



**PREVALENCIA Y DIVERSIDAD DE BACTERIAS PERTENECIENTES AL  
GÉNERO *STREPTOCOCCUS* EN SALIVA DE NIÑOS PRE-ESCOLARES  
CHILENOS ENTRE 2 Y 5 AÑOS DE EDAD CON Y SIN CARIES.**

**Pamela Madeleine Tournelle Kimura**

**TRABAJO DE INVESTIGACION  
REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE  
CIRUJANO-DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Prof. Dra. Carla Lozano Moraga**

**TUTORES ASOCIADOS**

**Prof. Dra. Irene Morales Bozo**

**Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente**

**Financiado por Proyecto Fondecyt Postdoctorado N° 3120164**

**Santiago – Chile**

**2013**

*A mi Hija...*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi hija, quien llegó como una bendición en mi último año de universidad y me dio la fuerza y motivación necesaria para sacar mi carrera, por el sacrificio que significó estar en la pancita de una mamá estudiante, por las innumerables veces que me acompañaste temprano a la clínica y esperaste paciente que mamá terminara de atender a sus pacientes... Gracias mi pequeña por existir.

A mis padres, por todo el esfuerzo que hicieron por darme una buena educación, por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida, por haber encontrado siempre en ustedes un consejo sabio, por haberme guiado por el camino correcto con amor, comunicación, libertad y confianza.

A mi esposo, por su amor, paciencia y apoyo a lo largo de toda mi carrera, por el esfuerzo y la responsabilidad de sustentar solo nuestro hogar. Por aguantarme en mis periodos de estrés universitario y por ser mi compañero y amigo día a día.

A mi Tutora, Dra. Carla Lozano, por haberme guiado con disposición, dedicación, compromiso y paciencia en el desarrollo de mi Tesis, por sus conocimientos y por el amor que pone en su trabajo.

Al área de Bioquímica, Dra. Irene Morales, Dra. Blanca Urzúa, Dra. Claudia Lefimil, Andrea y Katy. Por sus conocimientos y experiencia, por su ayuda y buena disposición en el desarrollo de mi proyecto de investigación, por hacer del laboratorio un lugar alegre y grato para trabajar.

A la Comisión evaluadora: Prof. Nora Silva Steffens, Prof. Dr. Gonzalo Rodríguez Martínez y Prof. Dr. Rodrigo Cabello Ibacache, por sus valiosas sugerencias y aportes en el desarrollo de este trabajo.

## INDICE

|  | Página |
|--|--------|
| RESUMEN.....   | 1      |
| INTRODUCCION.....  | 3      |
| MARCO TEORICO.....   | 7      |
| 1. Caries.....   | 7      |
| 1.1. Definición de caries.....   | 7      |
| 1.2. Epidemiología de la caries.....   | 8      |
| 2. ICDAS.....  | 9      |
| 3. <i>Biofilm</i> , Placa dental y Microbiota oral.....                                | 12     |
| 3.1. Género <i>Streptococcus</i> .....   | 16     |
| 4. La caries en Chile.....   | 18     |
| HIPOTESIS.....   | 20     |
| OBJETIVO GENERAL.....  | 20     |
| OBJETIVOS ESPECIFICOS.....   | 20     |
| METODOLOGÍA.....   | 21     |
| 1. Obtención de las muestras.....  | 21     |
| 1.1. Criterios de inclusión.....   | 21     |
| 1.2. Criterios de exclusión.....   | 21     |
| 1.3. Muestras de saliva.....   | 21     |
| 2. Determinación de pH y capacidad tamponante de la saliva.....                        | 22     |
| 3. Aislamiento e identificación de microorganismos a partir de muestras de saliva..... | 22     |
| 3.1. Aislamiento de bacterias.....   | 22     |
| 3.2. Identificación de los aislados.....   | 23     |
| 3.2.a. Test bioquímico.....  | 23     |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.b. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....                     | 24 |
| 3.2.c. Secuenciación y análisis bioinformático.....                       | 25 |
| 4. Análisis estadístico.....  | 26 |
| RESULTADOS.....   | 27 |
| I. Resultados Generales.....  | 27 |
| 1. Distribución por sexo y edad de los grupos en estudio.....             | 27 |
| 2. Determinación del índice de caries mediante ICDAS II.....              | 28 |
| 3. Recuento bacteriano del género <i>Streptococcus</i> .....              | 29 |
| 4. Curva de crecimiento para <i>S. mutans</i> y <i>S. sanguinis</i> ..... | 29 |
| 5. Identificación de los aislados.....                                    | 31 |
| II. Resultados por Objetivo Específico.....                               | 33 |
| a. Objetivo 1.....  | 33 |
| b. Objetivo 2.....  | 34 |
| c. Objetivo 3.....  | 36 |
| d. Objetivo 4.....  | 36 |
| DISCUSION.....  | 37 |
| CONCLUSIONES.....   | 53 |
| SUGERENCIAS.....  | 54 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 55 |
| ANEXOS.....   | 68 |

## RESUMEN

Introducción: La cavidad oral es un ecosistema mixto, formado por diversas especies microbianas, en donde las bacterias cumplen un rol fundamental en el equilibrio salud- enfermedad. Se ha descrito a la caries dental como una de las patologías orales más prevalentes a nivel mundial y se ha observado que especies pertenecientes al género *Streptococcus*, específicamente al grupo *viridans*, están fuertemente relacionadas con su desarrollo. *S. mutans* ha sido una de las especies más asociadas a su inicio y progresión. Sin embargo, esta enfermedad puede ocurrir en ausencia de él y, otras especies pertenecientes a este género, podrían tener una inesperada relevancia en la enfermedad.

Objetivo: Determinar la prevalencia y diversidad de especies bacterianas pertenecientes al género *Streptococcus* en saliva de niños pre-escolares chilenos con y sin caries.

Metodología: Muestras de saliva total no estimulada fueron colectadas de la cavidad oral de niños pre-escolares chilenos, entre 2 y 5 años de edad, que presentan caries (10 individuos) o libres de caries (10 individuos), según índice ICDAS II. Se determinó la capacidad tamponante y pH salival, recuento, aislamiento e identificación bacteriana pertenecientes al género *Streptococcus*. La identificación se realizó mediante test bioquímicos, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación de ADN, según corresponda.

Resultados: Se observaron diferencias en relación a las especies identificadas en las muestras de sujetos con y sin caries. De los aislados obtenidos de sujetos sin caries, las especies más prevalentes fueron *S. salivarius* (40%), *S. mutans* (20%) y *S. thermophilus* (13,3%) y las especies aisladas en baja proporción correspondieron a *S. vestibularis* y *S. sanguinis* (3,3% cada una). De los aislados obtenidos de sujetos con caries, la especie más prevalente correspondió a *S. salivarius* (73,3%) y las especies encontradas en menor proporción correspondieron a *Bacillus subtilis subsp. subtilis* (16,7%), *S. anginosus* y *S. mitis* (3,3% cada una). Los análisis estadísticos para asociar las variables edad, pH, capacidad tamponante y recuento bacteriano, en relación a prevalencia de caries, resultaron ser no significativos.

Conclusiones: Las especies del género *Streptococcus* y otras especies identificadas, tanto para sujetos con y sin caries, fueron diferentes en cuanto a diversidad. Sin embargo, especies que han sido identificadas como autores principales tanto del desarrollo de caries como de su ausencia, fueron encontradas en baja proporción o no fueron encontradas en este grupo etario. *S. salivarius* resultó ser la especie aislada con mayor frecuencia en ambos grupos y, parámetros como edad, pH, capacidad tamponante en relación con prevalencia de caries, no fueron significativos. Esto podría revelar que las propiedades cariogénicas y de virulencia de cada especie estarían en íntima relación con las condiciones ambientales y las asociaciones bacterianas que ellas realicen dentro del *Biofilm*, que una misma especie podría actuar tanto a favor o en contra del hospedero y que un mayor tamaño muestral sería necesario para obtener resultados más concluyentes.

## INTRODUCCION

La cavidad oral es un ecosistema mixto donde cohabitan diversas especies bacterianas, de las cuales han sido detectadas alrededor de 700 especies (Paster y cols., 2001; Ten Cate y cols., 2006). Estas bacterias tienden a conformar biopelículas o *Biofilms*, siendo la placa dental una de ellas (Marsh y cols., 2000; 2004). Crielaard y cols. (2011) estudiaron la composición microbiana oral de 74 niños y adolescentes entre 3 y 18 años de edad, divididos de acuerdo a su estado de dentición. Observaron la presencia de 4 filos en todos los grupos estudiados: *Firmicutes*, *Proteobacterias*, *Bacteroidetes* y *Actinobacterias*. De ellos, el filo *Firmicutes* alberga importantes comensales y patógenos oportunistas de la cavidad oral, como aquellos correspondientes al género *Streptococcus*. Este género se ha descrito como residente de la cavidad oral y representa un bajo porcentaje (20%) del total de las bacterias presentes en ella (Kreth y cols., 2008).

Las bacterias pertenecientes al género *Streptococcus* corresponden a cocos Gram positivos, dispuestos en cadenas cortas de 4 a 6 cocos o largas, anaerobios facultativos y catalasa negativos, forman parte de la microbiota residente de la cavidad oral y vías respiratorias altas, pero también son patógenos oportunistas en enfermedades humanas como la caries dental y la endocarditis infecciosa (Twetman, 2012). Su agrupación ha sido compleja y habitualmente se han clasificado de acuerdo a 3 propiedades generales: propiedades serológicas en base a antígenos de carbohidratos de la pared celular (grupo A, B, C, F y G cuyo antígeno de clasificación corresponde a polisacáridos de pared celular y grupo D y especies de *Enterococcus* cuyo antígeno de clasificación corresponden a lipoproteínas de pared celular), propiedades hemolíticas (en base a su capacidad de hemólisis en agar sangre) y propiedades bioquímicas (fisiológicas).

Históricamente, el primer intento por diferenciar las bacterias pertenecientes al género *Streptococcus* fue hecho en 1903 por Shottmuller (Schleifer, 1986), mediante la hemólisis en agar sangre diferenciando aquellas especies beta-hemolíticas (hemólisis total de los eritrocitos dejando un halo claro) de aquellas que no lo eran (alfa-hemolíticas con hemólisis parcial de los eritrocitos dejando un halo verde por un producto de la degradación de la hemoglobina llamado bili-

verdina y no hemolíticas). Posteriormente, Lancefield (1933) clasificó a este género de acuerdo a la presencia de un antígeno específico en la pared celular asociados a las cepas beta-hemolíticas. Para ello, estudió 106 cepas de *Streptococcus haemolyticus* aisladas a partir de una amplia variedad de fuentes: animales, productos lácteos y también humanos. Se sabía que los *Streptococcus* hemolíticos de origen humano contenían un hidrato de carbono, “sustancia C”, que no era específico de cada especie y se pensaba que este podía ser idéntico en todos los *Streptococcus* hemolíticos. Sin embargo, cuando una variedad más amplia de este género se estudió en animales, no se encontró el antígeno C característico de las cepas humanas. De este modo, las agrupaciones específicas se hicieron sobre una base serológica de acuerdo con los resultados del Test anti-C precipitina, clasificándolos en los siguientes grupos: A (reacción positiva de precipitación y mayormente en cepas humanas), B, C, D y E.

Posteriormente, Sherman (1937), propuso un esquema para la clasificación de los *Streptococcus* en cuatro divisiones de acuerdo a reacciones hemolíticas, por los antígenos de la pared celular y por pruebas fenotípicas como fermentación. Estas cuatro divisiones comprenden: división *pyogénica*, división *viridans*, división *láctica* y división *enterococcus*. De ellos, la división *pyogénica*, incluye las cepas beta-hemolíticas con antígenos de la pared celular de los grupos (A, B, C, E, F, y G). La división *viridans* incluye especies de *Streptococcus* que no fueron beta-hemolíticas, que no eran tolerantes a las condiciones de crecimiento de alto pH, que no fueron tolerantes a la sal, y que no crecían a 10°C. Esta clasificación permitió agrupar a la mayoría de los *Streptococcus* patógenos, sin embargo, es difícil de aplicar ya que algunos antígenos pueden ser compartidos por más de una especie.

Los *Streptococcus* del grupo *viridans* son cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, asociados en parejas o cadenas, catalasa negativos y fermentan la glucosa con producción de ácido láctico. El término *viridans* se debe al halo verde de la hemólisis que producen en agar sangre, debido a una destrucción incompleta de los eritrocitos (hemólisis  $\alpha$ ), también comprenden aquellos *Streptococcus* que no producen hemólisis y a aquellos que, sin ser  $\beta$ -hemolíticos (exceptuando a *S. anginosus*), no poseen antígenos de pared de los grupos B o D,

no crecen en caldo con 6,5% de cloruro de sodio y no son solubles en bilis, ni inhibidos por la optoquina. A pesar de considerarse patógenos de poca virulencia, son agentes etiológicos de diversas patologías entre las cuales se encuentra la Caries dental (Facklam, 2002).

En las últimas décadas, con el desarrollo de la biología molecular (como las técnicas de hibridación de ADN y análisis de secuencias del rRNA 16S), se han conseguido avances en relación a identificación y taxonomía. Sin embargo, no se ha logrado un consenso general sobre la denominación de las especies que integran el género *Streptococcus*.

Coykendall (1989) basándose en la definición genética y su correlación con las características fenotípicas útiles en las pruebas de laboratorio, clasificó a las especies de este grupo en 5 subgrupos: *mutans*, *salivarius*, *sanguis*, *mitis* y *anginosus*.

Actualmente, se acepta la clasificación que divide a las especies pertenecientes a este grupo en 6 subgrupos: *mitis*, *anginosus*, *mutans*, *salivarius* *bovis* y *sanguis* (Alarcón, 2011 visitado en página web <http://www.sochinf.cl>).

Diversos estudios han asociado a *S. mutans* y *S. sobrinus* como los principales agentes microbianos involucrados en el inicio y desarrollo de caries temprana de la infancia (Van Houte, 1994; Seow, 1998; Becker y cols., 2002; Brailsford y cols., 2005; Corby y cols., 2005; Okada y cols., 2005; Figueroa y cols., 2009). Sin embargo, otros microorganismos del grupo *viridans* podrían desempeñar roles importantes (Van Houte, 1994), hasta ahora desconocidos. Un ejemplo de ello es *S. sanguinis*, que se ha asociado, en conjunto con bajos recuentos de *S. mutans*, a salud oral. Sin embargo, el rol de otras especies en el desarrollo de caries temprana de la infancia como *S. mitis* y *S. salivarius* continúa siendo una pregunta sin respuesta (Seow y cols., 2009).

Es por esta razón, que en este trabajo de investigación, se intentará determinar la diversidad y abundancia de especies bacterianas pertenecientes al género *Streptococcus* en saliva de niños pre-escolares chilenos con y sin caries. Además

se medirá el pH y la capacidad tamponante de la saliva, con el fin de distinguir posibles asociaciones con prevalencia de Caries.

## MARCO TEORICO

Se han descrito como patologías orales más prevalentes en el mundo, así como en nuestro país: la caries dental, la enfermedad periodontal y las anomalías dentomaxilares (Ministerio de Salud MINSAL, 2012 visitada en página web <http://www.minsal.gob.cl>). Pese a los intentos de disminuir la incidencia de las enfermedades bucales, éstas siguen siendo un importante problema de Salud Pública debido a su alta prevalencia, impacto en la vida de los individuos, costos asociados a su tratamiento y secuelas que ellas dejan.

### 1. Caries

#### 1.1 Definición de caries.

Antiguamente, se definía a la caries dental como una enfermedad infecciosa y transmisible, sin embargo, se ha observado que ésta no cumple con parte importante de los postulados de Koch que han permitido definir a las enfermedades como infecciosas:

a.- El agente patógeno no siempre está presente en caso de haber enfermedad y no siempre está ausente en las personas sanas (Loesche y Straffon; 1979).

b.- No siempre es aislado del cuerpo en un cultivo puro a partir de las lesiones de la enfermedad.

c.- El agente no siempre provoca la enfermedad en un animal susceptible al ser inoculado (Kleinberg, 2002).

Y por otro lado no sería transmisible, ya que, si bien se transmiten las bacterias, no necesariamente se desarrolla la enfermedad de caries.

De este modo, en la actualidad, se entiende que la caries dental ocurriría como resultado de un desequilibrio de la microbiota autóctona oral en respuesta a cambios en el medio ambiente, entre ellos consumo regular de azúcares fermentables, alteración del flujo salival y mala higiene oral. Esto se traduce en producción de ácidos por parte de estas bacterias con la consecuente disminución

del pH, lo que seleccionaría bacterias más acidúricas y acidogénicas, favoreciendo así el inicio del proceso de desmineralización de los tejidos dentarios, que sumado al tiempo de exposición, se traduciría en el comienzo de la enfermedad (Marsh y cols., 2000; Marsh, 2009).

## **1.2 Epidemiología de la caries.**

La Organización Mundial de la Salud, en su informe sobre salud oral del año 2003, define epidemiológicamente a la caries como una Pandemia, reportando una prevalencia en niños de edad escolar de un 60-90% (Petersen, 2003). Pese a que la caries posee una gran distribución en la población, se ha observado un descenso de su prevalencia a nivel mundial, especialmente en los países desarrollados, debido a la implementación de políticas y planes de promoción y prevención en salud. Las diferencias se han atribuido principalmente al consumo de azúcar, uso de flúor, acceso a atención dental y determinantes sociales de la salud (nivel de pobreza, educación, ruralidad extrema) (Petersen, 2003; Duque y Mora, 2012).

Se ha observado también que los niveles de daño por caries son más altos en América y relativamente bajos en África (Petersen y cols., 2005).

Entre 1996 y 1999, se describió que los adolescentes chilenos de 12 años presentaron una prevalencia de caries de un 86% y un índice de daño por caries promedio (COPD) de 3,42 piezas dentarias (Urbina y cols., 1996; 1999).

