



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
ÁREA DE BIOQUÍMICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA ORAL
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
ÁREA MICROBIOLOGÍA

**“PRESENCIA DE FACTORES DE VIRULENCIA EN MIEMBROS
DE LA FAMILIA *BIFIDOBACTERIACEAE* AISLADAS DESDE
CAVIDAD ORAL DE NIÑOS CHILENOS DE 7 A 11 AÑOS”**

Marta Fernanda Bravo Caba

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente, PhD

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. Carla Paola Lozano Moraga

Prof. Dr. Andrés Celis Sersen

Adscrito a Proyecto U-inicia difarp 40/13, VID, U. de Chile

Santiago - Chile

2016



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
ÁREA DE BIOQUÍMICA
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA ORAL
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA Y MEDICINA ORAL
ÁREA MICROBIOLOGÍA

**“PRESENCIA DE FACTORES DE VIRULENCIA EN MIEMBROS
DE LA FAMILIA *BIFIDOBACTERIACEAE* AISLADAS DESDE
CAVIDAD ORAL DE NIÑOS CHILENOS DE 7 A 11 AÑOS”**

Marta Fernanda Bravo Caba

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente, PhD

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. Carla Paola Lozano Moraga

Prof. Dr. Andrés Celis Sersen

Adscrito a Proyecto U-inicia difarp 40/13, VID, U. de Chile

Santiago - Chile

2016

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| I. RESUMEN _____ | 1 |
| II. MARCO TEÓRICO _____ | 3 |
| A. Microbiota Oral..... | 4 |
| A.1. Adquisición de la Microbiota Oral Normal..... | 5 |
| A.2. Formación de la Biopelícula Dental..... | 6 |
| B. Caries Dental..... | 8 |
| B.1. Patogénesis de la Caries..... | 8 |
| B.2. Factores de Riesgo..... | 10 |
| B.3. Prevalencia y Medición de Severidad de Caries..... | 12 |
| B.4. Etiología de la Caries Dental..... | 14 |
| C. Familia <i>Bifidobacteriaceae</i> | 14 |
| D. Mecanismos de Patogenicidad..... | 16 |
| III. HIPÓTESIS _____ | 19 |
| IV. OBJETIVOS _____ | 19 |
| A. General..... | 19 |
| B. Específicos..... | 19 |
| V. MATERIALES Y MÉTODOS _____ | 20 |
| A. Sujetos y Examen Clínico..... | 20 |
| B. Toma de muestras de saliva y desde sitios de caries..... | 21 |
| C. Preparación del medio de cultivo modificado de extracto de Triptona-Fitona-Levadura (MTPY)..... | 21 |

| | |
|---|----|
| D. Aislamiento y crecimiento de <i>Bifidobacteriaceae</i> desde las muestras..... | 21 |
| E. Extracción de ADN e identificación de especies..... | 22 |
| E.1. Extracción de ADN genómico..... | 22 |
| E.2. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)..... | 22 |
| E.3. Purificación de ADN..... | 23 |
| E.4. Secuenciación e identificación de especies..... | 24 |
| E.5. Análisis estadísticos..... | 24 |
| F. Determinación de la presencia de Factores de Virulencia..... | 25 |
| | |
| VI. RESULTADOS_____ | 26 |
| | |
| A. Caracterización de la población en estudio..... | 26 |
| B. Crecimiento bacteriano..... | 27 |
| C. Purificación de ADN genómico y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)..... | 28 |
| D. Presencia de <i>Bifidobacteriaceae</i> en las muestras estudiadas..... | 30 |
| E. Determinación de la presencia de genes de Factores de Virulencia en los aislados clínicos de <i>P. denticolens</i> | 31 |
| F. Resultados de secuenciación de los aislados clínicos no pertenecientes a la familia <i>Bifidobacteriaceae</i> | 34 |
| F.1. Distribución de las especies encontradas según el tipo de muestra..... | 34 |
| F.2. Distribución de especies por individuo, según condición de salud oral de los participantes (con o | |

| | | |
|-------|---|----|
| | sin experiencia de caries) y tipo de muestra..... | 37 |
| VII. | DISCUSIÓN _____ | 40 |
| VIII. | CONCLUSIONES _____ | 47 |
| IX. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS _____ | 48 |
| X. | ANEXOS Y APÉNDICES _____ | 57 |
| | A. Acta de aprobación del comité de ética..... | 57 |
| | B. Consentimiento Informado..... | 59 |
| | C. Ficha Clínica..... | 62 |

I. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La caries dental es una enfermedad crónica compleja y multifactorial, de componente infeccioso y de alta prevalencia en el ser humano. Se desarrolla producto de la interacción en el tiempo de una producción de ácidos a partir del metabolismo bacteriano, los dientes y la saliva. La microbiota que interactúa en este proceso es muy diversa. Estudios recientes han identificado a miembros de la familia *Bifidobacteriaceae* como microorganismos participantes de este proceso. Estos estudios son, en su mayoría, en adultos, y no existen análisis que relacionen estos microorganismos con niños. Por otra parte, las bacterias cariogénicas deben presentar mecanismos de patogenicidad para producir la enfermedad, entre los que se han descrito la aciduria, acidogénesis y la adhesión, todas codificadas por genes. En el presente estudio se buscará la presencia de estos mecanismos a partir de los genes *ldh*, *gadB* y *spaA*.

OBJETIVO: Determinar la presencia de miembros de la familia *Bifidobacteriaceae* en saliva y caries de niños Chilenos entre 7 y 11 años de edad y analizar los genes que codifican para los factores de virulencia *ldh*, *gadB* y *spaA*.

METODOLOGÍA: Mediante examen clínico, se seleccionó un grupo de 18 niños, 9 niños sin experiencia de caries y 9 con experiencia de caries. Se tomaron muestras de saliva de ambos grupos y muestras de sitio con caries en dentina a niños con experiencia de caries. Se procedió a realizar cultivos en medio MTPY, selectivo para *Bifidobacteriaceae*. Se aisló ADN genómico desde aislados clínicos seleccionados al azar, se realizó PCR para amplificar un fragmento del ADN del gen 16S ARNr y fueron enviados para su secuenciación. El análisis de estas secuencias permitió identificar las especies presentes en cada muestra. La presencia de los factores de virulencia se realizó por PCR, utilizando partidores específicos para cada gen en análisis (*ldh*, *gadB* y *spaA*).

RESULTADOS: Se detectó *Parascardovia denticolens*, miembro de la familia *Bifidobacteriaceae*, en el 5,6% de los niños estudiados (n=18). Mediante PCR se determinó que de los aislados clínicos obtenidos, el 50% dió positivo para el factor de virulencia *ldh* mientras que para los factores de virulencia *gadB* y *spaA* no fue posible obtener un amplificado positivo. No se obtuvieron aislados clínicos para otras especies de *Bifidobacteriaceae*. La especie *Actinomyces odontolyticus* fue encontrada abundantemente en muestras de saliva del grupo de niños con experiencia de caries y sin experiencia de caries. Se determinó una asociación estadísticamente significativa de este microorganismo a las muestras de saliva de ambos grupos, al comparar con su presencia en los sitios con caries ($p=0,01$ y $p=0,001$). *Rothia mucilaginosa* se encontró asociada a las muestras de saliva en ausencia de experiencia de caries al comparar con su presencia en sitios con caries ($p=0,001$).

CONCLUSIONES: En niños Chilenos entre 7 y 11 años sólo fue posible detectar la presencia de *P. denticolens* desde sitios con caries, única especie de los siete géneros de la familia *Bifidobacteriaceae*.

Los aislados clínicos de *P. denticolens* codifican el gen *ldh* en un 50% de los aislados, mientras que no codifican para los genes *spaA* y *gadB*, por lo que estos aislados no usarían estos mecanismos descritos para la adhesión y resistencia de ambientes ácidos.

Se encontraron otras especies bacterianas asociadas al tipo de muestra, como *A. odontolyticus* encontrada en saliva tanto de niños libres de caries como con experiencia de caries. De este mismo modo existen especies bacterianas relacionadas a la ausencia de caries, como *R. mucilaginosa*.

II. MARCO TEÓRICO

En nuestro país existe un gran número de enfermedades crónicas, dentro de las cuales se encuentran las patologías orales. Estas últimas, representan un grave problema de salud pública, por su prevalencia, costo de tratamiento y lo que ocasionan a nivel individuo y sociedad (MINSAL, 2007).

La salud oral puede definirse como la ausencia de dolor orofacial crónico en las diferentes partes del sistema estomatognático. Este dolor puede deberse a diferentes causas, tales como, cáncer de boca o garganta, heridas bucales, defectos congénitos como labio leporino o paladar hendido, enfermedades periodontales, pérdida de dientes, caries dental, entre otras (OMS, 2007).

La salud oral ha significado siempre una preocupación para la población. En Chile, las patologías orales afectan de manera importante el bienestar de las personas, como se refleja en la Encuesta Nacional de Calidad de Vida del año 2006, realizada por el Ministerio de Salud (MINSAL), donde el 37% de la población de mayores de 15 años refieren a la salud oral como un factor importante en la calidad de vida (MINSAL, 2006).

Según estudios epidemiológicos realizados por el MINSAL, en nuestro país las patologías orales de mayor prevalencia son: enfermedad periodontal, anomalías dento-maxilares y caries dental (Gamonal y cols., 2010; MINSAL 2007). Dentro de éstas, la caries dental y la enfermedad periodontal son patologías de origen infeccioso, que se producen por la presencia de microorganismos capaces de formar una biopelícula bacteriana sobre la superficie dentaria o en el surco subgingival respectivamente, y que se conoce como placa dental (Hojo y cols., 2009). Muchos de estos microorganismos son comensales, ya que forman parte de nuestra microbiota oral normal, y producto de cambios ecológicos producidos en la cavidad oral pueden llevar al desarrollo de la enfermedad. Pero antes de hablar del desarrollo de este proceso, es importante entender y conocer a la microbiota en su estado natural, sin factores determinantes de la enfermedad.

A. Microbiota Oral

En la cavidad oral humana existen diferentes hábitats, incluyendo los dientes, surcos gingivales, lengua, mejillas, paladar duro y blando y amígdalas, las cuales son colonizadas por bacterias. Este conjunto de bacterias se conoce con el término de Microbioma, acuñado por Joshua Lederberg en el año 2001: “Comunidad ecológica comensal, simbiótica y microorganismos patógenos que comparten espacio en nuestro organismo, determinantes en la salud y enfermedad” (Lederberg y cols., 2001; Dewhirst y cols., 2010). Este microbioma residente no tiene una relación pasiva con el hospedero, sino que contribuye directa e indirectamente con la fisiología, nutrición y sistema de defensa del organismo. En general, esta microbiota natural vive en armonía con humanos y animales, otorgando beneficios al hospedero. La pérdida o perturbación de esta microbiota residente puede producir la colonización de microorganismos exógenos (patógenos) predisponiendo a la enfermedad (Marsh, 2003).

En la microbiota oral humana existe una gran diversidad, tal como describe Cornejo y cols. (2012), donde a partir de muestras de placa dental de 98 adultos sanos aislaron alrededor de 10.000 especies microbianas diferentes. Esto corresponde a un orden de magnitud mayor a las 700 especies bacterianas orales previamente reportadas, identificadas por cultivo o clonación y secuenciación tradicional (Dewhirst y cols., 2010). Sin embargo, a la fecha, el 34% de estas especies aún no son cultivables y, por lo tanto, no se han caracterizado, por lo que sólo se detectan usando técnicas moleculares (Aas y cols., 2005; Cornejo y cols., 2012; Human Oral Microbiome Database: www.homd.org).

Los diferentes sitios en la cavidad oral albergan comunidades microbianas únicas, cuya composición es influenciada por las fluctuaciones físicas y químicas que resultan del consumo de alimentos y de las medidas de higiene oral utilizadas por el hospedero. A pesar de ello, estudios realizados hasta el momento revelan que la comunidad microbiana oral es relativamente estable, ya que muestra pocas diferencias entre individuos, en comparación con los microbiomas de la piel o del tracto gastrointestinal (Crielaard y cols., 2011).

A.1. Adquisición de la Microbiota Oral Normal.

Al momento de nacer, la cavidad oral es estéril, excepto quizás por algunos microorganismos adquiridos durante el paso a través del canal de parto. Luego de unas horas, los microorganismos provenientes de la madre, personal de maternidad, e incluso medio ambiente, van colonizando y estableciéndose en la cavidad oral del recién nacido (Caulfield y cols., 1993).

