

“ESPECIES DE *LACTOBACILLUS* SPP. PRESENTES EN SALIVA DE UN GRUPO DE NIÑOS CHILENOS DE 7 A 11 AÑOS CON Y SIN EXPERIENCIA DE CARIES”

Jacqueline Andrea Figueroa Carraha

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Claudia Lefimil

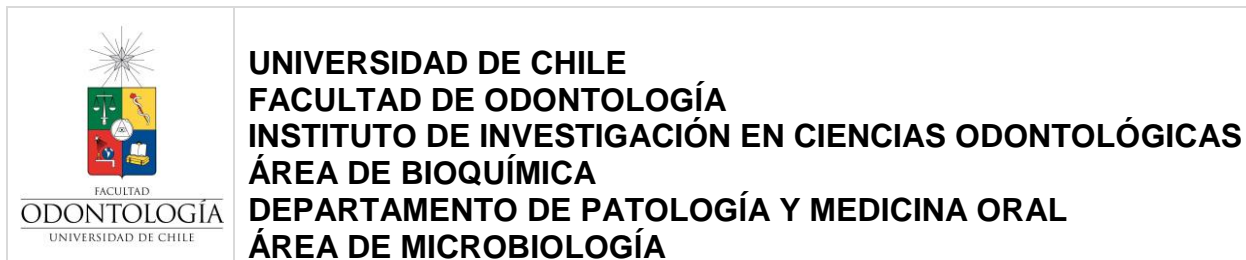
TUTORES ASOCIADOS

Dr. Andrés Celis

Adscrito a Proyecto U-Inicia Difarp 40/13, VID, U de Chile

Santiago - Chile

2016



“ESPECIES DE *LACTOBACILLUS* SPP. PRESENTES EN SALIVA DE UN GRUPO DE NIÑOS CHILENOS DE 7 A 11 AÑOS CON Y SIN EXPERIENCIA DE CARIES”

Jacqueline Andrea Figueroa Carraha

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Claudia Lefimil

TUTORES ASOCIADOS

Dr. Andrés Celis

Adscrito a Proyecto U-Inicia Difarp 40/13, VID, U de Chile

Santiago - Chile

2016

DEDICATORIA

A mis Padres, Víctor, Josefina y Nicolás, por ser los pilares de mi vida, los amo.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradeceré a mi familia, especialmente a mis padres por darme la oportunidad de cumplir mi sueño y por siempre apoyarme en todo y estar presentes cuando los he necesitado. Gracias, sin ustedes nada de esto sería posible.

A Víctor por compartir la vida conmigo y darme lo más maravilloso que tengo en este mundo, mis hijos Josefina y Nicolás.

A mis amigos que durante estos 6 años hemos compartido altos y bajos juntos y nos hemos apoyados para poder salir adelante. En especial a Dayana, Valentina, Tamara, Gustavo, Valeska y Catalina. Son grandes personas, los quiero mucho y me encantó haber podido compartir durante este tiempo con ustedes.

A mi tutor principal Claudia Lefimil por ser una gran persona, cercana y preocupada por el bienestar de todos los alumnos. Muchas gracias por todo, sin su ayuda esto habría sido aún más difícil.

Gracias a mi tutor asociado Andrés Célis por encaminarme hacia la realización de este trabajo.

A los docentes, compañeros y todas las personas con las que compartí durante todos estos años, los llevaré siempre en mi corazón. Gracias.

INDICE

1) Resumen	1
2) Marco Teórico	3
2.1) Caries Dental	3
2.2) Microbiota oral y caries dental	8
2.3) <i>Lactobacillus</i> spp. y cavidad oral	11
3) Hipótesis y Objetivos	15
4) Materiales y Métodos	16
4.1) Sujetos y examen clínico.....	16
4.2) Toma de muestras de saliva.....	17
4.3) Aislamiento y crecimiento de <i>Lactobacillus</i> spp. desde las muestras.....	17
4.4) Extracción de ADN.....	17
4.5) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	18
4.6) Electroforesis de ADN.....	18
4.7) Purificación de los fragmentos de ADN productos del PCR.....	19
4.8) Secuenciación e identificación de especies.....	20
4.9) Análisis estadísticos.....	20
5) Resultados.....	21
5.1) Características demográficas de los participantes.....	21
5.2) Crecimiento bacteriano.....	22

5.3) Purificación de ADN genómico y Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	23
5.4) Determinación de la especie por secuenciación y distribución según tipo de muestra.....	24
6) Discusión	27
7) Conclusiones	33
8) Referencias Bibliográficas	34
9) Anexos	41
12.1.- Carta de Aprobación del Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile	42
12.2.- Consentimiento Informado	45
12.3.- Ficha Clínica	47

1) RESUMEN

Introducción: La caries dental es la destrucción del tejido mineralizado que se produce por ácidos, generados por una biopelícula bacteriana en la superficie del diente. Esta biopelícula está compuesta por bacterias capaces de producir ácidos orgánicos, como producto de la fermentación de carbohidratos de la dieta. En la biopelícula dental, llamada también placa dental, es posible encontrar una amplia diversidad de microbiota oral, siendo los miembros del género *Lactobacillus* algunos de sus componentes. *Lactobacillus* spp. se han considerado, por décadas, agentes etiológicos de la caries dental, siendo aisladas desde sitios activos de caries y asociadas sistemáticamente con la presencia y progresión de esta patología. A la fecha, no existen reportes en Chile sobre la caracterización de especies de *Lactobacillus* presentes en la cavidad oral de sujetos, o de su asociación con caries.

Objetivo General: Determinar las especies de *Lactobacillus* presentes en saliva de un grupo de niños chilenos de 7 a 11 años de edad con y sin experiencia de caries.

Material y métodos: Participaron en el estudio 18 niños chilenos de 7 a 11 años de edad, 8 niños conformaron el grupo sin experiencia de caries y 10 niños el grupo con caries. Se tomó a cada niño una muestra de saliva no estimulada, las que se sembraron sobre la superficie de placas de medio de cultivo sólido MRS, que permite el aislamiento de *Lactobacillus* spp. Se seleccionaron colonias al azar para la extracción de su ADN y se realizó amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para *Lactobacillus* spp. Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar a Macrogen USA y las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando el programa BLAST para la identificación de las especies. Se realizó un análisis de asociación de éstas al tipo de muestras, mediante Test exacto de Fisher.

Resultados: En saliva de sujetos sin experiencia de caries se encontraron *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. casei/L. paracasei*, *L. gasseri/L. johnsonii* y *L. acidophilus*. En saliva de sujetos con caries se obtuvo crecimiento de *L. salivarius*, *L. acetotolerans*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. casei/ L. paracasei* y *L. gasseri/L. johnsonii*. Desde ambos tipos de muestras se obtuvieron además aislados clínicos de otras especies como por ejemplo *S. salivarius* y *S. vestibularis*. Al comparar ambos grupos se determinó que *L. salivarius* y *L. acetotolerans*, sólo fueron obtenidas a partir de muestras de saliva de niños con caries. *L. salivarius* presentó además una asociación estadísticamente significativa con esta condición ($p=0,002$). Por otra parte, *L. fermentum* fue la especie más abundante en la saliva de niños libres de caries, presentando una asociación estadísticamente significativa a las muestras de este grupo ($p=0,011$), y *L. acidophilus* sólo fue obtenida a partir de saliva de niños en esta condición.

Conclusiones: Las especies de *Lactobacillus* presentes en saliva de un grupo de niños chilenos de 7 a 11 años de edad con experiencia de caries difieren de las presentes en saliva de niños sin experiencia de caries.

2) MARCO TEORICO

2.1) Caries dental

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la caries dental es un problema importante para la salud pública a nivel mundial (Petersen, 2003). En la mayoría de los países industrializados se encuentran afectados del 60 al 90% de los escolares y una gran mayoría de los adultos (Petersen, 2003). Es además, la enfermedad oral más prevalente en varios países de Asia y América Latina, mientras que parece ser menos severa en muchos países africanos (Petersen, 2003).

En Chile, la prevalencia de caries dental aumenta sostenidamente con la edad, llegando casi al 100% en la población adulta. Estudios del Ministerio de Salud (MINSAL) señalan que la prevalencia de caries en nuestro país es de aproximadamente 16,8% a los 2 años, 49,6% a los 4 años, 70,4% a los 6 años, 64,5% a los 12 años, a los 15 años es de 73,9%, y sobre los 35 años es mayor a un 99% (Soto y cols., 2007a; Soto y cols., 2007b).

El impacto en los individuos y comunidades en cuanto a dolor, sufrimiento, alteración funcional y disminución en la calidad de vida es considerable (Sheiman, 2005). En asociación a los determinantes socio-ambientales se considera una enfermedad crónica, ya que está muy ligada al estilo de vida de las personas, y se encuentran más afectadas las poblaciones socialmente marginadas (Petersen, 2003; Selwitz y cols., 2007).

La caries dental se considera multifactorial, ya que se han encontrado asociaciones entre su prevalencia y factores socioeconómicos, como acceso a la educación y servicios de salud, con factores biológicos como la nutrición y la microbiota oral, y también con factores de comportamiento de las personas (Selwitz y cols., 2007; Dantas Cabral de Melo y cols., 2015).

La caries dental es la destrucción del tejido mineralizado dental, la que se produce por ácidos, generados por una biopelícula bacteriana en la superficie del diente. Esta biopelícula está compuesta, entre otros, por bacterias capaces de producir

ácidos orgánicos, como producto de la fermentación de carbohidratos de la dieta (Hojo y cols., 2009).

Es una enfermedad sitio específica, que se desarrolla debido a la pérdida en el equilibrio de los ciclos dinámicos normales de desmineralización y remineralización del esmalte y la dentina. Debido a esta dinámica, el proceso es lento. Sin embargo, si las condiciones ambientales cambian, por ejemplo, aumenta la frecuencia de consumo de azúcar o disminuye la secreción salival, combinado con mala higiene oral, se producen disminuciones en el pH ambiental, que alcanzan el nivel crítico de desmineralización del esmalte (pH 5,5) (Dong y cols., 1999) y el equilibrio entre des y remineralización estará a favor de una pérdida neta de minerales (Takahashi y Nyvad, 2011). En esta condición, la progresión de la enfermedad puede resultar en el desarrollo de cambios detectables en la estructura del diente, o lesión de caries, la cual inicialmente no es cavitada pero puede progresar a la cavitación (Fontana y cols., 2010). Debido a esta dinámica, la lesión de caries puede reparar en etapas tempranas, sin la intervención de operatoria, a través del incremento de una ganancia neta de minerales durante los ciclos de desmineralización y remineralización, mediante una reducción de los factores etiológicos, como son la biopelícula cariogénica, la dieta, y aumentando la eficacia de agentes remineralizadores como la saliva y fluoruros (González-Cabezas, 2010).