Posteriormente, se evaluó que la caries dental aumenta su prevalencia con la edad, alcanzando un 16,8% a los 2 años, un 49,6% a los 4 años (Ceballos y cols., 2007), 70,4% a los 6 años (Soto y cols., 2007a), 62,5% a los 12 años, llegando casi a un 100% en la población adulta (Soto y cols., 2007b).

Soto y cols. (2007b), con el objetivo de continuar la línea de vigilancia epidemiológica de los estudios realizados entre los años 1996 y 1999, con respecto a su estudio realizado en adolescentes chilenos de 12 años, concluyeron que la prevalencia de niños libres de caries correspondía a un 37,5%, observando un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de este grupo, en comparación a los estudios realizados por Urbina y cols. (1996; 1999).

Comparando la prevalencia de adolescentes chilenos de 12 años libres de caries, por sexo, se observó que el sexo masculino presentó una mayor prevalencia de dientes libres de caries que el sexo femenino y, el índice promedio de COPD encontrado en este estudio correspondía a 1,9 dientes con historia de caries, donde el sexo masculino presentó un COPD menor que el femenino con 1,69 y 2,09, respectivamente.

Pese a que Chile ha seguido la tendencia mundial a la disminución de la prevalencia de caries y haber alcanzado uno de los objetivos sanitarios 2000-2010 del MINSAL en cuanto a la disminución del índice COPD, se observan diferencias significativas en relación a distribución geográfica y nivel socioeconómico (Soto y cols., 2007b). Esto indica que pese a los esfuerzos realizados por el sistema de salud público y privado, aún es necesario un mayor conocimiento de la etiopatogenia de esta enfermedad que permita enfocar los recursos en aumentar la prevención y la investigación, mejorar su tratamiento y permitir un mejor acceso a la atención a fin de disminuir tanto la prevalencia como las secuelas de la enfermedad.

## **2. ICDAS.**

Tradicionalmente, la caries se diagnosticaba en la etapa de cavitación o más recientemente en la fase de lesión que se extiende en dentina, siendo este el punto donde la mayoría de los Odontólogos concuerdan en que se requiere una restauración como tratamiento. Sin embargo, la enfermedad está presente mucho antes, cuando comienza el proceso de desmineralización del esmalte, por lo tanto, la enfermedad puede no ser diagnosticada, registrada y tratada de manera adecuada en sus etapas iniciales. Estas diferencias en los criterios de diagnóstico, han impedido la comparación entre los estudios epidemiológicos o ensayos de investigación (Pitts, 2004).

En el año 2002, un grupo de investigadores, epidemiólogos y Odontólogos se reunieron a revisar e integrar diferentes sistemas de detección de caries, creando un nuevo sistema, el cual es el Sistema Internacional de Detección y Evaluación de caries (ICDAS) (Ismail y cols., 2007), método visual desarrollado para proporcionar a médicos, epidemiólogos e investigadores una herramienta que

permita la detección y el diagnóstico de la enfermedad de una manera estandarizada, basada en la evidencia y que permita su aplicación en diferentes entornos y situaciones. Sistema que es modificado en sus criterios, dando origen a ICDAS II (ICDAS Foundation, 2012 visitado en página web <http://www.icdas.org>).

ICDAS II (International Caries Detection and Assessment System) es un nuevo sistema internacional de detección de caries, consensuado en Baltimore, Maryland, USA en el año 2005 con el objetivo de crear un método visual para la detección de caries en sus fases más tempranas que permitiera detectar su gravedad y nivel de actividad.

Su nomenclatura comprende 2 dígitos (XX), el primer dígito corresponde al código de restauración que se explica en la Tabla N°1, cuyos valores van del 0 al 8. Para dientes ausentes se utiliza como primer dígito el código 9, dividiéndose en subcódigos del 0 al 9 como se muestra en la Tabla N°2. El segundo dígito corresponde al código de caries de esmalte y dentina que va del 0 al 6, el cual se explica en la Tabla N°3 (ICDAS Foundation, 2012 visitado en página web <http://www.icdas.org>).

**Tabla N°1: Código de restauración.**

|   |   |
|---|---|
| 0 | No restaurado ni sellado.                             |
| 1 | Sellante parcial.                                     |
| 2 | Sellante completo.                                    |
| 3 | Restauración color diente.                            |
| 4 | Restauración con amalgama.                            |
| 5 | Corona inoxidable.                                    |
| 6 | Corona o carilla en porcelana, metal-porcelana u oro. |
| 7 | Restauración perdida o fracturada.                    |
| 8 | Restauración temporal (vidrio ionómero o IRM).        |

**Tabla N°2: Código de diente ausente.**

|    |  |
|----|--|
| 90 | Implante realizado por pérdida dental por otras causas.                        |
| 91 | Implante realizado por pérdida dental por caries.                              |
| 92 | Póntico realizado por pérdida dental por otras causas.                         |
| 93 | Póntico realizado por pérdida dental por caries.                               |
| 96 | Superficie de los dientes que no pueden ser examinadas. Superficies excluidas. |
| 97 | Diente ausente extraído por caries.  |
| 98 | Diente ausente por otras razones.  |
| 99 | No erupcionado.  |

**Tabla N°3: Códigos de caries en esmalte y dentina tanto en dentición permanente y temporal.**

|   |   |
|---|---|
| 0 | Diente sano al secado con aire durante 5 minutos.   |
| 1 | Caries limitada a esmalte como mancha blanca/ marrón en esmalte seco.   |
| 2 | Caries en esmalte como mancha blanca/ marrón en esmalte húmedo.   |
| 3 | Microcavidad en esmalte seco menor a 0,5 mm sin dentina visible.  |
| 4 | Caries como sombra oscura de dentina vista a través del esmalte húmedo con o sin pérdida superficial del esmalte. |
| 5 | Caries como exposición de dentina en cavidad mayor a 0,5 mm hasta la mitad de la superficie dental en seco.       |
| 6 | Caries como exposición de dentina en cavidad mayor a la mitad de la superficie dental.                            |

Este índice posee entre un 70 a 85% de sensibilidad y una especificidad entre 80 a 90% en detección de caries, tanto en dentición permanente como temporal, variando el rango de acuerdo al grado de entrenamiento y calibración del examinador y, con un índice de concordancia Kappa igual o mayor a 0,65 (Jablonski-Momeni y cols., 2008; Diniz y cols., 2009; Shoaib y cols., 2009).

Bader y cols. (2001), señalaron que existe pobre evidencia sobre validez de detección y diagnóstico de caries en dentición temporal. Ismail y cols. (2007),

observaron que existe una reducida investigación sobre la reproducibilidad y validez de criterios ICDAS en superficies oclusales. Ellos analizaron estos parámetros de ICDAS II en 112 molares temporales extraídos con y sin caries (tanto en superficies oclusales como proximales), los cuales fueron evaluados por 3 examinadores calibrados. Concluyeron que la validez y reproducibilidad de criterios ICDAS II es aceptable al ser aplicado en molares temporales.

### **3. *Biofilm*, Placa dental y Microbiota oral.**

La cavidad oral es un ecosistema mixto que gracias a sus propiedades de temperatura y humedad es capaz de permitir el crecimiento de una variedad de microorganismos (virus, micoplasmas, bacterias, hongos y protozoos), siendo las bacterias el grupo más representativo y de las cuales han sido detectadas alrededor de 700 especies (Socransky y cols., 2000; Paster y cols., 2001; Becker y cols., 2002; Aas y cols., 2005; Ten Cate, 2006). De ellas, solo la mitad ha podido ser cultivada, siendo identificada la mitad restante gracias a la biología molecular y la secuenciación de ADN (Corby y cols., 2005; Ten Cate, 2006). Estas bacterias tienden a conformar biopelículas o *biofilms*, siendo la placa dental una de ellas (Marsh y cols., 2000; 2004), la cual cumple un rol importante en la mantención del equilibrio salud-enfermedad en la cavidad oral (Socransky y Haffajee, 2000; Hedge y cols., 2005).

El *Biofilm* se define como una comunidad microbiana estructurada, organizada y compleja, formada por uno o varios tipos de microcolonias, donde los microorganismos se agrupan y organizan, asociándose a una superficie o sustrato vivo o inerte, mediante la excreción de matriz extracelular adhesiva, la cual está formada principalmente por exopolisacáridos y poseen una arquitectura abierta de canales y huecos que permiten el transporte de nutrientes, metabolitos y productos de desecho. Estas asociaciones permiten que entre ellos se adquieran funciones, relaciones y dependencias que les permiten adaptarse al medio ambiente que los rodea y comunicarse por medio del “*quórum sensing*”. Este fenómeno, en el cual la acumulación de moléculas de señal permite a una célula individual percibir el número de bacterias (densidad celular) que tiene a su alrededor, por la detección y reacción con estos compuestos, es suficiente para

que las bacterias inicien la expresión coordinada de genes específicos, lo que implica un cambio en su comportamiento hacia una fase multicelular. Estos cambios se traducen en la activación de genes específicos en respuesta a la señal (Hojo y cols., 2009). De esta manera obtienen beneficios como: producción de polímeros extracelulares para formar una matriz funcional que les otorga protección física contra la fagocitosis, transferencia de genes que les otorgan mayor resistencia a agentes antimicrobianos y enzimas, síntesis de proteínas nuevas, cohesión, heterogeneidad ambiental en cuanto a nutrientes, pH, CO<sub>2</sub> y potencial redox, formación de redes, cadenas alimentarias y obtención de mayor virulencia (Marsh y cols., 2000). El *Biofilm* oral además puede desarrollarse sobre la superficie dentaria o sobre los tejidos blandos (Guillarte y Perrone, 2004).

La formación del *Biofilm* oral comprende varias etapas que van desde la formación de la película adquirida (PA): delgada membrana biológica que se deposita en diferentes superficies orales, restauraciones y aparatos protésicos como resultado de la adsorción de proteínas y glucoproteínas contenidas en la saliva y el líquido crevicular, así como también otras provenientes de productos microbianos y celulares; adhesión bacteriana a las proteínas de la PA, coagregación bacteriana, formación de microcolonias intercaladas y finalmente la estructuración y maduración del *biofilm* (Francia y cols. 2007).

La placa dental se ha definido como la comunidad microbiana que se desarrolla sobre la superficie dental, embebida en una matriz de polímeros de origen bacteriano y salival (Marsh y cols., 2000). Es el primer *biofilm* en ser estudiado tanto en su composición microbiana como en su sensibilidad a los agentes antimicrobianos. Antonie van Leeuwenhoek, en el siglo XVII, fue pionero en el estudio de *biofilms* mediante la observación microscópica directa de raspados de dientes humanos, informando una gran diversidad y cantidad de lo que él llamó “animáculos”, sugiriendo la posibilidad de que hubiera microorganismos involucrados en la producción de caries.

En el siglo XIX, Miller propuso la “teoría quimioparasitaria de la caries”, la cual define que esta enfermedad ocurre por una desmineralización del diente como

resultado de la producción de ácidos por las enzimas bacterianas que degradan los hidratos de carbono.

A partir de esta observación surge la “hipótesis de placa inespecífica” que propone que la caries sería producto de la interacción de todas las bacterias orales, atribuyendo a la placa dental el concepto de comunidad microbiana (Loesche, 1976). Sin embargo, en el siglo XX, esta hipótesis es desplazada por la “hipótesis de placa específica” que propone que sólo un reducido grupo de especies bacterianas pertenecientes a la placa dental estarían directamente relacionadas con el origen de esta enfermedad (Van Houte, 1994).

Actualmente se acepta la “hipótesis ecológica de la caries” (Takahashi y Nyvad, 2008; 2011), según la cual las enfermedades producidas por la placa dental son consecuencia de un desequilibrio en la microbiota residente. En ella se describe que el proceso de la caries consistiría de 3 etapas o Fases: Fase dinámica, Fase acidogénica y Fase acidúrica. En la Fase dinámica, la acidez del medio favorece el equilibrio desmineralización-rem mineralización o cambia el equilibrio mineral hacia la ganancia neta de él. El esmalte clínicamente sano contiene principalmente bacterias del grupo no-mutans *Streptococci* (no-MS) y *Actinomyces*.

En la fase acidogénica, al disminuir el pH del medio, aumenta adaptativa y selectivamente la capacidad acidogénica y acidúrica de bacterias no-MS. Esto se traduce, en el tiempo, en un desequilibrio en la balanza desmineralización-rem mineralización favoreciendo la pérdida de mineral del diente, dando lugar a la iniciación y progresión de la caries dental para así, en la Fase acidúrica, microorganismos como *Streptococcus mutans*, Lactobacilos, no-MS acidúricas, *Actinomyces*, Bifidobacterias y levaduras pueden llegar a ser dominantes, pudiendo considerarse como biomarcadores de sitios de progresión de caries particularmente rápidas (Van Ruyven y cols., 2000; Takahashi y Nyvad, 2008; 2011). Es así como el pH del medio ambiente es el principal determinante de los cambios que se producen en la microflora durante la caries, considerándose un pH normal de la saliva de 6 a 7, lo que significa que es ligeramente ácida. Para poder revertir la acidificación del medio la saliva posee la función de amortiguación y remoción a través de los siguientes componentes: bicarbonato, fosfato, urea,

proteínas y enzimas, siendo el bicarbonato el sistema tampón más importante. Además, se genera amoníaco y aminas que también sirven como un amortiguador neutralizando ácidos (Humphrey y Willianson, 2001).

Van Ruyven y cols. (2000) describen en su estudio realizado en placa supragingival de sujetos adultos con y sin caries, que dentro de las poblaciones cariogénicas predominantes se encuentran bacterias Gram-positivas del grupo Lactobacilli y mutans Streptococci (MS), y las bacterias pertenecientes al grupo no-MS. De ellas, las más relevantes fueron *S. mutans* y *S. sobrinus* pertenecientes al grupo MS.

Recientes estudios, a través de métodos moleculares de identificación bacteriana, como PCR, han demostrado que las especies implicadas en el desarrollo de la caries dental son más complejas y variadas que sólo la presencia de *S. mutans* y *Lactobacillus* (Figueroa y cols., 2009).

Corby y cols. (2005) analizaron mediante PCR, las especies bacterianas asociadas con caries dental y con salud dental en un grupo de 204 individuos gemelos, en edades comprendidas entre 1,5 y 7 años de edad, diseñando dos modelos de estudio: Modelo 1: Sujetos con caries de los cuales se obtuvieron muestras de placa de esmalte sano y de dientes con lesiones de caries en diferentes grados de severidad. Modelo 2: Sujetos sin caries y muestras de placa de esmalte sano. Se comparó las especies bacterianas encontradas en muestras de esmalte sano tanto de individuos con caries como de individuos sin caries.

En ambos modelos se encontraron coincidencias en cuanto a la abundancia de microorganismos asociados con caries, siendo identificadas bacterias Gram positivas como: *Actinomyces*, *Lactobacillus* y *S. mutans* (en un 90% en sujetos con caries), mientras que los sujetos libres de caries presentaron abundancia de otras bacterias tales como: *S. sanguinis*, *S. parasanguinis*, *Abiotrophia defectiva*, *Gemella haemolysans*, *S. mitis/oralis* y *S. cristatus*.

Este mismo autor describió que *S. mutans* predomina durante el inicio y progresión de la caries, mientras que *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* predominan en etapas avanzadas, existiendo una transición entre microorganismos anaerobios

facultativos gram positivos a bacterias anaerobias estrictas gram positivas y negativas (Figueroa y cols., 2009). Sin embargo, se desconocen con exactitud los factores que determinan esta sucesión y las interacciones existentes entre los microorganismos que coexisten en el *biofilm* dental, tanto en condiciones de salud como en presencia de esta enfermedad, lo que es concordante con revisiones anteriores (Van Houte, 1994).

### 3.1 Género *Streptococcus*

Diversos autores han aislado de la cavidad oral distintas especies de *Streptococcus*. Su crecimiento aeróbico se ve favorecido en presencia de un 5 a 10% de CO<sub>2</sub>, su temperatura óptima de crecimiento es de 36± 1°C y poseen un metabolismo fermentativo que da origen a la producción de ácidos.

En la cavidad bucal de sujetos con caries, se han aislado *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. parasanguinis*, *S. sanguinis* (*S. sanguis*), *S. cristatus*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. constellatus*, *S. gordonii*, *S. anginosus* y *S. oligofermentans* (Figueroa y cols., 2009).

De todas estas especies, *S. mutans* ha sido la más estudiada. En cuanto a su mecanismo de patogenicidad, se ha estudiado su poder acidógeno, acidófilo y acidúrico, su propiedad de síntesis de polisacáridos extracelulares de tipo glucanos insolubles y solubles en agua y fructanos. Estos facilitan la formación del *biofilm* dental (Figueroa y cols., 2009), así como la de síntesis de polisacáridos intracelulares (Gibbons y Socransky, 1962; Napimoga y cols., 2005), su capacidad adhesiva debido a las proteínas de superficie bacteriana, las cuales posibilitan su adhesión a superficies duras en ausencia de glucanos, su capacidad agregativa y coagregativa a través de mutanos, glucosiltransferasas y proteínas receptoras de glucanos y, además, producción de bacteriocinas con actividad sobre otros microorganismos (Napimoga y cols., 2005).

Pese a existir evidencia que sustenta la asociación de *S. mutans* con caries inicial y avanzada, se ha observado que esta enfermedad puede ocurrir en ausencia de esta bacteria (Loesche y Straffon, 1979), y que individuos con altos recuentos de ella no necesariamente desarrollan lesiones de caries (Kleinberg, 2002).

Becker y cols. (2002), mediante PCR compararon bacterias no cultivables y especies no asociadas anteriormente con caries en sujetos sanos y con la enfermedad, entre 2 y 8 años de edad y observaron diferencias significativas en nueve microorganismos. *S. sanguinis* fue asociada a sujetos sanos y en orden decreciente fueron asociados a caries: *A. gerencseriae*, *Bifidobacterium*, *S. mutans*, *Veillonella*, *S. salivarius*, *S. constellatus*, *S. parasanguinis* y *L. fermentum*. Especies de *Actinomyces*, en particular *A. gerencseriae* jugaron un papel relevante en el inicio de caries, mientras que *Bifidobacterium* fue el patógeno reportado mayoritariamente en caries avanzada.