Se ha reportado que estas especies bacterianas pioneras son generalmente del género *Streptococcus*, y tendrían la capacidad de unirse al epitelio de la mucosa, por ejemplo *S. salivarius*. Posterior a la adhesión y colonización, la actividad metabólica de la comunidad pionera modifica el medio local, facilitando la colonización por otras especies bacterianas (Caulfield y cols., 1993; Li y cols., 1995; Crielaard y cols., 2011). Unos pocos meses luego del nacimiento aparecen los primeros dientes, agregando a la cavidad oral dos nuevos hábitats susceptibles a ser colonizados; el esmalte dental y el surco gingival.

La especies bacterianas que prefieren la colonización de los tejidos duros son *S. mutans*, *S. sanguinis* y *Actinomyces* spp. Ellas colonizan de forma selectiva la superficie del esmalte, recubierta por la película dental adquirida o PDA (Caulfield y cols., 1993; Hojo y cols., 2009).

Existen también otras especies bacterianas, que colonizan la zona del surco gingival, como *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. y algunas espiroquetas, las que requieren de un ambiente anaeróbico y de la presencia previa de colonizadores tempranos (Kuboniwa y cols., 2010).

Durante el primer año de vida, la microbiota oral consiste principalmente de especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Neisseria* y *Lactobacillus*, y en menor cantidad, de especies de *Actinomyces* y de *Prevotella* (Lemos y cols., 2013).

A.2. Formación de la Biopelícula Dental

Placa dental, biopelícula dental o *biofilm* dental, es una comunidad microbiana compleja y estructurada, que crece en la superficie de los dientes. Está formada por uno o varios tipos de microcolonias rodeadas de una matriz orgánica, producida por las bacterias residentes que ocupan un lugar y una función determinada dentro de ella (Guillarte y cols., 2004; Lakshman y cols., 2006). Se desarrolla sobre superficies duras y tejidos blandos de la cavidad oral. Dentro de su composición es posible encontrar bacterias vivas y muertas, productos metabólicos bacterianos y componentes derivados del hospedero (Kuboniwa y cols., 2010).

La matriz orgánica que rodea a los microorganismos en la placa dental se encuentra compuesta fundamentalmente por exopolisacáridos, y representa un 75-80% del volumen total de la biopelícula. Actúa como reservorio de nutrientes, confiere adhesión y mantiene la integridad estructural de ésta. Además, otorga protección a las bacterias cuando existen cambios en su ambiente, en las defensas del hospedero y/o antibióticos (Socransky y cols., 2002; Brescó-Salinas y cols., 2006).

El proceso de formación de la biopelícula dental es complejo y contempla varias etapas, entre las cuales tenemos: formación de la Película Dental Adquirida (PDA), adhesión bacteriana a la PDA, co-agregación bacteriana, formación de microcolonias y finalmente la estructuración de la biopelícula (Lakshman y cols., 2006). Los primeros microorganismos colonizadores de esta PDA son especies cocáceas y bacilos Gram-positivo, para luego ser reemplazadas por especies cocáceas, bacilos, cocobacilos y fusobacterias Gram-negativo. Finalmente, se agregan especies filamentosas, espirilos y espiroquetas (Guillarte y cols., 2004; Ahn y cols., 2008; Kuboniwa y cols., 2010).

Los colonizadores primarios y sus productos metabólicos son los responsables de crear un potencial redox más bajo en el ambiente, lo que permite que los colonizadores anaerobios se vayan incorporando. De este modo, poco a poco, se va aumentando la complejidad microbiana y el grosor de la biopelícula.

Cuando esta biomasa adquiere un tamaño adecuado, se logra el equilibrio entre los depósitos y pérdida de biopelícula, estableciéndose una comunidad clímax (Kuboniwa y cols., 2010). Las bacterias de la superficie de la biopelícula, y que forman parte de esta comunidad clímax, pueden desprenderse y entrar en una fase planctónica, esto quiere decir, quedar suspendidas en saliva o fluido crevicular gingival, y ser así transportados a nuevos sitios para comenzar una nueva colonización (Kuboniwa y cols., 2010). En la Fig. 1 es posible ver un diagrama representativo de este proceso.

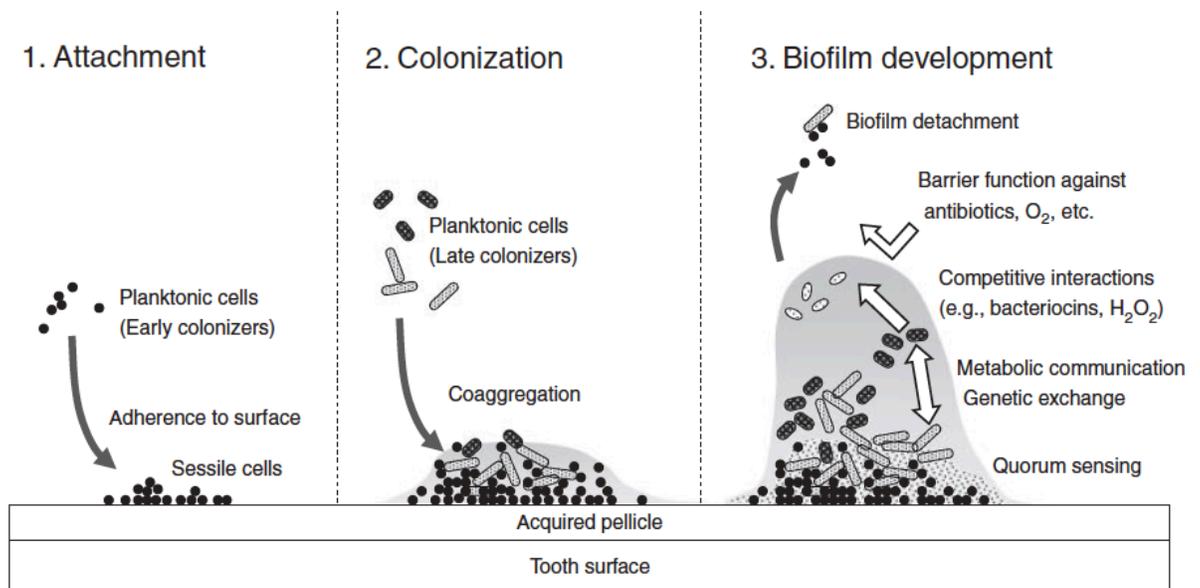


Figura 1. Diagrama representativo de la formación de la biopelícula en la superficie del diente y los roles potenciales de la interacción bacteriana. Tomado desde Hojo y cols., 2009.

B. Caries Dental

La caries dental es parte de un grupo de enfermedades crónicas complejas y multifactoriales, de componente infeccioso y de alta prevalencia en el ser humano. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la define como: “Un proceso patológico localizado, de origen multifactorial, que se inicia después de la erupción dentaria, determinando el reblandecimiento de tejido duro del diente, que evoluciona hasta la formación de una cavidad” (*World Health Organization, 1987*).

Es generada mediante la interacción entre bacterias cariogénicas productoras de ácidos, a través del metabolismo de carbohidratos, factores individuales que incluyen dientes y saliva, más el tiempo transcurrido en contacto con éstos (Selwitz y cols., 2007). El desarrollo y progresión de la caries se produce en sub-superficies del esmalte y en tejidos dentarios profundos, como dentina y pulpa dental, inducido por las variaciones de pH, las que llevan a un desequilibrio de los procesos normales de desmineralización y remineralización del esmalte (Selwitz y cols., 2007).

Cabe destacar que el término “caries” es utilizado para referirse al proceso que abarca esta patología, mientras que la lesión de caries, ya sea cavitada o no cavitada, es el resultado del proceso. La manifestación de estas lesiones en dientes puede ser reversible antes de que sean cavitadas, y puede ser detenida en cualquiera de sus etapas, incluso si existe destrucción de esmalte o dentina, modificando los factores que inciden en su desarrollo (Piits y cols., 2004; Scheie y cols., 2004).

B.1. Patogénesis de la Caries

El proceso de caries dental se produce debido al desbalance en el equilibrio fisiológico entre el mineral del diente, y la biopelícula o *biofilm* que existe sobre éste (Brescó-Salinas y cols., 2006).

Los procesos de remineralización y desmineralización del esmalte, se encuentran en equilibrio constantemente. Cuando hay modificaciones en este equilibrio, como el aumento en la producción de ácidos orgánicos por el metabolismo de bacterias que comúnmente son encontradas en boca, se genera

un descenso en el pH del medio, bajo un nivel crítico (pH 5,5), que provoca la pérdida de fosfato, calcio y carbonato desde la superficie del diente. Si el equilibrio entre esta desmineralización y la remineralización no es restaurado, se produce el colapso de las estructuras de los tejidos dentarios, provocándose la cavitación del diente. La mantención de condiciones acídicas, posibilita la selección por presión positiva de especies que son capaces de tolerar y adaptarse a las nuevas condiciones de pH y a la disponibilidad de nutrientes del entorno (Selwitz y cols., 2007). Todo esto, en conjunto a factores de riesgo que presenta el individuo, permiten el progreso del proceso de caries, lo que provoca las cavitaciones que destruyen la corona de los dientes (Figura 2) (Scheie y cols., 2004; Bader y cols., 2004).

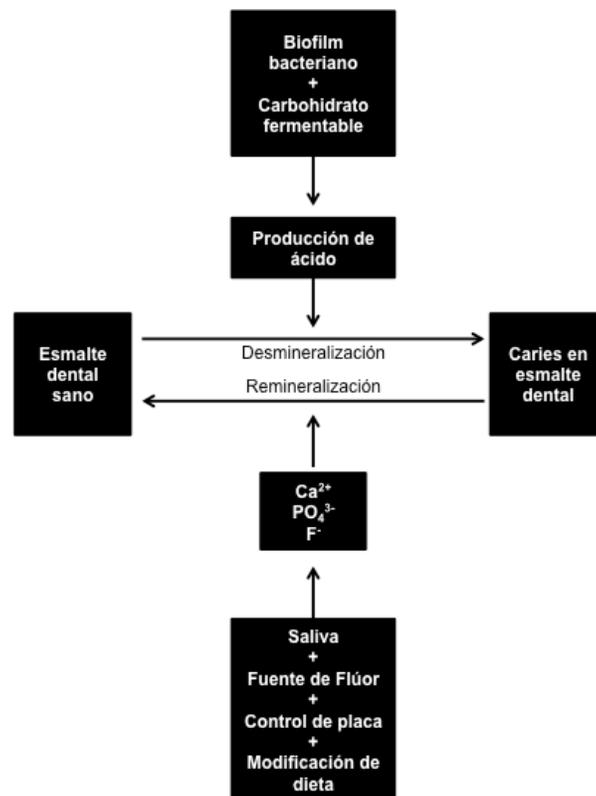


Figura 2. Diagrama del proceso de caries como un flujo constante de desmineralización (destrucción) y remineralización (reparación). Adaptado desde Selwitz y cols., 2007.

La saliva actúa como tampón, restaurando el pH del medio a valores cercanos al neutro. El esmalte dental está compuesto por cristales de hidroxiapatita, estructura cristalina que presenta menor resistencia al ataque por ácido que la fluorapatita, incluso que la hidroxiapatita expuesta a fluoruros (Kidd y cols., 2004). El temprano uso de fluoruros puede revertir el proceso de caries en etapas iniciales, ya que estos aceleran la difusión de calcio y fosfato hacia la estructura dentaria (Figura 2) (Yévenes y cols., 2010).

B.2. Factores de Riesgo

El proceso de caries es variable en el tiempo, dependiente del momento de vida y varía según epidemiología de acuerdo a la población que se esté analizando. Estudios han descrito como principales factores de riesgo la composición y el flujo de saliva, el número elevado de bacterias cariogénicas, escasa exposición a fluoruros, recesiones gingivales, componentes inmunológicos y factores genéticos (Featherstone y cols., 2002; Fejerskov y cols., 2003).

El estilo de vida y los factores conductuales de los individuos también se relacionan fuertemente con la caries dental, dentro de los cuales tenemos la higiene oral y la dieta, así como el momento de ingesta y el tipo de carbohidrato que se consume (Touger-Decker y cols., 2003).

El nivel socioeconómico del individuo, escolaridad, acceso a la atención dental, el uso de sellantes, el uso de aparatos de ortodoncia y las restauraciones dentales en mal estado también han sido descritos como factores que afectan el proceso de caries (Scheie y cols., 2004; Selwitz y cols., 2007).

Todos estos factores de riesgo se encuentran representados en la Figura 3.