Los factores de riesgo de una persona para desarrollar caries pueden variar en el tiempo. Los factores de riesgo físicos y biológicos incluyen un inadecuado flujo y composición salival, un alto número de bacterias cariogénicas, una insuficiente exposición a flúor, recesión gingival, componentes inmunológicos, necesidad de cuidados especiales y factores genéticos (Selwitz y cols., 2007). Además, el riesgo de desarrollar caries también se afecta por pobre higiene oral, pobres hábitos dietarios, como consumo frecuente de carbohidratos refinados, uso frecuente de medicamentos e inapropiados métodos de alimentar a los niños (Selwitz y cols., 2007). Otros factores relacionados con el riesgo de caries incluyen pobreza, privación o status social, número de años de educación, cobertura dental, uso

de sellantes, uso de aparatos de ortodoncia y uso de prótesis (Selwitz y cols., 2007). Es conocido además, que niños con historia o evidencia de caries, o que sus padres o cuidadores presentan caries severas, tienen un mayor riesgo cariogénico (Selwitz y cols., 2007). Todos estos factores de riesgo se encuentran representados en la figura 1.

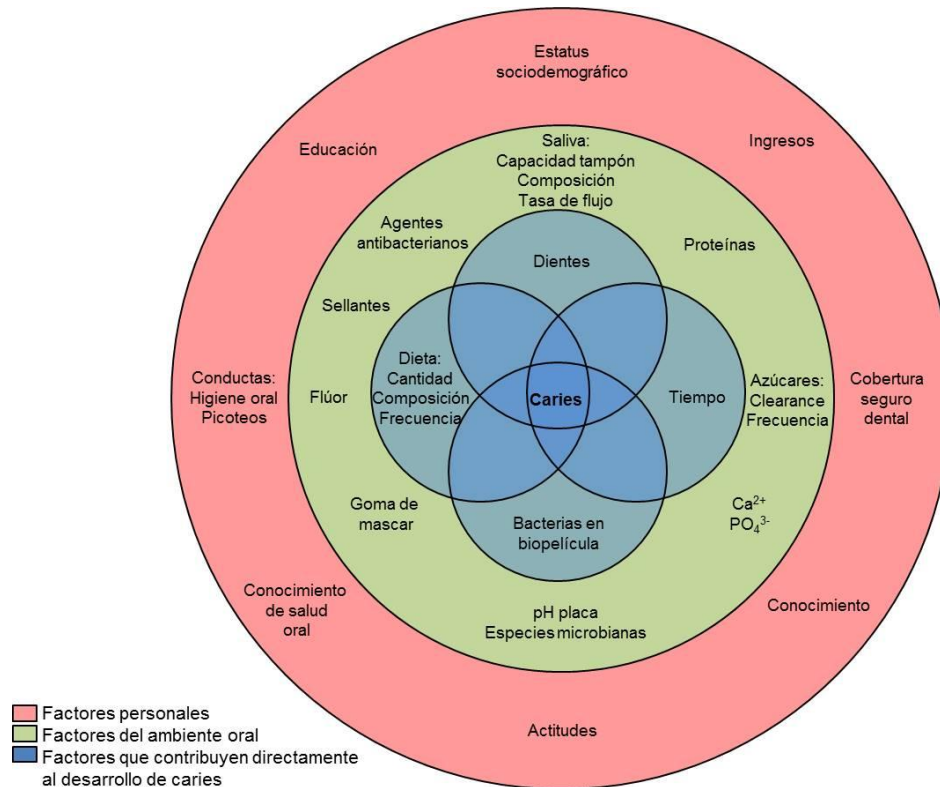


Figura 1. Factores de riesgo asociados al proceso de caries (Adaptado de Selwitz R. y cols., 2007).

Existen diversos criterios clínicos de detección de lesiones de caries. Entre ellos, se encuentran el criterio de la Organización Mundial de la Salud (OMS), ampliamente utilizado en epidemiología e investigación, además de otros criterios desarrollados desde el año 1999 a la fecha. El criterio estándar de la OMS considera presencia de caries cuando una lesión de punto y fisura o de superficie lisa tiene cavidad evidente, socavado en esmalte, o se detecta piso y/o paredes reblandecidas (OMS, 1997).

El índice COPD/ceod ha sido utilizado desde 1935 y fue creado por Klein, Palmer y Knutson. Se ha convertido en un índice fundamental en estudios odontológicos que se realizan para cuantificar la prevalencia de caries dental. Este índice señala la experiencia de caries, tanto presentes como pasadas, pues toma en cuenta los dientes con lesiones de caries y con tratamientos previamente realizados. El índice COPD se obtiene de la sumatoria de los dientes permanentes cariados, obturados o perdidos por caries, incluyendo las extracciones indicadas por caries. Solo considera 28 dientes, no incluyendo a terceros molares. El índice ceod se realiza en dientes temporales y también considera dientes cariados, perdidos y obturados por caries (Palmer y cols., 1938).

La OMS ha establecido diferentes niveles de severidad, de acuerdo a la prevalencia de caries medida a través de los índices COPD y ceod (Tabla 1) (OMS, 1997).

Tabla 1. Grados de severidad de la prevalencia de caries según la OMS para índice COPD y ceod.

Rango de valores	Grado de severidad
0,0 a 1,1	Muy bajo
1,2 a 2,6	Bajo
2,7 a 4,4	Moderado
4,5 a 6,5	Alto
6,6 o más	Muy alto

ICDAS (International Caries Detection and Assessment System) es un criterio simplificado, desarrollado en el año 2002, y posteriormente revisado en 2005, recibiendo el nombre de ICDAS II, diseñado para detectar seis diferentes estados del proceso de caries (Ismail y cols., 2007). El sistema abarca la detección de cambios tempranos clínicamente visibles en esmalte, hasta cavidades extensas en dentina. Las lesiones de caries se clasifican de acuerdo a su severidad y actividad a través de códigos que van desde el 0 al 6 (Tabla 2).

Tabla 2. Criterios para cada código del sistema ICDAS para diagnóstico de caries dental. (Adaptado desde Braga y cols., 2010).

Código	Criterio
0	Sin o leve cambio en la translucencia del esmalte luego de secar con aire por 5 segundos.
1	Primer cambio en esmalte visto solo después de un largo secado con aire o restringido a una cavidad o fisura.
2	Cambio visible en esmalte
3	Alteración localizada en esmalte, con decoloración u opacidad (sin alteración visible en dentina)
4	Mancha oscura en dentina subyacente
5	Cavidad distintiva con dentina visible
6	Cavidad distintiva extensa con dentina visible que envuelve más de la mitad de la superficie.

Los códigos mencionados deben ser aplicados por superficie; en la corona: mesial/distal, fosas y fisuras y vestibular/palatino; en la raíz; y en caries asociadas a restauraciones o sellantes. El sistema se encuentra validado y presenta un

protocolo de calibración intra e interexaminador. El desarrollo del sistema ICDAS ha permitido unificar criterios diagnósticos a nivel de la práctica clínica, epidemiología y educación en odontología. Su filosofía y fundamento van acordes con el conocimiento actual del inicio y progresión del proceso de caries y permiten que dicha información se refleje de manera fidedigna en las áreas clínica, epidemiológica y de investigación (Ismail y cols., 2007; Shivakumar y cols., 2009).

2.2) Microbiota oral y caries dental

La cavidad oral posee una numerosa, diversa y característica microbiota comensal, similar a otros hábitats del cuerpo (Dewhirst y cols., 2010). Esta microbiota no solo reside en forma pasiva, sino que contribuye a la mantención de la salud, a través de la promoción del sistema inmune y excluyendo microorganismos exógenos y muchas veces patógenos (Marsh, 2010). Se describe que hay más de 700 especies o filotipos bacterianos en boca, de los cuales, según la base de datos del microbioma oral humano HOMD (Human Oral Microbiome Database: www.homd.org), aproximadamente el 35% aún no han sido cultivados (Dewhirst y cols., 2010). La presencia de éstas varía en las distintas superficies, como son la lengua, mucosa y dientes, debido a que las condiciones ambientales en cada una son diferentes, convirtiendo a la cavidad oral en un complejo y versátil ecosistema. En cada una de estas superficies pueden formarse biopelículas, que son consorcios microbianos interactuantes entre sí, adheridas a una superficie y embebidas en una matriz extracelular (Marsh, 2010).

Uno de los mayores actores de este complejo ecosistema es la biopelícula dental, que se desarrolla en forma natural sobre la superficie de los dientes. Esta biopelícula muestra una organización compleja, que se mantiene relativamente estable en el tiempo. Cuando este equilibrio se compromete, se desarrollan patologías como la caries dental o la periodontitis (Kolenbrander y cols., 2010).

En la biopelícula dental, llamada también placa dental, es posible encontrar una amplia diversidad de microbiota oral. La superficie dental se cubre de una película

de moléculas derivadas de saliva, junto con fluido crevicular y bacterias. Inicialmente, solo unas pocas especies bacterianas son capaces de unirse a esta película (Marsh, 2010). Ellas se unen reversiblemente cerca de la superficie a través de fuerzas fisicoquímicas. Estas bacterias colonizadoras iniciales poseen adhesinas, mediante las cuales pueden unirse a receptores complementarios, y así estas especies pioneras comienzan a multiplicarse. El metabolismo de estos colonizadores modifica el ambiente local, por ejemplo haciéndolo más anaerobio. Luego, adhesinas de colonizadores secundarios, generalmente anaerobios obligados, se unen a las bacterias adheridas produciéndose la co-agregación o co-adhesión (Hojo y cols., 2009). Se producen polímeros extracelulares que consolidan la unión de la biopelícula. Esta biopelícula está espacial y funcionalmente organizada, y las condiciones heterogéneas dentro de ésta inducen nuevos patrones de expresión genética bacteriana (Hojo y cols., 2009; Marsh, 2010).

La microbiota residente oral es capaz de responder a los cambios ambientales. Modificaciones importantes en las condiciones locales pueden llevar a alteraciones en la composición y actividad metabólica de la microbiota, que pueden ser dañinas para la salud del hospedero (Marsh, 2010).

Con el tiempo, se han desarrollado tres hipótesis para explicar la etiología de las caries: la hipótesis de la placa específica, la hipótesis de la placa no específica y la hipótesis de la placa ecológica (Takahashi y Nyvad, 2008).

La hipótesis de la placa específica, proponía que unas pocas especies presentes en la placa dental estaban activamente envueltas en la enfermedad de caries. De este modo, la enfermedad podía controlarse con medidas preventivas e intervención contra estos organismos específicos (Loesche, 1979). La hipótesis de la placa no específica proponía que la enfermedad sería el resultado de la actividad de toda la microbiota de la placa (Theilade, 1986). Con el tiempo, a medida que existe un mayor entendimiento del metabolismo de los miembros de la biopelícula dental, ha surgido una nueva visión sobre el papel de la placa en el desarrollo de caries.

La hipótesis de la placa ecológica es el modelo aceptado en la actualidad. Esta hipótesis propone que la caries dental es consecuencia de un desbalance en la microbiota residente. Este desbalance se produce por un enriquecimiento en la comunidad de bacterias altamente cariogénicas, debido a condiciones de bajo pH en la placa dental (Marsh, 2003; Takahashi y Nyvad, 2008). Es por esto que se ha descrito que la caries dental sería una enfermedad endógena, causada por un cambio desde una simbiosis mutualista hacia una simbiosis parasítica del ecosistema microbiano oral. En esta condición ocurre una adaptación inducida por ácido, seguida de una selección de microorganismos acidúricos (resistentes a ácido). La producción de ácido por estos microorganismos es un factor directo en la desmineralización de las superficies dentarias, pero es también un determinante ambiental que influencia las propiedades fenotípicas y genotípicas de la microbiota oral a través de una selección y adaptación inducida por ácido (Takahashi y Nyvad, 2011).