Se han encontrado diferencias en la microbiota presente en molares con lesión de mancha blanca, destacando la presencia de grandes proporciones de *S. oralis* y *S. salivarius* en molares recién erupcionados y de *S. mutans* en molares completamente erupcionados, mientras que la presencia de *Actinomyces naeslundii* se relacionó con molares sanos (Braisford y cols., 2005), quedando en evidencia que otras especies de *Streptococcus* pueden estar asociadas al desarrollo de lesiones de caries iniciales en molares permanentes en erupción.

Li y cols. (2007), evaluaron la diversidad microbiana presente en la placa dental de un grupo de niños de origen hispano entre 2 y 8 años de edad, con lesiones de caries severa en edad temprana y un grupo de niños sin caries. Encontraron diferencias en el recuento de especies en ambos grupos lo que sugeriría que la diversidad y complejidad de la microbiota en la placa dental es significativamente menor en niños con caries que en niños libres de caries. Así, se sugiere que la microbiota oral asociada a caries dental presentaría menor diversidad de especies.

Por otro lado, Gizani y cols. (2009), analizaron la distribución de bacterias cariogénicas en muestras de 5 sitios intraorales (saliva, placa supragingival y subgingival, dorso de lengua y tejidos blandos), en niños entre 3 y 12 años de edad divididos en 3 grupos según dentición (temporal, mixta primera fase y mixta segunda fase). Encontraron que las especies *S. mitis*, *S. oralis*, *S. salivarius* y *S. gordonii*, junto con *Actinomyces* y *Lactobacillus* estaban presentes en casi todos los niños y en todos los hábitats. De ellos, *S. mutans* y *Lactobacillus* no se detectaron en muestras supragingivales y subgingivales de sujetos libres de

caries. *S. mutans* y *S. sobrinus*, se detectaron en casi todos los niños a pesar de su corta edad, siendo *S. sobrinus* más frecuente que *S. mutans*.

Carlsson y cols. (1970), fueron uno de los primeros en describir *S. sanguinis* en cavidad oral, observando que coloniza antes que *S. mutans*, una vez ocurrida la erupción dentaria. Posteriormente, Caufield y cols. (1993), señalaron que este tiempo de colonización ocurriría alrededor de los 9 meses de edad y que la colonización temprana por *S. sanguinis* estaba relacionada con un retardo de 6 meses en la colonización por *S. mutans*. Se observó también que los niños que no presentaron niveles detectables de *S. mutans* en saliva, tenían niveles significativamente altos de *S. sanguinis*, en comparación con aquellos niños en los cuales se les detectó niveles de *S. mutans* en saliva. Así, la colonización por *S. mutans* coincide con una disminución de los niveles de *S. sanguinis*.

Todos estos hallazgos en conjunto sugerirían que la colonización de *S. sanguinis* podría influir en la sucesiva colonización de *S. mutans* y que podría existir un cierto antagonismo entre estas especies.

#### **4. La Caries en Chile**

En Chile, existen pocos estudios que analicen la problemática de la caries desde un punto de vista microbiológico tanto en niños como en adultos.

Salazar y cols. (2008), reportan que los métodos microbiológicos y bioquímicos, disponibles a esa fecha en Chile, no permiten la rápida detección e identificación de *S. mutans* y *S. sobrinus*. En su trabajo de investigación implementaron la metodología de PCR para detectar la presencia de estas bacterias en saliva. Participaron de su estudio 51 escolares (5 a 17 años), provenientes de colegios de la ciudad de Temuco, a los cuales se les realizó recuento de *Streptococcus* del grupo *mutans* en saliva por método microbiológico y, la diferenciación de especies por la técnica de PCR. Los resultados mostraron que la sensibilidad de la técnica de PCR fue diez veces superior a la sensibilidad del método microbiológico utilizado, concluyendo que la técnica de PCR es útil para la detección rápida de *S. mutans* y *S. sobrinus* en saliva.

Rodríguez (2009), concluyó que la prevalencia de caries para una muestra de 380 pre-escolares, cuyo promedio de edad es de 4,32 años, alcanza un 48,95% y que la proporción de niños libres de caries es de 51,05%, siendo los niños de mayor edad los que más presentan caries. Esto concuerda con el estudio del MINSAL del año 2009 (Soto y cols., 2009), donde se analizó la prevalencia de caries en niños pre-escolares cuyas edades comprendían entre 2 y 4 años, en la región metropolitana.

Linossier y cols. (2011), utilizando un método semi-cuantitativo para cuantificar bacterias, evaluaron la colonización por *S. mutans* en muestras de saliva obtenidas a partir de 14.649 pacientes de 5 a 40 años de edad de la Región Metropolitana. Concluyeron que el recuento de *S. mutans* relacionados con la edad fue significativo y que el método semi-cuantitativo es útil para determinar la colonización por *Streptococcus mutans*.

De esta manera, los estudios realizados en Chile se han enfocado principalmente en evaluar la prevalencia de caries (Gamonal, 1996, Urbina y cols., 1996, 1997, 1999; Ceballos y cols., 2007; Rodríguez, 2009), y en aislar, identificar y genotipificar *S. mutans* (Maturana, 2002), dejando de lado la posible asociación y correlación de caries con otras especies del género como *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, entre otros; además del grupo *Lactobacilli* y levaduras.

El presente trabajo de investigación intentará determinar la diversidad y abundancia de especies de bacterias pertenecientes al género *Streptococcus* en saliva de niños pre-escolares chilenos con y sin caries, a través del aislamiento e identificación de las cepas obtenidas mediante test bioquímicos y técnicas moleculares utilizando PCR y secuenciación. Se medirá también el pH y la capacidad tamponante de la saliva, con el fin de establecer posibles asociaciones con prevalencia de caries.

## **HIPOTESIS**

La prevalencia y diversidad de especies bacterianas pertenecientes al género *Streptococcus*, junto con parámetros químicos salivales como pH y capacidad tamponante, difieren en saliva de niños pre-escolares chilenos con y sin caries.

## **OBJETIVO GENERAL**

Establecer diferencias en la prevalencia y diversidad de bacterias pertenecientes al género *Streptococcus*, junto con parámetros químicos salivales como pH y capacidad tamponante, en saliva de niños pre-escolares chilenos con y sin caries.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1.- Determinar prevalencia y diversidad de bacterias pertenecientes al género *Streptococcus*, junto con pH y capacidad tamponante, en saliva de niños pre-escolares chilenos sin caries.

2.- Determinar prevalencia y diversidad de bacterias pertenecientes al género *Streptococcus*, junto con pH y capacidad tamponante, en saliva de niños pre-escolares chilenos con caries.

3.- Comparar prevalencia y diversidad de bacterias pertenecientes al género *Streptococcus*, junto con pH y capacidad tamponante, en saliva de niños pre-escolares chilenos con y sin caries.

4.- Determinar posibles asociaciones entre pH y capacidad tamponante con prevalencia de caries.

## METODOLOGIA

### 1.- Obtención de las muestras.

Se colectaron muestras de saliva total no estimulada provenientes de la cavidad oral de niños pre-escolares chilenos, entre 2 y 5 años de edad, que presentan caries (10 individuos) o libres de caries (10 individuos). Estos niños fueron reclutados visitando el jardín infantil “Virgen de las Maravillas” ubicado en la comuna de Renca y el jardín infantil y sala cuna del Hospital Clínico Universidad de Chile (previo acuerdo con la Directora correspondiente de cada jardín). En el proceso de toma de muestras y examen intra-oral de los niños colaboró desinteresadamente el Dr. Gonzalo Rodríguez, Odontólogo calibrado en la medición del índice de caries ICDAS II, quien pertenece al Departamento de Odontología Restauradora de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Previamente, cada padre o tutor firmó voluntariamente un consentimiento informado, el cual está aprobado tanto por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología como por el Comité asesor de Bioética de FONDECYT (Anexo N°1).

**Criterios de inclusión:** niños con caries y libres de caries entre 2 y 5 años de edad. Firma del consentimiento informado por parte del padre o tutor del niño.

**Criterios de exclusión:** niños que hayan consumido antibióticos y/o antifúngicos los últimos 6 meses previos a la toma de muestra; padezcan diabetes tipo I; sufran de alguna enfermedad que afecte la secreción salival; daño cognitivo severo; falta de colaboración durante el procedimiento o que no hayan firmado sus padres o tutores el documento de consentimiento informado.

**Muestras de saliva:** 2 ml de saliva total no estimulada proveniente de la cavidad oral de cada individuo fue colectada en frascos estériles mediante expectoración o directamente con pipeta Pasteur plástica blanda. Los frascos con saliva se mantuvieron a 4°C para su transporte al laboratorio de Bioquímica y Biología Oral de la Facultad de Odontología para su procesamiento y análisis. La mitad del volumen de saliva se utilizó en los análisis químicos y el volumen restante en el estudio microbiológico.

## **2.- Determinación de pH y capacidad tamponante de la saliva.**

Cada muestra de saliva fue homogeneizada para la medición de ambos parámetros mencionados. Para determinar la capacidad tamponante de la saliva total, se utilizó el método de Ericsson (Ericsson, 1959), que consiste en tomar 500  $\mu$ l de saliva y añadir 1,5 ml de ácido clorhídrico (HCl) 0,005 M. Luego, a esta solución se le agregan 20  $\mu$ l de alcohol isoamílico para evitar la formación de espuma. Se agita durante 20 min para remover el CO<sub>2</sub>. Finalmente, se mide el pH final. La capacidad tamponante alta se define por un pH mayor a 6,5; capacidad tamponante normal con un pH entre 5,75 y 6,50; capacidad tamponante baja con un pH entre 4,0 y 5,74 y capacidad tamponante muy baja con un pH menor a 4,0. Tanto la capacidad tamponante como el pH de la saliva total se determinó en un pH-metro (Ezdo modelo PL-600, LabTec).

## **3.- Aislamiento e identificación de microorganismos a partir de muestras de saliva.**

### **3.1.- Aislamiento de bacterias.**

1 ml de saliva total fue homogeneizada y diluida en tampón PBS: buffer salino fosfato (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4). Para la obtención de bacterias del género *Streptococcus*, 100  $\mu$ l de las diluciones 1/100 y 1/1000 se sembraron, por duplicado, en agar mitis salivarius para realizar el recuento de *Streptococcus* totales. Las placas fueron incubadas durante 48h a 37°C y a una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las colonias presentes en las distintas placas fueron fenotípicamente identificadas, cuantificadas y expresadas como unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). Posteriormente, se cultivaron al azar distintos fenotipos de colonias obtenidas de cada placa en 5 ml de medio BHI (infusión cerebro corazón), se incubaron a 37°C durante 48h en jarras de anaerobiosis. Al término de la incubación se tomó una alícuota del cultivo para almacenar el aislado bacteriano en criotubos con glicerol al 20% y almacenarlo a -80°C hasta su posterior análisis.

### 3.2.- Identificación de los aislados.

Se utilizaron como controles las cepas *S. mutans* ATCC 25175 y *S. sanguinis* SK 36 ATCC BAA-1455.

Previo a realizar la identificación bacteriana, se realizaron curvas de crecimiento para las cepas controles antes mencionadas. Para ello se inocularon matraces (por duplicado), que contenían 30 ml de medio BHI, con 100 µl de un cultivo en fase exponencial tardía de la bacteria correspondiente. Este último a su vez fue inoculado con una colonia fresca aislada de la bacteria en estudio. Los cultivos se incubaron y permanecieron en jarras anaeróbicas a 37°C. Cada cierto período de tiempo se tomaron alícuotas de cultivo para medir densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm y, obtener de este modo, las curvas de crecimiento para cada bacteria para así determinar sus fases exponenciales y estacionarias de cultivo, a fin de tener un parámetro para saber en forma aproximada el tiempo de incubación de los aislados clínicos, que permitiera obtener células en cantidad suficiente que asegure una cantidad adecuada de ADN que pudiera servir como templado para las reacciones posteriores de PCR.

Las bacterias controles se cultivaron en medio BHI hasta fase exponencial media-tardía, previamente determinado en las curvas de crecimiento. Para la obtención de ADN genómico bacteriano, se utilizó QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN) y las muestras se procesaron según las instrucciones del proveedor.

Una vez realizado los procedimientos anteriores, se procedió a la identificación de los aislados obtenidos de cada una de las muestras. La identificación de bacterias pertenecientes al género *Streptococcus* se realizó en base a 3 métodos: a) Test bioquímico, b) PCR y c) Secuenciación.

**3.2.a.- Test bioquímico:** En primera instancia, para identificación de bacterias pertenecientes al género *Streptococcus*, se utilizó el sistema bioquímico estándar API 20 STREP strips (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France). Las muestras se procesaron según las instrucciones del proveedor.

**3.2.b.- Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR):** En segunda instancia, se realizaron reacciones de PCR para la identificación molecular de especies. Se utilizaron partidores específicos para identificar *S. mutans* y *S. sanguinis*, los cuales fueron diseñados a partir de genes específicos descritos para ellas (Tabla N°4). La mezcla de reacción de PCR (para identificar *S. mutans*), en un volumen final de 25 µl, incluyó: 2 U de *Taq* polimerasa (BIOLASE), entre 10 y 100 ng de ADN molde, 1 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1 µl de cada uno de los partidores a una concentración de 25 µM, 0,5 µl dNTP's 10 mM, 2,5 µl de tampón de PCR 10X pH 8,4 (Tris-HCl 200 mM y KCl 500 mM) y agua estéril. La amplificación del ADN correspondiente se realizó en un termociclador DNA Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems), utilizándose el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineación de los partidores a 55°C por 30 s y elongación a 72°C por 3 min. Finalmente, las reacciones se dejaron para una extensión final a 72°C por 10 min y luego se mantuvieron a 4°C hasta su análisis. El programa de amplificación para *S. sanguinis* presentaba algunas modificaciones, el cual consistió en: desnaturalización inicial a 98°C por 3 min, 30 ciclos de desnaturalización a 98°C por 10 s, alineación de los partidores a 70°C por 1 min y elongación a 70°C por 1 min. Las reacciones se dejaron para una extensión final a 72°C por 10 min y luego se mantuvieron a 4°C hasta su análisis.

Para obtención de ADN bacteriano templado, cada aislado (mantenido a -80°C) se refrescó en medio BHI líquido o con agar. Posteriormente, se tomó una colonia aislada o 125 µl de cultivo para inocular un tubo cónico que contenía 5 ml de medio BHI líquido y se incubó a 37°C durante un tiempo determinado previamente (de acuerdo a tiempo de curva de crecimiento de las bacterias controles en que se alcanza fase exponencial tardía). Al cabo de este tiempo, se prepararon papeles filtros (3MM Whatman) para cada aislado, en donde se depositaron 250 µl del cultivo. Se incubaron a 30°C para permitir el secado de los filtros. Luego se cortaron 4 discos desde cada papel filtro, los cuales se depositaron en un tubo de PCR. Previo a la amplificación, los discos se lavaron por el método de NaOH (Lefimil y cols. 2013), el cual consiste en lavar los discos con 200 µl de NaOH 20 mM durante 30 min a temperatura ambiente, se retira este volumen y se agregan 200 µl de Tris-EDTA pH 8 (TE: Tris HCl 10mM pH 8, EDTA 0,1mM), se incuban

durante 5 min a temperatura ambiente y se retira el volumen. Finalmente, los discos se incubaron a 30°C para su secado. De esta manera, los discos se utilizan como templado para la reacción de PCR.

**Tabla N°4: Genes y partidores utilizados en este trabajo.**

| Gen <sup>#</sup>                                | Partidor | Secuencia (5´ - 3´)      | Referencia                |
|---|----------|--------------------------|---------------------------|
| 5´ <i>htrA</i> - 3´ ISR<br>( <i>S. mutans</i> ) | SmF      | tcgcgaaaaagataaacaaca    | Chen y cols.,<br>2007     |
| 5´ <i>htrA</i> - 3´ ISR<br>( <i>S. mutans</i> ) | SmR      | gcccttcacagttggttag      | Chen y cols.,<br>2007     |
| <i>gtfP</i><br>( <i>S. sanguinis</i> )          | GtfPF    | ggatagtggtcagggcagccagtt | Hoshino y cols.,<br>2004  |
| <i>gtfP</i><br>( <i>S. sanguinis</i> )          | GtfPR    | gaacagttgctggacttgctgtc  | Hoshino y cols.,<br>2004  |
| 16S rRNA<br>( <i>E. coli</i> )                  | fD1      | agagtttgatcctggctcag     | Weisburg y<br>cols., 1991 |
| 16S rRNA<br>( <i>E. coli</i> )                  | rP2      | acggctacctgttacgactt     | Weisburg y<br>cols., 1991 |

<sup>#</sup> Entre paréntesis está la especie de bacteria a la cual pertenece el gen mencionado.

El ADN genómico y los productos de PCR, se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Para su visualización, los geles se tiñeron con bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. Los geles se prepararon en amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM pH 8,0) con una concentración de agarosa entre 0,7 y 2,5 % según el tamaño del DNA. Como estándares de peso molecular se utilizaron DNA del fago *λ*/HindIII (Fermentas) y GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas). El DNA se visualizó con luz U.V. en un transiluminador. Las fotos obtenidas se obtuvieron con el sistema de captura de imagen Gel Logic 112 Carestream.

