gaspak™ EZ Campy Container System) por 7 horas hasta alcanzar la fase logarítmica. Posteriormente, una alícuota del medio fue transferido a un tubo que contenía suero fisiológico y se ajustó la turbidez a una escala 0.5 de McFarland ⁽⁸⁾. Para *L. acidophilus*, se empleó caldo de Man, Rogosa y Shape (MRS). Los medios de crecimiento bacteriano fueron adquiridos de Liofilchem®.

Ensayo de difusión en agar

Para el ensayo de inhibición de crecimiento bacteriano, 50 µL de la suspensión de *S. mutans* se vertió en ocho placas Petri que contenían agar cerebro-corazón (BHA), la suspensión fue esparcida por método del hisopado. Las placas se dejaron reposar por 10 minutos y se colocó un disco de resina de cada concentración de NPsAg y del control, con una distancia de 2 cm entre ellos (se emplearon un total de 40 discos). Las placas fueron incubadas a 37 °C en condiciones de microaerofilia por 48 horas. Posteriormente, los halos de inhibición de crecimiento bacteriano, se midieron con un compás Vernier digital (Ubermann©, Chile) ⁽⁸⁾. Los

procedimientos se repitieron para *L. acidophilus* empleando agar MRS como medio de cultivo.

Unidades formadoras de colonias

Para el análisis de las unidades formadoras de colonias (UFC), 200 µL de BHI enriquecida con 1% de sucrosa y 15 µL de suspensión de *S. mutans* ajustado a una escala de 0.5 de McFarland se vertieron en los pozos de una microplaca de 96 pozos (columnas: 1, 3, 5 y 7; y filas: A, C, E y G). En la columna 12, se vertieron 200 µL de BHI sin suspensión bacteriana (control negativo). Un disco de cada cemento modificado y sin modificar (n = 20) se colocó en los pozos y la placa fue incubada a 37 °C en condiciones de microaerofilia por 24 horas. Posteriormente, se realizó una dilución de 10^{-6} con 100 µL de la suspensión de cada pozo con 900 µL de solución salina. 50 µL de la dilución final se vertieron en placas Petri conteniendo BHA y fueron esparcidas con un hisopo. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 48 horas. El número de UFC fueron contadas y transformadas a log UFC por mililitro (log UFC/mL) ⁽²⁶⁾. Los mismos procedimientos fueron realizados para *L. acidophilus*, empleando como medio de cultivo MRS.

Evaluación del cambio de color del esmalte

Tamaño de la muestra

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó en el programa G*power 3.1, empleando la comparación de múltiples medias de un estudio previo ⁽²⁷⁾, donde se evaluó el efecto pigmentante de la adición de NPsAg en un material dentario. Se

adoptó un tamaño del efecto de 2.25, un error del 5% y un poder del 90%. Se obtuvo un tamaño de muestra de 25. Se emplearon 25 dientes premolares inferiores, divididos aleatoriamente en 5 grupos ($n = 5$) empleando el programa Research Randomizer Form 4.0 (Social Psychology Network, Middletown, CT, USA); según el cemento ortodóntico modificado con 0.05%, 0.1%, 0.5% y 1% de NPsAg y un grupo control.

Preparación de los especímenes

Los dientes fueron pulidos por 30 s y lavados con agua destilada. Los brackets fueron adheridos en el centro de la corona clínica ⁽²⁸⁾. Se aplicó ácido fosfórico al 37% por 30 s para el grabado del esmalte (Unitek Etching Gel, 3M, Monrovia, CA, USA), los dientes fueron lavados con agua corriente por 1 min y secados con aire libre de aceite ⁽¹⁰⁾⁽²⁸⁾. Se aplicó *primer* (Transbond XT Primer; 3M Unitek, Monrovia, CA, USA) y fue polimerizado por 20 s (Elipar DeepCure-L unit; 3M, Monrovia, CA, USA) a una longitud de onda de 450 nm y 1470 mw/cm². Se emplearon brackets ortodónticos (Gemini, 3M Unitek, Monrovia, CA, USA) aplicando una fuerza constante de 250 grf por 20 s para estandarizar el grosor de la resina ⁽²⁹⁾. Los excesos del cemento fueron removidos y las muestras fueron polimerizadas por 20 s por cada lado. Todas las muestras fueron almacenadas de manera individual a 37 °C ⁽¹⁰⁾ por 6 meses en tubos FalcomTM conteniendo 10 mL de agua deionizada, que fue renovada cada semana.

Retiro de los brackets

Después del tiempo de almacenamiento, los brackets fueron cuidadosamente removidos con una alicate ortodóntico (Ormco, Glendora, CA, USA). La resina remanente de la superficie del esmalte fue removida con una hoja de bisturí nro 15 (Aesculap®, Braun VetCare). Para asegurar una superficie de esmalte libre de cemento, se empleó una fresa ortodóntica de zirconia de ocho láminas (Dental Morelli, Sorocaba, SP, Brasil) por 60 segundos con presión moderada, empleando un micromotor con refrigeración abundante.

Medición del color

Los dientes fueron mantenidos en un ambiente húmedo antes de iniciar la medición del color, para evitar su alteración. La medición de color fue realizada empleando un espectrofotómetro (EasyShade V, Vita Zahnfabrik, Bad Säckingen, Alemania) previamente al procedimiento de adhesión de los brackets (T1) y luego de la remoción de los brackets (T2). Se realizaron tres mediciones para cada muestra en cada tiempo. Para asegurar la reproducibilidad de las mediciones y el correcto posicionamiento de la punta del espectrofotómetro, se empleó una matriz de silicona (Zetaplus, Zhermack SpA, Italia). Previo a la toma de color, el espectrofotómetro fue calibrado de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Los datos fueron recolectados empleando el sistema CIE: L^* , a^* y b^* . El cambio de color de T1 y T2 fue calculado empleando la fórmula CIEDE2000 (ΔE_{00}), que emplea los valores h (matiz) y C (Chroma) ⁽³⁰⁾. En este estudio los valores paramétricos K_L , K_C y K_H fueron ajustados a 1 ⁽³¹⁾⁽³²⁾. El cambio de color fue considerado clínicamente inaceptable cuando los valores fueron mayores a 3.7

unidades, de acuerdo a estudios previos ^(31,32). La fórmula empleada para el cálculo del cambio de color fue la siguiente ⁽³³⁾:

$$\Delta E_{00} = \sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{K_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{K_C S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta L'}{K_H S_H}\right)^2 + R_T \left(\frac{\Delta C'}{k_C S_C}\right) \left(\frac{\Delta C'}{k_C S_C}\right)}$$

Adicionalmente se analizaron los cambios en las coordenadas: L^* , a^* y b^* , de manera independiente para evaluar el comportamiento del espacio de color según la luminosidad, los valores de rojo a verde y de amarillo a azul, respectivamente.

Evaluación de la resistencia al cizallamiento

Tamaño de la muestra

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó con el programa G*power a través de la prueba ANOVA de efectos fijos, empleando un tamaño del efecto de 0.53, un error de probabilidad alpha de 0.05 y un poder del 80%. Se calculó un total de 50 muestras. Empleándose 50 premolares superiores sanos extraídos por motivos ortodónticos. Los dientes fueron divididos de manera aleatoria en 5 grupos (n=10) empleando el programa Research Randomizer Form 4.0 (Social Psychology Network, Middletown, CT, USA).

Preparación de los especímenes

Los dientes fueron embebidos en cilindros de PVC (15 mm de diámetro interno x 20 mm de altura) conteniendo resina autocurable (VIPI®, Pirassununga, SP,

Brasil), teniendo cuidado de que la superficie bucal de los dientes esté perpendicular a la base del cilindro y que la unión amelocementaria esté a 2 mm por encima de la resina acrílica. Los dientes fueron limpiados por 20 s con una pasta profiláctica con una copa de pulido a baja velocidad. La superficie del esmalte fue grabada con ácido fosfórico a 37% (Unitek Etching Gel, 3M, Monrovia, CA, USA) por 30 segundos ⁽¹⁴⁾⁽³⁴⁾. Los dientes fueron lavados por 60 segundos y secados con aire comprimido libre de aceite. Los especímenes fueron divididos aleatoriamente en 5 grupos (n = 10) de acuerdo a las concentraciones de la resina modificada, incluyendo el grupo control.

Se aplicó primer (Transbond XT Primer; 3M Unitek, Monrovia, CA, USA) sobre la superficie del esmalte y se fotopolimerizó por 20 s (Elipar DeepCure-L unit; 3M Unitek, Monrovia, CA, USA). Se emplearon brackets metálicos (Gemini, 3M Unitek, Monrovia, CA, USA). Para la adhesión de los brackets se emplearon los cementos modificados con NPsAg en las concentraciones de 0.05%, 0.1%, 0.5% y 1%. Los brackets fueron posicionados paralelos al eje largo del diente y a 4 mm de la cúspide vestibular. Se aplicó una fuerza constante 250 grf con un dinamómetro por 20 s para asegurar un espesor uniforme de la resina ⁽¹⁰⁾. Los excesos del cemento fueron removidos y se fotopolimerizaron por 40 s (10 s por cada lado del bracket) ⁽³⁴⁾. Los especímenes fueron almacenados en agua deionizada por 24 horas a 37 °C hasta su uso ⁽¹⁴⁾.

Prueba de cizallamiento

La prueba de resistencia al cizallamiento se realizó empleando una máquina universal de ensayos (Odeme; OM 150, São Carlos, Brasil). Los especímenes fueron colocados en el jig de la máquina asegurando que la base del bracket esté paralela al vector de aplicación de la carga de fuerza. Un punzón fue posicionado en la interfase bracket-diente con una velocidad de cabezal de 1 mm/min hasta que ocurra la falla de adhesión ⁽¹⁰⁾⁽¹⁹⁾⁽³⁴⁾. Los resultados fueron registrados en Kgf y convertidos a Newtons. La resistencia al cizallamiento se presenta en megapascuales (MPa), dividiendo los valores de Newtons entre el área de la base del bracket (10.62 mm²).

Índice remanente adhesivo

Luego de producirse la falla de adhesión, los dientes fueron evaluados con una magnificación de 20X empleando un estereomicroscopio (AmScope™, ZM-3B/T, United Scope LLC, California, USA) ^(26,35) y los valores del índice remanente adhesivo (IRA) fueron registrados siguiendo las recomendaciones de Årtun and Bergland ⁽³⁶⁾. Resumidamente, el IRA puede ser clasificado de la siguiente manera: 0 = nada de cemento remanente en la superficie del diente, 1 = menos de la mitad del cemento remanente en la superficie del diente, 2 = más de la mitad del cemento remanente en el diente; y 3 = todo el cemento remanente en la superficie del diente con una impresión distintiva de la malla del bracket.

Evaluación del efecto preventivo sobre la formación de lesiones de mancha blanca

Tamaño de la muestra

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó con el programa G*power a través de la prueba ANOVA de efectos fijos, empleando un tamaño del efecto de 0.8, un error de probabilidad alpha de 0.05 y un poder del 80%. Se emplearon 25 premolares humanos extraídos por razones ortodónticas sin fisuras, fracturas o lesiones de caries. Los dientes fueron divididos de manera aleatoria en 5 grupos (n=5), empleando el programa Research Randomizer Form 4.0 (Social Psychology Network, Middletown, CT, USA).

Procedimiento de adhesión de los brackets

La superficie del esmalte de los dientes fueron pulidos con pasta y una copa de pulido y lavados con abundante agua destilada. Para estandarizar la exposición al grabado y adhesión, se delimitó la zona de aplicación de los brackets con cinta adhesiva. El esmalte fue acondicionado con ácido fosfórico al 37% (Unitek Etching Gel, 3M, Monrovia, USA) por 30 s y fue lavado por el doble del tiempo con agua destilada y secado con aire comprimido libre de aceite ⁽¹²⁾. Se aplicó el *primer* Transbond XT sobre el esmalte y fue fotopolimerizado por 20 s con una unidad Led (Elipar DeepCure-L). 5 muestras fueron usadas para adherir los brackets (Gemini, 3M Unitek, Monrovia, USA) con cada cemento modificado, adicionalmente en 5 muestras se aplicó el cemento sin modificar. Una vez colocado en bracket sobre la superficie del esmalte, se aplicó una fuerza constante de 250 grf por 20 s para estandarizar el espesor del cemento; los excesos de cemento fueron removidos con un explorador. Finalmente, las muestras fueron polimerizadas por 20 s por lado (mesial, distal) ⁽¹⁰⁾ y fueron almacenados en agua destilada a 37 °C por 24 horas.

Enseguida, las coronas y las raíces fueron selladas con un barniz de uñas ácido-resistente (Maybelline New York, NY, US) dejando un área rectangular de 2.5 mm x 2 mm en la región cervical de los brackets.

Inducción microbiológica de lesión superficial de desmineralización

Se preparó una solución cariogénica de la siguiente manera: se mezclaron 14.8 g de BHI, 2 g de extracto de levadura, 4 g de glucosa y 8 g de sucrosa, con 400 mL de agua destilada. La solución fue autoclavada a 121 °C por 15 minutos. Cada diente fue colocado en un tubo FalcomTM con 25 mL de la solución cariogénica inoculada con 25 µL de suspensión de *S. mutans* y *L. acidophilus*. Los tubos fueron incubados a 37 °C por 9 días; el medio fue cambiado cada 48 horas, sin inocular con las suspensiones bacterianas ^(37,38). Posteriormente, el barniz de uñas fue removido con una hoja de bisturí y los dientes fueron lavados con agua destilada.

Medición del área de mancha blanca

Los dientes fueron fotografiados en dos tiempos. T1: inmediatamente después de la adhesión de los brackets y T2: después de la inducción de la formación de la lesión de mancha blanca. Se utilizó una cámara Canon 60D (canon INC., Tokio, Japón) con un lente macro LF y un flash circular (Yongnuo Macro Ring Lite YN-14EX). La cámara fue ajustada con una apertura de f9, un velocidad de obturación de 1/125 s y sensibilidad ISO de 200. La toma de las fotografías fue estandarizada siguiendo las recomendaciones de un estudio previo ⁽³⁹⁾. Los dientes fueron colocados en tubos plásticos conteniendo silicona de condensación (Zetaplus, Zhermack SpA, Italia) para asegurar el correcto posicionamiento perpendicular al lente de la

cámara. Se construyó un soporte especial para estandarizar la toma fotográfica asegurando la distancia y ángulo de la adquisición de las imágenes. Se colocó una regla en el soporte para permitir las mediciones posteriores. Las imágenes fueron guardadas como archivos JPEG, importadas al programa Image J (Image J, 1.52v para Mac OS, US National Institutes of Health, Bethesda, Md) y convertidas a una escala de grises de 8 bits. La escala fue ajustada a pixel/mm para las mediciones de tamaño relativa a la regla contenida en la fotografía. Las áreas en T1 (área inicial) y T2 (área de formación de la lesión de mancha blanca) fueron seleccionadas con la herramienta de mano alzada y el programa fue ajustado para calcular el área expresada en mm^2 ⁽³⁹⁾.

Medición de la cantidad relativa de iones fosfato y longitud de las lesiones de mancha blanca

Tamaño de la muestra

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó con el programa G*power 3.1, a través de la prueba ANOVA de efectos fijos, empleando los datos de un estudio previo donde se comparó la profundidad de la lesión de mancha blanca medida a través de microscopía Raman confocal ⁽⁴⁰⁾. Se adoptó un tamaño del efecto detectado de 0.81; un error de 0.05 y un poder de 0.80. Se establecieron 5 muestras para cada grupo. Las muestras fueron asignadas de manera aleatoria en los grupos, empleando el programa Research Randomizer Form 4.0 (Social Psychology Network, Middletown, CT, USA).

Preparación de muestras

Se seleccionaron 25 dientes premolares inferiores sanos extraídos por motivos ortodónticos. Los dientes fueron distribuidos de manera aleatoria en cinco grupos de acuerdo a los cementos empleados. Brackets metálicos fueron adheridos con los cementos conteniendo 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% de NPsAg y cemento sin modificar de acuerdo a los grupos experimentales. Las muestras fueron sometidas al modelo microbiológico para la inducción de LMB siguiendo los procedimientos descritos anteriormente.