Un gran número de estudios ha confirmado la fuerte asociación entre la presencia de *Streptococcus mutans* y el desarrollo de caries (Hamada y cols., 1980; Van Houte, 1980; Loesche, 1986). Sin embargo, estudios más recientes han demostrado que las caries pueden ser desarrolladas incluso en ausencia de éste (Takahashi & Nyvad, 2011). Se ha demostrado que bacterias de tipo *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Veillonella* y *Propionibacteria*, entre otros, complementan o substituyen a *S. mutans* en el proceso patológico de caries (Hojo y cols., 2009).

Por otro lado, también se ha descrito que la dominancia de ciertos microorganismos depende de la profundidad de la lesión de caries, encontrándose altos niveles de especies de *Actinomyces* y *Streptococcus* no-mutans en lesiones de mancha blanca, mientras que *S. mutans*, *Lactobacillus* spp., *Propionibacterium* spp. y *Bifidobacterium* spp. dominan en lesiones más avanzadas (Kianoush y cols., 2014).

2.3) *Lactobacillus* spp. y cavidad oral

Lactobacillus spp. son bacterias Gram positivo, con forma de bacilos, no esporuladas y catalasa negativo. Han sido aisladas a partir de una amplia variedad de hábitats que incluyen productos lácteos fermentados y no fermentados, tracto gastrointestinal y sistema reproductor humano (Klander y Weiss, 1986). La habilidad de *Lactobacillus* spp. de adaptarse a una amplia variedad de ambientes ecológicos está asociada a su plasticidad genómica. Esta adaptación hacia nuevos hospederos o ambientes se acompaña de una reducción del genoma con la adquisición de genes adicionales a través de duplicación y transferencia de genes horizontales (Caufield y cols., 2015).

Estos microorganismos se caracterizan por ser grandes productores de ácido láctico (acidogénicos), así como también por llevar a cabo su metabolismo resistiendo y tolerando la acidez del medio (acidúricos) (Cotter y Hill, 2003). Poseen un metabolismo fermentativo, que según la especie puede ser homoláctico, es decir, que solo produce ácido láctico, o heteroláctico, donde se produce además CO₂, ácido acético y etanol. Cualquiera sea el tipo de metabolismo utilizado, el resultado final es la producción de ácido, con la consecuente acidificación del medio que puede llegar a valores de pH menores a 4,5 (Piwat y cols., 2012).

Las especies del género *Lactobacillus* pueden diferir en su acidogenicidad, debido a variaciones en el metabolismo de la fermentación de azúcares (Almstahl y cols., 2012; Piwat y cols., 2012). Si bien todas las especies tienen la habilidad de producir ácido, lo hacen en diferentes tasas y cantidades, siendo *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *L. casei/paracasei*, y *L. plantarum* los mayores productores, disminuyendo el pH del medio más rápido que las otras especies (Piwat y cols., 2012). Esto es importante, pues podría tener un rol en el desarrollo de caries.

Se ha descrito que *Lactobacillus* spp. aparecen en la cavidad oral durante el primer año de edad en los niños, y se presentan en alto número en saliva, dorso de la lengua, mucosas, paladar duro y placa dental (Badet y Thebaud, 2008). Un

7,2% de los niños presentan *Lactobacillus* spp. a una edad temprana, lo que se explicaría por transferencia de microbiota materna durante el nacimiento, y el mantenimiento de esta microbiota en la cavidad oral (Teanpaisan y cols., 2007). Un aumento de *Lactobacillus* spp. en la cavidad oral ocurriría en un segundo periodo (18 a 24 meses) (Teanpaisan y cols., 2007). En población adulta en Tailandia, se determinó que un 54% portaban *Lactobacillus* spp. en saliva (Teanpaisan y cols., 2009).

En un estudio de Koll-Klais y cols. (2004), se analizó la presencia y composición del género *Lactobacillus* en muestras de saliva de niños escolares de Estonia, sin experiencia de caries. Se determinó que el 64% de los niños presentaba *L. fermentum*, seguido de *L. oris* que se encontró en un 45% de las muestras. *L. paracasei* y *L. plantarum* fueron encontrados en el 36% de los niños, seguidos de *L. salivarius* y *L. rhamnosus*, determinadas en el 27 y 18% de las muestras, respectivamente. Otras especies como *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. gasseri* y *L. crispatus* fueron también encontradas, pero en menor prevalencia.

Si bien *Lactobacillus* spp. son descritos como miembros de la microbiota nativa humana, se han considerado por décadas como agentes etiológicos de la caries dental, siendo aisladas desde sitios activos de caries y asociadas sistemáticamente con la presencia y progresión de esta patología (Van Houte y cols., 1981; Nancy y Dorignac, 1992; Marchant y cols., 2001; Byun y cols., 2004; Caufield y cols., 2007; Aas y cols., 2008; Preza y cols., 2009; Piwat y cols., 2010; Lima y cols., 2011; Wolff y cols., 2013; Kianoush y cols., 2014).

Nancy y Dorignac (1992), analizaron muestras de placa dental y dentina cariada, obtenidas de niños de 5 a 15 años de edad, encontrando presencia de *Lactobacillus* spp. en el 100% de las muestras de dentina cariada y en el 29% de las muestras de placa dental, determinando una correlación directa entre los índices ceod y COPD y la presencia de estos microorganismos en dentina. A partir de dentina cariada aislaron especies de *L. rhamnosus*, *L. pseudoplanarum*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. cellobiosus*, *L. fermentum* y *L. delbrueckii*, las mismas obtenidas a partir de las muestras de placa dental, con excepción de

L. pseudoplantarum. También realizaron la identificación de las especies de *Lactobacillus* presentes en saliva de niños sin caries, encontrando presencia de sólo algunas de las especies determinadas en las muestras de dentina y placa dental de los niños con caries: *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum* y *L. salivarius*.

Marchant y cols. (2001) también estudiaron la microbiota predominante en muestras de dentina infectada proveniente de lesiones de caries en niños, siendo las especies de *Lactobacillus* más frecuentemente aisladas *L. casei*, *L. fermentum* y *L. rhamnosus*. Caufield y cols. (2007), analizaron la diversidad de *Lactobacillus* spp. en la cavidad oral de mujeres jóvenes con lesiones de caries, y determinaron que *L. vaginalis*, *L. fermentum* y *L. salivarius* estaban presentes en gran parte de los sujetos estudiados.

Estudios realizados por Piwat y cols. (2010, 2012) en los que se analizaron muestras de saliva de niños y adultos tailandeses, evidenciaron una amplia heterogeneidad de especies de *Lactobacillus*, entre las cuales predominaban *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. fermentum* y *L. salivarius*. Además se determinó que *L. salivarius* era predominante en saliva de niños con altos niveles de caries y que *L. fermentum* era predominante tanto en los niños con caries como en aquellos libres de caries (Piwat y cols., 2010).

En un estudio realizado en 38 niños con caries temprana de la infancia severa, se determinó que las especies dominantes eran *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. casei/paracasei*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, y en menor medida *L. oris* y *L. vaginalis* (Caufield y cols., 2015).

Aunque los diferentes estudios no son comparables porque ellos difieren en las características de los sujetos de estudio (niños, adultos, ancianos, mujeres, hombres), en el sitio de muestra (saliva, placa dental, dentina, etc) y en los métodos utilizados para realizar el análisis, existe una tendencia común que indica que las especies encontradas en sujetos con caries difieren de las especies encontradas en sujetos libres de caries.

A la fecha, no existen reportes en Chile sobre la caracterización de especies de *Lactobacillus* presentes en la cavidad oral de sujetos, o de su asociación con caries. Por esto, en este estudio se planteó analizar las especies de *Lactobacillus* presentes en saliva de un grupo de niños sin experiencia de caries y en saliva de un grupo de niños con experiencia de caries. La saliva es el fluido que une los diferentes tejidos y estructuras de la cavidad oral, por lo que su análisis revela características de la microbiota oral, y se ha descrito que existe una correlación entre las especies de *Lactobacillus* presentes en saliva con aquellas presentes en placa dental y caries (Badet y Thebaud, 2008). De acuerdo a la literatura mencionada, es factible suponer que las especies de *Lactobacillus* spp. presentes en la cavidad oral de niños con caries difieren de las encontradas en niños sin caries.

La importancia de llevar a cabo este estudio radica en la obtención de una mayor comprensión del proceso patológico y del papel que juegan las diferentes especies de *Lactobacillus* en la etiopatogenia y epidemiología de las caries. Entender cómo se comportan y se distribuyen especies de *Lactobacillus* resulta útil para establecer grupos de riesgo portadores de especies con mayor correlación con la enfermedad, en los que sean necesarias medidas específicas de promoción, prevención, control y tratamiento de la caries dental.

3) HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPOTESIS.

Las especies de *Lactobacillus* presentes en saliva de un grupo de niños chilenos de 7 a 11 años de edad con experiencia de caries difieren de las presentes en saliva de niños sin experiencia de caries.

OBJETIVO GENERAL.

Determinar las especies de *Lactobacillus* presentes en saliva de un grupo de niños chilenos de 7 a 11 años de edad con y sin experiencia de caries.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1) Analizar las especies de *Lactobacillus* presentes en saliva de un grupo de niños chilenos de 7 a 11 años de edad con experiencia de caries.
- 2) Analizar las especies de *Lactobacillus* presentes en saliva de un grupo de niños chilenos de 7 a 11 años de edad sin experiencia de caries.
- 3) Comparar las especies de *Lactobacillus* presentes en saliva de un grupo de niños con caries versus saliva de un grupo de niños sin experiencia de caries.

4) MATERIALES Y METODOS.

4.1) Sujetos y examen clínico.

Este protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética Científica de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile. Se invitó a participar voluntariamente a niños Chilenos entre 7 a 11 años de edad. Estos niños pertenecían al Colegio Luis Galdames, el cual presenta un convenio con el departamento de extensión de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Para esto el investigador principal explicó los objetivos del proyecto de investigación al padre/madre del niño, solicitando que asistieran a la unidad de Diagnóstico de la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología. Posterior a su aceptación de participar y previa firma de consentimiento informado, se realizó un examen clínico bajo las condiciones de estandarización indicadas más adelante y se tomaron las muestras de saliva desde cada niño. Este examen clínico se realizó bajo luz artificial, en un box dental, utilizando instrumental estéril (sonda de caries y espejo n°5) y se determinó su experiencia de caries, que se expresó como índice ceod y COPD, de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud, 1997. Esto fue realizado por un examinador previamente calibrado (índice kappa de Cohen de 0,83.)

Los niños fueron divididos en dos grupos: 0 caries fue considerado como libre de experiencia de caries y 1 o más caries fueron considerados con experiencia de caries. Se reclutaron 8 niños sin caries y 10 niños con caries en dentina, cuyo número se determinó por conveniencia. Sujetos con experiencia de caries, pero sin lesiones activas no fueron incluidos en este estudio. Aquellos niños que, en el último mes, consumieron antibióticos o recibieron aplicación de flúor, tampoco fueron considerados para este estudio.