**3.2.c.- Secuenciación y análisis bioinformático:** Las reacciones de secuenciación se realizaron en aquellos casos donde no se obtuvo resultados concluyentes de un aislado de bacteria luego de los 2 métodos mencionados anteriormente. Para la obtención de los amplificados se realizaron reacciones de PCR con los partidores universales para identificación de bacterias: fD1 y rP2 (Tabla N°4), los cuales amplifican una zona conservada del gen 16S rRNA

bacteriano (Weisburg y cols., 1991). Las condiciones en el termociclador fueron las mismas utilizadas para identificar *S. mutans* y utilizando como ADN templado 4 discos extraídos de los papeles filtros Whatman, anteriormente descritos. Posteriormente, los productos de las reacciones de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1X. En los casos que se observara ADN degradado o un amplificado adicional (inespecífico), se recuperaron las bandas que contenían los amplificados esperados de cada aislado, desde los geles de agarosa y, se recortaron con bisturí. Los bloques de agarosa conteniendo el ADN se depositaron en tubos Eppendorf. Todos los amplificados, ya sea aquellos presentes en la mezcla de PCR (con un solo amplificado y esperado), más los presentes en bloques de agarosa, se enviaron a la empresa Macrogen, Inc. Korea, en donde purificaron las reacciones y los bloques de agarosa previo a la secuenciación.

El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas, se realizó utilizando el programa *on line* BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

**4.- Análisis Estadístico:** Para determinar si los valores presentaron o no distribución normal, se aplicó el test de Shapiro-Wilk. Si los valores presentaban distribución normal, se expresó en promedio y desviación estándar; para determinar diferencias entre ambos grupos se aplicó el Test de Student para muestras independientes. Si los valores no presentan distribución normal, se determinó las diferencias entre ambos grupos aplicando el Test no paramétrico Mann-Whitney para 2 muestras independientes. Para analizar asociaciones entre las variables pH y capacidad tamponante con prevalencia de caries, se utilizó el Test de regresión logística. Todos los tests estadísticos se realizaron con el programa Stata v 11.0 y el nivel de significación estadístico se fijó en un valor de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### I.- Resultados Generales

De un total de 20 muestras (10 sujetos sin caries y 10 sujetos con caries), de las cuales se obtuvieron 3 aislados por muestras con un total de 30 aislados para sujetos sin caries y 30 aislados para sujetos con caries, se obtuvieron los siguientes resultados.

#### Distribución por sexo y edad de los grupos en estudio:

Distribuidos por edad, el promedio de los pacientes sin caries fue de 3 años  $\pm$  0,21 y el de los pacientes con caries fue de 3,5 años  $\pm$  0,16. Las frecuencias de cada edad se muestran en la tabla N°5.

**Tabla N°5: Frecuencia de edad de las muestras obtenidas en ambos grupos de estudio.**

| Muestras sin caries | Número de pacientes | Frecuencia (%) |
|---------------------|---------------------|----------------|
| 2 años              | 2                   | 20             |
| 3 años              | 6                   | 60             |
| 4 años              | 2                   | 20             |
| 5 años              | 0                   | 0              |
| Muestras con caries |                     |                |
| 2 años              | 0                   | 0              |
| 3 años              | 5                   | 50             |
| 4 años              | 5                   | 50             |
| 5 años              | 0                   | 0              |

Al asociar ambas variables con prevalencia de caries mediante Test de regresión logística el resultado fue no significativo ( $p= 0,095$ ).

Distribuidos por sexo, en los pacientes sin caries, el sexo femenino correspondió a un 60% y el sexo masculino a un 40% y, de los pacientes con caries, un 40% correspondió a sexo femenino y un 60% a sexo masculino.

## Determinación del índice de caries mediante ICDAS II.

La determinación de la presencia o ausencia de caries en ambos grupos de estudio se realizó mediante el índice ceo-d modificado. Esto significa que para las lesiones de caries (c) se utilizó el segundo dígito del código ICDAS II correspondiente a códigos de caries en esmalte y dentina.

El código ICDAS II para una de las muestras no pudo ser obtenido, por lo que la frecuencia de cada uno de los códigos se calculó en base a 9 muestras en vez de 10.

Los pacientes del grupo sin caries presentaron un 100% de índice ICDAS II = 0 (Completamente sano oralmente) (Tabla N°3).

Los pacientes del grupo con caries presentaron un índice ICDAS II entre 3 y 6 para el código correspondiente a caries en esmalte y dentina. La frecuencia de cada uno de los códigos se observa en la Tabla N° 6.

**Tabla N°6: Frecuencia de pacientes con caries distribuidos según código de caries en esmalte y dentina de ICDAS II.**

| Código ICDAS II de caries en esmalte y dentina  | Número de pacientes | Frecuencia (%) |
|---|---------------------|----------------|
| Código 1: Caries limitada a esmalte como mancha blanca/ marrón en esmalte seco.   | 0                   | 0              |
| Código 2: Caries en esmalte como mancha blanca/ marrón en esmalte húmedo.   | 1                   | 11,1           |
| Código 3: Microcavidad en esmalte seco menor a 0,5 mm sin dentina visible.  | 2                   | 22,2           |
| Código 4: Caries como sombra oscura de dentina vista a través del esmalte húmedo con o sin pérdida superficial del esmalte. | 0                   | 0              |
| Código 5: Caries como exposición de dentina en cavidad mayor a 0,5 mm hasta la mitad de la superficie dental en seco.       | 3                   | 33,3           |
| Código 6: Caries como exposición de dentina en cavidad mayor a la mitad de la superficie dental.                            | 3                   | 33,3           |

**Recuento bacteriano del género *Streptococcus*:**

Una vez sembradas e incubadas las muestras de saliva de ambos grupos de estudio, se realizó el recuento bacteriano del género *Streptococcus* y se expresó en UFC/ml.

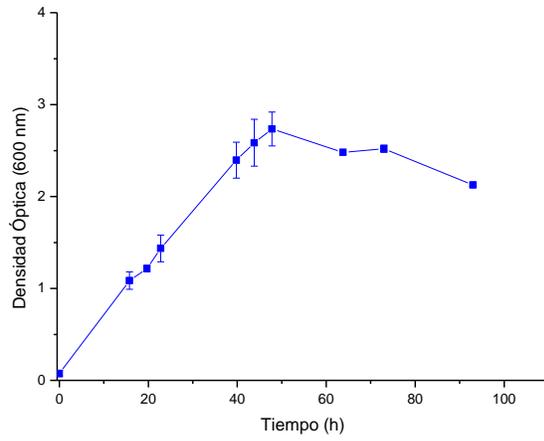
La determinación del promedio para el recuento de *Streptococcus* totales encontrado en muestras sin caries fue de  $7,1 \times 10^5 \pm 2,1 \times 10^5$  UFC/ml.

La determinación del promedio para el recuento de *Streptococcus* totales encontrado en muestras con caries fue de  $8,5 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^5$  UFC/ml.

Los datos obtenidos para este parámetro en ambos grupos de estudio no presentaron distribución normal al realizar el Test de Shapiro Wilk. Por lo tanto, se utilizó la estadística no paramétrica Test de Mann-Whitney para muestras independientes. Finalmente, la determinación de este parámetro microbiológico de la saliva resultó ser no significativo ( $p= 0,28$ ).

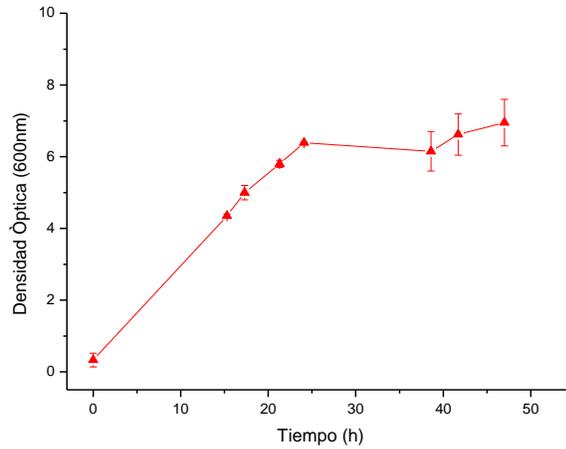
**Curvas de crecimiento para *S. mutans* y *S. sanguinis*:**

Se realizó curva de crecimiento para las especies *S. mutans* y *S. sanguinis* con el fin de evaluar cuánto tarda cada especie en alcanzar fase exponencial tardía. Con este dato se cultivaron (el tiempo necesario), los aislados obtenidos para la identificación microbiológica por los métodos previamente descritos en el ítem metodología (Figuras N°1 y N°2).



**Figura N°1: Curva de crecimiento de *S. mutans*.**

■: puntos medidos en el tiempo con error estándar.



**Figura N°2: Curva de crecimiento de *S. sanguinis*.**

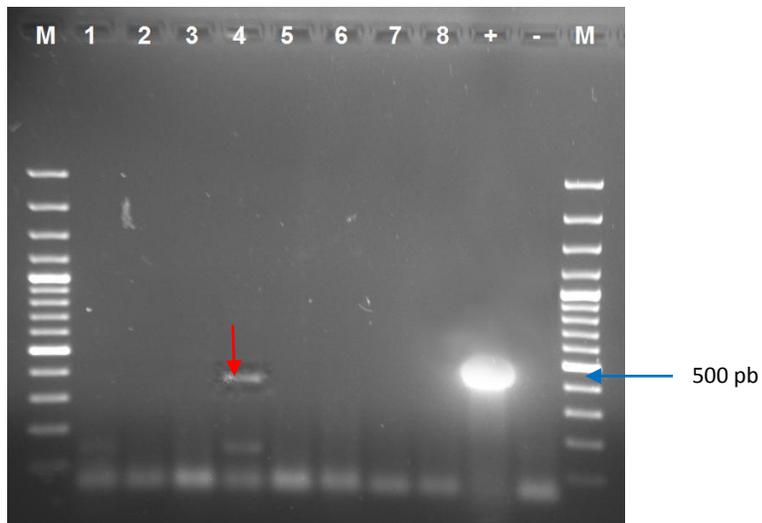
▲: puntos medidos en el tiempo con error estándar.

## Identificación de los aislados

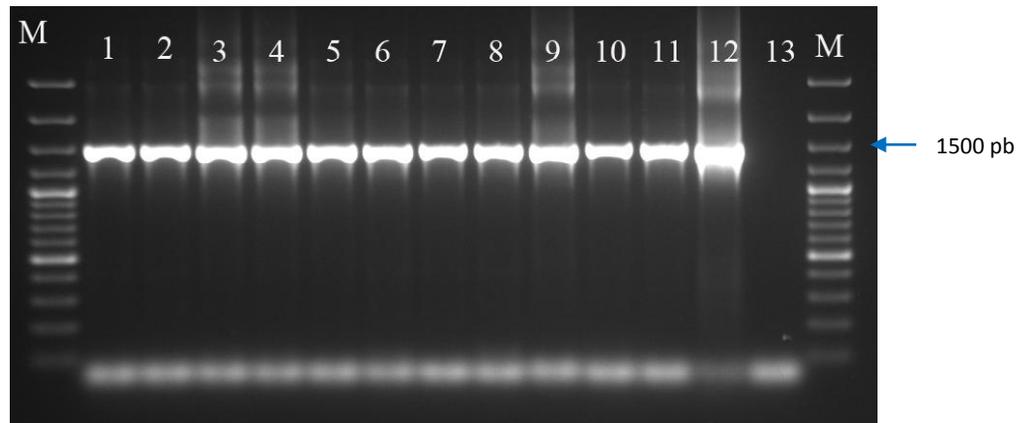
En relación a identificación bacteriana del género *Streptococcus*, esta se realizó mediante Test bioquímico (Figura N°3), PCR (Figura N°4) y secuenciación (Figura N°5) como se describió en la metodología.



**Figura N°3: Ejemplo de Kit de identificación API 20 STREP strips (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France).**



**Figura N°4: Ejemplo de electroforesis de ADN.** PCR para identificación bacteriana con los primarios SmF y SmR para amplificar *S. mutans*. La muestra M36-4 (flecha roja) amplificó para *S. mutans*. Carril M: marcador de tamaño molecular Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas). Carriles 1-8: muestras experimentales. Carril 9: control positivo ADN genómico de *S. mutans*. Carril 10: control negativo.



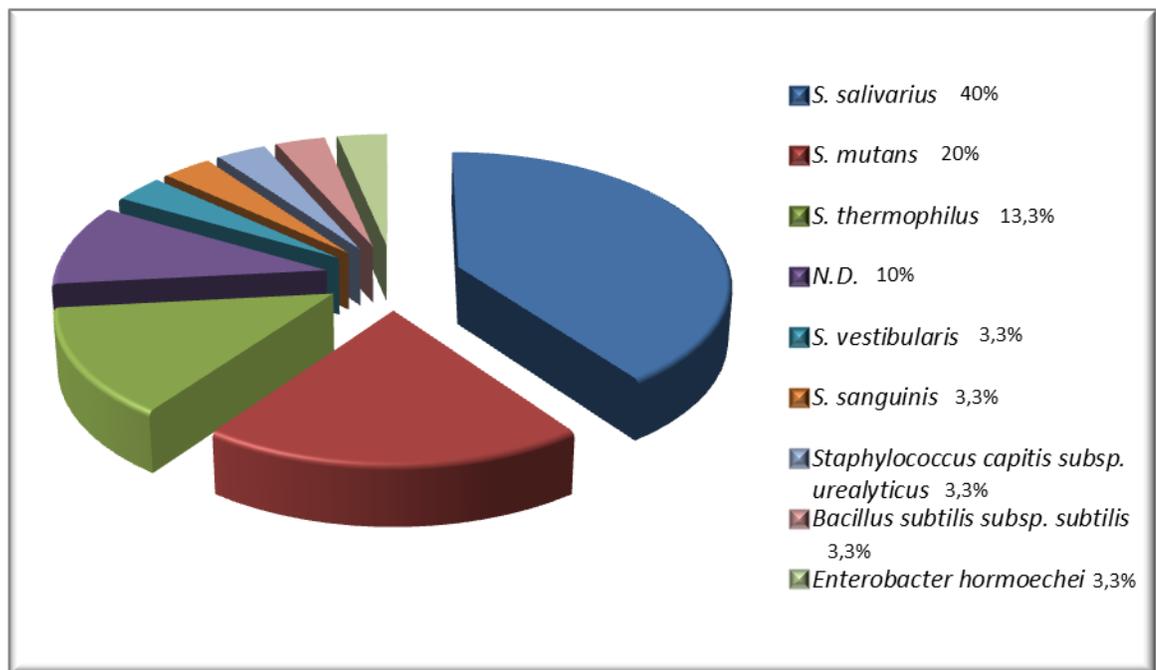
**Figura N°5: Ejemplo de electroforesis de ADN.** PCR para identificación bacteriana con los los partidores universales fD1 y rP2 para amplificar 16S rRNA bacteriano. Carril M: marcador de tamaño molecular Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas). Carril 1-11: muestras experimentales. Carril 12: control positivo: ADN genómico de *S. mutans*. Carril 13: control negativo.

## II.- Resultados por Objetivo Específico

Los resultados obtenidos para cada objetivo específico de este trabajo de investigación se presentan a continuación:

**Objetivo N°1: .- Determinar prevalencia y diversidad de bacterias pertenecientes al género *Streptococcus*, junto con pH y capacidad tamponante, en saliva de niños pre-escolares chilenos sin caries.**

Con respecto a la determinación de prevalencia y diversidad de bacterias pertenecientes al género *Streptococcus* en el grupo sin caries, se obtuvieron los resultados que se exponen en la Figura N° 6.



**Figura N°6: Frecuencia de especies bacterianas obtenidas de los aislados de sujetos sin caries. N. D.= no determinado.**

Con respecto a la determinación de pH y capacidad tamponante, los resultados obtenidos fueron: el promedio de pH para las muestras sin caries fue de  $7,9 \pm 0,2$ . Los datos obtenidos de pH presentaron distribución normal al realizar el Test de Shapiro Wilk.

La determinación del promedio para la capacidad tamponante fue de  $3,9 \pm 0,3$ . Los datos obtenidos presentaron distribución normal al realizar el Test de Shapiro Wilk.

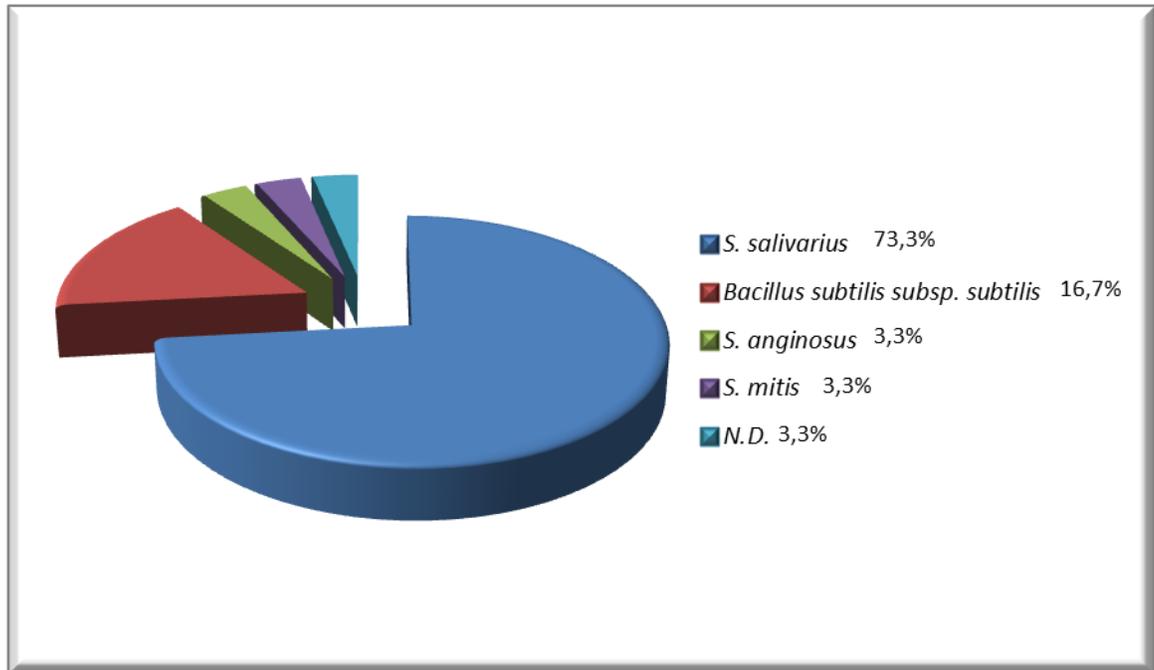
La frecuencia para capacidad tamponante, clasificando cada muestra de acuerdo a lo descrito en la metodología, se observa en la Tabla N° 7.