Los brackets fueron removidos con una pinza para extracción de brackets y los remanentes de cemento fueron pulidos con una fresa multilaminada (Broca ortodóntica carbide FG, Ortomundi L.3829, Londrina, Brasil). Los dientes fueron seccionados transversalmente con un disco diamantado (930D Jota, Suiza) a baja velocidad (micromotor Kavo 500, Alemania) bajo irrigación constante con agua. Además, fueron cortados a 5 mm de la unión amelo-cementaria desde la cara vestibular. Posteriormente una de las secciones de los dientes fue montada en una probeta de PVC (Pavco, Perú) de 15 mm de diámetro interno y 10 mm de altura con la parte de la sección transversal hacia abajo y fue embebida con resina acrílica de autocurado (VIPIflash, SP, Brasil). Una vez completado el proceso de polimerización, la superficie del diente fue pulida de forma manual con papel lija #600, #800, #1000.

Microscopía Raman Confocal

Para este ensayo se observaron los cambios en la intensidad del pico en el modo vibracional más fuerte del ion fosfato (PO_4^{3-}) a 960 cm^{-1} , que corresponde a un modo de estiramiento simétrico $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$. El espectro Raman fue registrado empleando un sistema de microscopía Raman confocal Alpha 300 RA (WITec GmbH, Ulm, Alemania). La excitación de las muestras se realizó con una fuente de láser con una longitud de onda de 532 nm con una potencia de 50 mW y rejilla de difracción de 300 líneas/mm. El haz incidente se enfocó sobre la muestra a través de un objetivo 20X Zeiss EC Epiplan. El modo de adquisición fue por escaneo lineal en la zona más representativa de la lesión de desmineralización, desde la superficie externa del esmalte, con una longitud total de 136 μm , con mediciones cada 5 μm . El tiempo de adquisición fue de 10 s por medición, con un total de 20 espectros de 0.5 s cada uno, promediados en cada punto. El procesamiento de los espectros adquiridos fue realizado empleando el software Project FIVE 5.9 (WITec GmbH, Ulm, Alemania).

Los valores obtenidos correspondientes a la intensidad del pico $\nu_1(\text{PO}_4^{3-})$ registrada a lo largo de la zona de desmineralización para cada muestra fueron ponderados porcentualmente a partir de la intensidad registrada para el esmalte sano; y empleando como modelo de ajuste a la curva sigmoideal de Boltzmann. Este procedimiento permitió expresar porcentualmente la cantidad relativa de iones fosfato (PO_4^{3-}) remanente en las zonas de desmineralización, que está relacionado con la profundidad de la lesión para cada muestra.

Medición de las microfotografías

Las microfotografías obtenidas con la cámara digital del sistema de microscopía Raman confocal fueron convertidas a formato JPG e importadas al programa Image J (Image J, 1.52v para Mac OS, US National Institutes of Health, Bethesda, Md). Las microfotografías se convirtieron a una escala de grises de 8-bit y se ajustaron los valores de brillo y contraste para una mejor visualización. La escala fue ajustada a pixeles/ μm para la medición de la longitud de las zonas de desmineralización respecto a la escala contenida en las microfotografías. La profundidad de la lesión de desmineralización se midió con la herramienta línea recta a mano alzada, realizando 10 mediciones lineales en la extensión de la lesión desde la superficie del esmalte hasta la mayor profundidad observable de la lesión.

Consideraciones éticas

La presente investigación se encuentra registrada con Código SIDISI N° 66846 y contó con la aprobación del comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia en la condición de aprobado en la categoría de exento con el registro Nro. 310-15-19. (Anexos 1 y 2)

Plan de análisis

Los datos producto de los diversos ensayos desarrollados fueron organizados en una base de datos elaborada en Microsoft Excel 2016. El análisis estadístico de los datos fue realizado con el programa estadístico Stata 16 en su versión para MacOS (StataCorp LP, College Station, TX, USA) En el caso de los datos numéricos, estos fueron previamente analizados para conocer su distribución mediante la prueba de

Shapiro Wilk. La estadística descriptiva incluyó medidas de tendencia central como la media y la mediana y medidas de dispersión como la desviación estándar y rango intercuartílico, según correspondía a partir de la distribución normal o no de los datos. Para la estadística inferencial se adoptó un nivel de significación del 5% para todas las pruebas. Adicionalmente, se incluyó el análisis de tamaño del efecto para las distintas pruebas a través de los coeficientes correspondientes. La presentación de los resultados se realizó mediante tablas y en algunos casos con gráficos de barras de error y gráfico de líneas con marcadores.

Debido a que cada ensayo requería de pruebas distintas y dependientes de la naturaleza de la variable y de la distribución normal de los datos; se eligieron las siguientes pruebas estadísticas:

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se empleó la prueba de análisis de la varianza de un factor para comparar las zonas de inhibición de crecimiento bacteriano de *S. mutans* y *L. acidophilus* producido por los cementos ortodónticos con diferentes concentraciones de NPsAg. Para las comparaciones intragrupo se empleó la prueba post hoc de Tukey.

Para evaluar del cambio de color del esmalte se analizó los valores de ΔE_{00} obtenidos de las mediciones realizadas antes de la adhesión de los brackets cementados con las diferentes concentraciones de NPsAg del cemento experimental y después de seis meses de almacenamiento. Para identificar las diferencias de los valores ΔE_{00} y los valores individuales de las coordenadas L^* , a^* y b^* se utilizó la

prueba de análisis de la varianza de un factor, seguida de la prueba post hoc de Tukey.

Para la evaluación de la resistencia al cizallamiento se empleó la prueba de análisis de la varianza de un factor que permitió comparar los valores medios de la resistencia entre todos los grupos donde se empleó un cemento ortodóntico con distintas concentraciones de NPsAg. La comparación intragrupos se realizó con la prueba post hoc de Tukey. La comparación entre las puntuaciones del Índice Remanente Adhesivo que identifica el patrón de falla de adhesión se realizó con la prueba Chi-cuadrado.

Para evaluar el efecto preventivo sobre la formación de lesiones de mancha blanca se comparó el área inicial y la zona de desmineralización del esmalte en las muestras donde se empleó el cemento ortodóntico modificado con las concentraciones de NPsAg, luego de someter las muestras a la inducción microbiológica de formación de LMB se empleó la prueba *t* de Student para muestras repetidas. Adicionalmente, se empleó la prueba de análisis de la varianza de un factor para comparar las diferencias de los valores del área inicial y final entre los grupos.

Para comparar la cantidad relativa de iones fosfato y longitud de las lesiones de mancha blanca en las muestras donde se empleó el cemento ortodóntico modificado con las distintas concentraciones de las NPsAg se empleó la prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba post hoc de Dunn.

IV. RESULTADOS

Evaluación de la actividad antibacteriana

Los resultados del ensayo de actividad antibacteriana, mostraron que el grupo control y los grupos con 0.05% y 0.1% de NPsAg no presentaron inhibición del crecimiento bacteriano. Los resultados mostraron una diferencia significativa entre los grupos con 0.5% y 1% para las zonas de inhibición para *S. mutans* ($p<0.05$). No se observaron diferencias significativas entre los cementos modificados para *L. acidophilus* ($p>0.05$) (Figura 1). Por otro lado, todos los cementos modificados mostraron una menor formación de UFC que el cemento convencional para *S. mutans* y *L. acidophilus* ($p<0.05$) (Figura 2).

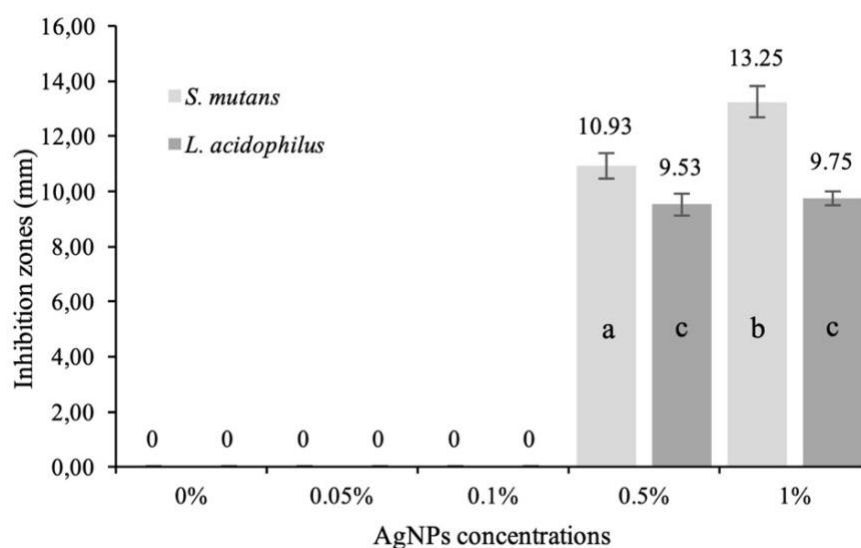


Gráfico 1. Zonas de inhibición en el crecimiento de *S. mutans* y *L. acidophilus* generadas por las concentraciones de NPsAg. Prueba ANOVA seguida de prueba post hoc de Tukey. Letras diferentes indican diferencias significativas.

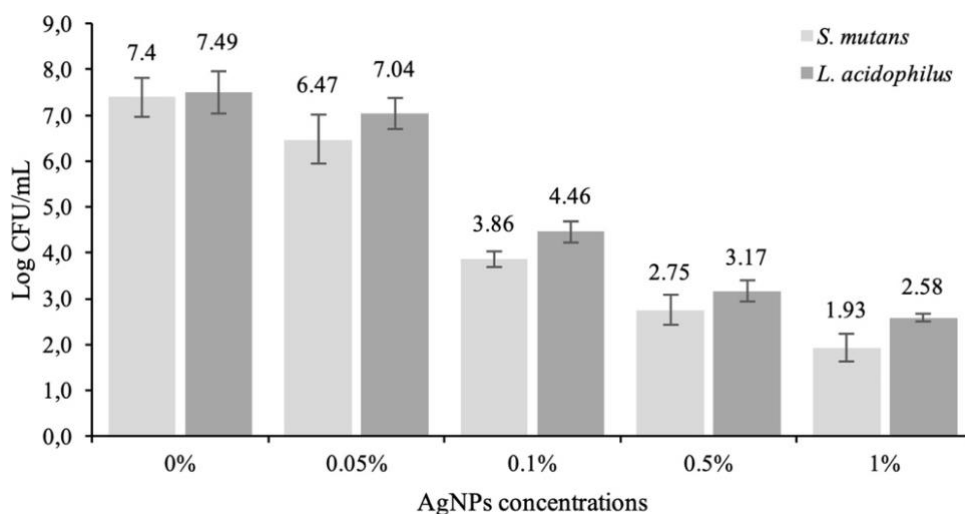


Gráfico 2. Unidades formadoras de colonias (Log UFC/mL) de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*.

Evaluación del cambio de color del esmalte

El cambio de color del esmalte luego de seis meses de almacenamiento se muestra en la Tabla 2. La prueba ANOVA de un factor mostró diferencias significativas entre el cambio de color entre todos los grupos ($p < 0.05$). Comparando el grupo control (2.00 ± 0.51) y el grupo con 0.05% de NPsAg (3.31 ± 0.70), los valores ΔE_{00} no mostraron diferencias significativas, y estos valores fueron inferiores a aquellos de los grupos que contenían 0.1%, 0.5% y 1% de NPsAg. El mayor cambio de color fue observado en el grupo con 1% de NPsAg (8.04 ± 1.48); sin embargo, no hubieron diferencias significativas cuando se realizó una comparación múltiple con los grupos de 0.5% y 0.1% de NPsAg ($p > 0.05$). Adicionalmente, se calculó la magnitud del efecto mediante el coeficiente eta cuadrado ($\eta^2 = 0.827$), lo que significa que las diferentes concentraciones de NPsAg permiten explicar el 82.7% de la variabilidad en el cambio de color del esmalte (ΔE_{00}).

Tabla 2. Evaluación del cambio de color (ΔE_{00}) del esmalte expuesto a los cementos experimentales con diferentes concentraciones de NPsAg luego de seis meses de almacenamiento.

Grupo	Media	DE	Min	Max	Valor <i>p</i>	η^2
0% NPsAg	2.00 ^a	0.51	1.48	2.75		
0.05% NPsAg	3.31 ^a	0.70	2.44	4.18		
0.1% NPsAg	6.42 ^{b*}	1.98	4.18	8.91	< 0.001	0.827
0.5% NPsAg	6.51 ^{b*}	1.70	4.78	8.67		
1% NPsAg	8.04 ^{b*}	1.48	6.33	9.57		

Letras diferentes indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$). * Indica valores inaceptables ($\Delta E > 3.7$).

El uso de los cementos experimentales modificados con NPsAg afectó los valores de las coordenadas L^* , a^* y b^* (Tabla 3). Todas las muestras mostraron valores negativos en la luminosidad (ΔL^*); valores negativos indican que las muestras se volvieron más oscuras. No se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los grupos con 0.05% de NPsAg ($p > 0.05$), mientras que en los grupos con concentraciones mayores de NPsAg, se observó una mayor disminución en la luminosidad, con un mayor cambio en ΔL^* en el grupo de 1% de NPsAg (-10.86 ± 2.65). Además, todas las muestras mostraron valores negativos de Δa^* , lo que significa un cambio hacia el color verde, sin observarse diferencias significativas entre los grupos. Cuando se evaluó el Δb^* , todas las muestras mostraron un cambio

hacia el color azul, con un mayor cambio observado en el grupo con 1% de NPsAg (-7.50 ± 1.21) ($p < 0.05$).

Tabla 3. Cambios de L^* , a^* y b^* del esmalte expuesto a los cementos experimentales con diferentes concentraciones de NPsAg luego de seis meses de almacenamiento.

Grupo	$\Delta L \pm DE$	Valor p	$\Delta a \pm DE$	Valor p	$\Delta b \pm DE$	Valor p
0% NPsAg	-2.73 ± 0.86^a		-0.80 ± 0.29^a		-2.36 ± 1.19^a	
0.05% NPsAg	-3.61 ± 0.33^a		-0.39 ± 0.40^a		-3.51 ± 1.46^a	
0.1% NPsAg	-9.65 ± 2.49^b	< 0.001	-0.66 ± 0.57^a	0.563	-3.76 ± 2.16^a	0.003
0.5% NPsAg	-9.72 ± 2.92^b		-0.39 ± 0.59^a		-3.64 ± 2.67^a	
1% NPsAg	-10.86 ± 2.65^b		-0.52 ± 0.44^a		-7.50 ± 1.21^b	

Letras diferentes entre columnas indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$).

Evaluación de la resistencia al cizallamiento

La prueba ANOVA de un factor mostró diferencias significativas en la resistencia al cizallamiento entre todos los grupos ($p < 0.05$). Los grupos experimentales tuvieron valores de resistencia al cizallamiento de 16.420 ± 0.745 , 16.924 ± 0.972 , 17.325 ± 0.881 y 17.721 ± 0.759 , para las concentraciones de NPsAg de 1%, 0.5%, 0.1% y 0.05%, respectivamente. La incorporación de las NPsAg en el cemento ortodóntico disminuyó la resistencia al cizallamiento en todos los grupos. No se observaron diferencias significativas en la reducción de la resistencia al

cizallamiento entre los grupos con concentraciones de 1%, 0.5% y 0.1% de NPsAg. Para el grupo control se observó una resistencia al cizallamiento de 17.849 ± 0.768 , no hubo diferencias significativas con los grupos que contenían 0.05%, 0.1% y 0.5% de NPsAg ($p > 0.05$) (Tabla 4). Por otro lado, se calculó el tamaño del efecto mediante el coeficiente eta cuadrado ($\eta^2 = 0.450$), lo que significa que el 45% de la variabilidad en los valores de resistencia al cizallamiento en los grupos es explicada por la concentración de NPsAg agregas al cemento ortodóntico.

Tabla 4. Comparación de la Resistencia al cizallamiento de brackets adheridos con cementos experimentales con diferentes concentraciones de NPsAg (MPa).

Grupo	Media	DE	Min	Max	Valor p^*	η^2
1% NPsAg	16.40 ^a	0.74	15.20	17.50	0.002	0.450
0.5% NPsAg	16.92 ^{ab}	0.97	15.54	18.55		
0.1% NPsAg	17.32 ^{ab}	0.88	16.29	18.59		
0.05% NPsAg	17.72 ^b	0.75	16.49	18.80		
0% NPsAg	17.84 ^b	0.76	16.66	18.95		

* Prueba ANOVA de un factor seguida de prueba post hoc de Tukey. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$).