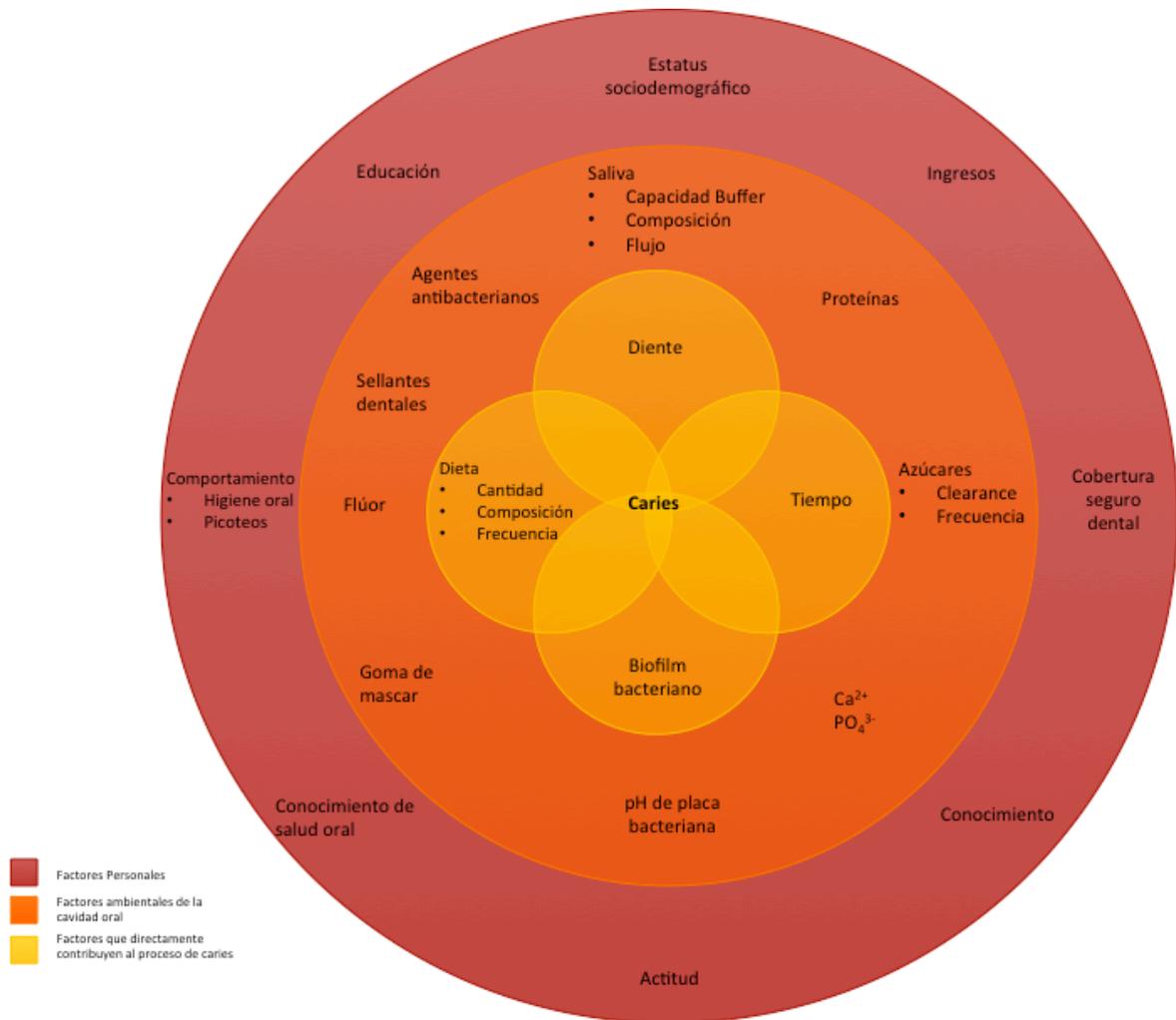


Figura 3. Esquema de los factores de riesgo en el desarrollo de caries dental. En amarillo se encuentran los factores que directamente contribuyen al proceso de caries, los dientes, la dieta, la presencia de un *biofilm* bacteriano más el tiempo. En naranja es posible ver a los factores ambientales de la cavidad oral que afectan el desarrollo del proceso. Y en rojo es posible ver los factores de riesgos personales del individuo que pueden afectar y ayudar en el desarrollo de éste. (Adaptado desde Selwitz y cols., 2007).

B.3. Prevalencia y Medición de Severidad de Caries

La prevalencia a nivel mundial de esta enfermedad, según la Organización Mundial de la Salud, OMS, oscila entre un 60 y 90% de la población escolar, mientras que a la población adulta la abarca en su gran mayoría (Petersen y cols., 2005).

El MINSAL, en su reporte del año 2011, describió que en Chile la prevalencia de caries dental a los 2 años ya es de un 16,8%, a los 4 años de un 49,6%, a los 6 años 70,4%, a los 12 años 62,5% y va en aumento a medida que avanza en edad, llegando a un 99,4% en la población adulta de 65-74 años (MINSAL, 2011).

La severidad de la caries dental es medida a través del número de dientes que se ven afectados por este proceso. Para esto, se ha descrito el índice COPD, propuesto por Klein, Palmer y Knutson en el año 1935. Este índice se utiliza para los dientes permanentes y el índice ceod para dentición temporal (ver Tabla 1), el cual es una modificación realizada por Gruebbel del índice COPD (Klein y cols., 1938).

Tabla 1. Definición de Índices COPD y ceod.

| COPD | ceod |
|---|--|
| C: número de dientes permanentes que presentan caries. | c: número de dientes temporales que presentan caries. |
| O: número de dientes permanentes obturados. | e: número de dientes temporales con indicación de extracción por caries. |
| P: número de dientes permanentes perdidos por caries y/o con indicación de extracción por caries. | o: número de dientes temporales obturadas. |
| El valor individual de ambos índices corresponde a la suma de los dientes cariados, obturados, perdidos o con indicación de extracción. | |

La OMS ha cuantificado la severidad de caries según el índice COPD/ceod de la siguiente forma:

- 0,0 a 1,1: Muy bajo.
- 1,2 a 2,6: Bajo.
- 2,7 a 4,4: Moderado.
- 4,5 a 6,5: Alto.

Esta clasificación permite medir en forma estandarizada la salud oral de la población en cuanto a la presencia de caries, así como establecer el accionar del profesional en salud oral para las distintas categorías.

En Chile, la prevalencia de caries según este índice, reportado por el MINSAL en el año 2011, mostró que los niños con dentición temporal presentan un promedio de ceod a los 2 años de 0,5, a los 4 años de 2,3, y a los 6 años de 3,7. Mientras que, en dentición definitiva, el índice COPD a los 6 años es 0,5, a los 12 años 1,9, a los 15 años es de 3,0. Estos datos se encuentran representados en la figura 4.

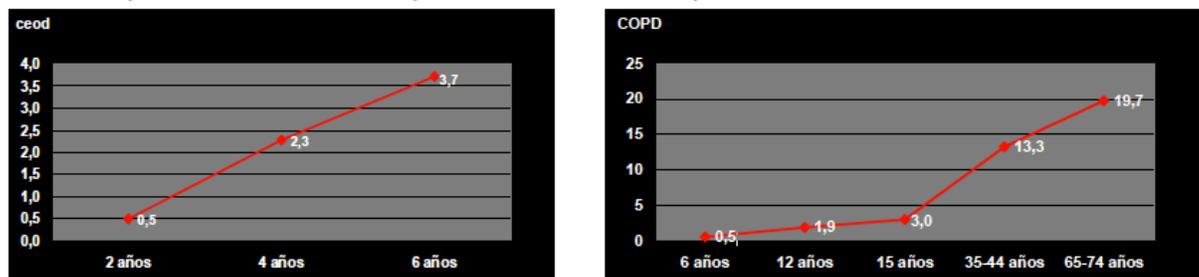


Figura 4: Gráficos representativos de índice ceod y COPD por edad. En el gráfico de la izquierda se presenta el índice ceod de dentición temporal en niños desde 2 a 6 años. En el gráfico de la derecha se representa los valores del índice COPD en dentición definitiva entre 6 y 74 años de edad. (Imagen tomada desde reporte MINSAL 2011).

B.4. Etiología de la Caries Dental

Como se mencionó anteriormente, la caries corresponde a una enfermedad multifactorial, donde tienen un rol la alimentación del individuo, factores socioeconómicos, la susceptibilidad individual y la formación de una placa bacteriana o biopelícula sobre la superficie dental (Arteaga y cols., 2008).

Las superficies de los dientes son colonizadas en primera instancia por especies de los géneros *Streptococcus* y *Actinomyces*, denominados colonizadores primarios (Wright y cols., 2013). Del género *Streptococcus*, el miembro más conocido a nivel oral es *S. mutans*, y muchos estudios lo reconocen como el principal agente etiológico de la caries dental (Tanzer y cols., 2001). Esto es debido a la frecuencia con la que ha sido aislado desde muestras de caries, a que es capaz de inducir la formación de caries en animales que se alimentan con dieta rica en sacarosa, y además, es altamente acidogénico y acidúrico. Junto con esto, es capaz de producir antígenos I/II de superficie, lo que facilita la adhesión a la superficie dental y a otras bacterias (Takahashi y cols., 2011).

S. mutans se encuentra en las superficies de las caries dentarias, y su porcentaje de aparición en ese proceso va en disminución a medida que éste avanza en dentina, y es ahí donde los géneros *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Atopobium* y *Bifidobacterium*, entre otros, aumentan su prevalencia (Aas y cols., 2008; Kianoush y cols., 2014).

C. Familia Bifidobacteriaceae

La familia *Bifidobacteriaceae* pertenece al Phylum *Actinobacteria*, una gran unidad taxonómica bacteriana. Se caracterizan por ser microorganismos Gram positivo con alto contenido de G+C en su ADN (Turróni y cols., 2010).

La familia *Bifidobacteriaceae* contiene 7 géneros; *Bifidobacterium*, *Aeriscardovia*, *Falcivibrio*, *Gardnerella*, *Parascardovia*, *Scardovia* y *Alloiscardovia*, los cuales han sido aislados desde humanos y animales. Estos organismos son Gram-positivos, no filamentosos, no mótils, no formadores de esporas, anaerobios, acidogénicos y acidúricos. Se encuentran en seis nichos ecológicos:

intestino humano, comida, tracto gastrointestinal en animales, intestinos de insectos, aguas servidas y cavidad oral (Ventura y cols., 2007).

Bifidobacteriaceae también habitan la cavidad oral, y han sido aisladas desde placa dental, saliva y lesiones de caries (Modesto y cols., 2006; Beighton y cols., 2008; Mantzourani y cols., 2009).

Existen varios estudios donde se señala la presencia de miembros de la familia *Bifidobacteriaceae* en cavidad oral, tanto en saliva como en caries dental. Beighton y cols. (2008), aislaron cepas de esta familia desde saliva humana y dentina infectada de caries en raíces, provenientes de voluntarios adultos. De las colonias aisladas, el 82,2% fue *B. dentium*, un 10,8% *B. longum*, 4,7% *Scardovia inopinata* y un 3,2% *Parascardovia denticolens*. Mantzourani y cols. (2009), aislaron *Bifidobacterium* spp. desde caries activas de dentina en adultos y niños, siendo *B. dentium* la especie más predominante en ser aislada tanto en adultos como en niños. Por otra parte, ellos no encontraron presencia de este género en las muestras tomadas desde las superficies oclusales de dientes libres de caries y sin restauraciones. En saliva de adultos mayores de 60 años, Beighton y cols. (2010) analizaron la presencia de *Bifidobacteriaceae*, encontrando que en individuos con caries el 96,8% de las cepas aisladas pertenecían al género *Bifidobacterium* y al igual que los estudios antes mencionados, *B. dentium* fue la especie más aislada (12,8%).

En nuestro país no existen publicaciones sobre la presencia de la familia *Bifidobacteriaceae* en la cavidad oral de individuos, así como su asociación a caries dental. En el año 2014, Pérez y cols., en el laboratorio de Bioquímica y Biología Oral de nuestra Facultad comenzaron el estudio de la presencia de miembros de esta familia en saliva de adultos con y sin caries, encontrando un menor recuento de estas bacterias en saliva de sujetos libres de caries que en los que sí presentaban caries, así mismo, se obtuvo un alto recuento desde sitios con caries. En estos estudios preliminares se encontró que los miembros de la familia *Bifidobacteriaceae* presentes en saliva son diferentes a las que se presentan en caries, lo que podría indicar que sólo algunas especies poseen los mecanismos

para sobrevivir en sitios de caries o bien, los mecanismos de patogenicidad necesarios para producir la enfermedad.