Se realizó un informe a los padres de la condición de salud oral actual de sus hijos, con recomendaciones para mejorarla y la entrega de kits con artículos para higiene oral a los niños y niñas participantes.

4.2) Toma de muestras de saliva.

Todas las muestras de saliva fueron recolectadas en tubos de plástico estériles y se tomó aproximadamente 1 ml de saliva no estimulada. Las muestras fueron almacenadas a 4°C por un tiempo breve, hasta su traslado al laboratorio de bioquímica y biología oral donde fueron procesadas. El procesamiento de estas muestras se realizó no más allá de 1 hora posterior a su toma, a fin de evitar cualquier tipo de degradación o alteración que pudieran sufrir en este período.

4.3) Aislamiento y crecimiento de *Lactobacillus* spp. desde las muestras.

Las muestras de saliva se diluyeron en 1:10, 1:100, 1:1000 v/v, en tampón fosfato salino PBS (NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,2). Se sembraron 100 µL de las diluciones 1:100 y 1:1000 sobre la superficie de placas de medio de cultivo sólido MRS (Oxoid). Posteriormente se cultivaron en una estufa a 37°C con 5% CO₂ por aproximadamente 48 horas. De las UFC (unidades formadoras de colonias) presuntivamente identificadas como *Lactobacillus* spp. (colonias blanquecinas, pequeñas, cóncavas de borde liso), se seleccionaron al azar 16, desde cada placa de cultivo, las que fueron resembradas en una nueva placa de Petri con medio MRS y crecidas como se indicó anteriormente, para la posterior extracción de ADN.

4.4) Extracción de ADN.

Las muestras de ADN fueron aisladas utilizando el kit FTA-Cards Whatman® y siguiendo las recomendaciones del proveedor. Para esto, colonias de aislados de *Lactobacillus* spp. fueron resuspendidas en 100 µL de PBS y depositadas en cartas de filtros FTA (Whatman®) (Figura 2). Luego se dejaron secar cercanas al mechero. Desde cada filtro FTA con los 50 µL de solución vertida se obtuvieron dos perforados de 1,2 mm que recibieron lavados seriados con 200 µL de reactivo FTA (Whatman®) durante 5 minutos en tres ocasiones, y tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) de igual forma. Posteriormente los perforados se secaron a 55 °C, quedando el ADN genómico depositado sobre éstos.

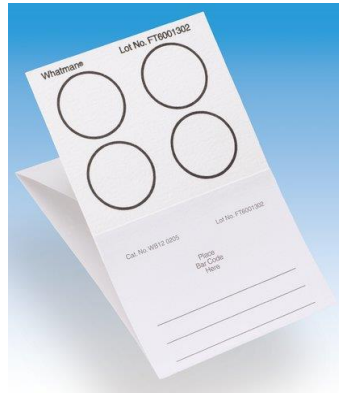


Figura 2. Cartilla de filtros FTA (Whatman®).

4.5) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Un fragmento de aproximadamente 232 pb del gen de 16S ARNr fue amplificado por PCR, utilizando los oligonucleótidos específicos descritos para *Lactobacillus* spp. (Lacto16sfw: 5'-TGGAAACAGATGCTAATACCG-3' y Lacto16s rev: 5'-GTCCATTGTGGAAGATTCCC-3') (Caufield y cols., 2007). Cada PCR fue realizado conteniendo ADN genómico en un filtro de 1,2 mm, 1 μ M de cada oligonucleótido, 0,2 mM de dNTPs (Thermo Scientific®), 0,05 U/ μ L DreamTaq ADN polimerasa (Thermo Scientific®), y 1x buffer de PCR con 1,5 mM MgCl₂. Se utilizó además ADNg de la cepa *L. casei* ATCC 334 como control positivo de amplificación, y agua en reemplazo de éste en el control negativo. La amplificación se llevó a cabo en un equipo GeneAmp 2400 PerkinElmer. Esto consistió en una denaturación inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de denaturación a 94°C por 30 s., alineamiento del oligonucleótido a 60°C por 30 s. y extensión (síntesis del ADN) a 72°C por 30 s., con un paso final de extensión a 72°C por 5 min. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis.

4.6) Electroforesis de ADN.

Las muestras de ADN se sometieron a electroforesis en geles de agarosa horizontales al 1% en amortiguador TAE (Tris-acetato 40 mM pH, EDTA 1 mM, pH 8,3), y se agregó Safeview NBS Biologicals Ltda, que permite la visualización de ácidos nucleicos con luz ultravioleta. Se utilizó el marcador de tamaño molecular

de ADN GeneRuler 1 kb DNA Ladder (ThermoFisher Scientific). La electroforesis se realizó a 80-100 V por tiempos variables en amortiguador TAE y los ácidos nucleicos se visualizaron en un transiluminador de radiación UV. Los geles se fotografiaron con una cámara digital (Carestream) y la imagen se procesó en un computador.

4.7) Purificación de los fragmentos de ADN productos del PCR.

El producto de PCR fue purificado utilizando el kit FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (Favorgen Biotech Corp.) a partir del gel de electroforesis de ADN en agarosa, bajo las recomendaciones del proveedor. Brevemente, se cortaron y pesaron trozos de no más de 300 mg del gel que contenía el producto de PCR, y se depositaron en un tubo con buffer FADF, incubando a 55°C hasta su disolución. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se traspasaron 800 µL de la muestra en una columna FADF. Se centrifugó por 30 segundos desechando el flujo y se agregó buffer de lavado centrifugando por 3 minutos para volver a desechar el contenido. Se agregó buffer de elución al centro de la columna y se centrifugó por 2 minutos para obtener el ADN, el que fue almacenado a -20°C (Figura 3).

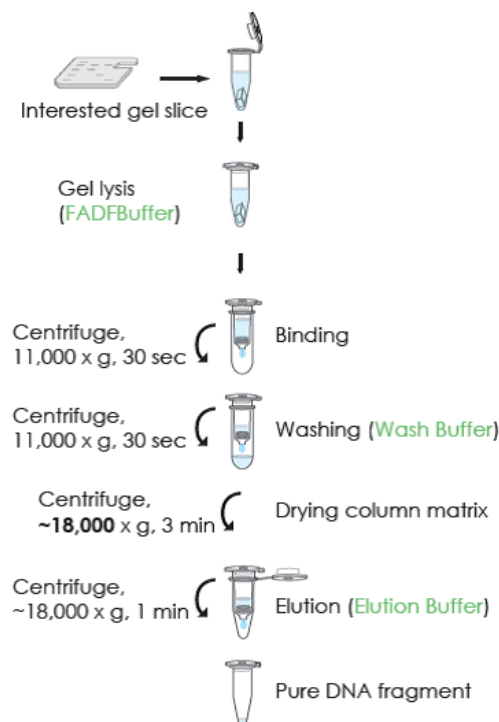


Figura 3. Esquema que muestra el proceso de purificación de fragmentos de ADN.

4.8) Secuenciación e identificación de especies.

Las muestras de ADN se enviaron a secuenciar en Macrogen USA. Las secuencias obtenidas fueron analizadas realizando un alineamiento contra la base de datos no-redundante (nr) utilizando el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). El análisis de los resultados de los alineamientos permitió identificar a las especies de *Lactobacillus* presentes en cada muestra. Se consideró una identificación positiva cuando existía más de un 95% de identidad de secuencia.

4.9) Análisis estadísticos.

Para determinar si la distribución de las edades de los participantes de ambos grupos en estudio fue similar, se utilizó el test no paramétrico Wilcoxon-Mann-Whitney debido a que uno de los grupos no presentó distribución normal. Se consideró como hipótesis nula (H_0) que ambos grupos eran similares (poseían medianas similares), como hipótesis alternativa (H_1) que ambos grupos difieren en distribución (sus medianas son diferentes). Se rechaza la hipótesis nula con valores de $p \leq 0,05$.

Con los resultados obtenidos de secuenciación se realizó un análisis de asociación de las distintas especies encontradas, tanto a las muestras de saliva como a las muestras de lesiones de caries dentinaria profunda, mediante Test de Fisher, que permite analizar asociación entre dos variables dicotómicas en muestras con n pequeño. Se consideró como hipótesis nula (H_0) la independencia entre las dos variables y la significancia estadística fue fijada en $p < 0,05$ para este análisis.

5) RESULTADOS

5.1) Datos demográficos de los participantes del estudio.

Para este estudio se incluyeron un total de 18 niños con edades entre los 7 y 11 años. De éstos, 8 se encontraban libre de caries y 10 con al menos una caries cavitada.

La edad promedio de los participantes del grupo libre de caries fue de $10 \pm 1,2$ años y del grupo con caries fue de $9,9 \pm 1,37$ años, y sus medianas fueron 10,5 y 10 años, respectivamente (Tabla 3). Ambos grupos presentaron una distribución etaria similar, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Test Wilcoxon-Mann-Whitney $p=0,897$).

La distribución por sexo no fue similar en ambos grupos, existiendo en el grupo sin lesiones de caries un porcentaje de hombres de 75% y de mujeres de un 25% y en el grupo con caries un 50% de cada uno. El promedio de COPD/ceod fue de $1 \pm 1,25$ para COPD y de $2,7 \pm 2,63$ para ceod.

Tabla 3. Datos demográficos de los niños participantes del estudio.

	Libres de Caries	Con Caries
Promedio edad	$10 \pm 1,20$	$9,9 \pm 1,37$
Mediana	10,5	10
Relación hombre/mujer	3:1	1:1
Promedio COPD	-	$1,0 \pm 1,25$
Promedio ceod	-	$2,7 \pm 2,63$

5.2) Crecimiento bacteriano

A partir del total de las muestras de saliva (18) se obtuvo crecimiento en las placas con medio de cultivo MRS. Las colonias fueron identificadas presuntivamente como *Lactobacillus* spp., por su aspecto cóncavo, de bordes lisos, colonias pequeñas y blanquecinas (Figura 4).



Figura 4. Colonias presuntivamente identificadas como *Lactobacillus* spp. crecidas sobre placas de medio de cultivo MRS.

Desde cada placa de cultivo se seleccionaron al azar 16 de estas colonias, las que fueron re-sembradas en nuevas placas de cultivo con medio MRS y crecidas como se indicó anteriormente, para permitir su aislamiento para la posterior extracción de ADN. Se re-sembraron un total de 288 aislados clínicos, de los cuales se obtuvo crecimiento desde aproximadamente un 80% de ellos.

5.3) Purificación de ADN genómico y Reacción en Cadena de la Polimerasa

A partir de los aislados clínicos re-sembrados, presuntamente identificados como *Lactobacillus* spp., se procedió a la purificación de ADN genómico (ADNg), tal como se señala en la sección materiales y métodos. Se obtuvo ADNg desde 10 aislados clínicos por cada muestra de saliva, obteniendo un total de 180 muestras de ADNg. El ADNg obtenido fue utilizado como molde para amplificar mediante PCR un fragmento específico de 232 pb del gen 16S RNA, encontrando amplificación positiva en más de un 90% de las muestras analizadas. En la figura 6 se puede evidenciar la presencia de un fragmento de ADN amplificado de forma específica en algunas de las muestras analizadas.