Las puntuaciones del IRA en el grupo con 1% de NPsAg fueron principalmente valores de 0 y 1, lo que significa que el patrón de falla de adhesión ocurrió de manera más frecuente en la interfase cemento-esmalte, con nada o menos del 50% del cemento en el esmalte. Las puntuaciones IRA 1 y 2 fueron más frecuentes en los grupos con 0.5% y 0.1% de NPsAg. Para el grupo con 0.05% de NPsAg y el

grupo control, el IRA más frecuente fue la puntuación 2, que significa que más del 50% del cemento permaneció en la superficie del diente. Adicionalmente, en algunas muestras de ambos grupos se observó que el cemento permaneció completamente en la superficie del esmalte (Figura 3). La prueba de Chi-cuadrado mostró diferencias significativa en las puntuaciones del IRA entre los grupos ($p<0.05$) (Tabla 5).

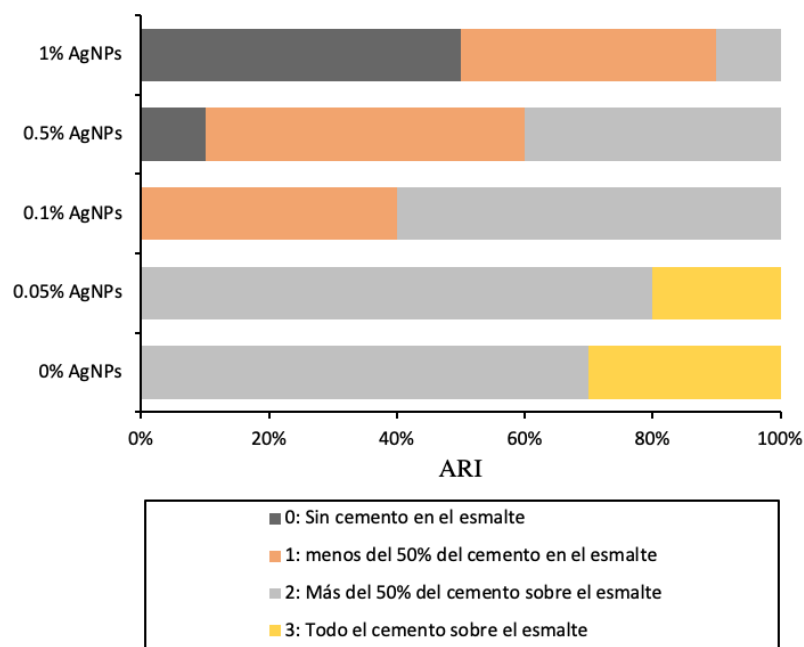


Gráfico 3. Frecuencia y distribución de las puntuaciones del Índice Remanente Adhesivo (IRA) para las muestras con diferentes concentraciones de NPsAg.

Tabla 5. Comparación del Índice Remanente Adhesivo (IRA) para las muestras con brackets adheridos con cementos con diferentes concentraciones de NPsAg.

Grupo	Puntaciones IRA				Valor p^*
	0	1	2	3	
1% NPsAg	5	4	1	0	< 0.001
0.5% NPsAg	1	5	4	0	
0.1% NPsAg	0	4	6	0	
0.05% NPsAg	0	0	8	2	
0% NPsAg	0	0	7	3	

* Prueba chi-cuadrado.

Evaluación del efecto preventivo sobre la formación de lesiones de mancha blanca

La comparación entre el área inicial y la zona de desmineralización del esmalte luego de someter las muestras a la inducción microbiológica de formación de LMB se evaluó con la prueba t de Student. Todos los grupos donde se usaron los cementos modificados con las NPsAg presentaron una menor área de desmineralización que el grupo control ($p < 0.05$) (Tabla 6). Adicionalmente se calculó el coeficiente d_{Cohen} para las comparaciones emparejadas; los valores fueron convertidos a una correlación biserial puntual para su interpretación, detectándose una discriminación aceptable en todos los casos.

Tabla 6. Comparación de la área inicial y la zona de desmineralización del esmalte (mm²) para las muestras donde se empleó un cemento ortodóntico con diferentes concentraciones de NPsAg.

Grupo	Initial	Final	Valor <i>p</i> *	<i>d</i> _{Cohen}	Correlación
					biserial puntual (<i>r</i>)
0% NPsAg	3.78±0.33	3.28±0.49	0.074	1.185	0.552
0.05% NPsAg	4.31±0.30	3.65±0.55	0.020	1.483	0.638
0.1% NPsAg	4.62±0.52	2.96±0.44	0.010	3.418	0.886
0.5% NPsAg	4.64±0.44	2.18±0.53	0.009	5.017	0.941
1% NPsAg	4.33±0.36	1.12±0.36	<0.001	8.815	0.957

* Prueba *t* de Student para muestras emparejadas.

Para comparar el efecto preventivo de la formación de la LMB de los cementos modificados con NPsAg, se emplearon las diferencias entre los valores del área inicial y final. La prueba ANOVA de un factor reveló diferencias significativas entre todos los grupos ($p < 0.05$). El grupo de 1% de NPsAg promovió la mayor prevención de formación de LMB ($3.21 \pm 0.56 \text{ mm}^2$). La prueba post hoc de Tukey se empleó para la comparación intra grupos, los resultados mostraron diferencias significativas entre el grupo de 1% de NPsAg y los demás grupos. El grupo de 0.5% fue similar al grupo de 0.1% de NPsAg ($p > 0.05$). No se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los grupos de 0.1% y 0.05% de NPsAg (Tabla 7). Por otro lado, se calculó el tamaño del efecto mediante el coeficiente eta cuadrado ($\eta^2 = 0.818$), lo que significa que el 81.8% variabilidad en los valores del área de desmineralización puede ser explicada por la concentración de NPsAg agregadas al cemento.

Tabla 7. Áreas de prevención de la desmineralización del esmalte (mm²) para las muestras donde se empleó un cemento ortodóntico con diferentes concentraciones de NPsAg.

Grupo	Media±DE	Valor <i>p</i>	η ²
0% NPsAg	0.55 ± 0.40 ^a	<0.001	0.818
0.05% NPsAg	0.66 ± 0.39 ^{ab}		
0.1% NPsAg	1.65 ± 0.79 ^{bc}		
0.5% NPsAg	2.45 ± 0.38 ^{cd}		
1% NPsAg	3.21 ± 0.56 ^d		

Los valores medios con letras diferentes son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Medición de la cantidad relativa de iones fosfato y longitud de las lesiones de mancha blanca

Se comparó la cantidad relativa de iones fosfato (PO_4^{3-}) en cada una de las muestras en la zona de la lesión respecto al esmalte sano de cada muestra. Todos los grupos presentaron variaciones en la cantidad relativa del ion fosfato. La prueba de Kruskal Wallis mostró diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$); para detectar las diferencias intra grupos se aplicó la prueba post hoc de Dunn, donde se detectó que no existió diferencia entre el grupo control y los grupos con concentraciones de 0.05%, 0.1% y 0.5% de NPsAg ($p > 0.05$); mientras que la diferencia con los valores reportados para el grupo con 1% de NPsAg fueron estadísticamente significativos ($p < 0.05$). Estos resultados indican que en las muestras del grupo de 1% de NPsAg,

la cantidad relativa de iones fosfato (PO_4^{3-}) se mantuvo cercana al 70.41% respecto a los valores medidos en el esmalte sano, a diferencia de los demás grupos que presentaron valores mucho menores (Tabla 8). Adicionalmente se calculó el coeficiente épsilon al cuadrado ($E_R^2=0.368$); que indica que el 36.8% de variabilidad de la intensidad del ion fosfato puede atribuirse a las concentraciones de NPsAg agregadas al cemento ortodóntico, pudiendo considerarse esta variabilidad como mediana.

Tabla 8. Comparación de la cantidad relativa (%) del ion fosfato en las muestras donde se empleó un cemento ortodóntico con diferentes concentraciones de NPsAg.

Grupo	Media	DE	Mediana	RIC	Valor p^*	E_R^2
0 % NPsAg	25.63	19.48	17.67 ^a	20.99	0.029	0.368
0.05 % NPsAg	27.65	7.86	23.59 ^a	11.61		
0.1 % NPsAg	15.16	9.52	15.49 ^a	12.89		
0.5 % NPsAg	26.75	17.93	23.74 ^a	9.51		
1% NPsAg	57.97	24.18	70.41 ^b	37.38		

* Prueba de Kruskal Wallis seguida de prueba post hoc de Dunn.

La figura 4 muestra la variación del pico fosfato en la banda vibracional 961 cm^{-1} del grupo control frente a los grupos experimentales. La gráfica expresa la intensidad relativa normalizadas del ion fosfato respecto a la distancia lineal de $136\text{ }\mu\text{m}$ desde la superficie del esmalte. Para los grupos control y los grupos con 0.05%,

0.1% y 0.5% de NPsAg, la intensidad del ion fosfato disminuyó desde la superficie del esmalte y permaneció baja hasta una distancia de 60-80 μm ; recuperándose a medida que la distancia fue mayor; por el contrario en el caso del grupo con 1% de NPsAg la recuperación de la intensidad se expresó rápidamente (20 μm). A una mayor distancia en la estructura del esmalte. En todos los grupos las intensidades del ion fosfato se acercaron a los valores normales del esmalte.

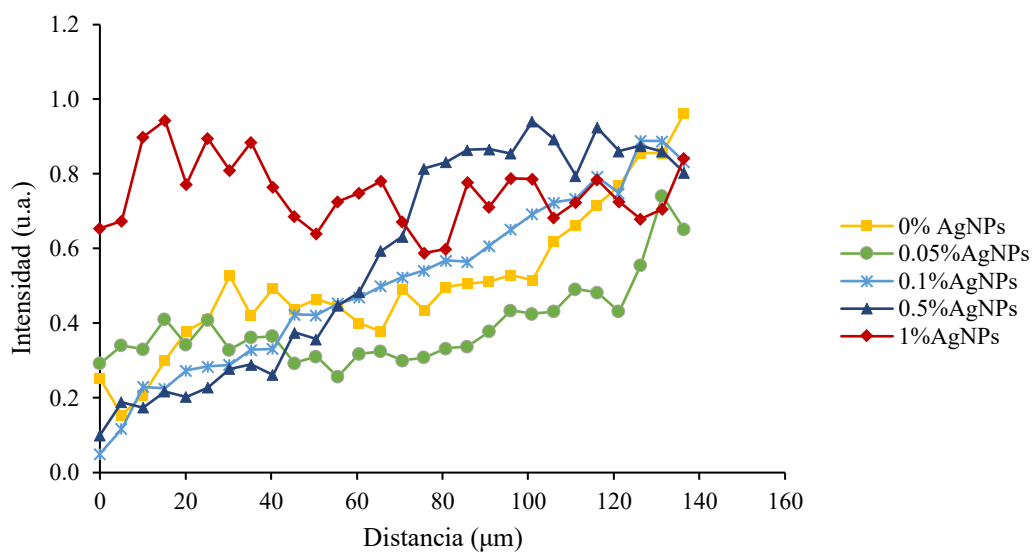


Gráfico 4. Variación de intensidad relativa del pico 961 cm^{-1} del ion fosfato entre los grupos donde se empleó un cemento ortodóntico con diferentes concentraciones de NPsAg.

La profundidad de las lesiones de desmineralización en μm fue medida y comparada entre los grupos. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos ($p < 0.05$). Los resultados mostraron que para el grupo control y grupos con 0.05% y 0.1% de NPsAg no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$); mientras que estos valores de profundidad de la lesión fueron significativamente mayores que los registrados para los grupos con 0.5% y

1% de NPsAg. Adicionalmente se calculó la magnitud del efecto ($E_R^2=0.728$); lo que indica que el 72.8% de la variabilidad en la profundidad de la zona de desmineralización puede atribuirse a la concentración de NPsAg agregadas a los cementos, pudiendo ser considerada como una variabilidad grande (Tabla 9).

Tabla 9. Profundidad de la zona de desmineralización entre los grupos donde se empleó un cemento ortodóntico con diferentes concentraciones de NPsAg (μm).

Grupo	Media	DE	Mediana	RIC	Valor p*	E_R^2
0 % NPsAg	120.29	19.65	122.68 ^a	20.47	0.001	0.728
0.05 % NPsAg	122.26	12.33	116.17 ^a	21.81		
0.1 % NPsAg	79.41	23.84	85.64 ^{ab}	43.98		
0.5 % NPsAg	62.61	18.79	54.17 ^b	5.33		
1 % NPsAg	35.36	24.45	21.87 ^b	12.52		

* Prueba de Kruskal Wallis seguida de prueba post hoc de Dunn.

V. DISCUSIÓN

Esta investigación tuvo por objetivo evaluar las propiedades biológicas y mecánicas de un cemento ortodóntico modificado con nanopartículas de plata en distintas concentraciones para la prevención de la formación de lesiones de mancha blanca, empleando diversos ensayos *in vitro*.

La prevención y tratamiento de las LMB es un tópico de interés para diversas especialidades de la odontología. Estas lesiones superficiales son consideradas como activas y se encuentran limitadas al esmalte, sin embargo tienen el potencial de progresar a lesiones cavitadas dependiendo de las condiciones clínicas. Recientemente, diversas intervenciones con distintos materiales han sido propuestos para prevenir y tratar la formación de las LMB; entre ellas materiales a base de fosfato de calcio amorfo asociado a flúor (CPP-ACPF), pastas funcionalizadas de fosfato tricalcico (fTCP), fluoruro de sodio, pastas que contienen hidroxiapatita y fluoruro, resinas infiltrantes, entre otras ⁽⁴¹⁻⁴⁵⁾.

La desmineralización del esmalte alrededor de los brackets es un problema persistente en los pacientes con tratamiento ortodóntico, que está comúnmente asociada a la deficiente higiene oral ^(3,4). Diversas estrategias han sido propuestas para prevenir su formación y como tratamiento, entre ellas el uso de péptidos autoensamblados P11-4 (SAP), pastas a base fluoruro, barnices de fluoruro, pastas a base de fosfato de calcio amorfo asociado a flúor, sellantes a base de organoselenio, uso de láser CO₂, entre otras ⁽⁴⁶⁻⁴⁹⁾. Recientemente, el uso de compuestos antibacterianos incorporados en la matriz de los cementos ortodónticos

ha demostrado ser efectivo para reducir la formación de las LMB. Dentro de estas estrategias, se ha descrito la eficacia de la incorporación de diferentes nanopartículas ⁽⁹⁻¹³⁾. Si bien estas estrategias han demostrado ser efectivas, es necesario continuar con los esfuerzos en la evaluación de posibles materiales candidatos para la prevención y manejo de las LMB, con un gran interés en aquellas asociadas al tratamiento de ortodoncia.

El primer objetivo específico de este estudio fue evaluar el efecto antibacteriano de la incorporación de diferentes concentraciones de NPsAg en un cemento ortodóntico. Los resultados demostraron que la incorporación de 0.5 y 1 % de NPsAg inhibió el crecimiento de *S. mutans* y *L. acidophilus*, mientras que las concentraciones menores (0.05 y 0.1%) no presentan actividad antibacteriana frente a las cepas evaluadas. En este estudio, la concentración más alta de NPsAg empleada fue de 1%. De acuerdo a reportes previos, para reducir el efecto sobre las propiedades mecánicas y estéticas, no se recomienda el uso de concentraciones mayores ⁽¹¹⁾. Los resultados mostraron una diferencia significativa entre las concentraciones de 0.5% y 1% de NPsAg para las zonas de inhibición de *S. mutans*; sin embargo, no se observaron diferencias entre las mismas concentraciones para *L. acidophilus*. Por otro lado, todos los cementos modificados mostraron menor UFC que el grupo control para *S. mutans* y *L. acidophilus* ($p < 0.05$).

Se ha propuesto que el mecanismo antibacteriano de las NPsAg está relacionado a la carga positiva del ion Ag^+ que permite la atracción electrostática entre la carga negativa sobre la bacteria, lo que afecta las enzimas respiratorias de la membrana,

desestabiliza los ribosomas, promueve la interacción enzimática que genera daño y consecuente muerte celular ^(18,50). Además, las NPsAg poseen la habilidad de alterar el ADN bacteriano induciendo la pérdida de replicación ⁽⁵⁰⁾.