D. Mecanismos de Patogenicidad

Todas las bacterias poseen mecanismos de patogenicidad específicos que emergen para superar las defensas de un hospedero. De esta forma, el microorganismo puede causar un daño a cualquier nivel en un organismo hospedero susceptible. Las bacterias a lo largo de su evolución han adquirido características que le permiten invadir un ambiente, expresar receptores superficiales especializados para su adhesión permitiendo la colonización, evadir el sistema inmune y finalmente, causar daño para lograr un acceso a la fuente de nutrientes necesarios para su crecimiento y reproducción. Todos estos componentes microbianos, que favorecen su crecimiento o sobrevivencia durante la infección, se conocen como factores de virulencia (Meylan y cols., 2006).

Dentro de los factores de virulencia de los miembros de la familia *Bifidobacteriaceae* destacamos la acidogénesis, aciduria y adhesión (Haukioja y cols., 2008; Nakajo y cols., 2010; Ventura y cols., 2007).

Una de las características más importantes de las bacterias cariogénicas es su capacidad de producir ácidos desde carbohidratos fermentables (acidogénesis). En un estudio de Haukioja y cols. (2008), analizaron la producción de ácidos *in vitro* por cepas de *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp., utilizando diferentes azúcares como fuente de carbono. Los resultados mostraron que todas las cepas de *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. utilizadas en el estudio fueron capaces de producir ácidos a partir del metabolismo de la glucosa, y la disminución de pH que generaron fue comparable a la causada por *S. mutans*, por lo tanto, pueden ser consideradas como acidogénicas. Ventura y cols. (2009), luego de analizar la secuencia genómica de *B. dentium* Bd1, determinaron que esta cepa posee todas las enzimas necesarias para la fermentación de glucosa y fructosa a ácido láctico y acetato, a través de la ruta fructosa-6-fosfato y la vía Embden-Meyerhoff (glicólisis). Estas vías metabólicas son importantes para

generar piruvato y, a partir de éste, ácido láctico, por medio de la enzima lactato deshidrogenasa codificada por el gen *ldh*.

Otro mecanismo de patogenicidad fundamental en la etiología de caries es la aciduria, que corresponde a la capacidad de resistir ambientes ácidos manteniendo su metabolismo fermentador (seguir produciendo ácido). En el estudio realizado por Nakajo y cols. (2010), se analizaron los efectos de la acidificación en *B. dentium*, *B. longum*, *S. mutans*, *S. sanguinis* y *L. paracasei*, utilizando medios de cultivo con pH entre 4,0 y 8,0. Se evidenció que *B. dentium* y *B. longum* fueron más resistentes a ácido, debido a la habilidad de controlar su pH interno (pH_{in}) más eficientemente que las otras cepas estudiadas. La habilidad de sobrevivir al ácido es una característica fundamental para permanecer en un sitio con caries, ya que se ha descrito que el pH se vuelve más ácido a medida que avanzamos en profundidad de la cavidad (Kianoush y cols., 2014). La habilidad de sobrevivir y la mantención de pH_{in} podría dar cuenta de la habilidad de proliferar en lesiones de caries. En bacterias se han descrito variados sistemas para sobrevivir a pH ácidos, siendo uno de ellos un sistema de resistencia a ácido dependiente de glutamato. Se ha descrito que el genoma de *B. dentium* Bd1 contiene los genes *BDP_1749* y *BDP_1750* que codifican para una glutamato decarboxilasa (GadB) y para el transportador antiporter de glutamato/gamma aminobutirato (GadC), los que serían homólogos al sistema de resistencia al ácido glutamato-dependiente descrito en otros microorganismos (Ventura y cols., 2009). Estos genes no se encuentran presentes en otros genomas de *Bifidobacterium* publicados hasta ahora.

Todas las especies de *Bifidobacterium* secuenciadas a la fecha, parecen codificar en sus genomas las vías metabólicas requeridas para la síntesis de polisacáridos extracelulares (EPS) o de una cápsula polisacárida, y tal estructura extracelular podría ser importante para la adherencia de la bacteria al hospedero. Ventura y cols. (2009) señalaron que en el genoma de *B. dentium* Bd1, se encuentra el gen *BDP_2059*, un putativo homólogo de *spaA*, que codifica la adhesina más importante de *S. viridans*. La posible adhesina *BDP_2059* tiene

también un dominio proteico que es similar al dominio de una proteína de *S. gordonii*, la cual media la co-agregación de este microorganismo.

Los factores de virulencia bacterianos pueden hacer más o menos virulenta a una bacteria y, cómo se señaló anteriormente, permiten a los microorganismos invadir al hospedero, evadiendo sus defensas y causando enfermedad. Los factores de virulencia otorgan a las diferentes especies bacterianas la capacidad de producir una patología. Frente a esto que su identificación es de importancia, debido que en un futuro es posible usarlos como blancos terapéuticos, frenando de algún modo el avance de una patología.

En nuestro país no existen publicaciones sobre la presencia de los diferentes géneros de la familia *Bifidobacteriaceae* en la cavidad oral en niños, así como su asociación a caries dental. Del mismo modo, tampoco se ha realizado un análisis de los factores de virulencia que podrían poseer estas géneros. En este estudio se propuso que la presencia o ausencia de estos factores podría determinar la capacidad de estas especies de establecerse en uno u otro nicho ecológico, entendiéndose saliva versus caries, por ejemplo. Debido a esto, el objetivo de este trabajo fue analizar cuáles son los géneros de *Bifidobacteriaceae* presentes en la cavidad oral de niños Chilenos de 7 a 11 años de edad con y sin caries, así como la presencia de los genes *ldh*, *gadB* y *spaA* en estas especies, que codifican para factores de virulencia importantes en la invasión y permanencia de estos microorganismos en un sitio con caries.

III. HIPÓTESIS

Aislados clínicos de la familia *Bifidobacteriaceae* obtenidos desde saliva y caries de niños Chilenos entre 7 y 11 años de edad presentan diferencias en la presencia de los genes de factores de virulencia *ldh*, *gadB* y *spaA*.

IV. OBJETIVOS

A. General

Determinar la presencia de miembros de la familia *Bifidobacteriaceae* en saliva y caries de niños chilenos entre 7 y 11 años de edad y analizar los genes que codifican para los factores de virulencia *ldh*, *gadB* y *spaA*.

B. Específicos

- a) Determinar los miembros de la familia *Bifidobacteriaceae* presentes en saliva y caries de niños Chilenos entre 7 y 11 años de edad.
- b) Analizar la presencia de los genes de virulencia *ldh*, *gadB* y *spaA* en los géneros de *Bifidobacteriaceae* aisladas desde saliva y caries de niños Chilenos entre 7 y 11 años de edad.
- c) Correlacionar la presencia de los genes de virulencia *ldh*, *gadB* y *spaA* a los géneros de *Bifidobacteriaceae*, tipo de muestra y al estatus de salud oral de los niños Chilenos entre 7 y 11 años de edad.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Sujetos y Examen Clínico

Este protocolo de estudio está aprobado por el Comité de Ética Científica de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile. 18 niños Chilenos entre 7 a 11 años de edad fueron invitados a participar voluntariamente de este estudio. Para esto el investigador principal explicó los objetivos del proyecto de investigación al padre/madre del niño, indicándoles que asistieran a la unidad de Diagnóstico de la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, en un horario específico. Posterior a su aceptación de participar y previa firma de consentimiento informado, se tomaron las muestras desde cada niño (como se señala más adelante) y se determinó su estatus de caries, que se expresó como índice ceod y COPD (para dentadura temporal y permanente respectivamente) de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud, 1997. El examen clínico y la toma de muestras fueron realizados por el Dr. Andrés Celis Sersen, Cirujano Dentista de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Los niños fueron divididos en dos grupos: 0 caries fueron considerado como libre de experiencia de caries y 1 o más caries fueron considerados con experiencia de caries. Se reclutaron 9 niños sin caries y 9 niños con caries en dentina. Desde los sujetos libres de caries se tomó una muestra de saliva, y desde los sujetos con caries se tomó una muestra de saliva y una desde un sitio con caries en dentina, a partir de primeros molares. Sujetos con experiencia de caries, pero sin lesiones cavitadas en dentina no fueron incluidos en este estudio. Aquellos niños que en el último mes hayan consumido antibióticos o hayan recibido aplicación de flúor tampoco fueron considerados para este estudio.

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

B. Toma de muestras de saliva y desde sitios con caries

Todas las muestras desde sitios con caries fueron colectadas con una espátula esterilizada y depositada en 100 μ L de buffer fosfato salino (PBS, pH 7,2) como describe en Kuribayashi y cols., 2012. Las muestras de saliva fueron recolectadas en tubos de plástico estériles y se tomó aproximadamente 1 mL de saliva. Las muestras fueron almacenadas a 4°C por un tiempo breve, hasta su traslado al laboratorio de bioquímica y biología oral donde fueron procesadas.

C. Preparación del medio de cultivo modificado de extracto de Triptona-Fitona-Levadura (MTPY)

Se realizó el medio basado en el estudio de Beighton y cols. (2010) para el aislamiento de *Bifidobacteriaceae*, que se describe con la siguiente composición: peptona 7 g/L, triptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, glucosa 15 g/L, rafinosa 5 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,5 g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,25 g/L, $CaCl_2$ 0,15 g/L, $FeCl_3$ 0,001 g/L, tween 80 0,1% v/v, mupirocina 5 mg/mL, agar 15 g/L.

D. Aislamiento y crecimiento de *Bifidobacteriaceae* desde las muestras

A partir de las muestras en PBS tomada desde sitios con caries, 100 μ L fueron sometidos a diluciones seriadas 1:10, 1:100 y 1:1000 v/v , de las cuales 100 μ L fueron depositados sobre la superficie de placas de medio MTPY modificado con la finalidad de aislar las diferentes especies de *Bifidobacteriaceae* presentes en esta muestra (Beighton y cols., 2010). El mismo procedimiento fue llevado a cabo con las muestras de saliva, donde las diluciones 1:100, 1:1000 y 1:10000 fueron sembradas. Todas las placas fueron incubadas según Beighton y cols. (2010) a 37°C, en anaerobiosis por 72 h. Para generar anaerobiosis se utilizaron sobres de AnaeroPackTM-Anaero. Un sobre de este producto absorbe el Oxígeno desde el contenedor de placas, generando aproximadamente un 16% de CO_2 , produciendo anaerobiosis atmosférica. La concentración de O_2 llega a cero en dos horas.

De las colonias crecidas, presuntamente identificadas como *Bifidobacteriaceae* (colonias blanquecinas, pequeñas, cóncavas, de borde liso (Whitman y cols., 2012), se seleccionaron al azar al menos 16 desde cada muestra, las que fueron re-sembradas en medio sólido MRS (Oxoid) suplementado con 0,02% de cisteína y 0,34% de ascorbato de sodio (Hirayama y cols., 2012) e incubadas como se indicó anteriormente, para la posterior extracción de ADN.

E. Extracción de ADN e identificación de especies

E.1. Extracción de ADN genómico

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

E.2. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Un fragmento de aproximadamente 500 pb del gen de 16S rRNA fue amplificado por PCR, utilizando los partidores específicos descritos para *Bifidobacteriaceae* (Bif164mod: 5'-GGGTGGTAATRCCSRATG-3' y Bif662mod: 5'-CCACCGTTACACCGRGAA-3') (Beighton y cols., 2010). Para la realización de la PCR se utilizó ADN genómico en filtros de disco de 1,2 mm obtenidos desde el proceso anterior, 1 µM de primer requerido, 0,2 mM de cada dNTP (Thermo Scientific®), 0,05 U/µL Taq ADN polimerasa (Thermo Scientific®), y 1x de buffer PCR que contiene 1,5 mM de MgCl₂. La amplificación fue llevada a cabo en un termociclador PCR GeneAmp 2400 (PerkinElmer) y el proceso consistió en una

desnaturalización inicial de 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos, con una etapa final de 72 °C por 5 minutos.

Alícuotas del producto de la PCR fueron corridas en gel de agarosa al 1% usando tampón TAE 1x (40 mM Tris-acetato, 1 mM Na₂EDTA) que contenía Safeview™ (NBS Biologicals) para su posterior visualización a través de transiluminación ultravioleta.

La electroforesis se realizó a 80-100 V por tiempos variables en amortiguador TAE (Tris-acetato 40 mM pH, EDTA 1 mM, pH 8,3) y los ácidos nucleicos se visualizaron en un transiluminador de radiación UV. Los geles se fotografiaron con una cámara digital (Sistema Carestream) y la imagen se procesó en un computador.