**Tabla N°7: Frecuencia de capacidad tamponante en pacientes sin caries.**

| Capacidad tamponante de pacientes sin caries | Número de pacientes | Frecuencia (%) |
|--|---------------------|----------------|
| Alta (pH > 6,5)                              | 0                   | 0              |
| Normal (pH 5,75 – 6,50)                      | 0                   | 0              |
| Baja (pH 4,0 – 5,74)                         | 4                   | 40             |
| Muy baja (pH < 4,0)                          | 6                   | 60             |

**Objetivo N°2: Determinar prevalencia y diversidad de bacterias pertenecientes al género *Streptococcus*, junto con pH y capacidad tamponante, en saliva de niños pre-escolares chilenos con caries.**

Con respecto a la determinación de prevalencia y diversidad de bacterias pertenecientes al género *Streptococcus*, se obtuvieron, para sujetos con caries, los resultados que se exponen en la figura N° 7.



**Figura N°7: Frecuencia de especies bacterianas obtenidas de los aislados de sujetos con Caries.** N.D.= no determinado.

En relación a la determinación de pH y capacidad tamponante, el promedio de pH para este grupo fue de  $7,5 \pm 0,2$ . Los datos obtenidos de pH presentaron distribución normal al realizar el Test de Shapiro Wilk.

El promedio de la capacidad tamponante para estas muestras fue de  $4,0 \pm 0,3$ . Los datos obtenidos para capacidad tamponante presentaron distribución normal al realizar el Test de Shapiro wilk.

La frecuencia para capacidad tamponante, clasificando cada muestra de acuerdo a lo descrito en la metodología, se grafica en la Tabla N° 8.

**Tabla N°8: Frecuencia de capacidad tamponante en sujetos con caries.**

| Capacidad tamponante de pacientes con caries | Número de pacientes | Frecuencia (%) |
|--|---------------------|----------------|
| Alta (pH > 6,5)                              | 0                   | 0              |
| Normal (pH 5,75 – 6,50)                      | 0                   | 0              |
| Baja (pH 4,0 – 5,74)                         | 5                   | 50             |
| Muy baja (pH < 4,0)                          | 5                   | 50             |

**Objetivo N°3: Comparar prevalencia y diversidad de bacterias pertenecientes al género *Streptococcus*, junto con pH y capacidad tamponante, en saliva de niños pre-escolares chilenos con y sin caries.**

Al comparar ambos grupos de estudio, se pudo observar diferencias en relación a diversidad y prevalencia de especies pertenecientes al género *Streptococcus*, presentando el grupo sin caries, una mayor diversidad de especies.

De los aislados obtenidos de sujetos sin caries, las especies más prevalentes fueron *S. salivarius* (40%), *S. mutans* (20%) y *S. thermophilus* (13,3%) y las especies aisladas en baja proporción correspondieron a *S. vestibularis* y *S. sanguinis* (3,3% cada una). De los aislados obtenidos de sujetos con caries, la especie más prevalente correspondió a *S. salivarius* (73,3%) y las especies encontradas en menor proporción correspondieron a *S. anginosus* y *S. mitis* (3,3% cada una). Siendo *S. salivarius* la especie más prevalente en este trabajo de investigación.

Con respecto a las variables pH y capacidad tamponante, al comparar cada variable entre ambos grupos de estudio (con y sin caries) mediante Test de Mann-Whitney, se obtuvieron resultados no significativos ( $p= 0,14$  y  $p= 0,67$ , respectivamente).

**Objetivo 4: Determinar posibles asociaciones entre pH y capacidad tamponante con prevalencia de caries en niños pre-escolares chilenos con y sin caries.**

**Asociación entre prevalencia de caries y pH:**

Para analizar la relación existente entre estas 2 variables se utilizó el Test de regresión logística cuyo resultado fue no significativo ( $p= 0,19$ ).

**Asociación entre prevalencia de Caries y capacidad tamponante:**

Para analizar la relación existente entre estas 2 variables se utilizó el Test de regresión logística cuyo resultado fue no significativo ( $p= 0,7$ ).

## DISCUSION

La gran mayoría de los estudios sobre la etiología microbiana de la caries dental se han llevado a cabo mediante cultivos bacterianos. Métodos moleculares, como PCR y secuenciación de ADN, han permitido la identificación y cuantificación más precisa de bacterias pertenecientes a la microbiota oral.

Estas bacterias pueden escapar a la detección ya sea porque no crecen en los medios de cultivo utilizados tradicionalmente o debido a que no se distinguen de las especies similares por características observables y fenotípicas (Becker y cols., 2002).

Aproximadamente, 260 especies de bacterias orales se han cultivado de los seres humanos y la diversidad real se ha estimado aproximadamente en 700 especies (Socransky y cols., 2000; Paster y cols., 2001; Becker y cols., 2002; Aas y cols., 2005; Ten Cate, 2006).

Se define a la caries como una enfermedad polimicrobiana (Milnes y Bowden, 1985; Marchant y cols., 2001), mediada por la acción conjunta de factores ambientales, conductuales y genéticos (Corby y cols., 2005). En relación a los factores microbianos, la presencia de bacterias es fundamental para el inicio y progresión de las lesiones (Beighton, 2005), siendo esencial que las especies bacterianas involucradas tengan la habilidad de producir ácido (acidogénicas) y tolerar un medio de pH bajo (acidúricas). Debe considerarse también la virulencia particular de aquellas especies capaces de producir polímeros de sacarosa y otras especies que aprovechan esta matriz de polímeros para su adherencia y colonización.

Crielaard y cols. (2011), estudiaron la composición microbiana oral de 74 niños y adolescentes entre 3 y 18 años de edad, divididos de acuerdo a su estado de dentición (temporal, mixta temprana, mixta tardía y permanente), evaluando los perfiles microbianos en saliva para su estado de salud oral mediante pirosecuenciación de las regiones hipervariables V5-V6 del rRNA 16S, así como mediante el uso de *microarrays* filogenéticos. Observaron que 4 filos: *Firmicutes*, *Proteobacterias*, *Bacteroidetes* y *Actinobacterias* predominaban en todos los

grupos y que la dentición temporal albergaba una mayor proporción de *Proteobacterias* (*Gammaproteobacteria*, *Moraxellaceae*) que *Bacteroidetes*, lo que reflejaría una maduración de la microbiota impulsada por los cambios biológicos y ambientales, con un aumento de la familia *Bacteroidetes* a medida que aumenta la edad.

Entre las bacterias asociadas con el inicio, progresión o avance de la lesión de caries se han descrito bacterias del género *Streptococcus* (Figuroa y cols., 2009). Aproximadamente el 20% de las bacterias orales corresponde a este género (Kreth y cols., 2008), siendo *S. mutans* la especie más estudiada.

Pese a existir evidencia que sustenta la asociación de *S. mutans* con caries inicial y avanzada, se ha observado que esta enfermedad puede ocurrir en ausencia de esta bacteria (Loesche y Straffon, 1979), que individuos con altos recuentos de ella no necesariamente desarrollan lesiones de caries (Kleinberg, 2002), y que las especies implicadas en el desarrollo de caries dental son más complejas y variadas que solo la presencia de *S. mutans* y *Lactobacillus* (Figuroa y cols., 2009).

Es por esta razón que el propósito de este trabajo de investigación intenta determinar la diversidad y abundancia de especies de bacterias pertenecientes al género *Streptococcus* en saliva de niños pre-escolares chilenos que presentan o no caries dental y evaluar posibles correlaciones entre pH y capacidad tamponante con presencia de caries.

En relación a la distribución por edad, se obtuvo como resultado un promedio de edad mayor para pacientes con caries (3,5 años) en relación a pacientes sin caries (3 años). Esto concuerda con estudios realizados en Chile que indican que el grado de infección y la prevalencia de caries son superiores en niños a medida que aumenta la edad (Ceballos y cols., 2007; Soto y cols., 2007a; 2009). Sin embargo, la asociación entre estas variables con prevalencia de caries, analizadas mediante Test de regresión logística, dio un resultado no significativo. Esto puede deberse al pequeño tamaño muestral utilizado y el rango etario analizado (2 a 5 años). Sería interesante abordar en estudios futuros, pacientes que se encuentren en etapas tempranas de su dentición temporal, como también pacientes que estén

en proceso de erupción del primer molar permanente (alrededor de los 6 años de edad). Braisford y cols. (2005), notaron asociaciones significativas entre lesiones iniciales de mancha blanca en primeros molares permanentes recién erupcionados y el incremento del recuento de *S. oralis*, *S. mutans* y *S. salivarius*.

Las especies bacterianas comienzan a colonizar la cavidad oral inmediatamente desde el momento del nacimiento. Con la erupción de las piezas dentarias temporales, el número y la complejidad de la microbiota aumenta (Law y cols., 2007).

Esta adquisición de bacterias durante los primeros años se obtiene principalmente por transmisión desde la madre (Könönen, 2000; Tanner y cols., 2002). Factores externos como el medio ambiente durante el parto, la microbiota oral de la madre, transmisión persona a persona, el tipo de alimentación infantil y las condiciones de higiene oral, junto con factores internos, como la etapa de desarrollo de la vía digestiva (Penders y cols., 2006), influyen en el establecimiento de la microbiota de la cavidad oral.

En el recién nacido, la colonización bacteriana oral comienza con *Streptococcus* del grupo viridans (Pearce y cols., 1995; Könönen, 2000), mientras que la colonización significativa de anaerobios no se detecta en los niños antes de los 2 meses de edad (Könönen, 2000).

Por otro lado, con respecto a la determinación de la presencia de caries mediante el código ICDAS II, resultó, para el grupo con caries, una mayor frecuencia de lesiones correspondientes a los códigos 5 y 6. Se ha observado que la caries temprana de la infancia comienza poco después de la erupción dental y que su progresión es rápida debido a las condiciones propias del diente temporal, entre las cuales se puede mencionar un menor grosor de esmalte y dentina y cámaras pulpares más amplias. Tiene un impacto negativo y duradero en la dentición ya que los bebés y niños que la padecen, tienen una mayor probabilidad de desarrollar caries posteriores, tanto en la dentición temporal como en la permanente (Kawashita y cols., 2011).

Los resultados estadísticos para los parámetros químicos salivales como pH, capacidad tamponante resultaron ser no significativos. Esto difiere a lo esperado, donde en sujetos sin caries, tanto el pH como la capacidad tamponante deberían ser mayores.

La saliva mantiene condiciones de temperatura (35 - 36 °C) y humedad a un pH alrededor de la neutralidad entre 6,75 y 7,25, el cual es óptimo para el crecimiento de muchos microorganismos (Marsh, 2003). Además, cumple un papel importante en la amortiguación del pH propio y de la placa, siendo el sistema bicarbonato-ácido carbónico el sistema tampón más importante de la saliva (Kaur y cols., 2012). La saliva es una solución sobresaturada en calcio y fosfato que contiene flúor, proteínas, enzimas, agentes tamponantes, inmunoglobulinas y glicoproteínas. Todos estos componentes ayudan a que la saliva sea capaz de prevenir la caries dental, ya sea por lavado mecánico o por su función antimicrobiana, porque favorece la remineralización y, además, porque regula el pH oral debido a su capacidad tamponante (Núñez y García, 2010; Kaur y cols., 2012).

Por otro lado, la saliva es esencial en el balance ácido-base de la placa. Las bacterias acidogénicas presentes en la placa metabolizan los hidratos de carbono fermentándolos, obteniendo de esta manera ácidos como producto final. Por la acción de estos ácidos, el pH desciende por debajo de 5,5 (pH crítico de disolución de la Hidroxiapatita) en zonas limitadas de la superficie del esmalte y por lo tanto se produce el inicio de la descalcificación. El pH disminuye rápidamente en los primeros minutos después de la ingesta de carbohidratos para luego comenzar a incrementar gradualmente.

Para que ocurra este incremento, el sistema tampón de la saliva debe cumplir su función, al estar formado por el bicarbonato, los fosfatos y las proteínas. Se ha observado que el pH salival depende de las concentraciones de bicarbonato, ya que un incremento en su concentración se traduce en un incremento del pH. Niveles muy bajos del flujo salival producen que el pH disminuya por debajo de 5, sin embargo, aumenta a 7-8 si se incrementa gradualmente el flujo (Núñez y García, 2010).

Por otro lado, se ha observado que una baja capacidad amortiguadora salival y niveles bajos de fosfato de calcio, se relacionan con una mayor incidencia de Caries (Kaur y cols., 2012).

Kaur y cols. (2012), con el objetivo de evaluar los parámetros químicos salivales en relación a la caries, estudiaron 60 niños con edades entre 4 y 6 años, seleccionados de las escuelas del distrito de Panchkula, Haryana. Los niños fueron divididos en 2 grupos: con caries activa y libres de caries. Se les evaluó el nivel de hidratación, velocidad de flujo salival, pH, capacidad de tamponante, viscosidad relativa, calcio, fósforo y los niveles de fosfatasa alcalina. Los resultados mostraron que el 90% de los sujetos libres de caries y un 33,3 % de los con caries activa, poseían una velocidad de flujo normal en saliva, siendo esta diferencia altamente significativa. Además, se encontró un pH salival adecuado en el 100% de los pacientes del grupo libre de caries y en un 30% en el grupo con caries activa y la diferencia fue altamente significativa también. Estos autores concluyeron que un nivel normal de hidratación y valores más altos de velocidad de flujo, pH y capacidad tamponante de la saliva, se relacionan con salud oral y ausencia de caries. Esto unido a que el flujo salival tiene un efecto preventivo a nivel de la enfermedad al influir en la velocidad de eliminación de detritus, bacterias e hidratos de carbono, cuanto mayor sea la velocidad de flujo, más rápida será la tasa de aclaramiento (Miura y cols., 1991).

Por el contrario, Cunha-Cruz y cols. (2013), con el objetivo de investigar si las características salivales están asociadas con la experiencia de caries dental, analizaron a 1.763 pacientes (niños, adultos y mayores de 65 años). Concluyeron que los resultados obtenidos para las características salivales como pH y capacidad tamponante, se asocian débilmente con la experiencia previa de caries dental, por lo que los autores discuten e insisten que se necesitan más investigaciones para entender estos resultados contradictorios y que los hallazgos del estudio no pueden apoyar el uso de las pruebas de saliva para determinar el riesgo de caries en los entornos clínicos reales.

En el presente trabajo de investigación se evaluaron 10 niños con caries y 10 niños sanos, a los cuales se les midieron los parámetros químicos de la saliva

como pH y capacidad tamponante. Al ser comparadas estas variables, entre los grupos de estudio, el resultado fue no significativo. Esto puede deberse al reducido tamaño muestral utilizado, debido principalmente a razones de tiempo estimado para desarrollar este trabajo. Un mayor tamaño muestral se sugiere para nuevos estudios a fin de obtener resultados más concluyentes y comparables.

Como se describe anteriormente, para evaluar la relación entre parámetros salivales y actividad de caries, es más válido utilizar la medición de flujo salival, sin embargo, en niños, esta medición se dificulta por las condiciones de cooperación propias de la edad. Es por este motivo que en este estudio sólo se realizaron las mediciones descritas en la metodología.

Se ha demostrado que una disminución en el flujo salival conduce a valores de pH más bajos después de la exposición a azúcares comparado con el flujo de saliva en condiciones normales (Abelson y Mandel, 1981; Van Houte, 1994).

Un mayor flujo salival se ha asociado con niveles reducidos de MS y no-MS de pH bajo (Lindquist y Emilson, 1990; Van Houte y cols., 1991), y con un nivel relativamente bajo de actividad de caries (Van Houte, 1994).

En relación al recuento de especies pertenecientes al género *Streptococcus* en ambos grupos de estudio, la determinación de su promedio fue no significativo. Es importante recalcar que el medio de cultivo utilizado en este estudio (agar mitis salivarius) es un medio selectivo para *Streptococcus* totales, por lo que el recuento total incluye varias especies pertenecientes a este género (y no sólo las más comúnmente asociadas tanto a caries como a salud oral). Se ha descrito en la literatura que la cantidad de *S. mutans* encontrada en saliva de pacientes con caries puede variar considerablemente desde cero hasta  $10^6$  UFC/ml, con una concentración promedio aproximada de  $10^5$  UFC/ml (Mohan y cols., 1998).

Wan y cols. (2002), compararon la selectividad y la sensibilidad de cinco medios de cultivo diferentes (mitis salivarius con bacitracina MSB, mitis salivarius kanamycin-bacitracina MSKB, glucosa-sacarosa-telurito-bacitracina GSTB, tripticasa de soja-sacarosa-bacitracina TYS20B y triptona-levadura-cisteína-bacitracina-agar sacarosa TYCSB) para el cultivo de una cepa de laboratorio de *S.*

*mutans* (NCTC 10449) y para el recuento de esta cepa en muestras de placa supragingival obtenidas de un grupo de niños entre 2 y 10 años de edad. En las muestras clínicas, TYCSB mostró las tasas de recuperación más altas para *S. mutans* en comparación con los medios de cultivo mencionados en este párrafo. Los resultados del estudio sugieren que TYCSB es uno de los medios más sensibles y selectivos para el cultivo de *S. mutans* tanto en estudios clínicos como de laboratorio. Estos resultados concuerdan con resultados encontrados por otros autores en estudios anteriores (Schaeken y cols., 1986).

En relación a la identificación microbiana, la especie más prevalente obtenida tanto en pacientes sanos como en pacientes con caries fue *S. salivarius* (40% y 73,3% respectivamente).

*S. salivarius* es un representante habitual de la flora comensal de la cavidad oral y es el constituyente principal del *biofilm* que coloniza preferentemente las células epiteliales del dorso de la lengua y la mucosa de la mejilla (Gizani y cols., 2009; Tamura y cols., 2009). Esta especie en conjunto con *S. mitis* y *S. oralis* han sido identificados como los primeros y más dominantes microorganismos que conforman el ecosistema oral (Law y cols., 2007), siendo asociada con mayor prevalencia a salud oral (Corby y cols., 2007). Posee un rol importante en la absorción de lactosa y la producción de ureasa que contribuirían a la estabilidad de la comunidad oral (Tamura y cols., 2009).