Se ha demostrado que cuando las partículas son más pequeñas, su efecto antibacteriano es mayor debido a la alta razón entre superficie/volumen ⁽⁵¹⁾, lo que puede explicar el porqué de los diferentes resultados reportados en algunos estudios. Recientemente, Eslamian *et al.* ⁽¹⁹⁾ demostraron que la incorporación de NPsAg con un tamaño de partícula de 50 nm a una concentración de 0.3% en un cemento ortodóntico tiene una importante actividad ante *S. mutans*, esta propiedad fue estable por 30 días de evaluación. Yassaei *et al.* ⁽¹¹⁾ condujeron un estudio para evaluar el efecto antibacteriano de un cemento ortodóntico modificado con nanopartículas de óxido de cobre y NPsAg y reportaron que la concentración de 1% de ambas nanopartículas redujo significativamente el crecimiento de *S. mutans*; sin embargo, luego de 30 días no hubieron diferencias significativas con el grupo control. Sodagar *et al.* ⁽⁸⁾ demostraron que un cemento ortodóntico que contenía 5 y 10 % de nanopartículas de plata/hidroxiapatita con un tamaño de 55-65 nm redujo el crecimiento de *S. mutans*, *L. acidophilus* y *S. sanguinis*. En contraste, Degrazia *et al.* ⁽¹²⁾, encontraron que la incorporación de concentraciones de 0.11%, 0.18% y 0.33% de NPsAg (tamaño de partícula < 150 nm) en un *primer* ortodóntico no tiene efecto en la inhibición de crecimiento de *S. mutans* en un ensayo de contacto directo, mientras que las mismas concentraciones demostraron una importante actividad antibacteriana en medio líquido; los autores explican que estos resultados pueden ser debidos a que la dispersión homogénea de las nanopartículas en medio

líquido mejora sus propiedades. En nuestro estudio el tamaño de las NPs Ag fue 20 nm, esto puede explicar la significativa actividad antibacteriana observada contra *S. mutans* y *L. acidophilus*.

El segundo objetivo fue evaluar el efecto del uso de un cemento ortodóntico modificado con distintas concentraciones de nanopartículas de plata sobre el cambio de color del esmalte. Los resultados mostraron que el uso del cemento ortodóntico modificado con NPsAg, para la adhesión de brackets, afectó el color del esmalte después de seis meses de almacenamiento. Concentraciones cercanas a 1% de NPsAg muestran un importante efecto antibacteriano sin afectar las propiedades mecánicas del material ⁽¹¹⁾. La incorporación mayor de NPsAg produce un cambio de color en el material, ocasionando que adquiriera un color gris oscuro, afectando las características estéticas del material. Consecuentemente, concentraciones iguales o mayores a 1% puede incrementar los problemas estéticos ⁽⁵²⁾. En este estudio, todas las concentraciones de NPsAg afectaron el color de la resina ortodóntica, produciendo un color gris de diferentes tonalidades, dependiendo en el incremento de las concentraciones.

Los resultados mostraron un cambio de color en el esmalte en todos los grupos luego de seis meses de almacenamiento en agua deionizada, incluso en el grupo control. De acuerdo a Aydın *et al.* ⁽⁵³⁾ los dientes inmersos en agua destilada por 24 horas mostraron un cambio de color debido a la absorción de agua en el esmalte, esto podría explicar porqué las muestras del grupo control mostraron una disminución en los valores de ΔE_{00} . En este estudio, el nivel aceptable de ΔE se fijó

en 3.7 unidades según la recomendación de otros autores ^(31,32); en consecuencia, valores menores a 3.7 fueron considerados aceptables. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los grupos con 0.1, 0.5 y 1% de NPsAg ($p>0.05$). Solo el uso del cemento con una concentración de 0.05% puede ser considerada clínicamente imperceptible para el ojo humano y comparable al cambio de color producido en el grupo control, donde se empleó el cemento sin modificación. Como se demostró previamente una concentración de 0.05% de NPsAg fue efectiva para disminuir las UFC de *S. mutans* y *L. acidophilus*, por lo que esta concentración puede ser efectiva para mejorar las propiedades antibacterianas de la resina ortodóntica sin afectar el color del esmalte.

La incorporación de NPsAg en el cemento ortodóntico afecta las mediciones de las coordenadas L^* , a^* y b^* . Se sabe que los valores de ΔL^* son más significativos debido a que son más fácilmente percibidos por el ojo humano, que los valores Δa^* y Δb^* ⁽³¹⁾. El mayor cambio del ΔL^* se observó en el grupo con 1% de NPsAg, lo que clínicamente afectó el color de los dientes, haciendo que estos luzcan más oscuros, además no se encontraron diferencias significativas con las concentraciones de 0.1%, 0.5% y 1%. Es importante notar que este cambio de color puede ser debido al agregado y precipitación de iones de plata en la superficie del esmalte ^(24,52). Las NPsAg usadas en este estudio tienen un tamaño promedio de 20 nm, lo que puede estar relacionado al efecto observado. Horst *et al.* ⁽²⁵⁾ describieron que los iones libres de plata pueden penetrar hasta 25 μm en la superficie del esmalte, causando su pigmentación. Estudios como el de Hernández-Sierra *et al.* ⁽⁵⁴⁾ demuestran que las NPsAg de 40 a 80nm no producen cambios significativos en

el esmalte, cuando estas son agregadas en combinación con un copolímero Gantrez S-97 en la forma de una pasta dental. Sin embargo, en este estudio se decidió utilizar NPsAg de menor tamaño (20 nm) considerando que las nanopartículas más pequeñas demuestra un potencial antibacteriano más importante ^(18,50,51).

Por otro lado, Pandian *et al.* ⁽⁵⁵⁾, indican que el esmalte después de la adhesión de brackets puede mostrar cambio de color, asumiendo que los componentes de los sistemas adhesivos puede producir este efecto. Çorekçi *et al.* ⁽⁵⁶⁾ demostraron que las alteraciones de color pueden ser observadas en los dientes donde se emplearon diferentes cementos ortodónticos; estos cambios estuvieron relacionadas con incremento en los valores en L^* y a^* ; mientras los valores b^* disminuyeron. Estos hallazgos deben ser considerados cuando se evalúa cambios de color debido a que puede afectar los resultados observados.

En este estudio se observó un pequeño cambio en Δa^* en todos los grupos; estos cambios indican un cambio suave hacia el color verde y podría ser explicado por el almacenaje en agua dionizada, lo que ha demostrado afectar el color de los dientes ⁽⁵³⁾. Por otro lado, los valores observados en Δb^* expresan un cambio hacia el color azul. Al respecto, se ha observado que a mayores concentraciones de NPsAg, mayores los cambios en términos de ΔE_{00} , ΔL^* , Δa^* y Δb^* .

De acuerdo a estos resultados, el tamaño de las NPsAg puede estar relacionado con su potencial de tinción. Por lo que se sugieren estudios futuros que evalúen el efecto del tamaño de diferentes NPsAg sobre el cambio de color, considerando el potencial

antibacteriano que presenten, para poder caracterizar un cemento ortodóntico con mejores propiedades.

El tercer objetivo de este estudio fue evaluar la resistencia al cizallamiento y el índice remanente adhesivo de un cemento ortodóntico modificado con nanopartículas de plata. Los resultados mostraron que la adición de NPsAg al cemento disminuyó la resistencia al cizallamiento a medida que se incrementó la concentración de NPsAg.

Reddy *et al.* ⁽²⁰⁾ demostraron que el incorporar 1% de NPsAg de un tamaño de 21 ± 5 nm a un cemento ortodóntico disminuyó significativamente la resistencia al cizallamiento (7.55 ± 1.29 MPa) cuando se comparó con un grupo control (9.43 ± 3.03 MPa), además los valores observados para el grupo con NPsAg fueron similares cuando se empleó nanopartículas de óxido de zinc o dióxido de titanio. Eslamian *et al.* (19) agregaron 0.3% de NPsAg (50 nm) en un cemento ortodóntico y evaluaron la resistencia al cizallamiento, sus resultados mostraron que el agregar NPsAg disminuye significativamente los valores de resistencia al cizallamiento (10.51 ± 7.15 MPa) frente a los valores observados en el grupo control (17.72 ± 10.55 MPa).

Akhavan *et al.* ⁽²¹⁾ incorporaron 1%, 5% y 10% de NPsAg/hidroxiapatita (< 200 nm) a un *primer* de cemento ortodóntico, observando que los valores de resistencia al cizallamiento para el grupo de 1% aumentaron (20.66 ± 10 MPa), y fueron incluso mayores que las observadas para el grupo control (12.06 ± 10 MPa), la

inclusión de 5% generaron los valores cercanos a los observados en el grupo control. Este aumento de resistencia observado en el grupo de 1% puede explicarse ya que se ha propuesto que los nanorellenos pueden incrementar la adhesión en la interfase entre el material de restauración y la estructura del diente, al mejorar sus propiedades mecánicas ⁽⁵⁷⁾. Blöcher *et al.* (58) agregaron NPsAg (12.6 – 18.5 nm) en concentraciones de 0.11%, 0.18% y 0.33% a un *primer* ortodóntico, observando que no se encontraron diferencias significativas cuando se comparó con los valores obtenidos cuando se empleó un *primer* sin modificar. Por otro lado, Degrazia *et al.* ⁽¹²⁾ agregaron las mismas concentraciones de una solución de NPsAg (0.11%, 0.18% y 0.33%) a un *primer* de resina ortodóntica, observando que en todos los grupos experimentales hubo una disminución significativa de la resistencia al cizallamiento. En el caso de los estudio de Akhavan *et al.*, Blöcher *et al.* y Degrazia *et al.*, las NPsAg fueron agregadas al *primer*, a diferencia de nuestro estudio donde fueron incorporadas en la matriz del cemento.

A pesar del efecto de disminución en los valores de resistencia al cizallamiento, en todos los casos los valores se mantienen por encima de los valores clínicamente aceptables que se han descrito entre 6-8 MPa ⁽⁵⁹⁾. Sin embargo, estos valores son recomendados para condiciones clínicas, por lo que podrían diferir de los hallazgos encontrados en estudios *in vitro* ⁽¹⁹⁾, siendo necesario estudios adicionales para valorar el efecto clínico del uso de cementos modificadas con NPsAg. Es necesario conducir estudios adicionales para evaluar la estrategia de incorporación de las NPsAg en el cemento o en el *primer* bajo mismas condiciones, considerando que han sido estudiadas de manera individual en la literatura.

Adicionalmente, los resultados de esta investigación mostraron diferencias significativas en el patrón de falla de adhesión entre los grupos. En el caso del grupo de 1%, el principal patrón de falla fue entre la interfase resina-esmalte; mientras que en el caso de grupo de 0.05% y grupo control, la falla ocurrió principalmente entre la interfase bracket-cemento. Eslamian *et al.* ⁽¹⁹⁾, no encontraron diferencias entre la distribución del patrón de falla del IRA entre el cemento modificado y el control, siendo más frecuente la puntuación 2, donde más de la mitad de la resina permaneció en la superficie del diente. Los resultados de Blöcher *et al.* ⁽⁵⁸⁾ tampoco mostraron diferencias en el patrón de falla evaluado por el IRA entre los cementos experimentales y el grupo control; los agregados de NPsAg en el *primer* presentaron principalmente falla de puntuación 1 al igual que el grupo control, lo que significa que menos de la mitad de la resina permaneció en la superficie del diente, ocurriendo principalmente en la interfase cemento-esmalte, de manera similar a lo reportado en nuestros resultados.

El patrón de falla de las resinas modificadas con NPsAg puede prevenir los posibles daños en el esmalte, se ha reportado que la falla entre el cemento y el esmalte puede incrementar la probabilidad de dañar la superficie del esmalte ⁽¹²⁾. En el presente estudio, se observó un patrón de falla, donde al incrementar la concentración de NPsAg la falla se expresó principalmente en la interfase cemento-esmalte con mayor puntuaciones IRA de 0 y 1.

El cuarto objetivo fue evaluar el efecto preventivo de cemento ortodóntico modificado con distintas concentraciones de nanopartículas de plata sobre la

formación de lesiones de mancha blanca. Para la evaluación de la disminución del área de formación de las LMB se ha reportado diversos métodos en la literatura como la fluorescencia por luz inducida (QLF) y la fluorescencia láser en estudios en modelos *in vitro* ^(37,60). Sin embargo, estos métodos representan un alto costo en equipamiento y procedimientos relativamente complicados. El uso de la fotografía digital ha sido propuesto por algunos autores, indicando un alto grado de reproducibilidad y representan un método poco costoso para la cuantificación de las zonas desmineralizadas del esmalte ^(39,61). Los resultados mostraron que la incorporación de concentraciones mayores a 0.1% de NPsAg fueron efectivas para prevenir la desmineralización del esmalte y consecuentemente evitar la formación de LMB. Ahn *et al.* ⁽⁶²⁾ demostraron que la incorporación de nanorellenos de silica y diferentes concentraciones de NPsAg con un tamaño menor de 5 nm pueden prevenir la desmineralización del esmalte alrededor de los brackets sin disminuir sus propiedades mecánicas. Debido a que el tamaño de las NPsAg empleadas en este estudio fue pequeño (20 nm), es posible que el efecto preventivo sobre la desmineralización haya sido efectivo.

Por otro lado, en el presente estudio la espectroscopía Raman fue empleada para evaluar la cantidad relativa de iones fosfato (PO_4^{3-}) en las zonas de las LMB. Este método permite una fácil caracterización de la superficie de los tejidos dentarios sin necesidad de preparación de las muestras, por lo que ha sido sugerido y empleado para este objetivo por diversos autores ⁽⁶³⁻⁶⁶⁾. Este método se basa en el hecho de que la intensidad de la dispersión Raman es proporcional al número de moléculas presentes en el volumen de la muestra ⁽⁶⁷⁾. Principalmente el pico de intensidad y el

pico de área son usados para el análisis; así es posible detectar los cambios en el contenido mineral de la lesión comparada con el esmalte sano, al comparar el pico de intensidad/pico de área, mientras las condiciones experimentales se mantengan ⁽⁶⁵⁾.

El ion fosfato (PO_4^{3-}) tiene cuatro modos vibracionales internos: ν_1 , ν_2 , ν_3 y ν_4 . En el presente estudio se evaluó la intensidad del pico en el modo vibracional más fuerte, que corresponde al modo de estiramiento simétrico ν_1 a 960 cm^{-1} ^(68,69). Como se mencionó previamente, la adquisición Raman se realizó en un escaneo lineal desde la superficie externa del esmalte; las intensidades absolutas fueron normalizadas y comparadas con las registradas en el esmalte sano. Los resultados mostraron que en todos los grupos se observaron variaciones en los perfiles de la cantidad relativa del ion fosfato respecto del esmalte sano. La más baja intensidad de los picos de fosfato de las lesiones indica que su contenido de fosfato es sustancialmente menor que en el esmalte sano. Se observó que a mayor profundidad, la intensidad del ion fosfato (PO_4^{3-}) se fue recuperando, acercándose a los valores observados en el esmalte sano. Estos resultados son consistentes con los reportados con los de otros autores. Mohanty *et al.* ⁽⁶⁵⁾ encontraron que la formación de la LMB progresó a una distancia máxima de 100-120 μm de profundidad del esmalte, siendo que en el modo vibracional ν_1 la intensidad del ion fosfato (PO_4^{3-}) cayó más del 40% respecto al esmalte sano. Sin embargo, sus resultados mostraron que la lesión fue en la subsuperficie del esmalte, existiendo cerca de 15 μm de esmalte sano antes de inicio de la lesión. Al-Obadi *et al.* ⁽⁴⁰⁾ evaluaron la formación de LMB artificiales y naturales a través de microscopía

Raman, sus resultados mostraron que el escaneo lineal identificó señal de ion fosfato en la superficie más externa del esmalte en todas sus muestras, lo que indicó la presencia de una capa de superficie intacta del esmalte, seguida de una severa deflexión en el pico del ion fosfato (PO_4^{3-}) en la zona correspondiente a la lesión. Además, a mayor distancia en el esmalte, el pico de la intensidad del ion fosfato (PO_4^{3-}) se acercó a la del esmalte sano.