Ya que en la mayoría de los aislados clínicos no amplificaron *Bifidobacteriaceae* se decidió realizar la amplificación por PCR de un fragmento de ADN de aproximadamente 1500 pb del gen de 16S rRNA bacteriano, utilizando los partidores específicos para bacterias PU1R: 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3' y PU1F 5'- ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT -3' (Cogulu y cols., 2008), y así se determinó qué cepas bacterianas había en las placas de muestras. Se utilizó el mismo programa y condiciones de PCR descritas anteriormente. Posterior a la amplificación se procedió a realizar lo previamente descrito. Todos los oligonucleótidos utilizados en este estudio fueron manufacturados por Integrated DNA Technologies, Inc (<https://www.idtdna.com/site>).

E.3. Purificación de ADN

El producto de PCR fue purificado utilizando el kit FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (Favorgen Biotech Corp.) a partir de un gel de electroforesis de ADN en agarosa, y siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Un fragmento del gel que contenía la banda de ADN, obtenida desde la amplificación por PCR, se procedió a cortar procurando no pesar más de 300 mg. Luego, se agregó 500 µL de FADF Buffer, para posteriormente incubar a la 55°C por 10-15 minutos hasta que el gel se disolvió. Se dejó enfriar a temperatura

ambiente, para luego traspasar 800 μ L de la muestra a una columna FADF, esto se centrifugó por 30 segundos. Una vez listo lo anterior, se agregó 750 μ L de Wash Buffer a la columna y se volvió a centrifugar por 30 segundos, eliminando el líquido. Este centrifugado se realizó hasta que la columna estuviera seca. Posteriormente, se procedió a cambiar el FADF a un nuevo tubo de centrifugación, agregando 40 μ L de Elution Buffer o agua bidestilada, en el centro de la columna, se esperó 2 minutos para luego centrifugar por 2 minutos. El ADN obtenido se conservó a -20°C .

E.4. Secuenciación e identificación de especies

El producto de PCR purificado fue secuenciado en la empresa MacroGen USA. Las secuencias obtenidas fueron analizadas realizando un alineamiento contra la base de datos no-redundante (nr) utilizando el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Para la utilización de este programa en la página previamente nombrada, se utilizó la secuencia enviada en formato .txt desde la empresa MacroGen USA. Los resultados fueron categorizados en porcentajes de similitud con las distintas cepas de bacterias de la base de datos. El análisis de los resultados de los alineamientos permitió identificar a las distintas especies de bacterias presentes en cada muestra, considerando una identificación positiva cuando existía más de un 90% de identidad de secuencia. Con estos resultados se realizó un análisis de la prevalencia de las diferentes especies encontradas en saliva y sitios profundos con caries, así como, su asociación con la ausencia o presencia de caries. Análisis estadísticos adecuados (test exacto de Fisher) fueron realizados.

E.5. Análisis estadísticos

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

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

F. Determinación de la presencia de Factores de Virulencia

La presencia de los factores de virulencia se realizó por PCR, utilizando oligonucleótidos específicos contra cada gen en análisis (*ldh*, *gadB* y *spaA*). El diseño de los oligonucleótidos se realizó previamente en el laboratorio, mediante un alineamiento de al menos 5 secuencias de cada uno de los genes blanco e identificando regiones conservadas en dichas secuencias. En la Tabla 2 se muestra la secuencia de los oligonucleótidos para cada gen. Las condiciones de realización de la PCR y la visualización de los productos fueron idénticas a las señaladas en la sección E.2.

Tabla 2. Oligonucleótidos para detección de genes de factores de virulencia.

| Gen en estudio | Tamaño esperado del producto de PCR ** | Nombre del oligonucleótido | Secuencia oligonucleótido 5' → 3' * |
|----------------|--|----------------------------|-------------------------------------|
| <i>ldh</i> | 620 pb aprox. | Bif-ldh-fw | AGS KYG GTK CCG GAG CC |
| | | Bif-ldh-rev | SCG ACR TGR TCG TCA WC |
| <i>gadB</i> | 647 pb aprox | Bif-gadB-fw | GTR GAM SCG CKT KAC GYG |
| | | Bif-gadB-rev | GAA CCG YCK KTM CAT YGA G |
| <i>spaA</i> | 600 pb aprox. | Bif-spaA-fw | CRA CKG SRG MTS GTA HTA C |
| | | Bif-spaA-rev | CBA GRM CKG CSG CAT GG |

* Códigos de letras de nucleótidos: R: A/G; Y: C/T; M: A/C; K: G/T; S: C/G; W: A/T; B: C/G/T; H: A/C/T. **El tamaño del amplificado depende de la especie utilizada.

VI. RESULTADOS

A. Caracterización de la población en estudio

Para este estudio se incluyeron un total de 18 niños Chilenos, con edades entre los 7 a 11 años, seleccionados de acuerdo a los criterios de inclusión establecidos previamente. Del total de sujetos estudiados, 9 se encontraban libres de experiencia de caries y 9 con al menos una caries cavitada y el 57,9% fueron mujeres y 42,1% fueron hombres.

La edad promedio de los participantes del grupo libre de caries fue de $9,7 \pm 1,5$ años y del grupo con caries fue de $9,6 \pm 0,5$ años y la mediana para ambos grupos fue de 10 años (Tabla 3). Ambos grupos presentaron una distribución etaria similar, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Test Wilcoxon-Mann-Whitney $p=0,31$). La distribución por sexo fue similar en ambos grupos. El promedio de ceod/COPD del grupo con experiencia de caries se encuentra descrita en la Tabla 3.

Tabla 3. Características demográficas de la población en estudio.

| | SIN EXPERIENCIA DE CARIES | CON EXPERIENCIA DE CARIES |
|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| EDAD PROMEDIO (años) | 9,7 ± 1,5 | 9,6 ± 0,5 |
| MEDIANA (años) | 10 | 10 |
| DISTRIBUCIÓN POR SEXO* | M: 5 H: 4 | M: 6 H: 3 |
| N | 9 | 9 |
| ceod | 0 | 4 ± 2,65 |
| COPD | 0 | 0,67 ± 1 |

*M: mujeres. H: hombres.

B. Crecimiento bacteriano

A partir del 94% de las muestras de saliva y desde el 100% de los sitios de caries se obtuvo crecimiento en las placas con medio de cultivo modificado de extracto de Triptona-Fitona-Levadura (MTPY), descrito como selectivo para *Bifidobacteriaceae* (Beighton, 2010).

Las colonias fueron identificadas presuntivamente como *Bifidobacteriaceae* por su aspecto de colonias pequeñas, blanquecinas, cóncavas, de bordes lisos (Whitman W. y cols., 2012) (Figura 5).

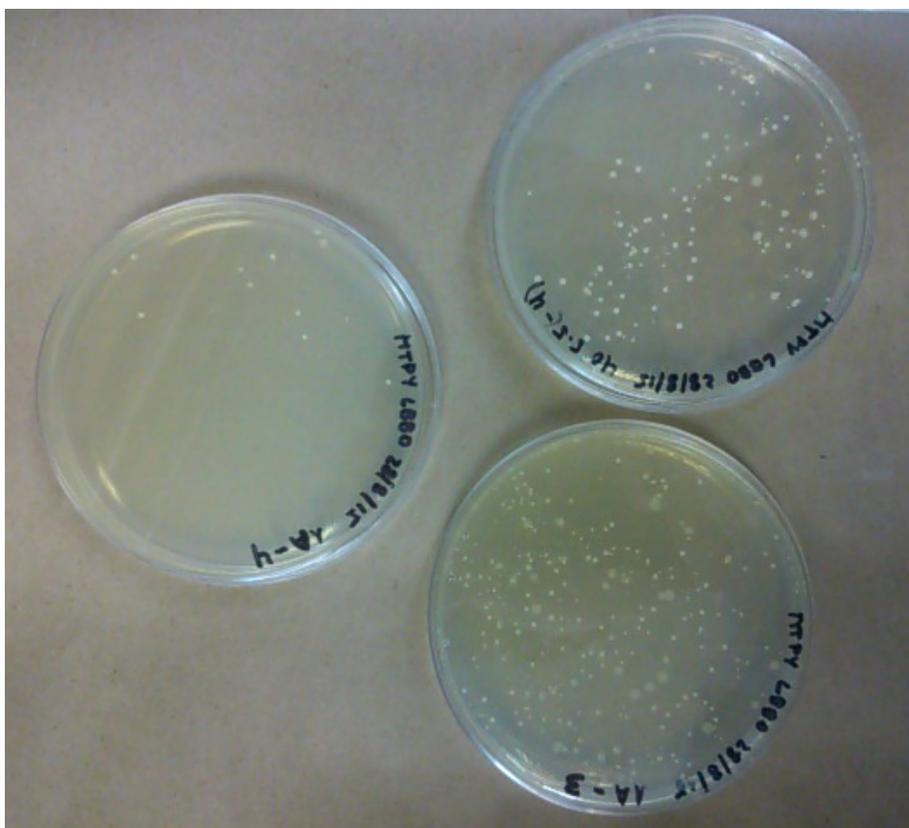


Figura 5. Placas de crecimiento bacteriano con medio MTPY. Se muestran las colonias presuntivamente identificadas como *Bifidobacteriaceae*.

C. Purificación de ADN genómico y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A partir de las unidades formadoras de colonias (U.F.C.) presuntamente identificadas como *Bifidobacteriaceae* se procedió a la purificación de ADN genómico (ADNg), tal como se señala en la sección materiales y métodos. El ADNg obtenido fue utilizado como molde para amplificar mediante PCR un fragmento específico de 500 pb con los partidores Bif662 y Bif164, utilizando además ADNg de la cepa *B. animalis* spp. *lactis* DN173 010 como control positivo de amplificación.

Sólo un pequeño porcentaje de las muestras presentó amplificación positiva de un fragmento de 500 pb (Figura 6).

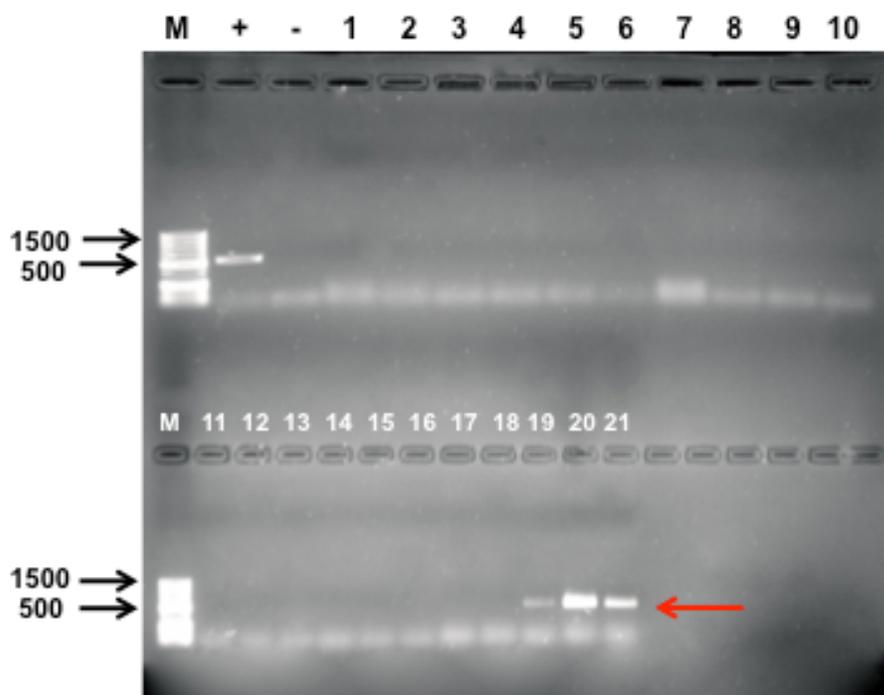


Figura 6. Amplificación por PCR con partidores específicos para *Bifidobacteriaceae* en diferentes aislados clínicos. En la figura se observa una imagen representativa de un gel que muestra el resultado de PCR. M: marcador de tamaño de ADN, carriles 1-21: diferentes aislados clínicos, carriles 19, 20 y 21: amplificados de aproximadamente 500pb indicados con flecha roja. (-): control negativo correspondiente a H₂O y (+): control positivo con la cepa *B. animalis* spp. *lactis* DN173 010.

A partir de las muestras de saliva de niños sin experiencia de caries y niños con experiencia de caries no se obtuvieron amplificadas de PCR con los partidores Bif164 y Bif662, lo que indicó la ausencia de *Bifidobacteriaceae* en estas muestras. Por esto, se procedió a utilizar partidores universales del Dominio Bacteria, para así lograr amplificar un fragmento de 1500 pb del gen 16S RNA. Los partidores utilizados fueron PU1R y PU1F (Cogulu y cols., 2008). Para éstos, se utilizó ADNg de la cepa *L. casei* ATCC 334, como control positivo de amplificación. En la Figura 7 se muestra la fotografía de un gel representativo de la amplificación con estos partidores.