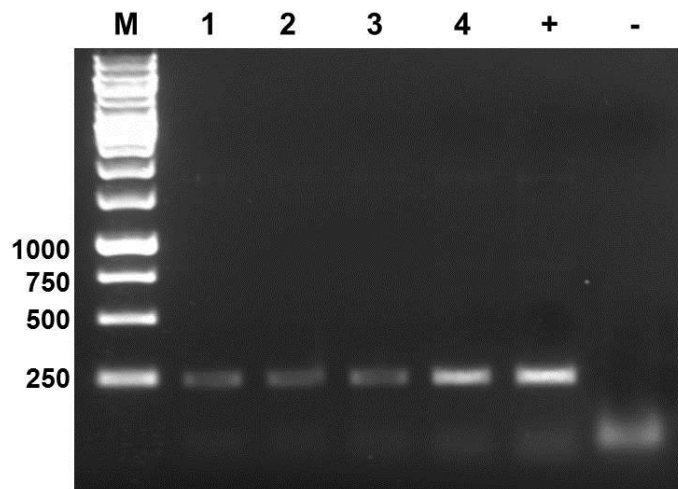


Figura 6. Amplificación por PCR de un fragmento de aproximadamente 232 pb del gen 16S ARNr de diferentes aislados clínicos. Se observa una foto representativa de un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X, que muestra el resultado del PCR. M: marcador de tamaño molecular de ADN, (+): control positivo con la cepa *L. casei* ATCC 334, (-): control negativo utilizando H₂O en vez de ADN molde en la reacción, carriles 1-4: diferentes aislados clínicos.

5.4) Determinación de las especies por secuenciación y distribución según tipo de muestra.

Se enviaron un total de 138 fragmentos de ADN purificados, de los cuales se obtuvo resultados de secuencia para 103 de ellos. De estas secuencias 101 pudieron ser asignadas a una especie bacteriana, y 2 no arrojaron resultados luego del análisis.

Los resultados indicaron que, a pesar de que el medio utilizado para el cultivo de las muestras es descrito como selectivo para *Lactobacillus* spp., luego del análisis de secuencias fue posible evidenciar que crecieron también otras especies principalmente del género *Streptococcus*, como *S. salivarius*, *S. vestibularis*, *S. sobrinus*, *S. anginosus*, *S. oralis* y *S. thermophilus*, además de un aislado de *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 4).

En saliva de sujetos libres de experiencia de caries se encontraron, principalmente, distintas especies del género *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Dentro de las especies de *Lactobacillus* encontradas están *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. casei/L. paracasei*, *L. gasseri/L. johnsonii* y *L. acidophilus* (Tabla 4). A partir de estas muestras se obtuvieron además aislados clínicos de *S. salivarius*, *S. vestibularis* y otras especies de *Streptococcus*, así como un aislado de *P. aeruginosa*.

A partir de las muestras de saliva de sujetos con caries también se obtuvo crecimiento de especies de *Lactobacillus* y de *Streptococcus*. Dentro de las especies de *Lactobacillus* encontradas, la más abundante fue *L. salivarius*, seguida de *L. casei/ L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri/ L. johnsonii*, *L. fermentum* y *L. acetotolerans* (Tabla 4). Se encontraron también un gran número de aislados clínicos de *S. salivarius* y *S. vestibularis*, así como otras especies de *Streptococcus* en baja cantidad (Tabla 4).

Tabla 4. Especies aisladas desde saliva de los participantes y análisis de test exacto de Fisher al comparar su presencia en las diferentes muestras.

Especie	niños sin caries	niños con caries	p**
<i>L. fermentum</i>	10	2	0,011***
<i>L. rhamnosus</i>	7	3	0,179
<i>L. casei / L. paracasei*</i>	2	4	0,686
<i>L. gasseri / L. johnsonii*</i>	2	3	1,000
<i>L. salivarius</i>	-	10	0,002***
<i>L. acidophilus</i>	2	-	0,205
<i>L. acetotolerans</i>	-	2	0,499
<i>Lactobacillus spp.</i>	1	2	0,495
<i>S. salivarius</i>	12	20	0,291
<i>S. vestibularis</i>	6	3	0,294
<i>S. sobrinus</i>	-	2	1,000
<i>S. anginosus</i>	-	1	1,000
<i>S. oralis</i>	-	1	1,000
<i>S. thermophilus</i>	-	1	1,000
<i>Streptococcus spp.</i>	3	1	0,328
<i>P. aeruginosa</i>	1	-	0,455
TOTAL	46	55	

* El fragmento secuenciado no permitió distinguir entre estas especies ya que ambas presentan un alto % de identidad de secuencia genómica.

** Test exacto de Fisher.

*** Valores con $p < 0,05$.

Al comparar la presencia de las diferentes especies de *Lactobacillus* en las muestras de saliva de los niños sin experiencia de caries, versus las muestras de saliva de niños con caries, se puede observar de que la mayoría de éstas se encuentran presentes en ambos tipos de muestras, como son *L. fermentum*, *L.*

rhamnosus, *L. casei*/*L. paracasei* y *L. gasseri*/*L. johnsonii*. Sin embargo, *L. fermentum* fue la especie más abundante en la saliva de niños libres de caries, y presentó una asociación estadísticamente significativa a las muestras de este grupo ($p=0,011$) (Tabla 4).

L. acidophilus fue obtenida exclusivamente a partir de muestras de saliva de niños sin experiencia de caries, similar a *L. acetotolerans*, que fue aislada sólo a partir de muestras de saliva de niños con caries (Tabla 4). *L. salivarius* también fue obtenida exclusivamente a partir de muestras de saliva de niños con caries, y presentó una asociación estadísticamente significativa con esta condición ($p=0,002$) (Tabla 4).

Las demás especies de *Lactobacillus* encontradas no presentaron asociación significativa con las muestras de una u otra condición, así como tampoco las especies de *Streptococcus* aisladas ($p>0,05$, Tabla 4).

5) DISCUSION

La hipótesis de este estudio planteó que las especies de *Lactobacillus* presentes en saliva de un grupo de niños chilenos de 7 a 11 años de edad con caries diferirían de las presentes en saliva de niños sin experiencia de caries.

Según los resultados obtenidos podemos validar nuestra hipótesis, ya que a pesar que algunas de las especies de *Lactobacillus* se encontraban presentes en ambos grupos, *L. acetotolerans* y *L. salivarius* se encontraron solo en el grupo con caries, presentando *L. salivarius* una asociación estadísticamente significativa con esta condición. Por otro lado, *L. fermentum* se encontró mayoritariamente en el grupo sin caries encontrándose asociación con esta condición, y *L. acidophilus* se encontró exclusivamente en las muestras de saliva de este grupo de niños.

Para este estudio fueron seleccionados 18 participantes entre los 7-11 años de edad, 8 sin experiencia de caries y 10 que presentaban al menos una lesión de caries cavitada. El COPD promedio de los niños participantes del estudio correspondió a $1,0 \pm 1,25$ y su ceod fue de $2,7 \pm 2,63$. Esto se encuentra dentro del rango nacional determinado por el MINSAL, que describe que en Chile los valores para niños de 6 años son de 0,16 para COPD y de 3,71 para ceod y para niños de 12 años es de 1,9 piezas dentarias para COPD (Soto L. y cols., 2007a; Soto y cols., 2007b).

En este estudio se utilizaron muestras de saliva no estimulada, pues se ha descrito que este fluido representa las características de la microbiota oral total, existiendo incluso una correlación entre la abundancia de *Lactobacillus* spp. presentes en este tipo de muestra con los encontrados en caries y placa dental (Badet y Thebaud, 2008).

Otro método descrito para la toma de este tipo de muestra es, por ejemplo, con espátula, la cual se humedece en saliva y luego se apoya directamente sobre la superficie de placas con el medio de cultivo adecuado, como se describe en Piwat y cols., 2010, para el aislamiento de *Lactobacillus* spp. desde saliva. Sin embargo,

este método sólo permite el aislamiento de una pequeña cantidad de UFC por cada muestra, además del requerimiento de que la muestra en la espátula debe ser sembrada inmediatamente después de la toma de muestras.

En este estudio, para el cultivo de *Lactobacillus* spp. se utilizó el medio MRS el cual es descrito como selectivo para el crecimiento de estas especies, y ha sido utilizado en diversos estudios para el aislamiento y cuantificación de estos microorganismos a partir de muestras provenientes desde la cavidad oral (Marchant y cols, 2001; Caufield y cols, 2007; Piwat y cols, 2010; Yang y cols., 2010). Caufield y cols. (2007) utilizando este medio de cultivo, obtuvo un alto porcentaje de *Lactobacillus* spp. en aislados clínicos, indicando que sólo un 2% de las UFC obtenidas correspondían a otros microorganismos. A pesar de estos antecedentes, en este estudio se obtuvo crecimiento de aislados clínicos de distintas especies de *Streptococcus* spp. como *S. salivarius*, *S. vestibularis*, *S. sobrinus*, *S. anginosus*, *S. oralis* y *S. thermophilus*, en gran proporción.

De los aislados clínicos analizados, aproximadamente el 90 % resultó positivo para la amplificación mediante PCR de un fragmento de gen de ARN ribosomal 16s, al utilizar oligonucleótidos específicos para *Lactobacillus* spp., descritos por Caufield y cols. (2007). Las muestras que no presentaron amplificación positiva fueron apartadas y se asumió que dichas UFC no correspondían a *Lactobacillus* spp. Sin embargo, la ausencia de amplificación pudo deberse también a una insuficiente cantidad o exceso de ADN en la muestra, o a que el ADN se haya deteriorado por el manejo de la misma.

Por otra parte, en el 90% de las muestras que si presentaron amplificación positiva por PCR, no sólo hubo amplificación del gen ARNr 16S de *Lactobacillus* spp., sino también del gen de ARNr 16s de otras especies, como *S. salivarius*, *S. vestibularis*, *S. sobrinus*, *S. anginosus*, *S. oralis* y *S. thermophilus*, además de un aislado de *P. aeruginosa*. Esto implicaría que los oligonucleótidos utilizados no serían completamente específicos para el género *Lactobacillus*.

En este estudio se pudieron aislar e identificar a partir de las muestras de saliva de niños sin experiencia de caries, las especies *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. casei/L. paracasei*, *L. gasseri/L. johnsonii* y *L. acidophilus*. A partir de las muestras de saliva de sujetos con caries, también se obtuvo crecimiento de *L. fermentum*, *L. rhamnosus*, *L. casei/ L. paracasei* y *L. gasseri/ L. johnsonii*, así como también de *L. salivarius* y *L. acetotolerans*.

L. fermentum fue la especie bacteriana más abundante aislada a partir de la saliva de niños libres de experiencia de caries. Si bien, también fue aislada a partir de las muestras de saliva de los niños con caries, presentó una asociación estadísticamente significativa con las muestras de saliva de los niños sin experiencia de caries ($p=0,011$). Esto es congruente con lo encontrado por Colloca y cols. (2000) y Ahumada y cols. (2003). En otros estudios se ha descrito que *L. fermentum* sería un comensal habitual de la cavidad oral, que estaría presente en cavidad oral de niños con caries y libres de caries (Piwat y cols., 2010).