La formación de las lesiones en la subsuperficie del esmalte observado en los estudios de Mohanty *et al.* y Al-Obaidi *et al.* difieren de lo observado en nuestros resultados, donde las lesiones aparecieron directamente en la superficie del esmalte, estas diferencias pueden deberse al modelo de generación de la LMB empleado, ya que en el caso de los estudios mencionados fue un modelo químico basado en soluciones de ácido láctico y ácido acético, mientras que en este estudio se empleó un modelo microbiológico reportado previamente en la literatura ⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾.

A nuestro entender esta es la primera investigación en la literatura donde se evalúa el efecto preventivo de las NPsAg en la formación de LMB a través de espectroscopía Raman. En los resultados se observaron diferencias en la cantidad relativa de ion fosfato (PO_4^{3-}) y en la profundidad de la formación de la lesión entre todos los grupos donde se emplearon resinas modificadas con NPsAg. Siendo que, en el grupo que contenía 1% de NPsAg, la cantidad relativa de ion fosfato (PO_4^{3-}) se mantuvo cercana a los valores medios detectados en el esmalte sano (70.41%); Por otro lado, en los grupos con concentraciones de 0.1%, 0.5% y 1% la profundidad de la LMB se redujo de manera significativa. Esto se explicaría por el

importante efecto de las NPsAg incorporadas en el cemento sobre la actividad bacteriana. Estas concentraciones parecen ser eficaz en controlar la formación de las LMB, por lo que resultaría prometedor su inclusión como estrategia en el control preventivo de formación de LMB en el tratamiento de ortodoncia.

Es importante mencionar que las investigaciones enfocadas en la evaluación de materiales dentales con diseños experimentales *in vitro* requieren la comprobación de diversas propiedades biológicas, físicas y mecánicas antes de ser sometidos a la evaluación clínica. Siendo así, en esta investigación se realizó un primer abordaje *in vitro* que constó de una serie de ensayos con el fin de comprobar algunas de las propiedades biológicas y mecánicas de un cemento ortodóntico modificado con NPsAg. Con respecto a los resultados encontrados en los ensayos podemos señalar que una concentración de 0.5% de NPsAg presenta una actividad antibacteriana importante sin generar un impacto sobre la resistencia al cizallamiento de los brackets, además es efectiva para la disminución del área de desmineralización de la superficie del esmalte y de la profundidad de la zona de desmineralización aunque su potencial de mantener una cantidad relativa de ion fosfato respecto del esmalte sano fue inferior a la observada cuando se empleó una concentración del 1% de NPsAg. Además una concentración del 0.5% parece tener un impacto negativo sobre el color del esmalte, principalmente sobre la luminosidad, generando una apariencia más oscura perceptible desde el punto de vista clínico. En consecuencia es necesario seguir con esta línea de investigación con el objetivo de probar nuevas formulaciones o concentraciones que permitan verificar y mejorar los resultados observados.

Las limitaciones encontradas en la presente investigación, están relacionadas con el modelo *in vitro* que fue adoptado. Se debe considerar que, aunque los modelos *in vitro* permiten controlar de manera adecuada las variables estudiadas, en algunos casos no es posible reproducir de manera exacta las condiciones clínicas que se encontrarían en el medio bucal. Por otro lado, consideramos necesario el planteamiento de estudios adicionales para evaluar algunas propiedades biológicas, físicas y mecánicas de la resina ortodóntica modificada con NPsAg como la citotoxicidad, liberación controlada de las NPsAg, microdureza de la resina, grado de conversión de la resina, evaluación de actividad antibacteriana a través de modelos de *biofilm* bacteriano.

VI. CONCLUSIONES

1. La incorporación de 0.5% y 1% de NPsAg en un cemento ortodéntico provee una importante actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*
2. La incorporación de NPsAg en el cemento ortodéntico a concentraciones mayores a 0.1% afecta el color del esmalte luego de seis meses de almacenaje. Adicionalmente, la incorporación de NPsAg principalmente afectó los valores de la coordinada L^* , haciendo que el esmalte luzca más oscuro.
3. A mayor concentración de las NPsAg en el cemento ortodéntico, mayor fue la disminución de la resistencia al cizallamiento, aunque en todos los casos se mantuvo por encima de los valores clínicamente aceptables. Por otro lado, el patrón de falla mostró que al incrementar la concentración de NPsAg la falla se expresó principalmente en la interfase cemento-esmalte con mayores puntuaciones IRA de 0 y 1.
4. La concentración de 1% de NPsAg fue la que promovió mayor prevención de formación de LMB. Por otro lado, esta misma concentración presentó el potencial de mantener la cantidad relativa de iones fosfato (PO_4^{3-}) cercana al 70.41% respecto a los valores medidos en el esmalte sano. Así mismo, a mayor concentración de las NPsAg incorporadas en el cemento ortodéntico, la profundidad de la LMB fue menor.

VII. RECOMENDACIONES

1. Continuar con la línea de investigación para la evaluación y comprobación de las propiedades biológicas, mecánicas y físicas de distintas metodologías que permitan confirmar los resultados observados en esta investigación.
2. Sintetizar nanopartículas de plata a partir de productos naturales como las plantas medicinales y verificar sus propiedades como agente antimicrobiano y preventivo de la formación de lesiones de mancha blanca.
3. Promover diseños de investigación *in vitro* para comprobar las propiedades de otros agentes antibacterianos a base de productos naturales oriundos de nuestro país que permitan la prevención de las lesiones de mancha blanca.
4. Promover la realización de investigaciones clínicas que permitan confirmar los resultados observados en la presente investigación *in vitro*.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Richter AE, Arruda AO, Peters MC, Sohn W. Incidence of caries lesions among patients treated with comprehensive orthodontics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;139(5):657-64.
2. Benkaddour A, Bahije L, Bahoum A, Zaoui F. L'orthodontie et les déminéralisations amélares: étude clinique des facteurs de risque. *Int Orthod.* 2014;12(4):458–66.
3. Khoroushi M, Kachuie M. Prevention and Treatment of White Spot Lesions in Orthodontic Patients. *Contemp Clin Dent.* 2017;8(1):11-19.
4. Eltayeb MK, Ibrahim YE, El Karim IA, Sanhoury NM. Distribution of white spot lesions among orthodontic patients attending teaching institutes in Khartoum. *BMC Oral Health.* 2017;17(1):88.
5. Migliorati M, Isaia L, Cassaro A, Rivetti A, Silvestrini-Biavati F, Gastaldo L, Piccardo I, Dalessandri D, Silvestrini-Biavati A. Efficacy of professional hygiene and prophylaxis on preventing plaque increase in orthodontic patients with multibracket appliances: a systematic review. *Eur J Orthod.* 2015;37(3):297-307.
6. Lopatiene K, Borisovaite M, Lapenaite E. Prevention and Treatment of White Spot Lesions During and After Treatment with Fixed Orthodontic Appliances: a Systematic Literature Review. *J Oral Maxillofac Res.* 2016;7(2):e1.

7. Cosma LL, Şuhani RD, Mesaroş A, Badea ME. Current treatment modalities of orthodontically induced white spot lesions and their outcome - a literature review. *Med Pharm Rep.* 2019;92(1):25-30.
8. Sodagar A, Akhavan A, Hashemi E, Arab S, Pourhajibagher M, Sodagar K, Kharrazifard MJ, Bahador A. Evaluation of the antibacterial activity of a conventional orthodontic composite containing silver/hydroxyapatite nanoparticles. *Prog Orthod.* 2016;17(1):40.
9. Torres-Garcia ML, Llavore LD, Bungay A, Sarol JD Jr, Pineda RR, Peñas KD. Benzalkonium chloride in an orthodontic adhesive: Its effect on rat enamel demineralization using color-based image analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2019;155(1):88-97.
10. Poosti M, Ramazanzadeh B, Zebarjad M, Javadzadeh P, Naderinasab M, Shakeri MT. Shear bond strength and antibacterial effects of orthodontic composite containing TiO₂ nanoparticles. *Eur J Orthod.* 2013;35(5):676-9.
11. Yassaei S, Nasr A, Zandi H, Motallaei MN. Comparison of antibacterial effects of orthodontic composites containing different nanoparticles on *Streptococcus mutans* at different times. *Dental Press J Orthod.* 2020;25(2):52-60.
12. Degrazia FW, Leitune VC, Garcia IM, Arthur RA, Samuel SM, Collares FM. Effect of silver nanoparticles on the physicochemical and antimicrobial properties of an orthodontic adhesive. *J Appl Oral Sci.* 2016;24(4):404-10.
13. Sodagar A, Akhoundi MSA, Bahador A, Jalali YF, Behzadi Z, Elhaminejad F, Mirhashemi AH. Effect of TiO₂ nanoparticles incorporation on

- antibacterial properties and shear bond strength of dental composite used in Orthodontics. *Dental Press J Orthod*. 2017;22(5):67-74.
14. Sodagar A, Bahador A, Pourhajibagher M, Ahmadi B, Baghaeian P. Effect of Addition of Curcumin Nanoparticles on Antimicrobial Property and Shear Bond Strength of Orthodontic Composite to Bovine Enamel. *J Dent (Tehran)*. 2016;13(5):373-382.
 15. Allaker RP, Memarzadeh K. Nanoparticles and the control of oral infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43(2):95-104.
 16. Song W, Ge S. Application of Antimicrobial Nanoparticles in Dentistry. *Molecules*. 2019;24(6):1033.
 17. Vimbela GV, Ngo SM, Frazee C, Yang L, Stout DA. Antibacterial properties and toxicity from metallic nanomaterials. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:3941-3965.
 18. Yin IX, Zhang J, Zhao IS, Mei ML, Li Q, Chu CH. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:2555-2562.
 19. Eslamian L, Borzabadi-Farahani A, Karimi S, Saadat S, Badiie MR. Evaluation of the Shear Bond Strength and Antibacterial Activity of Orthodontic Adhesive Containing Silver Nanoparticle, an In-Vitro Study. *Nanomaterials (Basel)*. 2020;10(8):1466.
 20. Reddy YG, Sharma R, Singh A, Agrawal V, Agrawal V, Chaturvedi S. The Shear Bond Strengths of Metal and Ceramic Brackets: An in-Vitro Comparative Study. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(7):1495-7.

21. Akhavan A, Sodagar A, Mojtahedzadeh F, Sodagar K. Investigating the effect of incorporating nanosilver/nanohydroxyapatite particles on the shear bond strength of orthodontic adhesives. *Acta Odontol Scand.* 2013;71(5):1038-42.
22. Sayed M, Hiraishi N, Matin K, Abdou A, Burrow MF, Tagami J. Effect of silver-containing agents on the ultra-structural morphology of dentinal collagen. *Dent Mater.* 2020;36:936-944.
23. Eslami N, Ahrari F, Rajabi O, Zamani R. The staining effect of different mouthwashes containing nanoparticles on dental enamel. *J Clin Exp Dent.* 2015;7(4):e457-61.
24. Knight GM, McIntyre JM, Craig GG, Mulyani, Zilm PS, Gully NJ. Differences between normal and demineralized dentine pretreated with silver fluoride and potassium iodide after an in vitro challenge by *Streptococcus mutans*. *Aust Dent J.* 2007;52(1):16-21.
25. Horst JA, Ellenikiotis H, Milgrom PL. UCSF Protocol for caries arrest using silver diamine fluoride: rationale, indications and consent. *J Calif Dent Assoc.* 2016;44:16–28.
26. Altmann AS, Collares FM, Ogliari FA, Samuel SM. Effect of methacrylated-based antibacterial monomer on orthodontic adhesive system properties. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2015;147(4 Suppl):S82-7.
27. Yin IX, Zhao IS, Mei ML, Lo ECM, Tang J, Li Q, So LY, Chu CH. Synthesis and Characterization of Fluoridated Silver Nanoparticles and

- Their Potential as a Non-Staining Anti-Caries Agent. *Int J Nanomedicine*. 2020;15:3207-3215.
28. Toodehzaeim MH, Zandi H, Meshkani H, Hosseinzadeh Firouzabadi A. The Effect of CuO Nanoparticles on Antimicrobial Effects and Shear Bond Strength of Orthodontic Adhesives. *J Dent (Shiraz)*. 2018;19(1):1-5.
 29. Saito K, Hayakawa T, Kawabata R, Meguro D, Kasai K. Antibacterial activity and shear bond strength of 4-methacryloxyethyl trimellitate anhydride/methyl methacrylate-tri-n-butyl borane resin containing an antibacterial agent. *Angle Orthod*. 2007;77(3):532-6.
 30. Sharma G, Wu W, Dalal E. The CIEDE2000 color-difference formula: implementation notes, supplementary test data, and mathematical observations. *Color Res Appl*. 2005;30:21–30.
 31. Jahanbin A, Basafa M, Moazzami M, Basafa B, Eslami N. Color stability of enamel following different acid etching and color exposure times. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2014;8:67–70.
 32. Zaher AR, Abdalla EM, Abdel Motie MA, Rehman NA, Kassem H, Athanasiou AE. Enamel colour changes after debonding using various bonding systems. *J Orthod*. 2012;39:82–88.
 33. Luo MR, Cui G, Rigg B. The Development of the CIE 2000 Colour-Difference Formula: CIEDE2000. *Color Res Appl*. 2001; 26(5):340-350.
 34. Altmann AS, Collares FM, Leitune VC, Arthur RA, Takimi AS, Samuel SM. In vitro antibacterial and remineralizing effect of adhesive containing triazine and niobium pentoxide phosphate inverted glass. *Clin Oral Investig*. 2017;21(1):93-103.

35. de Almeida RM, Hass V, Sasaki DY, Berger SB, Fernandes TM, Tonetto MR. The impact of different surface treatments on the shear bond strength of orthodontic metal brackets applied to different CAD/CAM composites. *J Clin Exp Dent*. 2021;13(6):e608-e613.
36. Artun J, Bergland S. Clinical trials with crystal growth conditioning as an alternative to acid-etch enamel pretreatment. *Am J Orthod*. 1984;85(4):333-40.
37. Restrepo M, Bussaneli DG, Jeremias F, Cordeiro RC, Magalhães AC, Palomari Spolidorio DM, Santos-Pinto L. Control of white spot lesion adjacent to orthodontic bracket with use of fluoride varnish or chlorhexidine gel. *ScientificWorldJournal*. 2015;2015:218452.
38. De Campos PH, Sanabe ME, Rodrigues JA, Duarte DA, Santos MT, Guaré RO, Duque C, Lussi A, Diniz MB. Different bacterial models for in vitro induction of non-cavitated enamel caries-like lesions: Microhardness and polarized light microscopy analyses. *Microsc Res Tech*. 2015;78(6):444-51.
39. Livas C, Kuijpers-Jagtman AM, Bronkhorst E, Derks A, Katsaros C. Quantification of white spot lesions around orthodontic brackets with image analysis. *Angle Orthod*. 2008;78(4):585-90.
40. Al-Obaidi, R., Salehi, H., Desoutter, A. *et al*. Chemical & Nano-mechanical Study of Artificial Human Enamel Subsurface Lesions. *Sci Rep*. 2018;8:4047.