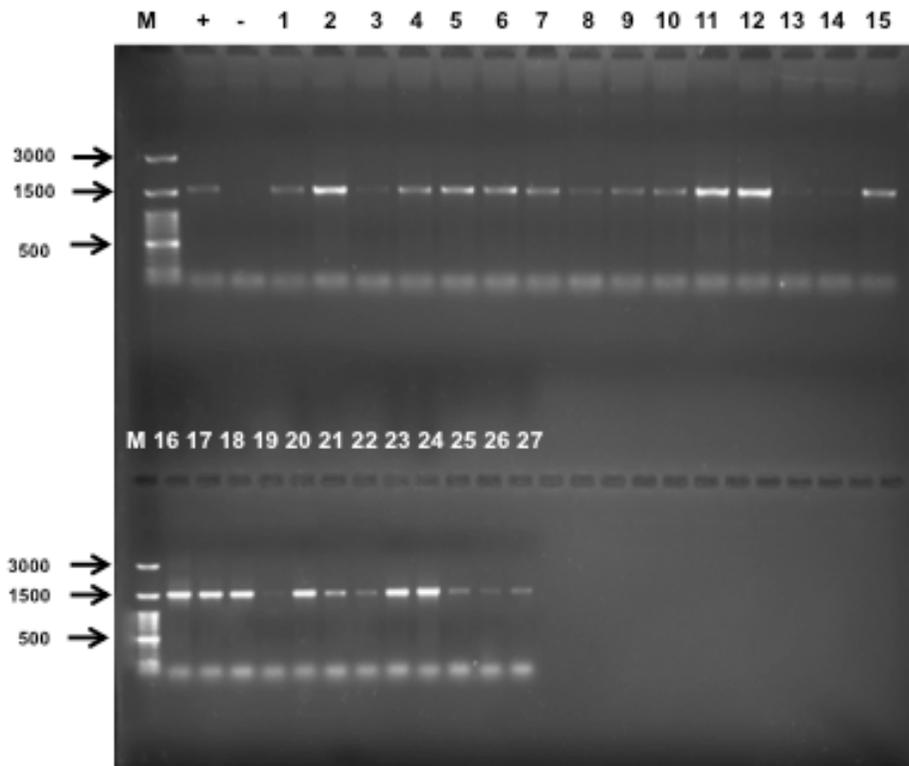


Figura 7: Amplificación por PCR con partidores específicos para amplificación del gen 16S ARNr bacteriano en diferentes aislados clínicos. En la figura se observa una imagen representativa de un gel que muestra el resultado de PCR. M: marcador de tamaño de ADN, carriles 1-27: diferentes aislados clínicos con amplificación de aproximadamente 1500 pb. (-): control negativo correspondiente a H₂O y (+): control positivo de amplificación con ADNg de *L. casei* ATCC 334.

D. Presencia de *Bifidobacteriaceae* en las muestras estudiadas

Los productos de PCR purificados fueron enviados a Macrogen USA para su secuenciación. Las secuencias recibidas fueron analizadas utilizando el programa BLAST y la base de datos no-redundante. Posteriormente, fueron ordenadas de acuerdo a las muestras, niños sin experiencia de caries (saliva) y niños con experiencia de caries (saliva y sitio con caries).

De los siete géneros de la familia *Bifidobacteriaceae*, sólo fue posible aislar el género *Parascardovia* desde uno de los niños con caries. Desde la muestra de sitio con caries de este sujeto se obtuvieron cuatro aislados clínicos para *P. denticolens* (Tabla 4).

Desde las muestras restantes, saliva de niños sin experiencia de caries y saliva de niños con experiencia de caries, no fue posible aislar géneros de esta familia.

Al comparar la presencia de *P. denticolens* en las muestras desde sitios con caries versus muestras de saliva de los niños sin experiencia de caries, se encontró asociación estadísticamente significativa con los sitios con caries ($p=0,04$).

Tabla 4: *P. denticolens* según el tipo de muestras.

| MUESTRAS ESPECIE | SIN EXPERIENCIA DE CARIES SALIVA | EXPERIENCIA DE CARIES SALIVA | EXPERIENCIA DE CARIES CARIES |
|---|---|---|---|
| <i>Parascardovia denticolens</i> | - | - | 4 |
| Otras especies | 41 | 30 | 33 |

E. Determinación de la presencia de genes de Factores de Virulencia en los aislados clínicos de *P. denticolens*

Dentro de los siete géneros de la familia *Bifidobacteriaceae*, se encuentra el género *Parascardovia*. En este estudio se obtuvo aislados clínicos de *P. denticolens*, a partir de una muestra tomada desde un sitio con caries. Se realizó el análisis de la presencia de los genes de los factores de virulencia en estos aislados clínicos.

Al realizar una búsqueda en la base de datos del NCBI, se encontraron sólo dos genomas secuenciados de *P. denticolens*, correspondientes a *P. denticolens* JCM 12538T aislado desde caries dental (Oshima y cols., 2015) y *P. denticolens* IPLA 20019, aislado desde leche materna humana (Gueimonde y cols., 2012).

Sólo el genoma de *P. denticolens* JCM 12538T se encuentra disponible en forma pública en la base de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=parascardovia+>). Este genoma posee la secuencia de un putativo gen *ldh*, con una alta similitud al gen *ldh* encontrado en *B. dentium* Bd1. Del mismo modo, se encontraron genes con similitud al gen *spaA*. No se encontraron genes codificando para el sistema *gadB/gadC* en esta secuencia genómica.

En la figura 8 se muestra el resultado de la amplificación por PCR de un fragmento del gen *ldh*. Fue posible determinar una banda del tamaño esperado de aproximadamente 620 pb para los amplificados clínicos 1 y 4, mientras que en los amplificados clínicos 2 y 3 se observa una banda de menor tamaño que podría corresponder a una isoforma de tamaño menor.

Al realizar el análisis para la presencia del gen *gadB*, no fue posible obtener una amplificación positiva mediante PCR, para ninguno de los aislados clínicos analizados, como se evidencia en la figura 9.

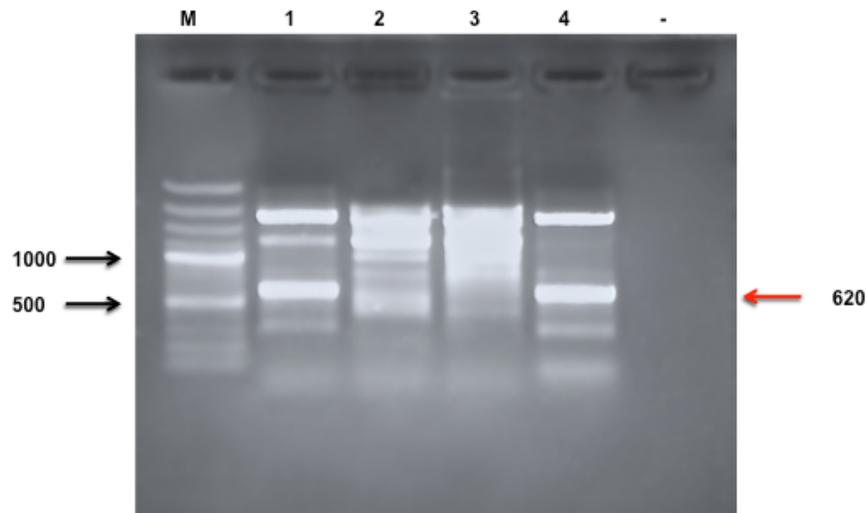


Figura 8. Amplificación por PCR del gen *ldh*. Se muestra una fotografía de una electroforesis de ADN. M: marcador de tamaño de ADN, carriles 1-4: diferentes aislados clínicos. Los amplificadores clínicos 1 y 4 presentan amplificación positiva de aproximadamente 620 pb. (-): control negativo correspondiente a H₂O.

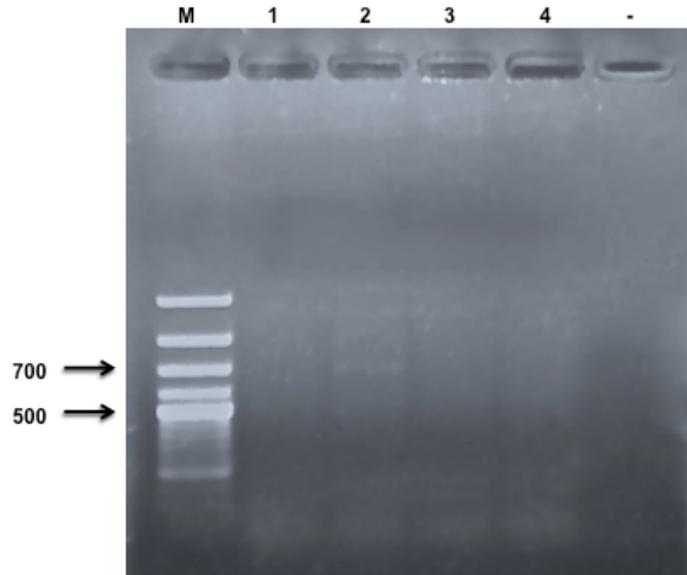


Figura 9. Amplificación por PCR del gen *gadB*. Se muestra una fotografía de una electroforesis de ADN. M: marcador de tamaño de ADN, carriles 1-4: diferentes aislados clínicos. Los amplificadores clínicos 1, 2, 3 y 4 no presentan amplificación positiva para 647 pb aproximadamente. (-): control negativo correspondiente a H₂O.

En la figura 10 se muestra el resultado de la amplificación por PCR de un fragmento del gen *spaA*. No fue posible determinar una banda del tamaño esperado de aproximadamente 600 pb en los aislados de *P. denticolens* analizados. Sin embargo, se puede observar un amplificado de tamaño menor a 500 pb en los aislados 1, 2 y 3, que podría corresponder a una isoforma de tamaño menor.

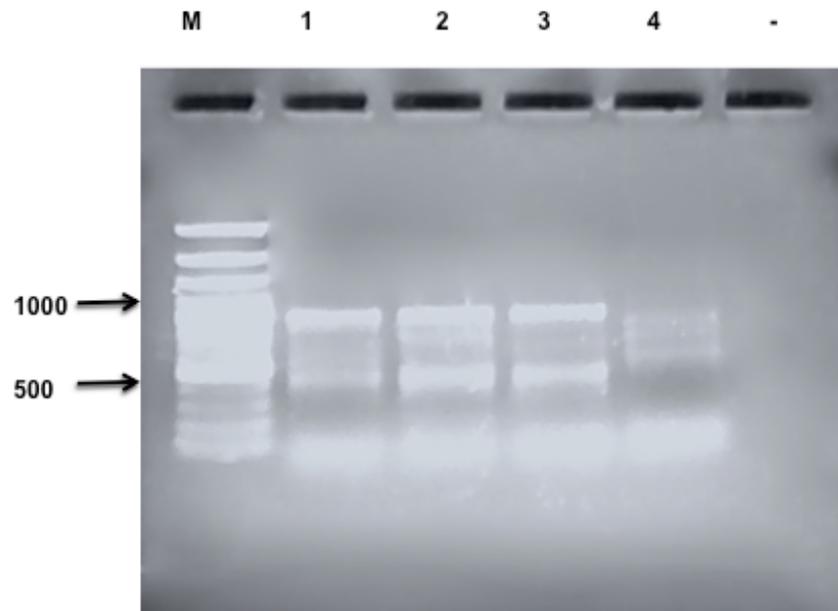


Figura 10. Amplificación por PCR del gen *spaA*. Se muestra una fotografía de una electroforesis de ADN. M: marcador de tamaño de ADN, carriles 1-4: diferentes aislados clínicos. Los amplificados clínicos 1, 2 y 3 presentan amplificación positiva de aproximadamente 600 pb. (-): control negativo correspondiente a H₂O.

F. Resultados de secuenciación de los aislados clínicos no pertenecientes a la familia *Bifidobacteriaceae*.

F.1. Distribución de las especies encontradas según el tipo de muestra

En este estudio se procedió al análisis de las especies que no corresponden a la familia *Bifidobacteriaceae*, encontradas a partir de las muestras de saliva y de sitios con caries.

En la Tabla 5 se encuentran descritas todas las especies de bacterias encontradas luego de la secuenciación, separadas por estado del niño, sin o con experiencia de caries, y para este último, separado en muestra desde saliva o desde un sitio con caries.

Las U.F.C. crecidas correspondieron a muchas especies diferentes, pertenecientes a los géneros *Actinomyces*, *Lactobacillus* y *Rothia*, principalmente (Tabla 5).