En este estudio, *L. acidophilus* fue aislado exclusivamente a partir de muestras de saliva de los niños sin experiencia de caries. Esto es similar a lo reportado en el estudio de Koll-Klais y cols. (2004), en el cual se analizó la presencia y composición del género *Lactobacillus* en saliva de niños escolares de Estonia sin experiencia de caries, determinando que *L. acidophilus* se encontraba presente en el 9% de las muestras. Sin embargo, en el estudio de Nancy y Dorignac (1992), analizaron muestras de placa dental y dentina cariada, obtenidas de niños de 5 a 15 años de edad con caries, y muestras de saliva de niños sin caries, encontrando *L. acidophilus* en los tres tipos de muestra. También en el estudio de Smith y cols. (2001), esta bacteria fue encontrada en un 7,69% de las muestras de placa dental y saliva de sujetos con caries dental. Por lo tanto, se requerirían más estudios para poder determinar si esta especie está relacionado a alguna condición de salud oral específica.

Por otra parte, *L. salivarius* fue aislado sólo a partir de las muestras de saliva de niños con caries, presentando una asociación con esta condición ($p=0,002$). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Piwat y cols. (2010), donde esta

bacteria fue la más prevalente en la saliva de niños con caries, en Tailandia. Esto podría deberse a que esta especie tiene una mayor capacidad cariogénica debido a sus factores de virulencia, como son su capacidad acidogénica (Martin y cols., 2006) y acidúrica (Strahinic y cols., 2007). Se ha visto que las diferentes especies de *Lactobacillus* muestran diferentes habilidades para generar ácido, siendo clasificadas en tres grupos de acuerdo a esta capacidad: fuertes, moderadas y débiles productoras de ácido, encontrándose a *L. salivarius* dentro del grupo fuerte (Piwat y cols., 2012).

L. acetotolerans también se encontró presente sólo en las muestras de saliva de niños con caries, pero no se encontró en la literatura algún reporte de la asociación de esta bacteria con cavidad oral o con el proceso de caries dental. Este microorganismo ha sido aislado a partir de alimentos fermentados (Entani y cols., 1986; Nakayama y cols., 2007), por lo que su presencia en boca podría deberse al consumo reciente de alguno de ellos.

L. rhamnosus, *L. casei*/*L. paracasei* y *L. gasseri*/*L. johnsonii* fueron aisladas a partir de saliva, independiente del estatus de caries que presentara el niño. Con respecto a *L. casei* y *L. rhamnosus*, un gran número de estudios han asociado su presencia a sitios con caries, como en un estudio de Marchant y cols. (2011) donde se describe que estas especies fueron aisladas predominantemente desde dentina infectada en niños con caries temprana de la infancia, y el estudio de Byun y cols. (2004) donde encontraron la presencia de ambos microorganismos asociada a lesiones de caries en dientes de adultos. Por otra parte, *L. rhamnosus* y *L. paracasei* también han sido descritos como microorganismos asociados a saliva de niños sin experiencia de caries (Koll-Klais y cols., 2004). En este estudio no fue posible discriminar entre las especies *L. casei* y *L. paracasei*, debido a que su similitud a nivel de genoma es muy elevado. Para lograr asignar a una u otra especie se debe secuenciar un fragmento de mayor tamaño del ARNr 16S, y se recomienda también secuenciar el 23S ARNr. Lo mismo para *L. gasseri*/*L. johnsonii*.

En este estudio además se encontraron especies de *Streptococcus*, siendo *S. vestibularis* y *S. salivarius* las más abundantes. Estas son bacterias comensales que se encuentran colonizando principalmente el tracto digestivo (Seow y cols., 2009), y predominan en la región orofaríngea (Bik y cols., 2010), lo que es consecuente con el hecho de que aparecieron en saliva de los niños con caries y sin experiencia de caries, por lo que no se encontrarían asociadas a una de esas condiciones en particular. Se ha reportado que *S. salivarius* podría tener un efecto inhibitorio de *Streptococcus* patógenos (Ogawa y cols., 2011) y de bacterias que producen infecciones periodontales (Lévesque, 2003).

Los niños libres de experiencia de caries poseían menores recuentos de *Lactobacillus* spp. que aquellos con caries, y un mayor % de las muestras aisladas de éstos correspondieron a bacterias que no eran *Lactobacillus* spp.. Esto puede tener relación con que estos microorganismos no poseen sistemas de adhesión que les permitan permanecer en cavidad oral. Se ha descrito que *S. mutans* y otras bacterias acidogénicas orales crearían el nicho necesario (lesión precaria) capaz de retener mecánicamente a *Lactobacillus* spp. Se habla del “modelo de nicho retentivo”, un prerrequisito necesario para que se produzca la colonización de *Lactobacillus* en la cavidad oral. En este lugar se produce retención de otros *Lactobacillus* planctónicos y además provee un área de bajo pH y un ambiente anaeróbico donde también se produce atrapamiento de comida que proveen una rica fuente de carbohidratos (Caufield y cols., 2015). Esto indica que es mayormente factible poder aislarlos desde la saliva de individuos que porten estas lesiones precarias.

Algunos autores han investigado el rol de *Lactobacillus* spp. como probióticos para mejorar la salud oral, debido a que estudios indican que poseería actividad inhibitoria contra *Streptococcus* spp. cariogénicos y patógenos periodontales como *P. gingivalis* y *A. actinomycetencomitans* (Koll-Klais y cols., 2005; Teanpaisan y cols., 2011). Una de las especies mayormente propuestas y evaluadas para su uso como probióticos en salud oral es *L. rhamnosus* GG (Stecksén-Blicks y cols., 2009; Nässe y cols., 2001). *L. rhamnosus* exhibe actividad antagonista contra

bacterias cariogénicas (Simark-Mattson y cols., 2007) y al ser utilizada en ensayos clínicos en niños preescolares, se observó que redujo el riesgo de caries (Näse y cols., 2001) y disminuyó la incidencia de estas lesiones (Stecksén-Blicks y cols., 2009). Sin embargo, se ha descrito que el efecto de los probióticos en cavidad oral desaparecerían al dejar de consumir el producto (Petti y cols., 2001; Hasslöf y cols., 2013; Rodríguez y cols., 2016). En este estudio *L. rhamnosus* se encontró presente en saliva de niños con caries y en saliva de niños sin caries, lo que indicaría que no existiría una asociación específica con ninguna de las dos condiciones. Sin embargo se requiere aumentar el número de niños y muestras del estudio, para determinar claramente el rol de cada especie de *Lactobacillus* en la cavidad oral.

Este estudio se planteó como un primer acercamiento en la determinación de las especies de *Lactobacillus* spp. presentes en saliva en una población de niños chilenos. Esta información cobra relevancia debido a que el conocimiento actual del proceso de caries releva la participación de *Lactobacillus* spp. como factores etiológicos de la enfermedad, siendo fundamentales en la progresión de la lesión en dentina.

De acuerdo a lo planteado, un mayor conocimiento de las especies involucradas en la etiología de la caries dental en sus diferentes etapas en la población infantil, entre ellas *Lactobacillus* spp., permitirán enfocar medidas preventivas costo beneficiosas que contribuyan a la disminución de los indicadores de historia de caries de nuestra población.

6) CONCLUSIONES

- Las especies de *Lactobacillus* presentes en saliva de un grupo de niños chilenos de 7 a 11 años de edad con experiencia de caries difieren de las presentes en saliva de niños sin experiencia de caries.
- Existen especies de *Lactobacillus* que no estarían relacionadas al estatus de caries del niño, y que se encontraron en ambos grupos estudiados, como son *L. rhamnosus*, *L.casei/L.paracasei* y *L. johnsonii/L. gasseri*.
- *L. salivarius* sólo fue obtenida a partir de muestras de saliva de niños con caries, presentando una asociación estadísticamente significativa con esta condición ($p=0,026$).
- *L. fermentum* fue la especie más abundante en la saliva de niños libres de caries, presentando una asociación estadísticamente significativa a las muestras de este grupo ($p=0,003$).

7) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Aas J., Griffen A., Dardis S., Lee A., Olsen I., Dewhirst F., Leys E., Paster B. (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *Am Soc Microbiol* 46:1407- 1417.
- 2) Ahumada Mdel C., Bru E. Colloca M., López M., Nadermacias M. (2003). Evaluation and comparison of lactobacilli characteristics in the mouth of patients with or without cavities. *J Oral Sci* 45:1-9.
- 3) Almstahl A., Lingström P., Eliasson L., Carlén A. (2012). Fermentation of sugars and sugar alcohols by plaque *Lactobacillus* strains. *Clin Oral Invest* DOI 10.1007/s00784-012-0832-z.
- 4) Badet C. and Thebaud N. (2008). Ecology of *Lactobacilli* in the oral cavity: A review of Literature. *Open Microbiol J* 2:38-48.
- 5) Bik E., Long C., Armitage G., Loomer P., Emerson J., Mongodin E., Nelson K., Gill S., Fraser-Liggett C., Relman D. (2010). Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *Isme J* 4:962-974.
- 6) Braga M., Fausto M., Ekstrand K. (2010). Detection activity assesment and diagnosis of dental caries lesions. *Dent Clin N Am* 54:479-493.
- 7) Busscher H., Mulder A., Van der meir H. (1999). *In vitro* adhesion to enamel and *in vivo* colonization of tooth surfaces by lactobacilli from a bio-yoghurt. *Caries Res* 33:403-404.
- 8) Byun R., Nadkarni M., Chhour K., Martin E., Jacques N., Hunter N. (2004). Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *J Clin Microbiol* 42:3128-3136.
- 9) Caufield P., Li Y., Dasanayake A., Saxena D. (2007). Diversity of lactobacilli in the oral cavities of young women with dental caries. *Caries Res* 41:2-8.

- 10) Caufield P., Schon C., Saraithong P., Argimon S. (2015). Oral lactobacilli and dental caries: A model for niche adaptation in humans. *J Dent Res* 94:110- 118.
- 11) Colloca M., Ahumada M., López M., Nadermacias M. (2000). Surface properties of lactobacilli isolated from healthy subjects. *Oral Dis* 6:227-233.
- 12) Cotter P. and Hill C. (2003). Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:429-453.
- 13) Dantas Cabral de Melo M., Vieira de Souza W., Tavares M., Carvalho de Lima M., Jamelli S. and Bosco G. (2015). Social conditions and high levels of dental caries in five year old children in Brazil. *J Dent Child* 82:29-35.
- 14) Dewhirst F., Chen T., Izard J., Paster B., Tanner A., Yu H., Lakshmanan A., Wade W. (2010). The Human Oral Microbiome. *J Bacteriol* 192:5002–5017.
- 15) Dong Y., Pearce E., Yue L., Larsen M., Gao X., Wang J. (1999). Plaque pH and associated parameters in relation to caries. *Caries Res* 33:428-436.
- 16) Eggertsson H. and Ferreira-Zandona A. (2009). Dentition and lesion history. *Monogr Oral Sci* 21:102-112.
- 17) Entani E., Masai H., Suzuki K. (1986). *Lactobacillus acetotolerans*, a new species from fermented vinegar broth. *Int J Syst Evol Microbiol* 36:544-549.
- 18) Fontana M., Young D., Wolff M., Pitts N., Longbottom C. (2010). Defining dental caries for 2010 and beyond. *Dent Clin North Am* 54:423-440.
- 19) González-Cabezas C. (2010). The chemistry of caries: remineralization and desmineralization events with direct clinical relevance. *Dent Clin North Am* 54:469- 478.
- 20) Hamada S. and Slade H. (1980). Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 44:331-384.