Tamura y cols. (2009), observaron que esta bacteria inhibe la formación de *biofilm* formado por *S. mutans*, cepa GS-5, cuando ambas especies son cultivadas en conjunto. Describieron que una “sustancia” en el sobrenadante del cultivo de *S. salivarius* inhibía la actividad del péptido estimulante de la competencia (CSP) de *S. mutans*. El análisis de proteínas mostró que la “sustancia” que producía la inhibición de la formación de *biofilm* era una fructanasa (FruA), demostrando que *S. salivarius* puede modular la colonización de *S. mutans* dependiente de sacarosa en las superficies de la cavidad oral. Observaron además, que el *biofilm* por *S. mutans* no se desarrolló en el medio de cultivo que contenía sacarosa pretratada con FruA. Esto sugiere que FruA digiere la sacarosa antes de la producción de glucanos por la glucosiltransferasa (GTF), compuesto que se

secreta después de una o más horas de cultivo de *S. mutans* y que esta glucosa, después de la digestión, no fue empleada para la síntesis de glucano. Cabe destacar que FruA puede ser producido también por otras especies pertenecientes al género *Streptococcus*. Esto, en conjunto con su alta prevalencia en cavidad oral de niños, su capacidad de adherirse preferentemente a células epiteliales más que a superficies dentales, podría explicar la alta frecuencia de esta especie en las muestras de sujetos sanos.

La segunda especie más prevalente en sujetos sanos fue *S. mutans* (20%). Law y cols. (2007), describen que, en sujetos sanos, especies del grupo MS corresponden a menos del 1% de los aislados obtenidos y que en niños con caries temprana de la infancia, el grupo MS comprende un 30-50% de los aislados obtenidos de placa dental y un 10-30% de los aislados obtenidos de saliva. Esto difiere de lo encontrado en el presente trabajo, ya que esta especie fue identificada solamente en pacientes sanos y no se obtuvieron aislados en pacientes con caries.

Mediante los avances en las técnicas de biología molecular, se ha podido demostrar que existe gran heterogeneidad clonal dentro de esta especie (Russell, 2008; Tabchory y cols., 2008). Estas diferencias estarían atribuidas a fenómenos de recombinación desde otras especies que se encuentran formando parte del *biofilm* y generarían diferencias en su capacidad de virulencia (Klein y cols., 2004; Law y cols., 2007; Lembo y cols., 2007). Esto podría explicar su presencia en muestras de pacientes sanos, ya que los factores de virulencia pueden diferir, estando más atenuados en estos individuos (Russell, 2008).

Si bien *S. mutans* ha sido fuertemente asociado con la presencia de caries (Van Ruyven y cols., 2000; Becker y cols., 2002, Figueroa y cols., 2009; Kawashita y cols., 2011), para que exista la enfermedad debe haber un desequilibrio en el ecosistema oral en relación a los factores mencionados en el marco teórico. Se ha observado que lesiones de caries pueden ocurrir en ausencia de esta especie (Loesche y Straffon, 1979) y que individuos con altos recuentos de ella no necesariamente desarrollan la enfermedad (Kleinberg, 2002). Todas estas observaciones sumadas al tamaño muestral, podrían explicar el por qué en el

presente trabajo, esta especie fue aislada de sujetos sanos y no de sujetos con caries.

Se ha descrito en la literatura que esta especie ha sido aislada comúnmente a partir de la cavidad oral de niños, con una prevalencia de infección que va desde un 30%, a los 3 meses de edad, a más del 80% a los 24 meses (Law y cols., 2007) y se ha relacionado en gran proporción con caries temprana de la infancia junto con *S. sobrinus*, especie no encontrada en este trabajo de investigación (Tanner y cols., 2011a; 2011b). Sin embargo, todavía no se ha resuelto en que momento coloniza con exactitud y si puede ser considerado como un componente de la microbiota oral normal (Van Houte, 1994; Tanzer y cols., 2001; Beighton, 2005; Law y cols., 2007).

Por el contrario a lo encontrado en este trabajo, Gizani y cols. (2009), analizaron la distribución de bacterias cariogénicas en muestras de 5 sitios intraorales (saliva, placa supragingival y subgingival, dorso de lengua y tejidos blandos), en niños entre 3 y 12 años de edad, divididos en 3 grupos según dentición (primaria, mixta temprana y mixta). Encontraron que *S. mutans* no se detectó en muestras supragingivales y subgingivales de sujetos libres de caries, pero que si se detectó en casi todos los niños con caries.

Law y Seow, (2006), describieron en un estudio controlado longitudinal los factores asociados con la infección por *S. mutans* y la lesión inicial de caries en niños entre 21 y 72 meses de edad. Se observó que la infección por *S. mutans* se asocia con: presencia de placa visible, hipoplasia del esmalte, inicio tardío del cepillado de dientes (después de 12 meses de edad), falta de asistencia de los padres durante el cepillado de dientes, el aumento de horas en la escuela, la mayor frecuencia de ingesta de azúcar, siendo este clasificado como el factor más importante, seguido de la lactancia materna y, los hábitos que permiten la transferencia vertical de la saliva de la madre al niño. Por el contrario, la ausencia de colonización por *S. mutans* se ha asociado con el uso reiterado de antibióticos. Además, observaron que las madres con bebés infectados tenían niveles de *S. mutans* mayores a  $5 \times 10^5$  UFC/ml de saliva, mala higiene oral, enfermedad periodontal y baja situación socio-económica en comparación con las madres de bebés sanos.

Caufield y cols. (1993), han sugerido que la adquisición más probable de esta especie en niños pequeños se lleva a cabo durante un periodo conocido como "ventana de infectividad" que ocurriría entre los 19 a 31 meses de edad, con un promedio de 26 meses. Se creía que *S. mutans* colonizaba el medioambiente bucal sólo cuando existía la presencia de dientes, describiéndose que la colonización inicial ocurría sólo después de la erupción de los dientes temporales. Sin embargo, estudios posteriores observaron la presencia de esta especie en niños previo a la erupción dentaria temporal, demostraron también que esta infección persistía en el tiempo y que pese a que esta especie es aislada de estos niños, se encuentra en bajas proporciones, lo que finalmente podría ser un reflejo de la ausencia de dientes (Wan y cols., 2001; 2003).

Por lo tanto, se puede concluir que no existe un período establecido para la colonización de *S. mutans*, este puede ocurrir desde el nacimiento hasta más allá de los tres años de edad, por lo que su colonización podría estar influenciada por la presencia de dientes, sin ser este un factor excluyente y que su colonización temprana le daría ventajas competitivas junto a otras especies que puedan colonizar más tardíamente (Law y cols., 2007).

Se ha descrito también en la literatura que altos recuentos salivales en madres generarían un mayor riesgo de infección temprana en sus hijos. Esta infección madre-hijo se conoce como "transmisión vertical" y también puede ocurrir desde el padre y de los cuidadores hacia el niño, siendo la saliva el medio más importante de transmisión (Douglass y cols., 2008). Factores neonatales también pueden aumentar el riesgo de adquisición temprana de *S. mutans* a través de la transmisión vertical. Los bebés nacidos por cesárea adquirirían *S. mutans* antes que los bebés por vía vaginal (Tanner y cols., 2011a; 2011b).

Otra especie identificada en pacientes sanos en una frecuencia relativamente alta (13,3%) fue *S. thermophilus*. Ésta es una bacteria perteneciente al grupo *salivarius*. Anaerobio facultativo, Gram positivo, homofermentativo (produce ácido láctico) y alfa-hemolítico. No genera esporas y tampoco es móvil. Ampliamente utilizado en la industria láctea por sus propiedades de generar ácido. Se ha encontrado en la ubre de las vacas, en las máquinas ordeñadoras, recipientes de

leche, yogurt, quesos y en la leche cruda. Es termoestable por lo que puede sobrevivir a la pasteurización. Se ha utilizado también como probiótico (Schleifer y cols., 1991, Briceño y cols., 2001). Esto puede explicar su identificación en las muestras de pacientes sanos, ya que podría colonizar la cavidad oral gracias al consumo lácteo en este grupo etario.

En este mismo grupo (pacientes sanos) y en menor frecuencia, fueron identificadas especies como *S. vestibularis*, *Staphylococcus capitis subsp. urealyticus*, *Enterobacter hormoechei* y *S. sanguinis* (3,3% cada una). Esta última ha sido aislada de la cavidad oral (Carlsson y cols., 1970; Becker y cols., 2002; Figueroa y cols., 2008) y asociada fuertemente a sujetos sanos (Corby y cols., 2005).

Carlsson y cols. (1970), fueron uno de los primeros en describir *S. sanguinis* en cavidad oral, observando que coloniza antes que *S. mutans*, una vez ocurrida la erupción dentaria. Posteriormente, Caufield y cols. (1993), señalaron que este tiempo de colonización ocurriría alrededor de los 9 meses de edad y que la colonización temprana por *S. sanguinis* estaba relacionada con un retardo de 6 meses en la colonización por *S. mutans*. Se observó también que los niños que no presentaron niveles detectables de *S. mutans* en saliva, tenían niveles significativamente altos de *S. sanguinis*, en comparación con aquellos niños en los cuales se les detectó niveles altos de *S. mutans* en saliva. Así, la colonización por *S. mutans* coincide con una disminución de los niveles de *S. sanguinis*.

Todos estos hallazgos en conjunto sugerirían que la colonización de *S. sanguinis* podría influir en la sucesiva colonización de *S. mutans* y que podría existir un cierto antagonismo entre estas especies. Es importante mencionar que en este trabajo se encontraron ambas especies en sujetos sanos, sin embargo, éstas no se encontraban conjuntamente en aislados de un mismo sujeto. Serían necesarios más aislados por individuo para obtener resultados más concluyentes.

Bacterias pertenecientes al género *Streptococcus* compiten por los sitios de unión en las superficies del diente cubierto por la película adquirida (Nobbs y cols., 2007), y son capaces de producir bacteriocinas y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) como agentes antimicrobianos (Kreth y cols., 2005). Estudios han descrito que *S.*

*S. sanguinis* utiliza la disponibilidad de oxígeno y la producción diferencial de  $H_2O_2$  para competir con eficacia frente a *S. mutans*. Este último, secreta las bacteriocinas mutacina I y IV cuando se inocula antes que *S. sanguinis in vitro* y *S. sanguinis* produce  $H_2O_2$  cuando se inocula antes que *S. mutans* (Kreth y cols., 2008).

*S. vestibularis* también ha sido identificado en este trabajo en los pacientes sanos aunque en baja frecuencia (3,3%). Perteneciente al grupo *salivarius*, se encuentra mayormente en mucosa vestibular. Su hallazgo concuerda con lo encontrado en la literatura donde pese a ser una especie presente en la cavidad oral, su prevalencia no es alta en comparación con otras especies del mismo género (Whiley y Hardie, 1988).

*Staphylococcus capitis subsp. urealyticus* fue identificada en un 3,3% de la muestras de pacientes sanos. Pertenecientes al género *Staphylococcus*, fue descrita por Bannerman y Kloos (1991), en la piel humana. Su presencia en este grupo de estudio puede deberse a contaminación involuntaria de las muestras al igual que *Enterobacter hormoechei*, que también fue identificado en baja proporción (3,3%) en este grupo. Esta última corresponde a bacterias del género *Enterobacter*, los cuales son gram negativos, oxidasa-negativos, fermentativos. Se encuentran como género en el medio ambiente, en hábitats tales como el agua, el alcantarillado, los vegetales y el suelo. En relación a la presencia de estas bacterias en la cavidad oral, *Staphylococcus capitis subsp. urealyticus* no ha sido descrito aún como aislado obtenidos de ella, sólo se ha descrito que ha sido aislado de piel y que puede causar endocarditis (Bannerman y kloos, 1991; Latorre y cols., 1993). En tanto, *Enterobacter hormaechei* no ha sido aislado hasta el momento de la cavidad oral (Peterson y cols., 2013).

En relación a la identificación microbiana en pacientes con caries, como se mencionó anteriormente, un 73,3% de los aislados fueron identificados como *S. salivarius*. El ser uno de los principales y pioneros microorganismos que conforman el ecosistema de la cavidad oral, podría explicar su alta prevalencia en este grupo. Algunos estudios han descrito que esta especie no solo crea condiciones favorables para la implantación de otras especies, sino que también

desempeña un papel moderador, permitiendo la implantación de bacterias que son perjudiciales para la salud de la cavidad oral. Se ha observado que junto con colonizar los sitios descritos anteriormente en la discusión, también puede adherirse a la superficie dental (aunque en menor proporción) en forma temprana después de la ingesta repetida de sacarosa. Se ha descrito que en animales (hámsters y ratas gnotobióticas), algunas cepas pertenecientes a esta especie son capaces de causar una disminución en el pH oral y han sido clasificadas como cariogénicas (Krasse y Carlsson, 1970; Becker y cols., 2002). También se ha sugerido que la eliminación de *S. mutans* de la placa dental humana por inmunización puede permitir que *S. salivarius* colonice la superficie del diente y pueda causar Caries dental (Druckerd y cols., 1984). Sin embargo, esta especie es considerada como un colonizador pobre de la superficie dental y su papel en el desarrollo de la enfermedad no está del todo claro (Simpson y cols., 1995).

Así, de acuerdo a lo expuesto en la discusión, esta especie cumpliría roles tanto beneficiosos como perjudiciales y éstos dependerían de las condiciones medioambientales, relaciones con otras especies y las características particulares que se estén analizando de ella. Su posible rol perjudicial podría atribuirse a su capacidad de secretar GTFs que forman glucanos a partir de sacarosa. *S. salivarius* es una de las principales fuentes de GTFs en la saliva, las cuales se cree que cumplen un rol en la adhesión a la película adquirida de otras especies microbianas, entre ellas *S. mutans*. De este modo, las GTFs producidas por *S. salivarius*, en sitios distantes de la superficie del diente, pueden ayudar en la adhesión inicial o coagregación de otras especies orales sobre superficies de los dientes recién erupcionados o en la superficie de los dientes después de la profilaxis (Simpson y cols., 1995).

Por otro lado, el posible rol beneficioso de *S. salivarius* en la cavidad oral podría deberse en parte a su capacidad de secretar la enzima ureasa, enzima que cataliza la hidrólisis de urea en amoníaco y dióxido de carbono (ureólisis), favoreciendo la regulación del pH ambiental, actuando como un sistema tamponante de la acidificación glicolítica in vitro y a concentraciones de urea que se encuentran normalmente en la cavidad oral. La posibilidad de modificar genéticamente bacterias de la placa que pueden modular el pH ambiental a través

de esta enzima, permitiría la utilización de organismos ureolíticos recombinantes, para probar la hipótesis sobre el papel de la ureólisis en la caries dental, la formación de sarro y las enfermedades periodontales. Tales organismos recombinantes eventualmente pueden resultar útiles para el control de la caries dental por la terapia de reemplazo (Chen y cols., 1996).

Otra especie que fue identificada en baja proporción tanto en pacientes con y sin caries (16,7% y 3,3% respectivamente) fue *Bacillus subtilis subsp. subtilis*. Esta especie corresponde a bacterias aeróbicas, formadoras de endoesporas, Gram positivas, que se encuentran comúnmente en hábitat como el suelo, agua y en asociación con plantas y pueden causar, muy ocasionalmente, intoxicación alimentaria (Claus y Berkeley, 1986), por lo que podría ser un contaminante de las muestras pese a que se siguieron todos los protocolos de asepsia y esterilización. Sin embargo, no existe evidencia de su identificación en cavidad oral hasta la fecha.

En pacientes con caries también se identificaron *S. anginosus* y *S. mitis* en baja proporción (3,3%). Ambas especies se han identificado en cavidad oral pero en menor proporción que especies más prevalentes como *S. mutans* o *S. salivarius* (Becker y cols., 2002; Figueroa y cols., 2009, Gizani y cols., 2009). De ellas, *S. mitis* es una especie alfa hemolítica, Gram positiva, catalasa negativa y anaerobia facultativa que pertenece al grupo *mitis* que coloniza superficies dentales y mucosas (Di Giulio y cols. 2011).

Corby y cols. (2005), estudiaron las especies bacterianas asociadas con caries y salud en un grupo de 204 sujetos gemelos, en edades comprendidas entre 1,5 y 7 años de edad. Observaron que *S. mitis* estaba asociado a sujetos sanos. Esto difiere a lo encontrado en este estudio donde se observa su presencia en sujetos con caries.

Por el contrario, Peterson y cols. (2013), observaron en su estudio realizado en niños entre 5 y 7 años de edad con el objetivo de mejorar el conocimiento de las especies microbianas que intervienen en la caries dental y la salud oral, una alta prevalencia de *S. mitis* en sujetos con caries, lo que concuerda con este trabajo. Según estos autores, los resultados contradictorios pueden reflejar variaciones

fenotípicas de distintas cepas de esta especie que pueden elevar su acidogenicidad y capacidad de resistir medios ácidos. Sin embargo, se requiere más investigación al respecto.

Gizani y cols. (2009), analizaron la distribución de bacterias cariogénicas en muestras de 5 sitios intraorales de niños con caries entre 3 y 12 años de edad divididos según dentición. Encontraron que *S. mitis* estaba presente en casi todos los niños y en todos los sitios.

Como se mencionó anteriormente, *S. mitis* ha sido descrito como uno de los primeros y abundantes colonizadores de la cavidad oral (en conjunto con *S. salivarius* y *S. oralis*), el medio de cultivo es un medio selectivo para *Streptococcus* totales y el tamaño muestral puede haber seleccionado aislados en pacientes con caries y haber dejado de lado bacterias pertenecientes a esta especie en pacientes sanos. Todos estos antecedentes, sumados a los anteriormente expuestos para esta especie, podrían explicar su presencia en pacientes con Caries.