A partir de cavidad oral del grupo de niños sin experiencia de caries (muestra de saliva), las especies encontradas fueron *A. odontolyticus*, *A. naeslundii*, *A. oris*, *E. sulci*, *L. gasseri*, *L. rhamnosus* y *R. mucilaginosus* (Tabla 5). Dentro de éstas, las especies aisladas en mayor frecuencia fueron *A. odontolyticus* y *R. mucilaginosus*, las que presentaron asociación estadísticamente significativa ($p=0,04$ y $p=0,02$), al comparar con su presencia en el grupo de niños con experiencia de caries.

Considerando la cavidad oral del grupo de niños con experiencia de caries, los microorganismos encontrados fueron *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *A. oris*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *Pseudomonas spp.*, *R. dentocariosa* y *R. mucilaginosus* (Tabla 5). No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas al comparar la presencia de estos microorganismos en la cavidad oral de los niños con experiencia de caries versus el grupo de niños sin experiencia de caries ($p>0,05$).

En el mismo grupo de niños con experiencia de caries, al considerar en forma separada la presencia de estas especies en muestras de saliva o de caries, no se encontró una asociación estadísticamente significativa para ninguna de las especies ($p > 0,05$).

Dentro de este mismo grupo de niños, es posible notar que los microorganismos *L. rhamnosus* y *R. mucilaginosus* sólo fueron encontrados en saliva. Sin embargo, de igual manera fueron halladas en saliva de niños sin experiencia de caries. Al ser comparadas ambas muestras, no se encontró asociación estadísticamente significativa de estas especies con ninguno de los dos grupos ($p = 1$ y $p = 0,34$). Sin embargo, *R. mucilaginosus* se encontró asociada a las muestras de saliva en ausencia de experiencia de caries al comparar con su presencia en sitios con caries ($p = 0,001$).

La especie *A. odontolyticus* fue encontrada abundantemente en muestras de saliva del grupo de niños con experiencia de caries y sin experiencia de caries, sin embargo se encontró en menor medida en los sitios con caries (Tabla 5). Se determinó una asociación estadísticamente significativa de este microorganismo a las muestras de saliva de ambos grupos, al comparar con su presencia en los sitios con caries ($p = 0,01$ y $p = 0,001$).

Tabla 5: Especies encontradas según el tipo de muestras.

| MUESTRAS ESPECIE | TIPO DE MUESTRA | | |
|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------|--|
| | SIN EXPERIENCIA DE CARIES SALIVA | EXPERIENCIA DE CARIES SALIVA | EXPERIENCIA DE CARIES SITIO CON CARIES |
| <i>Actinomyces naeslundii</i> | 3 | - | 2 |
| <i>Actinomyces odontolyticus</i> | 21 | 14 | 5 |
| <i>Actinomyces oris</i> | 2 | 5 | 5 |
| <i>Actinomyces spp.</i> | 2 | - | - |
| <i>Eubacterium sulci</i> | 1 | - | - |
| <i>Lactobacillus casei</i> | - | - | 2 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | - | 1 | 1 |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> | 3 | 4 | 4 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | - | - | 3 |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | 1 | 1 | - |
| <i>Lactobacillus salivarius</i> | - | - | 1 |
| <i>Lactobacillus spp.</i> | - | - | 3 |
| <i>Parascardovia denticolens</i> | - | - | 4 |
| <i>Pseudomonas spp.</i> | - | 2 | 2 |
| <i>Rothia dentocariosa</i> | - | - | 1 |
| <i>Rothia mucilaginosa</i> | 8 | 3 | - |
| TOTAL DE ESPECIES | 41 | 30 | 33 |

F.2. Distribución de especies por individuo, según condición de salud oral de los participantes (con o sin experiencia de caries) y tipo de muestra.

Del total de 18 niños, 9 fueron considerados sin experiencia de caries y 9 con experiencia de caries. En la Tabla 6 es posible ver una comparación en la cantidad de niños que presentaron las diferentes especies.

La especie que se encontró mayoritariamente en los niños sin experiencia de caries fue *A. odontolyticus*, que estaba presente en 4 niños, es decir, en el 44,4% del total de los participantes de este grupo. Mientras que, *A. naeslundii*, estaba presente en un 33,3%, vale decir, en 3 niños sin experiencia de caries. Estas especies también se encontraron en el 55,5% de los niños con experiencia de caries, lo que equivale a 5 niños del total de este grupo. La presencia de estos microorganismos en ambos grupos no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p=0,67$ y $p=1$ respectivamente) (Tabla 6).

A. oris y *L. gasseri* se encontraron en sitios de caries de 3 de los 9 niños con experiencia de caries (33,3%), sin embargo, esta distribución no presentó diferencias estadísticamente significativas al comparar con su presencia en el grupo de niños sin experiencia de caries ($p=1$ en cada caso).

En la Tabla 7 se puede observar la cantidad de niños que presentaron las especies aisladas desde el grupo con experiencia de caries, separado por tipo de muestra: saliva o sitio con caries. *A. naeslundii* y *A. odontolyticus* fueron las especies más frecuentemente encontradas en saliva de estos niños. Sin embargo, estas especies también fueron obtenidas a partir de sitios de caries, desde 2 y 2 niños, respectivamente, por lo que su distribución no mostró asociación estadísticamente significativa con ninguno de los dos tipos de muestras ($p=0,47$ y $p=0,33$). De igual manera, al comparar el resto de los microorganismos encontrados en este grupo de niños, entre su presencia en saliva o sitio con caries, no se encontró dependencia estadísticamente significativa ($p>0,05$) para alguna especie, con ninguna de las dos muestras.

Tabla 6: Cantidad de niños por especie secuenciada encontrada según experiencia de caries.

| ESPECIE | SIN EXPERIENCIA DE CARIES | CON EXPERIENCIA DE CARIES |
|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| <i>Actinomyces naeslundii</i> | 3 | 5 |
| <i>Actinomyces odontolyticus</i> | 4 | 5 |
| <i>Actinomyces oris</i> | 2 | 3 |
| <i>Actinomyces spp.</i> | 2 | - |
| <i>Eubacterium sulci</i> | 1 | - |
| <i>Lactobacillus casei</i> | - | 1 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | - | 2 |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> | 2 | 3 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | - | 1 |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | 1 | 1 |
| <i>Lactobacillus salivarius</i> | - | 1 |
| <i>Lactobacillus spp</i> | - | 1 |
| <i>Parascardovia denticolens</i> | - | 1 |
| <i>Pseudomonas spp.</i> | - | 3 |
| <i>Rothia dentocariosa</i> | - | 1 |
| <i>Rothia mucilaginosa</i> | 4 | 2 |

Tabla 7: Cantidad de niños por especie secuenciada encontrada en el grupo de niños con experiencia de caries.

| MUESTRAS ESPECIE | EXPERIENCIA DE CARIES SALIVA | EXPERIENCIA DE CARIES CARIES |
|-----------------------------------|---|---|
| <i>Actinomyces naeslundii</i> | 5 | 2 |
| <i>Actinomyces odontolyticus</i> | 5 | 2 |
| <i>Actinomyces oris</i> | 2 | 3 |
| <i>Lactobacillus casei</i> | - | 1 |
| <i>Lactobacillus fermentum</i> | 1 | 1 |
| <i>Lactobacillus gasseri</i> | 3 | 1 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | - | 1 |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | 1 | - |
| <i>Lactobacillus salivarius</i> | - | 1 |
| <i>Lactobacillus spp.</i> | - | 1 |
| <i>Parascardovia denticolens</i> | - | 1 |
| <i>Pseudomonas spp.</i> | 2 | 2 |
| <i>Rothia dentocariosa</i> | - | 1 |
| <i>Rothia mucilaginosa</i> | 2 | - |

VII. DISCUSIÓN

El presente estudio planteó como hipótesis que los aislados clínicos de la familia *Bifidobacteriaceae* obtenidos desde saliva y caries de niños Chilenos entre 7 y 11 años de edad, presentan diferencias en la presencia de los genes de factores de virulencia *ldh*, *gadB* y *spaA*.

Sin embargo, no fue posible validar la hipótesis, porque sólo se encontró *P. denticolens* desde el sitio con caries de un niño, y no los diferentes géneros de la familia.

Estos resultados podrían deberse a que la edad que se escogió para el estudio la cavidad oral no ha sido colonizada aún por estos microorganismos. A la fecha, no existen muchos estudios de la presencia de *Bifidobacteriaceae* en cavidad oral de niños. En un estudio de Kaur y cols. (2013), se muestran recuentos de estas bacterias en niños de no más de 11 años de edad. Sin embargo, este estudio sólo se basó en las características fenotípicas de las U.F.C. y no se realizó ningún análisis molecular para la identificación de las muestras, y por lo tanto, estos recuentos podrían corresponder a otros microorganismos. Dado que estos microorganismos si han sido encontrados en adultos chilenos, como describe Pérez y cols., en el 2014, sería interesante analizar a qué edad se produce la colonización de la cavidad oral por estos microorganismos.

Otro posible factor para la ausencia de *Bifidobacteriaceae* en las muestras de este estudio, es que el crecimiento de éstos se podría haber visto afectado debido al protocolo de la toma de muestras. Si bien, éstas fueron tomadas desde sitios con caries tal cual describe Kuribayashi y cols. (2012), es decir, mediante cucharitas de caries esterilizadas y depositando la muestra en PBS, y las muestras de saliva recolectadas en tubos de plástico estériles, procurando ser almacenadas inmediatamente a 4°C, no fueron inmediatamente almacenadas en medio anaeróbico como se describe por Kaur y cols., (2013). De este modo, el traslado de estas muestras al laboratorio puede haber afectado el futuro crecimiento de *Bifidobacteriaceae*.

En 1996, Crociani y cols, descubrieron la existencia de dos nuevas especies de *Bifidobacterium*: *B. inopinata* y *B. denticolens*, ambas aisladas de caries dental. Estas dos especies fueron recientemente reclasificadas de acuerdo a un análisis de la secuencia genómica basándose en el segmento 16s del ARN ribosomal, en dos nuevos géneros llamados: *Scardovia inopinata* y *Parascardovia denticolens*, respectivamente (Jian y cols., 2002).

En este estudio se encontró aislados clínicos de *P. denticolens*, esta especie creció sin problemas en el medio MTPY específico para el aislamiento de *Bifidobacteriaceae*. En el estudio de Modesto y cols., 2008, aislaron *P. denticolens* a partir de caries dental y placa dental. La prevalencia de este microorganismo fue similar en ambos hábitats. De este modo, queda claro que *Parascardovia denticolens* forma parte de la cavidad oral en placa y caries dental, donde en esta última fue encontrada en el presente estudio. Según los datos analizados en el presente estudio existe relación estadísticamente significativa ($p=0,04$) de *P. denticolens* en sitios de caries en comparación a muestras de saliva de niños con experiencia de caries.

Si bien fue posible determinar la presencia de los genes de factores de virulencia *ldh*, *gadB* y *spaA* en los aislados de *P. denticolens*, estos provenían sólo desde un sitio con caries, no pudiendo realizar una comparación con el resto de las muestras.

El gen *spaA* es importante en la adherencia bacteriana, una vez ya se encuentra lesión de caries presente. En este estudio fueron encontrados 4 aislados clínicos de *P. denticolens* desde un mismo sitio. Luego del análisis por PCR para la identificación del gen, ninguno de los 4 aislados dieron positivo para presencia de éste. Esto permite sugerir que estos aislados podrían tener otros mecanismos de adherencia.

Otro factor de virulencia potencial de adhesión es la unión a través de fimbrias que, en cavidad oral, puede ser mediada por el reconocimiento de proteínas de adhesión para la unión a la superficie de dientes y mucosa. O también se pueden unir a una pared celular de polisacáridos de ciertas bacterias orales (Clark y cols, 1984, Stephenson y cols., 2002). Sin embargo, no se ha

mostrado la presencia de ninguna estructura parecida a fimbrias en su superficie celular, aunque en especies de *Bifidobacterium* intestinales se ha descrito la presencia de subunidades homologas a fimbrias (Schell y cols., 2002, Ventura y cols., 2007). Sería interesante buscar si estos aislados también presentan estas otras capacidades de adhesión.