- 21) Hasslöf P., West C., Videhult F., Brandelius C., Stecksén-Blicks C. (2013). Early intervention with probiotic *Lactobacillus paracasei* F19 has no long-term effect on caries experience. *Caries Res* 47:559-565.
- 22) Hojo K., Nagaoka S., Ohshima T., Maeda N. (2009). Bacterial Interactions in dental biofilm development. *J Dent Res* 88:982-990.
- 23) Human Oral Microbiome Database. <http://www.homd.org/>.
- 24) Ismail A., Sohn W., Tellez M., Amaya A., Sen A., Hasson H. (2007). The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Comm Dent Oral Epidemiol* 35:170-178.
- 25) Kianoush N., Adler C., Nguyen K., Browne G., Simonian M., Hunter N. (2014). Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. *Plos One* 9: e92940.
- 26) Klander O. and Weiss N. (1986). Genus *Lactobacillus*. In: Sneath P., Mair N., Sharpe M., Holt J., editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 9th edition. Baltimore (MD): Williams & Wilkins. P. 1063-1065.
- 27) Klein H., Palmer C., Knutson J. (1938). Studies on dental caries, dental status and dental needs of elementary school. *Pub Health Rep* 53:751- 765.
- 28) Koll-Klais P., Mandar R., Leibur E., Kjaeldgaard M. (2004). High levels of salivary lactobacilli in Estonian schoolchildren. *Eur J Paediatr Dent* 5:107-109.
- 29) Koll-Klais P., Mandar R., Leibur E., Marcotte H., Hammarstrom L., Mikelsaar M. (2005). Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol Immunol* 20:354-361.
- 30) Lévesque C., Lamothe J., Frenette M. (2003). Coaggregation of *Streptococcus salivarius* with periodontopathogens evidence for

involvement of fimbriae in the interaction with *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol Immunol* 18:333-33.

- 31) Lima K., Coelho L., Pinheiro I., Rocas I., Siqueira J. (2011). Microbiota of dentinal caries as assessed by reverse-captured checkerboard analysis. *Caries Res* 45:21-30.
- 32) Loesche W. (1979). Clinical microbiological aspects of chemotherapeutic agents used according to the specific plaque hypothesis. *J Dent Res* 58:2404-2412.
- 33) Loesche W. (1986). *Streptococcus mutans* in human decay. *Microbiol Rev* 50:353-380.
- 34) Marchant S., Brailsford S., Twomey A., Roberts G., Beighton D. (2001). The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res* 35:397-406.
- 35) Marsh P. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 149: 279-294.
- 36) Marsh P. (2010). Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. *Dent Clin North Am* 54: 441-454.
- 37) Martin R., Jimenez E., Olivares M. (2006). *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potencial probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *Int J Food Microbiol* 112:35-43.
- 38) Nakayama J., Hoshiko H., Fukuda M., Tanaka H., Sakamoto N., Tanaka S., Ohue K., Sakai K., Sonomoto K. (2007). Molecular monitoring of bacterial community structure in long-aged nukadoko: pickling bed of fermented rice bran dominated by slow-growing lactobacilli. *J Biosci Bioeng* 104:481-489.
- 39) Nancy J. and Dorignac G. (1992). Lactobacilli from the dentin and saliva in children. *J Clin Pediatr Dent* 16:107-111.

- 40) Näse L., Hatakka K., Savilahti E., Saxelin M., Pönkä A., Poussa T. (2001). Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res* 35:412-420.
- 41) Ogawa A., Furukawa S., Fujita S., Mitobe J., Kawarai T., Narisawa N., Sekizuka T., Kuroda M., Ochiai K., Ogihara H., Kosono S., Yoneda S., Watanabe H., Morinaga Y. (2011). Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by *Streptococcus salivarius* FruA. *Appl Environ Microbiol* 77:1572-1580.
- 42) Organization WHO. (1997). Oral health surveys: basic methods. World Health Organization; 1997.
- 43) Petersen P. (2003). The World Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Comm Dent Oral Epidemiol* 31:3-23.
- 44) Petti S., Tarsitani G., D' Arca A. (2001). A randomized clinical trial of the effect of yoghurt on the human salivary microflora. 46:705-712.
- 45) Piwat S., Teanpaisan R., Thitasomakul S., Thearmontree A., Dahlén G. (2010). *Lactobacillus* species and genotypes associated with dental caries in Thai preschool children. *Mol Oral Microbiol* 25:157-164.
- 46) Piwat S., Teanpaisan R., Dahlen G., Thitasomakul S., Douglas C. (2012). Acid production and growth by oral *Lactobacillus* species *in vitro*. *J Inv Clin Dent* 3:56-61.
- 47) Preza D., Olsen I., Willumsen T., Boches S., Cotton S., Grinde B., Paster B. (2009). Microarray analysis of the microflora of root caries in elderly. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28:509-517.
- 48) Rodríguez G., Ruiz B. Faleiros S., Vistoso A., Marró M., Sánchez J., Urzúa I., Cabello R. (2016). Probiotic Compared with Standard Milk for High-caries Children: A Cluster Randomized Trial. *J Dent Res* 95:402-407.

- 49) Selwitz R., Ismail A., Pitts N. (2007). Dental caries. *The Lancet* 369:51- 59.
- 50) Seow W., Lam J., Tsang A., Holcome T., Bird P. (2009). Oral *Streptococcus* species in pre-term and full-term children- a longitudinal study. *Int J Paediatr Dent* 19:406-411.
- 51) Sheiham A. (2005). Oral health, general health and quality of life. *Bulletin of the World Health Organization* 83:644.
- 52) Shivakumar K., Prasad S., Chandu G. (2009). International caries detection and assessment system: A new paradigm in detection of dental caries. *J Cons Dent* 12:10-16.
- 53) Smith S., Aweh A., Coker A., Savage K., Abosede D., Oyedeji K. (2001). Lactobacili in human dental caries and saliva. *Microbios* 105:77-85.
- 54) Soto L., Tapia R., Jara G., Rodríguez G. (2007a). Diagnóstico Nacional de Salud Bucal de los niños de 6 años. Santiago: MINSAL.
- 55) Soto L., Tapia R., Jara G., Rodríguez G., Urbina T., Venegas C. (2007b). Diagnóstico nacional de salud bucal del adolescente de 12 años y evaluación del grado de cumplimiento de los objetivos sanitarios de salud bucal 2000-2010. Santiago: MINSAL.
- 56) Stecksén-Blicks C., Sjöström I., Twetman S. (2009). Effect of long-term consumption of milk supplemented with probiotic lactobacilli and fluoride on dental caries and general health in preschool children: a cluster-randomized study. *Caries Res* 43:374-381.
- 57) Strahinic I., Busacervic M., Pavlica D., Milasin J., Golic N., Topisirovic L. (2007). Molecular and biochemical characterizations of human oral lactobacilli as putative probiotic candidates. *Oral Microbiol* 22:111-117.
- 58) Takahashi N. and Nyvad B. (2011). The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res* 90:294-303.

- 59) Teanpaisan R., Thitasomakul S., Piwat S., Thearmontree A., Pithpornchaiyakul W., Chankanka O. (2007). Longitudinal study of the presence of mutans streptococci and lactobacilli in relation to dental caries development in 3-24 month old Thai children. *Int Dent J* 57:445-451.
- 60) Teanpaisan R., Hintao J., Dahlen, G. (2009). Oral *Lactobacillus* species in type 2 diabetic patients living in southern Thailand. *Anaerobe* 15:160-163.
- 61) Teanpaisan R., Piwat S., Dahlén G. (2011). Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. *Lett Appl Microbiol* 53:452-459.
- 62) Teanpaisan R., Chaethong W., Piwat S., Thitasomakul S. (2012). Vertical transmission of *Mutans Streptococci* and *Lactobacillus* in Thai families. *Pediatric Dentistry* 34:24-29.
- 63) Theilade E. (1986). The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 13:905-911.
- 64) Van Houte J. (1980). Bacterial specificity in the etiology of dental caries. *Int Dent J* 30:305-326.
- 65) Van Houte J., Aasenden R., Peebles T. (1981). Lactobacilli in human dental plaque and saliva. *J Dent Res* 60:2-5.
- 66) Wolff D., Frese C., Maier-Kraus T., Krueger T., Wolff B. (2013). Bacterial biofilm composition in caries and caries-free subjects. *Caries Res* 47:69-77.
- 67) Yang R., Argimon S., Li Y., Zhou X., Caufield PW. (2010). Determining the genetic diversity of Lactobacilli from oral cavity. *J Microbiol Methods* 82:163-169.

ANEXOS Y APENDICES

- 1.- Carta de aprobación de comité de ética.
- 2.- Consentimiento informado.
- 3.- Ficha clínica.

Ed 27/11/2012



UNIVERSIDAD DE CHILE
 FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
 DEPARTAMENTO CIENCIAS BÁSICAS Y COMUNITARIAS
 ÁREA DE BIOQUÍMICA
 LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA ORAL



**CONSENTIMIENTO INFORMADO
 (TUTORES DE NIÑOS MENORES DE 11 AÑOS)**

Nombre de Estudio: "Regulación de la respuesta de tolerancia a ácido en *Lactobacillus casei*: entendiendo su propiedad acidúrica en la progresión de la caries dental"

Investigador Principal: Prof. Dra. Claudia Lefimil
 Área Bioquímica
 Departamento de Ciencias Básicas y Comunitarias
 Facultad de Odontología, Universidad de Chile
 Sergio Livingstone Pohlhammer 943
 Independencia, Santiago
 Teléfono 9781.792

Institución Patrocinante: Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, Universidad de Chile.

Tipo de Proyecto: U-Inicia, revisado y aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Presidente CEC: Sr. Prof. Juan Cortés Araya
 Vicedecano Facultad de Odontología de la U. de Chile
 Sergio Livingstone Pohlhammer 943
 Independencia, Santiago.
 Email: vicedeca@odontologia.uchile.cl

Sujeto de estudio: _____

Este documento de Consentimiento Informado se aplicará a los padres o tutores de niños chilenos menores de 11 años, y consta de dos partes:

- Información (proporciona información sobre el estudio para usted)
 - Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar)
- Ud. recibirá una copia completa del Documento de Consentimiento Informado.

Usted y su hijo(a) han sido invitados a participar en este estudio. No tiene que decidir hoy si desean participar en este estudio. Antes de tomar su decisión puede hablar acerca de la investigación con cualquier persona de su confianza. Este proceso se conoce como Consentimiento Informado y puede que contenga términos que usted no comprenda, por lo que siéntase con la absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto. Una vez aclarada todas sus consultas y después que haya comprendido los objetivos de la Investigación, si usted desea que su hijo(a) participe, se le solicitará que firme este formulario.