*S. anginosus* pertenece al grupo *anginosus*. Este grupo comprende un grupo heterogéneo de especies de *Streptococcus* que corresponden a cocos Gram positivos que pueden ser alfa o beta hemolíticos o pueden no hacer hemólisis. Se ha observado que *S. anginosus* puede estar implicado en la producción de bacteremias (Singh y cols., 1988). Su identificación en sujetos con caries concuerda con lo descrito en la literatura (Figuroa y cols., 2009).

De este modo, los resultados obtenidos en relación a la diversidad de especies pertenecientes al género *Streptococcus* y a otros géneros en ambos grupos de estudio, concuerdan con lo descrito en la literatura, donde se describe que la diversidad y complejidad de la microbiota oral es menor en niños con caries que en niños sanos (Li y cols., 2007). Estos autores evaluaron las diferencias en la diversidad microbiana presente en la placa dental entre un grupo de niños de origen hispano, en edades comprendidas entre 2 y 8 años, con lesiones de caries severa en edad temprana, y un grupo de niños sanos, sugiriendo que la microbiota oral asociada a caries dental presenta menor diversidad de especies microbianas,

probablemente porque ciertos grupos de microorganismos suplantán o dominan el *biofilm* de la placa dental permitiendo la progresión de la lesión de caries.

Finalmente, más de 500 especies de bacterias o filotipos han podido ser identificadas de la cavidad oral, de las cuales más del 50% no han podido ser cultivadas aún.

La caries, como enfermedad, sigue siendo un problema mundial y la caries temprana de la infancia tiene consecuencias importantes en la salud y calidad de vida de quienes la padecen. En Chile, pese a seguir la tendencia mundial de disminución de la prevalencia, aún faltan estudios que permitan dilucidar las especies más habituales en la cavidad oral de bebés y niños, su asociación con incidencia de caries y alternativas de tratamiento que no sean solo tratar las secuelas dejadas por la enfermedad.

En la actualidad se están realizando estudios que pretenden evaluar el uso de cepas beneficiosas y asociadas con salud oral en probióticos. Las cepas más comunmente utilizadas pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterias*, sin embargo, algunas cepas de *Streptococcus* también están siendo investigadas con este fin (Twetman, 2012).

La cepa K12 de *S. salivarius* se ha convertido en una importante fuente de probióticos seguros y eficaces, capaces de fomentar una microbiota oral más equilibrada. Esta cepa se ha utilizado para controlar diversas infecciones provocadas por asociaciones bacterianas, incluyendo otitis media, halitosis y caries dentales (Burton y cols., 2011; Wescombe y cols., 2012).

Se sugieren nuevos estudios con un mayor tamaño muestral y más extenso grupo etario para obtener información sobre diversidad y prevalencia de especies asociadas tanto a caries dental como a salud oral, con el fin de obtener resultados más significativos estadísticamente, y posterior a la detección de especies preponderantes en ambas condiciones, la futura investigación debería centrarse en las interacciones existentes entre ellas, para comprender como ocurren las sucesiones o desplazamientos de ciertas especies en condiciones de salud y enfermedad de la cavidad oral.

## CONCLUSIONES

- La diversidad y prevalencia de especies bacterianas pertenecientes al género *Streptococcus* difiere en aislados obtenidos de saliva de niños pre-escolares que presentan o no caries dental, observándose mayor diversidad en pacientes sanos.
- *S. salivarius* fue la especie más prevalente en ambos grupos de estudio (sujetos con y sin caries).
- Especies comúnmente asociadas a caries dental como *S. mutans* y *S. sobrinus* no fueron identificadas en sujetos con caries. Sin embargo, *S. mutans* fue aislado en baja proporción en sujetos sin caries.
- *S. sanguinis*, especie asociada en mayor proporción con sujetos libres de caries, fue encontrada en baja proporción en este grupo de estudio. Es importante mencionar que *S. mutans* también fue encontrado en este grupo y que se ha descrito en la literatura un antagonismo entre estas 2 especies.
- La presencia de una misma especie tanto en sujetos sanos como con caries, podría sugerir que esta podría actuar tanto a favor como en contra del hospedero.
- Parámetros químicos salivales como edad, pH y capacidad tamponante y su asociación con prevalencia de caries resultaron ser no significativos.

## SUGERENCIAS

- Nuevos estudios que abarquen un mayor tamaño muestral, etario y una mayor cantidad de aislados por paciente son necesarios para obtener resultados más concluyentes y comparables.
- En relación a parámetros químicos de la saliva se sugiere la evaluación de flujo salival como parámetro importante en relación a pH.
- Mayores avances en relación a medios de cultivo, técnicas moleculares y bioquímicas son necesarios para identificar aquellas especies pertenecientes a la cavidad oral y que aún no han sido descritas.
- Nuevos estudios son necesarios para comprender la microbiota asociada a salud o enfermedad, en cavidades orales de niños y adolescentes, ya que en Chile son pocos los estudios que abordan esta problemática.
- Una vez identificadas las especies bacterianas más prevalentes tanto en condiciones de salud oral como en condiciones de presencia de caries, la futura investigación debiera centrarse en las interacciones existentes entre las especies bacterianas y entre distintas cepas dentro de una misma especie, para comprender como ocurren las sucesiones o desplazamientos de ciertas especies en condiciones de salud oral y producto del inicio y desarrollo de la caries dental.
- Identificar especies del género *Streptococcus* asociadas tanto a salud como a presencia de caries y estudiar sus relaciones de sucesión, colaboración y competencia pueden ser de suma importancia para el desarrollo futuro de nuevas metodologías de tratamiento que tengan un enfoque más preventivo y no solo se limiten a tratar las secuelas de la enfermedad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43: 5721-5732.
- Abelson DC y Mandel ID. (1981). The effect of saliva on plaque pH in vivo. *J Dent Res* 60: 1634-1638.
- Bader JD, Shugars DA, Bonito AJ. (2001). A systematic review of selected Caries prevention and management methods. *Community Dent Oral Epidemiol* 29: 399-411.
- Bannerman TL y Kloos WE. (1991). *Staphylococcus capitis* subsp. *ureolyticus* subsp. nov. from human skin. *Int J Syst Bacteriol* 41: 144-147.
- Becker M, Paster B, Leys E, Moeschberger M, Kenyon S, Galvin J y otros autores. (2002). Molecular analysis of bacterial species associated with childhood Caries. *J Clin Microbiol* 40: 1001-1009.
- Beighton D. (2005). The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the Caries process. *Community Dent Oral Epidemiol* 33: 248-255.
- Brailsford SR, Sheehy EC, Gilbert SC, Clark DT, Kidd EA, Zoitopoulos L y otros autores. (2005). The microflora of the erupting first permanent molar. *Caries Res* 39: 78-84.
- Briceño AG, Martínez R, García K. (2001). Viabilidad y actividad de las bacterias lácticas (*Streptococcus salivarius* ssp *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*) del yogurt en Venezuela. *Acta Cient Venez* 52: 46-54.
- Burton JP, Wescombe PA, Cadieux PA, Tagg JR. (2011). Beneficial microbes for the oral cavity: time to harness the oral Streptococci?. *Benef Microbe* 2: 93-101.
- Carlsson J, Grahnén H, Jonsson G, Wikner S. (1970). Establishment of *Streptococcus sanguis* in the mouths of infants. *Arch Oral Biol* 15: 1143- 1148.

Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP. (1993). Initial acquisition of *mutans* Streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res* 72: 37-45.

Caufield PW, Li Y, Dasanayake A. (2005). Dental Caries: an infectious and transmissible disease. *Compend Contin Educ Dent* 26: 10-16.

Ceballos M, Acevedo C y otros autores. (2007). Diagnóstico en Salud Bucal de niños de 2 y 4 años que asisten a la educación preescolar en la Región Metropolitana. MINSAL Gobierno de Chile.

Chen YY, Clancy KA, Burne RA. (1996). *Streptococcus salivarius* urease: genetic and biochemical characterization and expression in a dental plaque *Streptococcus*. *Infect Immun* 64: 585-592.

Chen Z, Saxena D, Caufield W, Ge Y, Wang M, Li Y. (2007). Development of species-specific primers for detection of *Streptococcus mutans* in mixed bacterial samples. *FEMS Microbiol Lett* 272: 154-162.

Claus and Berkeley. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

Corby PM, Bretz WA, Hart TC, Schork NJ, Wessel J, Lyons-Weiler J y otros autores. (2007). Heritability of oral microbial species in Caries-active and Caries-free twins. *Twin Res Hum Genet* 10: 821-828.

Corby PM, Lyons-Weiler J, Bretz WA, Hart TC, Aas JA, Boumenna T y otros autores. (2005). Microbial risk indicators of early childhood Caries. *J Clin Microbiol* 43: 5753-5759.

Coykendall A L. (1989). Classification and identification of the *viridans* Streptococci. *Clin Microbiol Rev* 2: 315-328.

Crielaard W, Zaura E, Schuller AA, Huse SM, Montijn RC, Keijser B. (2011). Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. *BMC Medical Genomics* 4: 22-34.

- Cunha-Cruz J, Scott J, Rothen M, Mancl L, Lawhorn T, Brossel K y otros autores. (2013). Salivary characteristics and dental Caries: Evidence from general dental practices. *J Am Dent Assoc* 144: 31-40.
- Di Giulio M, D'Ercole S, Zara S, Cataldi A, Cellini L. (2011). *Streptococcus mitis* human gingival fibroblasts co-culture: the best natural association in answer to the 2-hydroxyethyl methacrylate release. *APMIS* 120: 139-146.
- Diniz MB, Rodrigues JA, Hug I, Cordeiro Rde C, Lussi A. (2009). Reproducibility and accuracy of the ICDAS-II for occlusal Caries detection. *Community Dent Oral Epidemiol* 37: 399-404.
- Douglass JM, Li Y, Tinanoff N. (2008). Literature review of the relationship between *mutans Streptococci* in adult caregivers and *mutans Streptococci* and dental Caries in their children. *Pediatric Dentistry* 30: 375-387.
- Drucker B, Shakespear P, Green M. (1984). Production of dental plaque and Caries by the bacterium *Streptococcus salivarius* in gnotobiotic WAGIRIJ rats. *Archives of Oral Biology* 29: 437-443.
- Duque C y Mora I. (2012). La representación de la epidemiología de la Caries en el mundo a través de mapas. *Univ Odontol* 31: 41-50.
- Ekstrand KR, Martignon S, Ricketts DJN, Qvist V. (2007). Detection and activity assessment of primary coronal Caries lesions: A methodologic study. *Oper Dent* 32: 225-235.
- Ericsson Y. (1959). Clinical investigations of the salivary buffering action. *Acta Odontol Scand* 17: 131-165.
- Facklam R. (2002). What happened to the *streptococci*: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* 15: 613-630.
- Figuroa-Gordon M, Alonso G, Acevedo AM. (2009). Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de Caries dental. *Acta odontológica Venezolana* 47: 1-13.

- Francia M, Lissera G, Battellino L. (2007). Película adquirida salival: revisión de la literatura. *Acta Odontológica Venezolana* 45.
- Gamonal J. (1996). Prevalencia de enfermedades periodontales y de Caries dental en la población de 35-44 y de 65-74 años de nivel socio-económico bajo y medio-bajo de la provincia de Santiago, región metropolitana, y determinación de los recursos humanos necesarios para su tratamiento. *Rev Fac Odontol Univ Chile* 14: 56-57.
- Gibbons RJ y Socransky SS. (1962). Intracellular polysaccharide storage by organisms in dental plaques. Its relation to dental Caries and microbial ecology of the oral cavity. *Arch Oral Biol* 7: 73-79.
- Gizani S, Papaioannou W, Haffajee A, Kavvadia K, Quirynen M, Papagiannoulis L. (2009). Distribution of selected cariogenic bacteria in five different intra-oral habitats in young children. *Oral Microbiol Immunol* 24: 183-189.
- Guillarte C y Perrone M. (2004). Microorganismos de la placa dental relacionados con la etiología de la periodontitis. *Acta odontológica venezolana* 42.
- Hegde SK, Kumar KB, Sudha P, Bhat SS. (2005). Estimation of salivary bacteria capable of inhibiting and stimulating *Streptococcus mutans* and its correlation to dental Caries and untreated carious teeth. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 23: 126-130.
- Hojo K, Nagaoka S, Ohshima T, Maeda N. (2009). Bacterial Interactions in dental *biofilm* development. *J Dent Res* 88: 982-990.
- Hoshino T, Kawaguchi M, Shimizu N, Hoshino N, Ooshima T, Fujiwara T. (2004). PCR detection and identification of oral Streptococci in saliva samples using *gtf* genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 48: 195-199.
- Humphrey SP y Williamson RT. (2001). A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 85: 162-169.
- Ismail AI, Sohn W, Tellez M, Amaya A, Sen A, Hasson H y otros autores. (2007). The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 35: 170-178.

- Jablonski-Momeni A, Stachniss V, Ricketts DN, Heinzl-Gutenbrunner M, Pieper K. (2008). Reproducibility and accuracy of the ICDAS-II for detection of occlusal Caries in vitro. *Caries Res* 42: 79-87.
- Kaur A, Kwatra KS, Kamboj P. (2012). Evaluation of non-microbial salivary Caries activity parameters and salivary biochemical indicators in predicting dental Caries. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 30: 212-217.
- Kawashita Y, Kitamura M, Saito T. (2011). Early Childhood Caries. *Int J Dent*. Article ID 725320.
- Klein MI, Flório FM, Pereira AC, Höfling JF, Gonçalves RB. (2004). Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. *J Clin Microbiol* 42: 4620-4626.
- Kleinberg I. (2002). A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental Caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and The Specific-Plaque Hypothesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 13: 108-125.
- Könönen E. (2000). Development of oral bacterial flora in young children. *Ann Med* 32: 107-112.
- Krasse B y Carlsson J. (1970). Various types of Streptococci and experimental Caries in hamsters. *Arch of Oral Biol* 15: 25-32.
- Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. (2005). Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J Bacteriol* 187: 7193-7203.
- Kreth J, Zhang Y, Herzberg MC. (2008). Streptococcal antagonism in oral biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* interference with *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 190: 4632-40.
- Lancefield R C. (1933). A serological differentiation of human and other groups of Streptococci. *J Exp Med* 59: 441-458.

- Latorre M, Rojo P, Franco R, Cisterna R. (1993). Endocarditis due to *Staphylococcus subespecie urealyticus*. *Clin infec dis* 16: 343-344.
- Law V y Seow WK. (2006). A longitudinal controlled study of factors associated with *mutans* Streptococci infection and Caries lesion initiation in children 21 to 72 months old. *Pediatr Dent* 28: 58-65.
- Law V, Seow WK, Townsend G. (2007). Factors influencing oral colonization of *mutans* Streptococci in young children. *Aust Dent J* 52: 93-100.
- Lefimil C, Lozano C, Morales I, Plaza A, Maturana C, Urzúa B. (2013). DNA from oral bacteria by sodium hydroxide-paper method suitable for polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 433: 129-131.
- Lembo FL, Longo PL, Ota-Tsuzuki C, Rodrigues CR, Mayer MP. (2007). Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of Caries-free and Caries-active children. *Oral Microbiol Immunol* 22: 313-319.
- Li Y, Ge Y, Saxena D, Caufield P W. (2007). Genetic Profiling of the Oral Microbiota Associated with Severe Early-Childhood Caries. *J Clin Microbiol* 45: 81-87.
- Lindquist B y Emilson CG. (1990). Distribution and prevalence of *mutans* Streptococci in the human dentition. *J Dent Res* 69: 1160-1166.
- Linossier AC, Valenzuela CY, Soler ER, Contreras EM. (2011). Colonización de la cavidad oral por *Streptococcus* grupo *mutans*, según edad, evaluado en saliva por un método semi-cuantitativo. *Rev Chil Infect* 28: 230-237.
- Loesche W. (1976). Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev* 9: 65.
- Loesche WJ y Straffon LH. (1979). Longitudinal investigation of the role of *Streptococcus mutans* in human fissure decay. *Infect Immun.* 26: 498-507.
- Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC, Roberts GJ, Beighton D. (2001). The predominant microflora of nursing Caries lesions. *Caries Res* 35: 397-406.
- Marsh PD, Moter A, Devine DA. (2000). Dental plaque *biofilms*: communities conflict and control. *Periodontol* 55: 16-35.

- Marsh PD. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes?. *Microbiology* 149: 279-294.
- Marsh PD. (2004). Dental plaque as a microbial *biofilm*. *Caries Res.* 38: 204-211.
- Maturana C. (2002). Aislamiento y caracterización genética molecular de cepas de *Streptococcus mutans*. Universidad de Chile. Facultad de Odontología. Tesis requisito para optar al Título de Cirujano Dentista.
- Milnes AR y Bowden GH. (1985). The microflora associated with developing lesions of nursing Caries. *Caries Res* 19(4): 289-297.
- Miura H, Isogai E, Hirose K, Wakizaka H, Ueda I, Ito N. (1991). Application of a sucrose indicator strip to evaluate salivary sucrose clearance. *J Dent* 19: 189-191.
- Mohan A, Morse DE, O'Sullivan DM, Tinanoff N. (1998). The relationship between bottle usage/content, age, and number of teeth with *mutans* Streptococci colonization in 6–24-month-old children. *Community Dent Oral Epidemiol* 26: 12-20.
- Napimoga MH, Höfling JF, Klein MI, Kamiya RU, Gonçalves RB. (2005). Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. *J Oral Sci* 47: 59-64.
- Nobbs AH, Zhang Y, Khammanivong A, Herzberg MC. (2007). *Streptococcus gordonii* Hsa environmentally constrains competitive binding by *Streptococcus sanguinis* to saliva-coated hydroxyapatite. *J Bacteriol* 189: 3106-3114.
- Núñez D y García L. (2010). Biochemistry of dental caries. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* 9: 156-166.
- Okada M, Soda Y, Hayashi F, Doi T, Suzuki J, Miura K y otros autores. (2005). Longitudinal study of dental Caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children. *J Med Microbiol* 54: 661-665.
- Paster B J, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau C N, Levanos V y otros autores. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 183: 3770-3783.