41. Heravi F, Ahrari F, Tanbakuchi B. Effectiveness of MI Paste Plus and Remin Pro on remineralization and color improvement of postorthodontic white spot lesions. *Dent Res J (Isfahan)*. 2018;15(2):95-103.
42. Bhadoria N, Gunwal MK, Kukreja R, Maran S, Devendrappa SN, Singla S. An *In Vitro* Evaluation of Remineralization Potential of Functionalized Tricalcium Phosphate Paste and CPP-ACPF on Artificial White Spot Lesion in Primary and Permanent Enamel. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2020;13(6):579-584.
43. Swamy DF, Barretto ES, Mallikarjun SB, Dessai SSR. In vitro Evaluation of Resin Infiltrant Penetration into White Spot Lesions of Deciduous Molars. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(9):ZC71-ZC74.
44. aafif HA, Alibrahim IF, Alotaibi SH, Alharbi HG, Shubaily MN, Elkwatehy WMA. The Efficacy of Resin Infiltrant and Casein Phosphopeptide-amorphous Calcium Fluoride Phosphate in Treatment of White Spot Lesions (Comparative Study). *J Int Soc Prev Community Dent*. 2020;10(4):438-444.
45. Tahmasbi S, Mousavi S, Behroozibakhsh M, Badiie M. Prevention of white spot lesions using three remineralizing agents: An in vitro comparative study. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2019;13(1):36-42.
46. Welk A, Ratzmann A, Reich M, Krey KF, Schwahn C. Effect of self-assembling peptide P₁₁₋₄ on orthodontic treatment-induced carious lesions. *Sci Rep*. 2020;10(1):6819.
47. Lale S, Solak H, Hınçal E, Vahdettin L. In Vitro Comparison of Fluoride, Magnesium, and Calcium Phosphate Materials on Prevention of White Spot

- Lesions around Orthodontic Brackets. *Biomed Res Int.* 2020;2020:1989817.
48. Amaechi BT, McGarrell B, Luong MN, Okoye LO, Gakunga PT. Prevention of white spot lesions around orthodontic brackets using organoselenium-containing antimicrobial enamel surface sealant. *Heliyon.* 2021;7(3):e06490.
 49. Mahmoudzadeh M, Alijani S, Soufi LR, Farhadian M, Namdar F, Karami S. Effect of CO2 Laser on the Prevention of White Spot Lesions During Fixed Orthodontic Treatment: A Randomized Clinical Trial. *Turk J Orthod.* 2019;32(3):165-171.
 50. Liao C, Li Y, Tjong SC. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 2019;20(2):449.
 51. Bapat RA, Chaubal T V, Joshi CP, Bapat PR, Choudhury H, Pandey M, et al. An overview of application of silver nanoparticles for biomaterials in dentistry. *Mater Sci Eng C.* 2018;91:881–98.
 52. Almatroudi A. Silver nanoparticles: synthesis, characterisation and biomedical applications. *Open Life Sci.* 2020;15(1):819-839.
 53. Aydın N, Karaoğlanoğlu S, Oktay EA, Kılıçarslan MA. Investigating the color changes on resin-based CAD/CAM Blocks. *J Esthet Restor Dent.* 2020;32(2):251-256.
 54. Hernández-Sierra JF, Ruíz F, Castanedo-Cázares JP, Martínez-Ruiz V, Mandeville P, Pierdant-Pérez M, Gordillo-Moscoso A, Pozos-Guillén Ade J. In vitro determination of the chromatic effect of a silver nanoparticles

- solution linked to the gantrez S-97 copolymer on tooth enamel. *J Clin Pediatr Dent*. 2010;35(1):65-8.
55. Pandian A, Ranganathan S, Padmanabhan S. Enamel color changes following orthodontic treatment. *Indian J Dent Res*. 2017;28(3):330-336.
 56. Cörekçi B, Toy E, Oztürk F, Malkoç S, Oztürk B. Effects of contemporary orthodontic composites on tooth color following short-term fixed orthodontic treatment: a controlled clinical study. *Turk J Med Sci*. 2015;45(6):1421-8.
 57. Balhaddad AA, Garcia IM, Mokeem L, Alsahafi R, Collares FM, Sampaio de Melo MA. Metal Oxide Nanoparticles and Nanotubes: Ultrasmall Nanostructures to Engineer Antibacterial and Improved Dental Adhesives and Composites. *Bioengineering (Basel)*. 2021;8(10):146.
 58. Blöcher S, Frankenberger R, Hellak A, Schauseil M, Roggendorf MJ, Korbmacher-Steiner HM. Effect on enamel shear bond strength of adding microsilver and nanosilver particles to the primer of an orthodontic adhesive. *BMC Oral Health*. 2015;15:42.
 59. Reynolds R. A Review of Direct Orthodontic Bonding. *British Journal of Orthodontics*. 1975;2(3):171-178.
 60. Güçlü ZA, Alaçam A, Coleman NJ. A 12-Week Assessment of the Treatment of White Spot Lesions with CPP-ACP Paste and/or Fluoride Varnish. *Biomed Res Int*. 2016;2016:8357621.
 61. Tatano R, Berkels B, Ehrlich EE, Deserno TM, Fritz UB. Spatial agreement of demineralized areas in quantitative light-induced fluorescence images and digital photographs. *Dentomaxillofac Radiol*. 2018;47(8):20180099.

62. Ahn SJ, Lee SJ, Kook JK, Lim BS. Experimental antimicrobial orthodontic adhesives using nanofillers and silver nanoparticles. *Dent Mater.* 2009;25(2):206-13
63. Kirchner MT, Edwards HGM, Lucy D, Pollard AM. Ancient and Modern Specimens of Human Teeth : a Fourier Transform Raman Spectroscopic Study. *Journal of Raman Spectroscopy.* 1997;28:171–8.
64. Gallagher RR, Balooch M, Balooch G, Wilson RS, Marshall SJ, Marshall GW. Coupled Nanomechanical and Raman Microspectroscopic Investigation of Human Third Molar DEJ. *J Dent Biomech.* 2010;2010:256903.
65. Mohanty B, Dadlani D, Mahoney D, Mann AB. Characterizing and identifying incipient carious lesions in dental enamel using micro-Raman spectroscopy. *Caries Res.* 2013;47(1):27-33.
66. Huminicki A, Dong C, Cleghorn B, Sowa M, Hewko M, Choo-Smith LP. Determining the effect of calculus, hypocalcification, and stain on using optical coherence tomography and polarized Raman spectroscopy for detecting white spot lesions. *Int J Dent.* 2010;2010:879252.
67. Strachan CJ, Rades T, Gordon KC, Rantanen J. Raman spectroscopy for quantitative analysis of pharmaceutical solids. *J Pharm Pharmacol.* 2007;59(2):179-92.
68. Sadyrin E, Swain M, Mitrin B, Rzhepakovsky I, Nikolaev A, Irkha V, Yogina D, Lyanguzov N, Maksyukov S, Aizikovich S. Characterization of Enamel and Dentine about a White Spot Lesion: Mechanical Properties,

Mineral Density, Microstructure and Molecular Composition.
Nanomaterials (Basel). 2020 Sep 21;10(9):1889.

69. Yang S, Li B, Akkus A, Akkus O, Lang L. Wide-field Raman imaging of dental lesions. *Analyst*. 2014;139(12):3107-14.

IX. ANEXOS

Anexo 1: Constancia de aprobación del Comité de Ética en Investigación.



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

CONSTANCIA 310-15-19

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité Institucional de Ética en Investigación, bajo la categoría de revisión **EXENTO**. La aprobación será informada en la sesión más próxima del comité.

Título del Proyecto : "Propiedades biológicas y mecánicas de un cemento ortodóntico modificado con nanopartículas de propóleo para la prevención de lesiones de mancha blanca-Estudio in vitro".

Código de inscripción : 104007

Investigador principal : Sánchez Tito, Marco Antonio

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

1. Protocolo de investigación, versión recibida en fecha 03 de junio del 2019.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la Confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. La categoría de **EXENTO** es otorgado al proyecto por un periodo de cinco años en tanto la categoría se mantenga y no existan cambios o desviaciones al protocolo original. El investigador está exonerado de presentar un reporte del progreso del estudio por el periodo arriba descrito y solo alcanzará un informe final al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **03 de junio del 2024**.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 04 de junio del 2019.


Dra. Frine Samalvides Cuba
Presidenta
Comité Institucional de Ética en Investigación



/s/

Anexo 2: Constancia de enmienda del Comité de Ética en Investigación.



VICERRECTORADO
DE INVESTIGACIÓN

CONSTANCIA

El Presidente del Comité Institucional de Ética en Investigación (CIEI) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el comité institucional de ética en investigación aprobó la ENMIENDA/MODIFICACIÓN del proyecto de investigación señalado a continuación.

Título del Proyecto : “Propiedades biológicas y mecánicas de un cemento ortodóntico modificado con nanopartículas de plata para la prevención de lesiones de mancha blanca – Estudio in vitro”

Código de inscripción : 104007

Investigador principal : Sánchez Tito, Marco Antonio

La enmienda/modificación corresponde a los siguientes documentos:

1. Protocolo de investigación, versión recibida en fecha 22 de febrero del 2022.

Lima, 26 de abril del 2022.

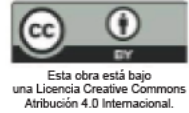

Dr. Luis Arturo Pedro Saona Ugarte
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación

/cht

Av. Honorio Delgado 430
San Martín de Porres
Apartado postal 4314
319 0000 Anexo 201302
vriuve@oficinas-upch.pe
www.cayetano.edu.pe

Anexo 3: Publicaciones.

Rev Estomatol Herediana. 2021 Ene-Mar;31(1):44-52
DOI: <https://doi.org/10.20453/reh.v31i1.3925>



Lesiones de mancha blanca en pacientes con tratamiento de ortodoncia. Revisión de la Literatura

White spot lesions in patients with orthodontic treatment. Literature review.

Marco Antonio Sanchez-Tito ^{1,a;2,b}, Lidia Yileng Tay Chu Jon ^{2,c}

RESUMEN

Las lesiones de mancha blanca son efectos adversos frecuentes en los pacientes con tratamiento de ortodoncia. Son producto del ataque de ácidos orgánicos capaces de desorganizar la estructura del esmalte y su formación está asociada a la presencia de factores de riesgo como el tiempo prolongado de tratamiento ortodóntico, la mala higiene bucal y edades tempranas de inicio de tratamiento. En la literatura existen diversos métodos de diagnóstico para este tipo de lesiones, así como diversas propuestas para su prevención y/o tratamiento. El objetivo de esta revisión de literatura es presentar la evidencia científica relacionada a la formación de las lesiones de mancha blanca, su prevalencia, factores de riesgo asociados a su formación, así como describir los métodos de diagnóstico más frecuentes y los mecanismos de prevención y de tratamiento.

PALABRAS CLAVE: Ortodoncia, mancha blanca, caries dental.

SUMMARY

White spot lesions are common side effects in patients with orthodontic treatment. They are the product of the attack of organic acids capable of disorganizing the structure of the enamel and its formation is associated with the presence of risk factors such as prolonged orthodontic treatment time, poor oral hygiene and early treatment initiation ages. In the literature there are various diagnostic methods for this type of lesions, as well as various proposals for prevention and/or treatment. The aim of this literature review is to present the scientific evidence related to the formation of white spot lesions, their prevalence, risk factors associated with their formation, and to describe the most frequent diagnostic methods and mechanisms of prevention and treatment.

KEYWORDS: Orthodontics, white spot, dental caries.

- 1 Universidad Privada de Tacna. Tacna, Perú.
- 2 Facultad de Estomatología, Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima, Perú
- a Especialista en Ortodoncia y Ortopedia Maxilar.
- b Estudiante de Doctorado en Estomatología.
- c Docente de Doctorado en Estomatología.

Journal section: Orthodontics

Publication Types: Research

doi:10.4317/jced.58330

https://doi.org/10.4317/jced.58330

Antibacterial and white spot lesions preventive effect of an orthodontic resin modified with silver-nanoparticles

Marco Sánchez-Tito ^{1,2}, Lidia-Yileng Tay ¹

¹ Facultad de Estomatología, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru

² Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Privada de Tacna, Tacna, Peru

Correspondence:

Facultad de Estomatología
Universidad Peruana Cayetano Heredia
Av. Salaverry 2475, San Isidro 15076
Lima, Perú
marcosanchez2183@gmail.com

Sánchez-Tito M, Tay LY. Antibacterial and white spot lesions preventive effect of an orthodontic resin modified with silver-nanoparticles. J Clin Exp Dent. 2021;13(7):e685-91.

Received: 12/02/2021
Accepted: 15/03/2021

Article Number: 58330 <http://www.medicinaoral.com/odo/index.htm>
© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - eISSN: 1989-5488
eMail: jced@jced.es
Indexed in:
PubMed
PubMed Central® (PMC)
Scopus
DOI® System

Abstract

Background: To evaluate the antibacterial property of a modified orthodontic resin with different concentrations of silver-nanoparticles (AgNPs), and quantify its preventive effect on the formation of white spot lesions (WSLs). **Material and Methods:** An orthodontic resin (Transbond XT) was modified with four concentrations of AgNPs (1%, 0.5%, 0.1%, and 0.05%), the orthodontic resin without AgNPs was used as control. Polymerized resin discs (n=80) were submitted to Agar diffusion test on Petri dishes inoculated with *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus*. In addition, resin discs of each group (n=40) were placed in 96-well plates with bacterial suspensions to evaluate the colony-forming-units (CFU). For the WSLs prevention test, brackets were bonded with the experimental orthodontic resins on 45 premolars (n=5), and were subjected to a microbiological caries induction method for 9 days. Photographs were taken before and after the test, and the images were evaluated with the Image J software to calculate the area of WSLs. The data were analyzed using ANOVA and Tukey-HSD test, Student's t-test and Kruskal-Wallis test ($\alpha=0.05$).

Results: The 0.5% and 1% AgNPs modified resin inhibit the growth of *S. mutans* and *L. acidophilus*. All the modified resins showed significantly less CFU, when compared to the control ($p<0.05$). 1% AgNPs resin promote the higher prevention of WSLs formation. There was no significant difference between the control group and the 0.1% and 0.05% groups.

Conclusion: 0.5% and 1% of AgNPs modified orthodontic resin exhibit an important antibacterial activity against *S. mutans* and *L. acidophilus*, and prevent the formation of WSLs.

Key words: White spot lesions, antibacterial, orthodontics, adhesive, Silver-nanoparticles.

Introduction

The most common complication in orthodontic treatment with fixed appliances is the high prevalence of demineralization of enamel caused by the bacterial biofilm

accumulation around orthodontic brackets, particularly in the gingival margin, that can affect nearly 70% of the orthodontic patients (1,2). Poor oral hygiene can increase the colonization of *Streptococcus mutans* and *Lacto-*

Journal section: Orthodontics
Publication Types: Research

doi:10.4317/jced.59224
<https://doi.org/10.4317/jced.59224>

Effect of an orthodontic resin modified with silver-nanoparticles on enamel color change

Marco Sánchez-Tito ^{1,2}, Lidia-Yileng Tay ¹

¹ Facultad de Estomatología, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru

² Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Privada de Tacna, Tacna, Peru

Correspondence:
Facultad de Estomatología
Universidad Peruana Cayetano Heredia
Av. Salaverry 2475, San Isidro 15076
Lima, Perú
marcosanchez2183@gmail.com

Sánchez-Tito M, Tay LY. Effect of an orthodontic resin modified with silver-nanoparticles on enamel color change. J Clin Exp Dent. 2022;14(3):e241-6.

Received: 06/11/2021
Accepted: 27/12/2021

Article Number: 59224 <http://www.medicinaoral.com/odo/index.htm>
© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - eISSN: 1989-5488
eMail: jced@jced.es
Indexed in:
Pubmed
Pubmed Central® (PMC)
Scopus
DOI® System

Abstract

Background: To evaluate the effect of an orthodontic resin modified with various concentrations of silver-nanoparticles (AgNPs) on enamel color.

Material and Methods: Twenty lower premolars were collected and divided into four groups (n = 5) according to the concentration of AgNPs (0.05%, 0.1%, 0.5%, and 1% wt/wt). Additionally, a group bonded with a conventional resin was used as control (n=5). Previous to the bracket bonding, enamel color was measuring with a spectrophotometer. Specimens were stored for 6 months in deionized water. Brackets were debonded and color changes of enamel were calculated with the CIEDE 2000 formula (ΔE_{00}). One-way ANOVA and Tukey test were used to assess the color change ($\alpha = .05$).

Results: The control group showed the lowest ΔE_{00} values, and no significant difference was observed when compared to the group with 0.05% of AgNPs ($P > .05$). The highest color change was observed in the group with 1% of AgNPs ($\Delta E_{00} = 8.04 \pm 1.48$), however no significant difference was observed between groups with 0.1% and 0.5% AgNPs.

Conclusions: The incorporation of AgNPs into orthodontic resin result in tooth color alteration. Lower concentrations of AgNPs should be considered to minimize negative changes in enamel color.

Key words: White spot lesions, antibacterial, orthodontics, adhesive, Silver-nanoparticles.

Introduction

White spot lesions (WSLs) are one of the adverse effects of orthodontic treatment, and can affect up to 50% of these patients (1,2). These lesions are the result of a process of enamel demineralization produced by the accumulation of biofilm in the regions close to the brackets

(3). Clinical situations where poor oral hygiene is associated with a higher consumption of fermentable carbohydrates will allow an increase in the colonization of acidogenic bacteria, which will lead to a reduction in the pH of the oral environment and promote the development of WSLs (4).