Los aspectos de este formulario tratan los siguientes temas: Explicación del proyecto, Justificación de la Investigación, Objetivo de la Investigación, Tipo de Intervención y procedimiento, Beneficios y Riesgos Asociados a la Investigación y Aclaraciones.



Fecha firma / /

1

Ed 27/11/2012

EXPLICACION DEL PROYECTO

La caries dental es uno de los principales problemas de salud bucal a nivel mundial, afectando a más del 60% de la población escolar. Su origen se asocia con la presencia de muchas bacterias adheridas sobre los dientes, que forman lo que se conoce como placa bacteriana. En esta placa viven bacterias que producen ácidos, produciendo pérdida del esmalte dental y la formación de caries. Las bacterias ácido-lácticas son un tipo de bacterias encontradas en la placa dental y numerosos estudios señalan que se encuentran muy relacionadas al desarrollo de caries. Cómo su nombre lo indica, las bacterias ácido-lácticas son productoras de ácido láctico. La producción de este ácido es lo que les da a estas bacterias la capacidad de producir caries. Además de producir ácido estas bacterias deben vivir tolerando el ambiente ácido que ellas mismas generan. Se propone que la capacidad de vivir en un ambiente ácido también tendría relación con cómo estas bacterias forman caries. Por todo eso, se quiere estudiar esta capacidad en bacterias ácido-lácticas presentes en saliva y en sitios de caries y compararlas.

Objetivo de la Investigación

La presente investigación tiene por objetivo aislar las bacterias ácido-lácticas que se encuentran en la saliva y/o en la(s) caries de su hijo(a), identificarlas y analizarlas. Se estudiará si son buenas o malas productoras de ácido y si poseen buena o mala capacidad de vivir en un medio ambiente ácido. Se compararán estas capacidades entre las bacterias de saliva y las de caries. Esto permitirá comprender si existe una relación entre estas capacidades y el hecho de que produzcan caries.

Beneficio de la Investigación.

Ud. o su hijo(a) no recibirán beneficio directo por participar en este estudio, sin embargo los resultados que se generen serán información muy importante y no disponible sobre cómo las bacterias producen caries. Además su hijo recibirá un set de productos para el aseo dental.

Tipo de Intervención y Procedimiento.

Si usted decide que su hijo(a) participe se le realizará un examen bucal para evaluar cómo se encuentra su dentadura y se contarán los dientes que posea con caries y aquellos que haya perdido, esto es para determinar un índice de salud bucal que se conoce como ceod-COPD. También se tomará una muestra de saliva con una pipeta plástica estéril y desechable (una especie de chupón). Finalmente, en el caso de que su hijo tenga caries, se le tomará una muestra desde ella con una espátula esterilizada. Estos procedimientos han sido probados previamente y no generarán ningún tipo de dolor para su hijo.

Riesgo de la Investigación.

Su hijo(a) no correrá ningún riesgo durante el procedimiento de la investigación, tampoco posterior a ésta, ya que son métodos no invasivos.

Aclaraciones

- La participación de su hijo(a) es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted o su hijo(a), en caso de no aceptar la participación en este estudio.
- Si usted decide pueden retirarse del estudio cuando lo deseen.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable.
- La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de pacientes, será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores.
- *Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de la participación de su hijo(a), puede si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa al documento.*

Fecha firma / /



Formulario de Consentimiento Informado

A través de la presente, declaro y manifiesto, libre y espontáneamente y en consecuencia acepto que:

1. He leído y comprendido la información anteriormente entregada y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. Tengo conocimiento del procedimiento a realizar en mi hijo(a).
3. Conozco los beneficios de participar en la Investigación.
4. El procedimiento no tiene riesgo alguno para la salud de mi hijo(a).
5. Además de esta información que he recibido, seré informado(a) cuando lo solicite de los resultados de esta investigación, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria.

Declaro que la participación de mi hijo(a) en este estudio es libre y voluntaria, pudiendo incluso dejar de participar en él cuando él o ella lo desee. Sé que la información obtenida de su persona será tratada de manera absolutamente confidencial, y únicamente utilizada para fines de investigación, sin fines de lucro. Entiendo que su nombre y sus datos personales serán codificados para el uso en este estudio y no serán jamás identificados públicamente.

Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento diagnóstico pertinente, PUESTO QUE SE QUE ES POR MI PROPIO INTERÉS.

- Sujeto de estudio: _____
- Nombre del Padre, Madre o Tutor Legal: _____
- Firma del Padre, Madre o Tutor Legal: _____
- Fecha: _____

Sección a llenar por el Investigador Principal

He explicado al Sr(a) _____ la naturaleza de la investigación y los riesgos y beneficios que implica la participación de su hijo(a). He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que conozco la normativa vigente para la realizar la investigación con seres humanos y me apego a ella.

- Nombre del Investigador Principal: Claudia Andrea Lefimil Puente
- Firma: _____
- Fecha: _____

En caso de cualquier duda puede acudir a Sergio Livingstone Pohlhammer 943 (ex-Olivos), Facultad de Odontología de Universidad de Chile, Edificio Colin piso -1 (Área de Bioquímica) de Lunes a Viernes de 9 a 18 horas o comunicarse con Claudia Lefimil a los números 29781972 o 29781816.



Fecha firma / /



04/12/2012

ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

ACTA N°: 2012/18

1. Acta De Aprobación De Protocolo De Estudio N° 2012/26.
2. **Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:**

Dr. Juan Cortes
Presidente

Valentina Fajreldin
Miembro permanente del CEC

Dr. Eduardo Rodríguez
Miembro permanente del CEC

Dr. Alejandro Escobar
Miembro permanente del CEC

3. **Fecha d Aprobación:** 30/11/2012
4. **Título completo del proyecto:** Regulación de la respuesta de tolerancia a ácido en *Lactobacillus casei*: entendiendo su propiedad acidúrica en la progresión de la caries dental. VID U INICIA ed. del 27/11/2012.
5. **Investigador responsable:** Claudia Lefimil (Bioquímico, Profesor Asistente)
6. **Institución Patrocinante:** Facultad de Odontología de la U. de Chile. Dpto. de Ciencias Básicas y Comunitarias
7. **Documentación Revisada:**
 - **Protocolo del proyecto de Investigación:** : Regulación de la respuesta de tolerancia a ácido en *Lactobacillus casei*: entendiendo su propiedad acidúrica en la progresión de la caries dental. VID U INICIA ed. del 27/11/2012.
 - **CV del Investigador principal**
 - **Formulario de CI para padres de participantes menores del proyecto :** Regulación de la respuesta de tolerancia a ácido en *Lactobacillus casei*: entendiendo su propiedad acidúrica en la progresión de la caries dental. VID U INICIA ed. del 27/11/2012. Enmienda del 27/11/2012.
8. **Carácter de la población**

30 niños entre 7 a 11 años de edad, reclutados en la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, divididos en 15 niños con mas de 4 caries y 15 niños sin experiencia de caries. A todos se les tomará una muestra de saliva, y a los niños con caries además se les tomara una muestra de placa bacteriana y tejido cariado desde sitios de caries.

9. **Fundamentación de la aprobación**

La caries dental es una enfermedad infecciosa crónica y multifactorial. Los niños muestran un elevado número de dientes afectados, cuyas lesiones no son tratadas y en nuestro país, la caries dental tiene el carácter de una epidemia. *Lactobacillus* son considerados agentes etiológicos de la caries dental, siendo rutinariamente aislados desde sitios de caries y asociados con su progresión, habituados a ambientes acidos,



04/12/2012

ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

aunque no se conoce bien cómo especies de esta bacteria toleran estos ambientes ácidos y regulan esta capacidad. Este estudio pretende comprender cómo *Lactobacillus* desarrolla y regula su Respuesta de Tolerancia al Ácido, analizando también las bacterias de niños sanos y niños con experiencia de caries. Este estudio permitirá establecer si existe una relación entre la alta presencia de caries, ambientes ácidos y el aumento de la capacidad de generar ácido de *Lactobacillus* en la generación y progresión de la caries dental.

Este comité ha considerado que los riesgos en la toma de muestra son muy limitados. Los investigadores han incorporado las modificaciones sugeridas por este Comité ya sea en el protocolo de Investigación como en el documento de consentimiento informado a saber:

- Respecto a la metodología, aclaró el mecanismo exacto de difusión de información hacia el sujeto. Y operacionalizó la categoría de "niños chilenos."
- Respecto a aspectos éticos cambió en el CI "nombre del paciente" por sujeto de estudio

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Aprueba por unanimidad de sus miembros el estudio: Regulación de la respuesta de tolerancia a ácido en *Lactobacillus casei*: entendiéndolo su propiedad acidúrica en la progresión de la caries dental. VID U INICIA ed. del 27/11/2012., bajo la supervisión de la Dra. Claudia Lefimil como Investigador Principal.

Le recordamos que toda información o elemento adicional que deba ser entregado o comunicado a los participantes, debe ser aprobado por este Comité. Este Comité se reserva el derecho de monitorear este proyecto si fuera necesario.


Dr. Juan Cortés
 Presidente del CE





Fecha: / /

FICHA CLÍNICA

Nombre: _____ Fecha de Nacimiento: / /

Edad: _____ Nacionalidad: _____ Nombre Apoderado: _____

Nacionalidad Apoderado: _____ Tel: _____

Colegio: _____ Curso: _____

Examen Clínico

Examen Extraoral (Cráneo, cara, labios, piel, ganglios, ATM, respiración)

Examen Intraoral (lengua, mucosas, vestíbulos, paladar, amígdalas)

Tipo de Dentición: _____ Anomalías y/o malos hábitos: _____

Examen Dentario

17	16	15	14	13	12	11		21	22	23	24	25	26	27				
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				
5.5	5.4	5.3	5.2	5.1										6.1	6.2	6.3	6.4	6.5
8.5	8.4	8.3	8.2	8.1										7.1	7.2	7.3	7.4	7.5
4.7	4.6	4.5	4.4	4.3	4.2	4.1		3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7				

		Diagnóstico Clínico	Diagnóstico radiográfico			Diagnóstico Clínico	Diagnóstico Radiográfico
1.8				3.8			
1.7				3.7			
1.6				3.6			
1.5	5.5			3.5	7.5		
1.4	5.4			3.4	7.4		
1.3	5.3			3.3	7.3		
1.2	5.2			3.2	7.2		
1.1	5.1			3.1	7.1		
2.1	6.1			4.1	8.1		
2.2	6.2			4.2	8.2		
2.3	6.3			4.3	8.3		
2.4	6.4			4.4	8.4		
2.5	6.5			4.5	8.5		
2.6				4.6			
2.7				4.7			
2.8				4.8			

⊕ Indicadores de Riesgo

Indicador	COPD-S	ceod-s	Dieta	Placa	Sangrado	Actividad	Caries Prox.
Valor del indicador						SP:	
						MB:	

Diagnóstico:

Derivaciones: _____

Plan de Tratamiento:

Evolución:

Fecha	Acciones	Firma

Evolución de Indicadores durante el tratamiento

Indicador	COPD-S	ceod-s	Dieta	Placa	Sangrado	Actividad	Caries Prox.
Valor del indicador						SP:	
						MB:	

Indicador	COPD-S	ceod-s	Dieta	Placa	Sangrado	Actividad	Caries Prox.
Valor del indicador						SP:	
						MB:	