Pearce CH, Bowdent G, Evans M, Fitzsimmons S, Johnsons J, Sheridan M y otros autores. (1995). Identification of pioneer *viridans* Streptococci in the oral cavity of human neonates. *J Med Microbiol* 42: 67-72.

Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma F, Snijders B, Kummeling I y otros autores. (2006). Factors Influencing the Composition of the Intestinal Microbiota in Early Infancy. *Dent Res* 81: 53-57.

Petersen P, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye CH. (2005). The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the World Health Organization* 83: 661-669.

Petersen PE. (2003). The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol* 31: 3-23.

Peterson S, Snesrud E, Liu J, Ong A, Killian M, Schork K y otros autores. (2013). The Dental plaque Microbiome in Health and Disease. *Plos ONE* 8: e 58487.

Pitts N. (2004). "ICDAS"--an international system for Caries detection and assessment being developed to facilitate Caries epidemiology, research and appropriate clinical management. *Community Dent Health* 21:193-198.

R. A. Whiley y Hardie J. (1988). *Streptococcus vestibularis* sp. nov. from the Human Oral Cavity. *Int Jour F Sys Bacteriol* 38: 335-339.

Rodríguez G. (2009). Prevalencia de Caries dental y factores asociados en niños y niñas que asisten a la educación preescolar del área norte de la región Metropolitana. Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Odontológicas con mención en Cariología. Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

Russell RR. (2008). How has genomics altered our view of Caries microbiology?. *Caries Res* 42: 319-327.

Salazar LA, Vásquez C, Almuna A, Oporto G, Santana R, Herrera CL y otros autores. (2008). Detección molecular de *Streptococcus* cariogénicos en saliva. *Int J Morphol* 26: 951-958.

- Schaeken MJ, van der Hoeven JS, Franken HC. (1986). Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on five isolation media, including a new simple selective medium. *J Dent Res* 65: 906-908.
- Schleifer K H y Kilpper-Balz R. (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of Streptococci, Enterococci and Lactococci: a review. *Syst Appl Microbiol* 10: 1-19.
- Schleifer K, Ehrmann M, Neve H. (1991). Revival of the species *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-jensen 1919). *Nom rev syst appl microbiol* 14: 386-388.
- Seow WK, Lam JH, Tsang AK, Holcombe T, Bird PS. (2009). Oral *Streptococcus* species in pre-term and full-term children - a longitudinal study. *Int J Paediatr Dent* 19: 406-411.
- Seow WK. (1998). Biological mechanisms of early childhood Caries. *Community Dent Oral Epidemiol.* 26: 8-27.
- Sherman J. (1937). The streptococci. *Bacteriol Rev* 1: 3-97.
- Shoaib L, Deery C, Ricketts DN, Nugent ZJ. (2009). Validity and reproducibility of ICDAS II in primary teeth. *Caries Res* 43: 442-448.
- Simpson CL, Cheetham NW, Giffard PM, Jacques NA. (1995). Four glucosyltransferases, GtfJ, GtfK, GtfL and GtfM, from *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. *Microbiology* 141: 1451-1460.
- Singh KP, Morris A, Lang SD, MacCulloch DM, Bremner DA. (1988). Clinically significant *Streptococcus anginosus* (*Streptococcus milleri*) infections: a review of 186 cases. *N Z Med J* 101: 813-816.
- Socransky SS y Haffajee AD. (2000). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 28: 12-55.
- Soto L, Jara G y otros autores. (2009). Diagnóstico en Salud Bucal de los niños de 2 y 4 años de edad que asisten a la educación preescolar en la zona norte y centro del país. MINSAL Gobierno de Chile.

- Soto L, Tapia R y otros autores. (2007a). Diagnóstico Nacional de Salud Bucal de los niños de 6 años. MINSAL Gobierno de Chile.
- Soto L, Tapia R y otros autores. (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. MINSAL Gobierno de Chile.
- Tabchoury CP, Sousa MC, Arthur RA, Mattos-Graner RO, Del Bel Cury AA, Cury JA. (2008). Evaluation of genotypic diversity of *Streptococcus mutans* using distinct arbitrary primers. *J Appl Oral Sci* 16: 403-407.
- Takahashi N and Nyvad B. (2008). Caries ecology revisited: microbial dynamics and the Caries process. *Caries Res* 42: 409-418.
- Takahashi N y Nyvad B. (2011). The role of bacteria in the Caries process: ecological perspectives. *J Dent Res* 90: 294-303.
- Tamura S, Yonezawa H, Motegi M, Nakao R, Yoneda S, Watanabe H y otros autores. (2009). Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 24: 152-161.
- Tanner AC, Kent RL Jr, Holgerson PL, Hughes CV, Loo CY, Kanasi E y otros autores. (2011a). Microbiota of severe early childhood Caries before and after therapy. *J Dent Res* 90: 1298-1305.
- Tanner AC, Mathney JM, Kent RL, Chalmers NI, Hughes CV, Loo CY y otros autores. (2011b). Cultivable anaerobic microbiota of severe early childhood Caries. *J Clin Microbiol* 49: 1464-1474.
- Tanner AC, Milgrom PM, Kent R Jr, Mokeem SA, Page RC, Riedy CA y otros autores. (2002). The microbiota of young children from tooth and tongue samples. *J Dent Res* 81: 53-57.
- Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. (2001). The microbiology of primary dental Caries in humans. *J Dent Educ* 65: 1028-1037.

- Ten Cate JM. (2006). Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology* 94:1-9.
- Twetman S. (2012). Are we ready for Caries prevention through bacteriotherapy?. *Braz Oral Res* 26: 64-70.
- Urbina T, Caro JC, Vicent M. (1997). Caries Dentaria y Fluorosis en niños de 6 a 8 y 12 años, de la I, III, IV, VII, XI y, XII. Regiones-Chile. MINSAL Gobierno de Chile.
- Urbina T, Caro JC, Vicente M. (1996). Caries dentaria y fluorosis en niños de 6 a 8 y 12 años de la II, VI, VIII, IX, X y Región Metropolitana Chile. MINSAL Gobierno de Chile.
- Urbina T, Caro JC, Vicente M. (1999). Caries dentaria y fluorosis en niños de 6 a 8 y 12 años de la V Región Chile. MINSAL Gobierno de Chile.
- Van Houte J, Sansone C, Joshipura K, Kent R. (1991). *mutans* Streptococci and non-*mutans* Streptococci acidogenic at low pH, and in vitro acidogenic potential of dental plaque in two different areas of the human dentition. *J Dent Res* 70: 1503-1507.
- Van Houte J. (1994). Role of microorganisms in Caries etiology. *J Dent Res* 73: 672-681.
- Van Ruyven FOJ, Lingström P, van Houte J, Kent R. (2000). Relationship among *mutans* Streptococci, "LOW PH" Bacteria, and Iodophilic Polysaccharide producing bacteria in dental plaque and early enamel Caries in humans. *J Dent Res* 79: 778-784.
- Wan AK, Seow WK, Purdie DM, Bird PS, Walsh LJ, Tudehope DI. (2001). Oral colonization of *Streptococcus mutans* in six-month-old predentate infants. *J Dent Res* 80: 2060-2065.
- Wan AK, Seow WK, Purdie DM, Bird PS, Walsh LJ, Tudehope DI. (2003). A longitudinal study of *Streptococcus mutans* colonization in infants after tooth eruption. *J Dent Res* 82: 504-508.

Wan AK, Seow WK, Walsh LJ, Bird PS. (2002). Comparison of five selective media for the growth and enumeration of *Streptococcus mutans*. *Aust Dent J* 47: 21-26.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697-703.

Wescombe PA, Hale JD, Heng NC, Tagg JR. (2012). Developing oral probiotics from *Streptococcus salivarius*. *Future Microbiol* 7: 1355-1371.

Whiley RA, Hardie JM. (1988). *Streptococcus vestibularis* sp. nov. from the human oral cavity. *Int J Syst Bacteriol* 38: 335-339.

**Páginas web visitadas:**

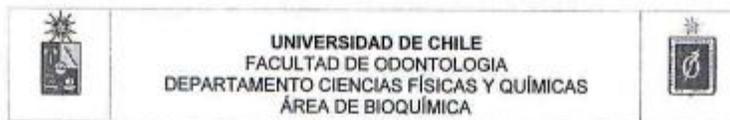
<http://www.icdas.org> ICDAS Foundation (2012). What is ICDAS.

<http://www.minsal.gob.cl> MINSAL (2012). Análisis de situación salud bucal.

[http://www.sochinf.cl/sitio/templates/sochinf2008/documentos/presentaciones\\_microbiologia\\_cli\\_2011/9\\_sr\\_Alarcon.pdf](http://www.sochinf.cl/sitio/templates/sochinf2008/documentos/presentaciones_microbiologia_cli_2011/9_sr_Alarcon.pdf) Alarcón P. (2011). Diagnóstico microbiológico del género *Streptococcus*. ISP, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile.

## ANEXOS

## ANEXO N°1: Consentimiento informado.



Fecha Edición: 24 de Octubre de 2011

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo Carla Lozano Moraga, docente de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, estoy realizando una investigación relacionada con microorganismos, los cuales son frecuentes en la población, especialmente en aquella que presenta caries dental. Le proporcionaré información y lo(a) invitaré a ser parte de ella. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. Antes de hacerlo 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 que haya comprendido la Investigación y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme este formulario. Los aspectos de este formulario tratan los siguientes temas: Nombre del proyecto, Investigadores asociados al Proyecto, Justificación de la Investigación, Objetivo de la Investigación, Procedimiento, Ventajas y Eventuales Riesgos Asociados a la Investigación y Aclaraciones.

**NOMBRE DEL PROYECTO:** "Efecto de factores de virulencia de *Lactobacillus casei* y *Candida albicans* sobre parámetros de crecimiento y viabilidad celular de *Streptococcus sanguinis*: un colonizador temprano del biofilm dental en ausencia de caries".

**INVESTIGADORES ASOCIADOS:** En este estudio el **Investigador Responsable** es: la Dra. Carla Lozano Moraga y el **Investigador Patrocinante** es el Dr. Víctor Cifuentes Guzmán. El Cirujano-Dentista, Dr. Gonzalo Rodríguez, perteneciente al área de Cariología de la Facultad de Odontología, es quien oficiará como único colaborador de este proyecto. El Financiamiento del estudio será por el Proyecto FONDECYT Postdoctorado 2012.

**JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN:** La caries dental es una enfermedad definida como infecciosa, que se puede transmitir y se origina por varios factores. Entre los factores implicados se pueden mencionar el alto consumo de azúcares, hábitos de higiene, acción de la saliva, tipo y cantidad de microorganismos presentes en la boca, entre otros. Debido a los factores anteriormente mencionados, la armonía que existe entre los microorganismos en estado de salud bucal, se altera, favoreciendo el desarrollo de aquellos que están involucrados tanto en la aparición como en el desarrollo de la caries dental. Las relaciones entre los distintos microorganismos que conviven, tanto en condiciones de salud como en presencia de caries, aún no se han aclarado del todo con exactitud, existiendo todavía un vacío en este tema.

**OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN:** Esta investigación tiene por objetivo detectar la presencia, cantidad y tipos de bacterias del género *Lactobacillus* y *Streptococcus* y de levaduras del género *Candida* en la saliva de niños sanos y en niños con caries. Además, se evaluará el efecto de las toxinas de la bacteria *Lactobacillus casei* y de la levadura *Candida albicans* sobre el crecimiento de la bacteria *Streptococcus sanguinis*. El estudio incluirá a un número total de 60 niños (30 sanos y 30 con caries), de 2 a 5 años de edad, que son atendidos en el servicio de diagnóstico de la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

**PROCEDIMIENTO AL QUE SERÁN SOMETIDOS LOS VOLUNTARIOS:** Si usted acepta que su hijo/a participe, él/ella será examinado(a) por el Dr. Gonzalo Rodríguez. A su hijo(a) o pupilo, se le tomará una muestra de saliva, la cual deberá ser depositada dentro de un frasquito que nosotros le proporcionaremos. En caso que ustedes estén dispuestos a participar pero el niño no sea capaz de depositar la saliva al frasquito, nosotros lo podemos ayudar con una bombilla plástica llamada pipeta.

R. 25/10/2011  
COMITÉ ASESOR  
DE BIOÉTICA  
FONDECYT



Antes del examen, a su hijo(a) o pupilo se le dará una breve explicación del procedimiento a realizar por parte del Dr. Rodríguez.

**VENTAJAS DE PARTICIPAR EN EL ESTUDIO:** Su hijo(a) o pupilo tendrá el beneficio de conocer el estado actual de su boca. Además, ellos y Usted recibirán al comienzo del estudio, una charla acerca de cómo cuidar y mantener la limpieza de sus dientes.

**EVENTUALES RIESGOS DE LA INVESTIGACIÓN:** Su hijo(a) o pupilo **NO CORRERÁ NINGÚN RIESGO** durante o posteriormente a su participación.

Toda la información derivada de su participación en este estudio, será conservada con estricta confidencialidad. Las únicas personas que tendrán acceso a los datos serán los investigadores de este estudio. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima. Cabe destacar que los datos personales serán codificados, es decir, se les asignará un número. Bajo ninguna circunstancia la Investigadora Responsable o el Investigador Patrocinante o el Cirujano-Dentista divulgarán estos antecedentes. Sólo se trabajará con el código asignado. Tampoco se le tomarán fotografías ni videos.

**ACLARACIONES:**

- La participación es completamente voluntaria
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para su hijo(a) o pupilo, en caso de no aceptar la intervención
- Si usted decide puede retirar del estudio a su hijo(a) o pupilo cuando lo desee.
- Las muestras obtenidas serán de exclusiva utilización para este estudio.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por la participación.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable, y posteriormente, las conclusiones del estudio, serán compartidas con usted si lo desea.
- La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de pacientes, será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores, para esto, no se utilizará su nombre sino un sistema de código que enumerará las muestras.
- Se le entregará a Usted una copia de este documento de Consentimiento Informado.

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento, y de haber podido aclarar todas sus dudas, puede, si lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado de la Investigación mencionada.

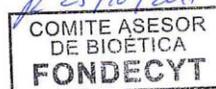
**FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

1.- Al firmar este documento, voluntariamente doy mi consentimiento para que un(a) Cirujano-Dentista, de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, me entreviste a mi y a mi hijo(a) y examine la boca de mi hijo(a). Estos procedimientos durarán alrededor de 30 a 50 minutos.

2.- Comprendo que los datos obtenidos en estos procedimientos, serán utilizados en un estudio de la U. de Chile, diseñado para averiguar la razón por la cual nos enfermamos de caries. Entiendo que este estudio tiene como finalidad última el contribuir con información para mejorar la salud bucal, el diagnóstico y prevención de la caries dental y sus resultados serán publicados en revistas científicas.

3.- Entiendo además, que para realizar parte de esta investigación mi hijo(a), deberá donar una muestra de saliva equivalente al volumen de una cuchara de té (5 ml), a la cual se le realizarán estudios de laboratorio. Entiendo que la muestra de saliva obtenida de la boca de mi hijo(a) será utilizada sólo para este estudio.

4.- Declaro que mi participación y la de mi hijo(a) en este estudio es libre y voluntaria, pudiendo incluso dejar de participar en él cuando lo deseemos. Si esto último ocurre, no habrá consecuencias negativas



sobre la atención que reciba el niño(a). Entiendo además, que la obtención de saliva de la boca del niño y el examen clínico que se le practicará, no presenta riesgo alguno. Sé que la información obtenida de mi hijo/a o pupilo será tratada de manera absolutamente confidencial, y únicamente utilizada para fines de investigación, sin fines de lucro. Entiendo que nuestros nombres y nuestros datos personales no serán jamás identificados públicamente.

5.- Por nuestra condición de voluntarios, entiendo que yo ni mi hijo(a) o pupilo recibiremos ninguna retribución económica. Comprendo que nuestra participación en este estudio no obliga de manera alguna a la Facultad de Odontología, de la Universidad de Chile, o al investigador, a hacerse cargo en forma gratuita del tratamiento de posibles enfermedades de la boca de mi hijo(a) o pupilo. Sin embargo, también he sido informado que si mi hijo(a) o pupilo presenta alguna enfermedad en la boca, será derivado al especialista respectivo.

6.- Entiendo sí, que por el hecho de participar en el estudio, yo y mi hijo(a) tenemos derecho a que se nos informe sobre los resultados de los exámenes que se practicará y a recibir un consejo al respecto, de parte del Cirujano-Dentista que examinó a mi hijo(a) o pupilo.

7.- El resultado final de la investigación me deberá ser entregado a mi, en representación de mi hijo(a), por escrito, con la correspondiente interpretación, si así lo deseo. Si requiero cualquier aclaración o información adicional sobre este estudio y nuestra participación en él, debo dirigirme al **Dr. Gonzalo Rodríguez**, Fono 02-9781742 o celular 95426731; al Investigador Responsable, **Dra. Caria Lozano**, Fono 02-9781792 o celular 93192730 o al Comité de Ética de la Facultad de Odontología, representado por el **Dr. Juan Cortés**, Fono 9781703. Las tres personas mencionadas se ubican en Av. Sergio Livingstone N° 943, Independencia, Santiago.

8.- Se me ha explicado que los datos clínicos y los resultados de los análisis de laboratorio permanecerán guardados en una base de datos y a ella tendrán acceso sólo el Investigador Responsable y el Dr. Rodríguez, quien examinará a los niños.

|   |                             |
|---|-----------------------------|
|   |                             |
| Firma del voluntario (Padre/Apoderado/Tutor)                              | Firma del Cirujano-Dentista |
| Nombre:   | Nombre:                     |
| Solicita Informe: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> |                             |

|                                  |
|----------------------------------|
|                                  |
| Firma del Investigador Principal |
| Nombre:                          |
|                                  |

Fecha: Santiago, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 20 \_\_\_\_