Anexo 4: Secuencia de imágenes.

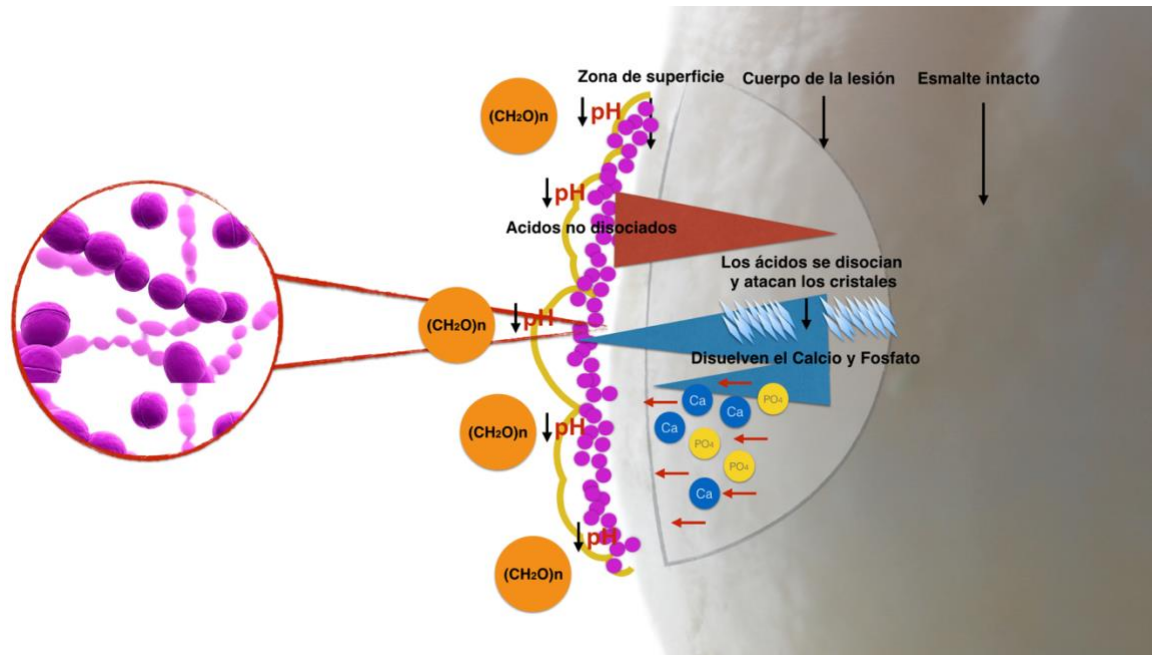


Imagen 1: Esquema del proceso de formación de la lesión de mancha blanca.

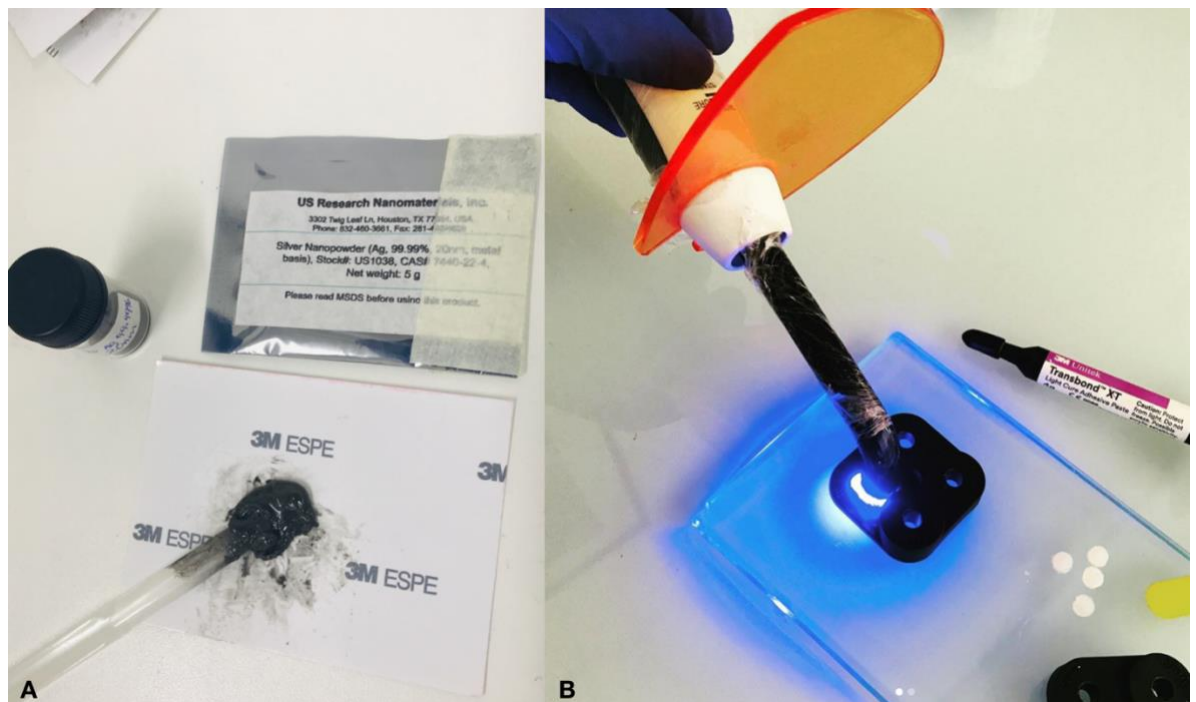


Imagen 2: (A) Preparación de la resina modificada con NPsAg. (B) fabricación de los discos de prueba.

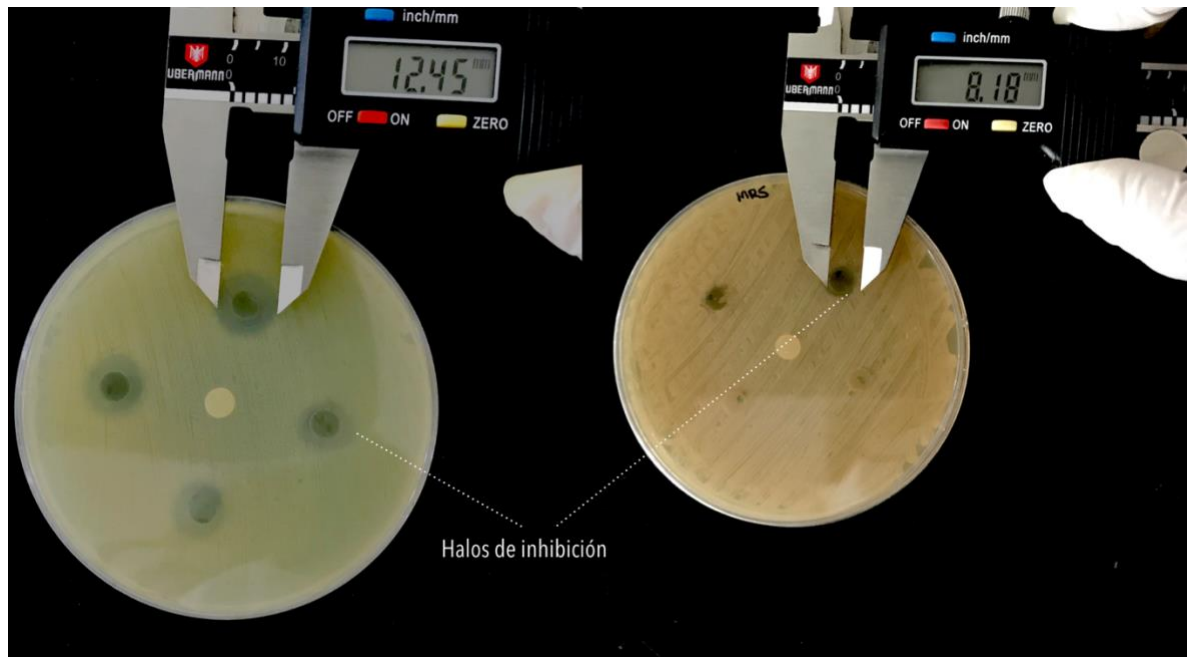


Imagen 3: Ensayo de difusión en agar. Halos de inhibición.

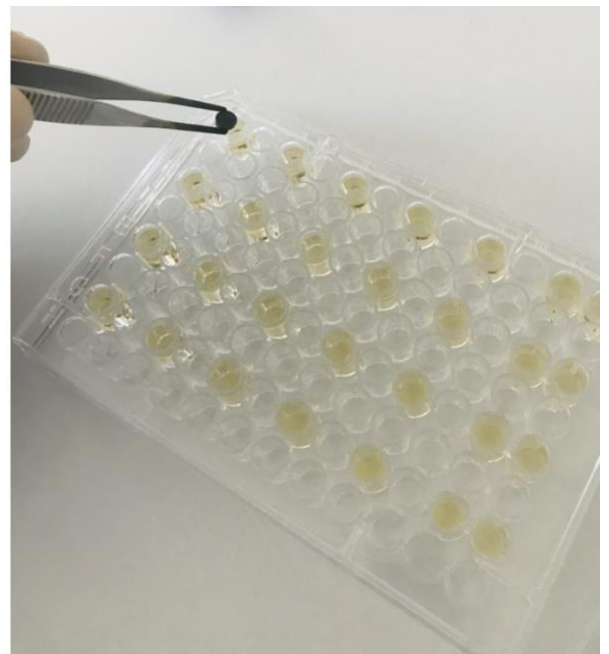
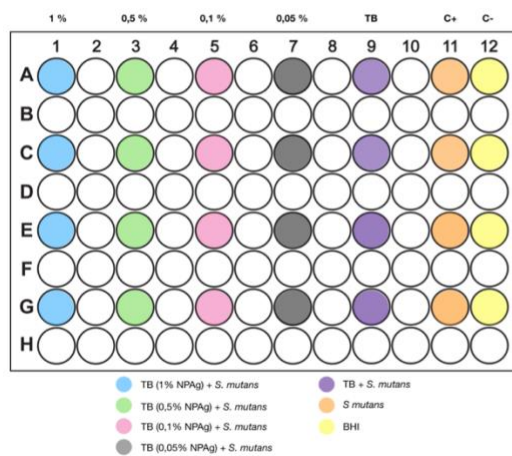


Imagen 4: Esquema de distribución en la microplaca de 96 pocillos.

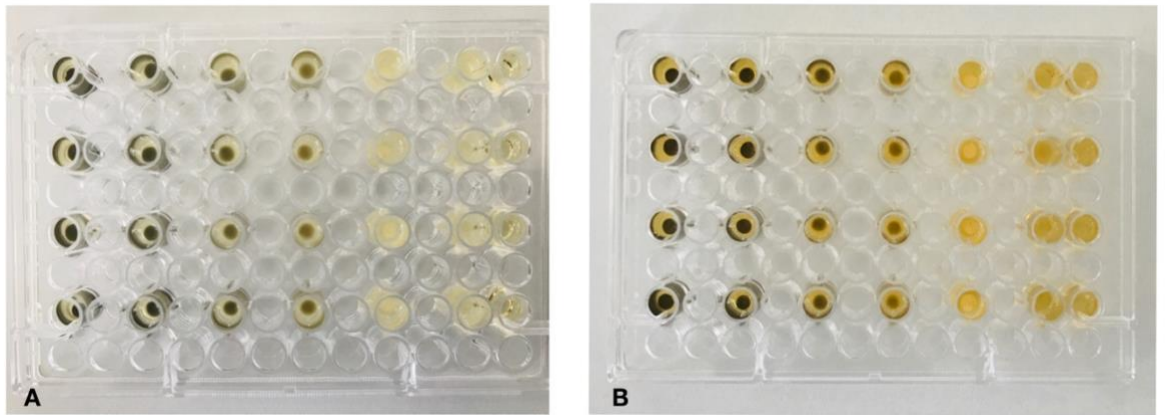


Imagen 5: *Microplacas de 96 pocillos con suspensiones de S. mutans (A) y L. acidophilus (B) para la prueba de actividad antibacteriana.*

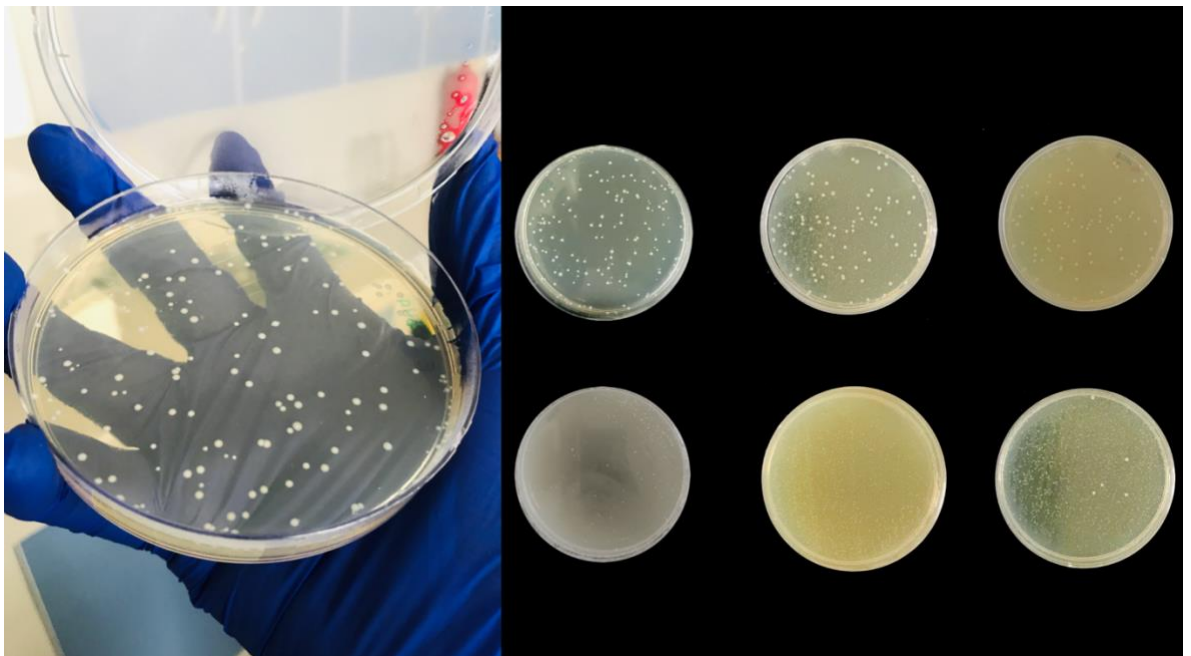


Imagen 6: *Unidades formadoras de colonias (UFC).*

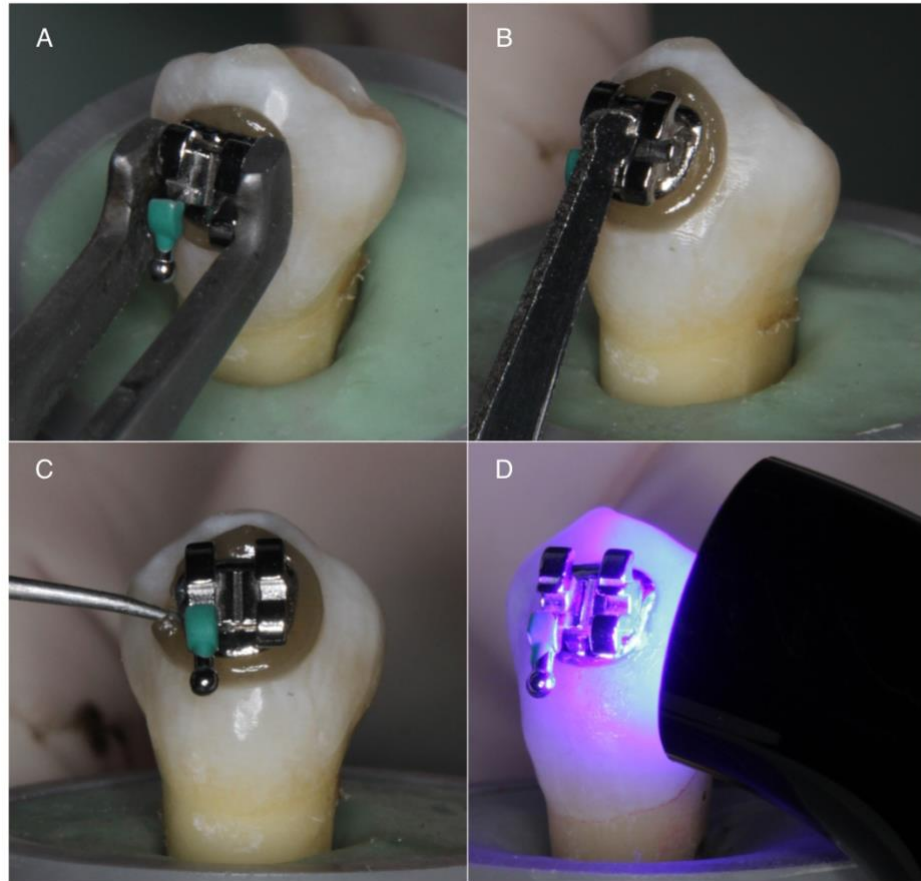


Imagen 7: Detalle del proceso de adhesión de los brackets con las resinas modificadas con NPsAg. (A) Posicionamiento del bracket. (B) Fuerza constante para estandarizar el grosor de la resina. (C) remoción de los excesos de resina. (D) Fotopolimerización.

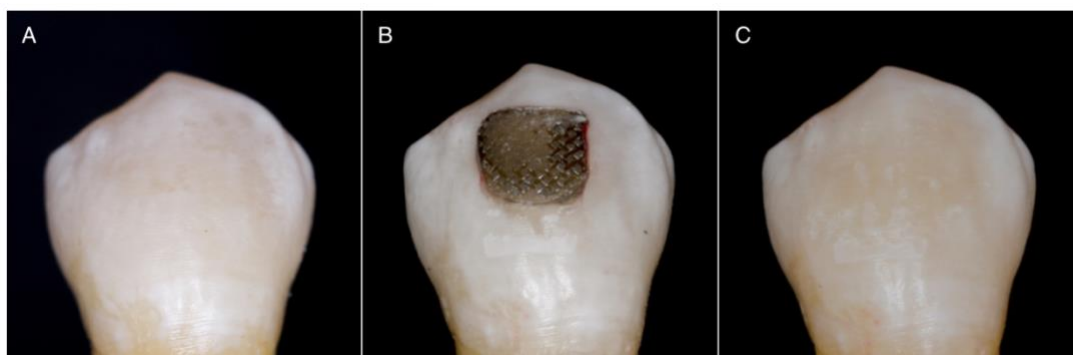


Imagen 8: Detalle de la muestra. (A) Apariencia inicial del esmalte. (B) Resina luego de la remoción del bracket luego de seis meses de almacenaje. (C) Apariencia final del esmalte luego de la remoción de la resina.



Imagen 9: Detalle del ensayo de cizallamiento.

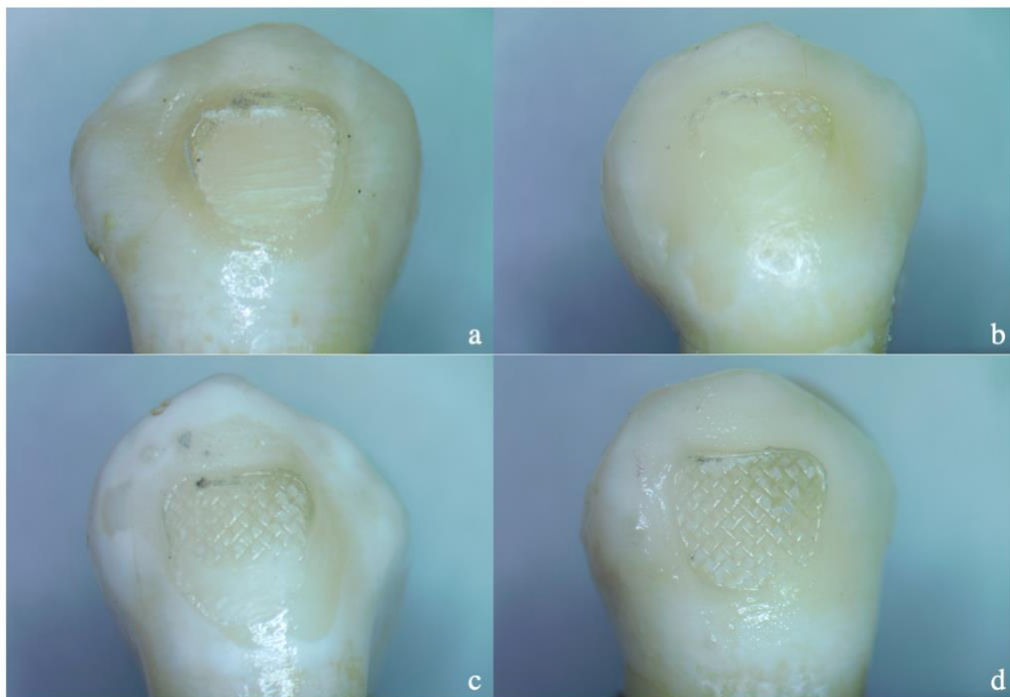


Imagen 10: Detalle de especímenes según IRA. (A) IRA 0 = nada de resina remanente en la superficie del diente. (B) IRA 1 = menos de la mitad de la resina remanente en la superficie del diente. (C) IRA 2 = más de la mitad de la resina remanente en el diente. (D) IRA 3 = toda la resina remanente en la superficie del diente con una impresión distintiva de la malla del bracket.

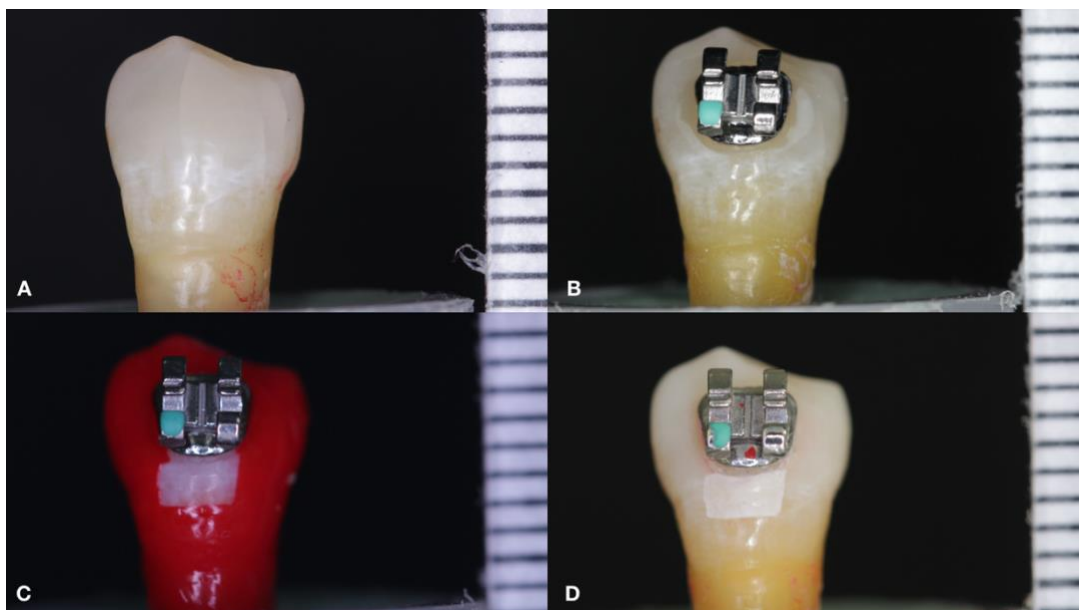


Imagen 11: Detalle de la muestra para la medición del área de formación de la LMB. (A) Apariencia inicial del esmalte. (B) Bracket adherido. (C) Colocación de esmalte y preparación de ventana de prueba. (D) Área de formación de la lesión de mancha blanca.

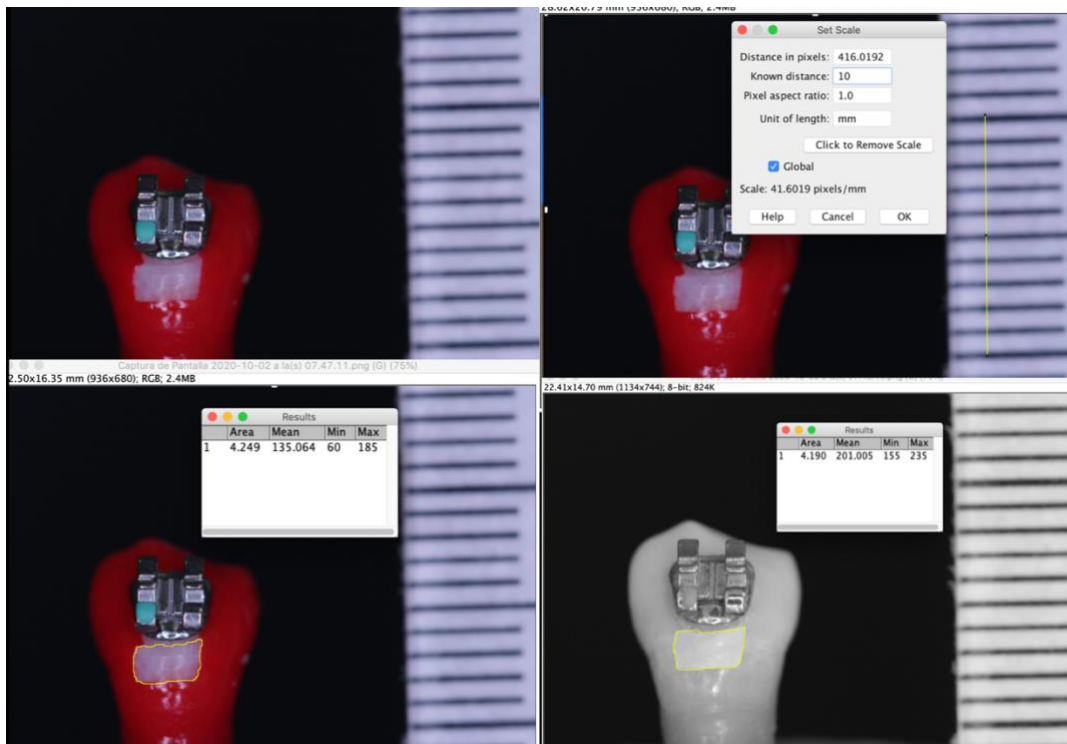


Imagen 12: Detalle de la aplicación del programa Image J para la medición del área de formación de la lesión de mancha blanca.

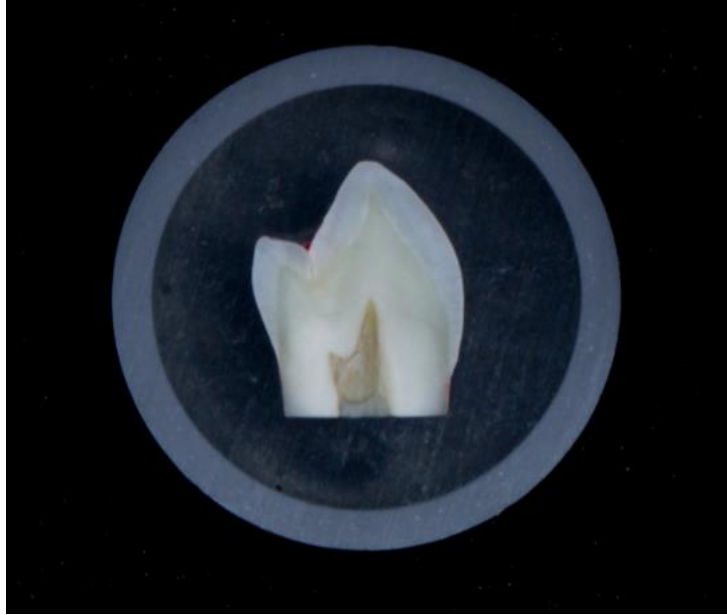


Imagen 13: Detalle de la preparación de la muestra para la medición de la intensidad del ion fosfato (PO_4^{3-}) bajo microscopía Raman.



Imagen 14: Muestra posicionada en el microscopio Raman,

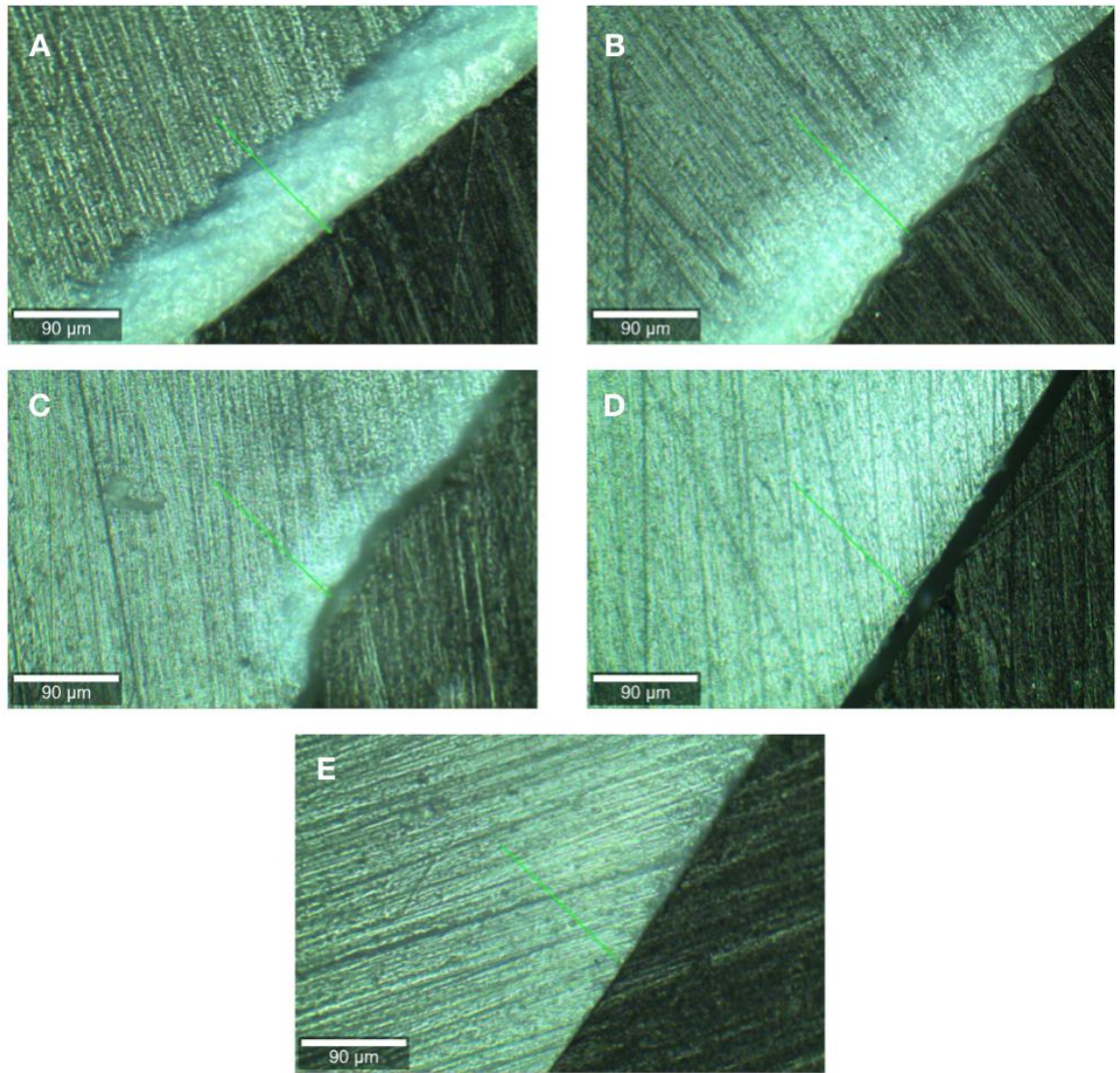


Imagen 15: Detalle de la formación de lesiones de mancha blanca en una muestra representativa de cada grupo según la concentración de nanopartículas de plata. (A) grupo control 0 % NPsAg. (B) 0.05 % NPsAg. (C) 0.1 % NPsAg. (D) 0.5 % NPsAg. (E) 1 % NPsAg.