El segundo mecanismo de patogenicidad estudiado fue la aciduria, habilidad de resistir ambientes ácidos induciendo la estimulación y expresión de ciertos genes que permiten la supervivencia a pH bajos (Matsui y cols., 2010). Nakajo y cols. (2010), en un estudio donde analizaron los efectos de acidificar el medio a distintas cepas, se evidenció que *B. dentium* y *B. longum* fueron más resistentes a ácido, debido a la habilidad de controlar su pH interno (pH_{in}). Esta capacidad de resistir medios ácidos es fundamental para seguir viviendo en un sitio con caries. Las bacterias han desarrollado varios mecanismos efectivos para la supervivencia a ambientes ácidos, siendo los más comunes el sistema Gad, la formación de *biofilm* y la densidad celular (Liu y cols., 2015). En el presente estudio se buscó la presencia de los genes *BDP_1749* y *BDP_1750* del sistema Gad descritos por Ventura y cols., en el año 2009 como homólogos al sistema de resistencia al ácido glutamato-dependiente (Gad). En este estudio los 4 aislados clínicos no presentaron la presencia del gen *gadB*, lo que sugiere que utilizan otro medio de resistencia de ácido, que sería interesante poder determinar en un estudio posterior. Del mismo modo, no se encontró la presencia de este gen en la secuencia del genoma de *P. denticolens* JCM 12538T, disponible en la base de datos (Oshima y cols., 2015).

En este estudio el 50% de los aislados clínicos de *P. denticolens* presentaron el gen *ldh*, que permite a la bacteria su capacidad de producir ácido láctico. En la secuencia genómica de *P. denticolens* JCM 12538T (Oshima y cols., 2015) es posible encontrar un putativo gen *ldh*, con una alta similitud al gen *ldh* encontrado en *Bifidobacterium* spp. *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp., tal como Haukioja y cols. (2008) son productoras de ácidos a partir de metabolismo de la glucosa. Es decir, *P. denticolens* poseería uno de los mecanismos de patogenicidad clásicos de las bacterias para ayudar en el avance del proceso de caries, pero cabe destacar que el otro 50% de los aislados clínicos presentó una

banda de menor tamaño que podría corresponder a una isoforma de tamaño menor, lo cual sería importante en un futuro investigar a qué isoforma podría corresponder.

En este estudio se obtuvo crecimiento de un gran número de otras especies en las placas de medio de cultivo MTPY. Beighton y cols. en sus estudios en el año 2008 y 2010, indican que este medio es selectivo para *Bifidobacteriaceae*, es decir, para los géneros *Bifidobacterium*, *Aeriscardovia*, *Falcivibrio*, *Gardnerella*, *Parascardovia*, *Scardovia* y *Alloiscardovia*. Sin embargo, otros autores indican que otros microorganismos presentan características fenotípicas y de requerimientos de crecimiento similares a *Bifidobacterium* spp., presentando colonias con características similares a U.F.C. de bacterias como *Actinomyces*, *Corynebacterium* y *Lactobacillus* (Goodfellow y cols., 2012). Por lo tanto, se requerirían pruebas bioquímicas especiales para discriminar entre *Bifidobacteriaceae* y los microorganismos antes mencionados. Por ejemplo, la mejor forma de asignar un organismo al género *Bifidobacterium* es demostrar la actividad de la enzima fosfofructoquinasa-6 (Goodfellow y cols., 2012). Esta actividad enzimática probada con fructosa 6-fosfato como sustrato está aparentemente ausente en bacterias Gram positivo anaeróbicas con morfología similar a *Bifidobacterium* como *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium* (Scardovi y cols., 1965). Frente a esto, sería bastante interesante poder contar con un medio de cultivo que tenga la capacidad de discriminar la utilización de este sustrato, para así poder evidenciar la presencia o ausencia de esta actividad enzimática en las U.F.C.

En el presente estudio, como se señaló anteriormente, se logró el aislamiento de un gran pool de microorganismos tales como: *A. naeslundii*, *A. odontolyticus*, *A. oris*, *Actinomyces* spp., *E. sulci*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *Lactobacillus* spp., *P. denticolens*, *Pseudomonas* spp., *R. dentocariosa* y *R. mucilaginosus*.

Como describe Karpinski y cols. (2013), en la cavidad oral hay un poco más de 700 especies diferentes de bacterias. Esta información se obtuvo a partir de estudios moleculares analizando ARN 16s, que han demostrado la predominancia

de ciertas bacterias en lesiones de caries profundas como *S. mutans* y el género *Lactobacillus*. En estudios de Becker y cols. (2002), y Aas y cols. (2008), se reportaron asociados a caries dental en dentición primaria y permanente los géneros *Streptococcus*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*.

Dentro de los resultados encontrados, los géneros más abundantes en los niños fueron *Actinomyces*, *Lactobacillus* y *Rothia*.

Actinomyces spp., son bacilos Gram positivo, anaerobios, no mótils y productores de ácidos orgánicos, como ácido láctico y succínico. Se encuentran entre los primeros colonizadores de la cavidad oral en niños (Wright y cols., 2013). Se ha reportado su presencia en lesiones de caries radiculares (Brallsford y cols., 1999), pero su rol en el inicio y progresión de la lesión de caries no es concluyente (Tanzer y cols., 2001).

En el año 2000, Sarkonen y cols. estudiaron cómo *Actinomyces* spp. coloniza la cavidad oral de niños hasta los 2 años de edad, además de cómo aparecen en la saliva a distintos meses de edad. Su frecuencia en la microbiota total se vió incrementada de 31% a 97% a los dos años de edad. La primera especie colonizadora del género, que predominó en todas las edades estudiadas, fue *A. odontolyticus*, mientras que luego del año de edad aparece *A. naeslundii*, ya que ésta a diferencia de la primera, depende de la erupción dentaria.

En este estudio *A. odontolyticus* fue encontrado tanto en saliva de niños con experiencia de caries como sin experiencia de caries, indicando que es posible encontrarlo en saliva como comensal.

El segundo gran recuento de especies encontradas pertenecen a la especie *Lactobacillus*. Estos son bacilos Gram positivo, anaerobios facultativos, acidogénicos, acidúricos y que se adhieren muy poco a las superficies lisas, por lo que deben utilizar otros mecanismos para colonizar superficies, como es la retención física en fosas y fisuras, y la co-agregación con otras especies bacterianas (Tanzer y cols., 2001, Loesche y cols., 1986). En un principio, *Lactobacillus* spp. se consideraban el principal agente microbiano causante de caries dental, pero Hemmens y cols., en 1946 demostraron que éstos colonizaban

sobre lesiones ya formadas, por lo que desde entonces se considera a esta especie bacteriana como un oportunista secundario, que está implicado en la progresión de la lesión de caries y que prevalece en las etapas avanzadas de la misma (van Houte, 1994).

El género *Lactobacillus* fue encontrado en abundancia en el grupo de niños con experiencia de caries, en su mayoría desde las muestras de sitios con caries, lo que coincidiría con la información previamente descrita, donde es posible encontrarlos asociados a caries como oportunista secundario. El bajo nivel de aislados desde saliva de ambos grupos, podría deberse a la característica de estas cepas de colonizar nichos específicamente retentivos.

Otro microorganismo que también fue encontrado en alta cantidad de aislados fueron la especie *Rothia*, microorganismo anaerobio facultativo, pero que igual puede vivir bajo condiciones aeróbicas. Los dos tipos aislados en este estudio fueron *Rothia dentocariosa* y *Rothia mucilaginosa*. Esta primera es habitante natural de la cavidad oral humana, mayormente aislados desde placa dental supragingival y ha sido asociado a caries dental y enfermedad periodontal (Pasciak y cols., 2002). Mientras tanto, *R. mucilaginosa*, es un patógeno oportunista responsable de variados casos de infecciones. El ambiente natural de este microorganismos es la cavidad oral y el tracto respiratorio superior, también ha sido aislado desde garganta, pulmones, sangre y placa dental (Pasciak y cols., 2004). Frente a los resultados encontrados en este estudio es posible validar que estos microorganismos son parte de la microbiota comensal del hospedero.

En Chile, existe una alta prevalencia de caries en niños pequeños, según el índice ceod/COPD a las edades estudiadas, el promedio a nivel nacional de ceod es 3,7, mientras que el índice COPD va desde 0,5 a 1,9 para estas edades (MINSAL, 2011). Los resultados encontrados en este estudio en el índice ceod fueron de $4 \pm 2,65$, mientras que el valor COPD fue de $0,67 \pm 1$. En ambos índices los valores encontrados están dentro de los promedios establecidos por el MINSAL en el 2011, para niños de estas edades estudiadas. El alto valor de estos índices tanto el encontrado en este grupo de estudio como el nacional, se puede deber a muchos factores de riesgo, que aumentarían la posibilidad de caries de

los niños, como son el nivel socioeconómico al que pertenecen, el acceso a atención dental (Scheie y cols., 2004; Selwitz y cols., 2007) la composición y flujo salival, escasa exposición a fluoruros (Featherstone y cols., 2002; Fejerskov y cols., 2003), el estilo de vida y conducta de los individuos en higiene y alimentación (Touger-Decker y cols., 2003). Por esto, vale enormemente la pena enfocar los estudios a la prevención para que estos índices no sigan en aumento.

Comprender la interacción entre la microbiota comensal y el hospedero es esencial para lograr un adecuado estado de salud oral. Este conocimiento puede ayudar a centrar los esfuerzos en buscar la prevención de la enfermedad controlando los factores que predisponen al aumento de especies bacterianas que tienen potencial patogénico. Es importante ir en aumento del conocimiento de las distintas especies, su hábitat, su accionar y sus mecanismos de patogenicidad para siempre ir en búsqueda de un posible control de la enfermedad e ir en búsqueda de la disminución de su prevalencia.

VIII. CONCLUSIONES

Se rechaza la hipótesis planteada en este estudio, pues no fue posible encontrar aislados de *Bifidobacteriaceae* en los tipos de muestras obtenidas que permitieran analizar si presentaban diferencias en sus genes de factores de virulencia.

En niños Chilenos entre 7 y 11 años sólo fue posible detectar la presencia de *P. denticolens* desde sitio con caries como parte de la familia *Bifidobacteriaceae*.

Los aislados clínicos de *P. denticolens* codifican el gen *ldh* en un 50% de los aislados, mientras que no codifican para los genes *spaA* y *gadB*, por lo que estos aislados no usarían estos mecanismos descritos para la adhesión y resistencia de ambientes ácidos.

Existen especies bacterianas asociadas al tipo de muestra, como *A. odontolyticus* encontrada en saliva tanto de niños libres de caries como con experiencia de caries. De este mismo modo existen especies bacterianas relacionadas a la ausencia de caries, como *R. mucilaginosa* y a sitios de caries, como *P. denticolens*.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aas J., Griffen A., Dardis S., Lee A., Olsen I., Dewhirst F., Leys E., Paster B. (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 46: 1407-1417.
- Aas J., Paster B., Stokes L. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43: 5721–5732.
- Ahn S., Wen Z., Brady L., Burne R. (2008) Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. *Infect Immun* 76: 4259–4268.
- Bader J., Rozier R., Lohr K. (2004). Physicians' roles in preventing dental caries in preschool children — A summary of the evidence for the US Preventive Services Task Force. *Am J Prev Med* 26: 315–325.
- Becker M., Paster B., Leys E., Moeschberger M., Kenyon S., Galvin J. (2002) Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 40: 1001-1009.
- Beighton D., Al-Haboubi M., Mantzourani M., Gilbert S., Clark D., Zoitopoulos L., Gallagher J. (2010). Oral *Bifidobacteria*: caries-associated bacteria in older adults. *J Des Res* 89: 970-974.
- Beighton D., Gilbert S., Clark D., Mantzourani M., al-Haboubi M., Ali F., Ransome E., Hodson N., Fenlon M., Zoitopoulos L., Gallagher J. (2008). Isolation and identification of *Bifidobacteriaceae* from human saliva. *Appl Environ Microbiol* 74: 6457-6460.
- Brailsford S., Tregaskis R., Leftwich H., Beighton D. (1999) The Predominant *Actinomyces* spp. Isolated from Infected Dentin of Active Root Caries Lesions. *J Dent Res* 78:1525-1534
- Brescó-Salinas M., Costa Riu N., Berini-Aytés L., Gay-Escoda C. (2006). Antibiotic Susceptibility, of the bacteria causing odontogenic infections. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 11: 70-75.

- Byun R., Nadkarni M., Chhour K., Martin F., Jacques N., Hunter N. (2004) Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *J Clin Microbiol* 42: 3128-3136
- Caulfield P., Cutter G., Dasanayake A. (1993). Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res* 72: 37-45.
- Chhour K., Nadkarni M., Byun R., Martin F., Jacques N., Hunter N. (2005) Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *J Clin Microbiol* 43: 843-849
- Clark W., Wheeler T., Cisar J. (1984) Specific inhibition of adsorption of *Actinomyces viscosus* T14V to saliva-treated hydroxyapatite by antibody against antibody against type 1 fimbriae. *Infect Immun* 43: 497–501.
- Cogulu D., Uzel A., Oncag O., Eronat C. (2008) PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106: 443 – 449.
- Cornejo O., Lefébure T., Pavinski P., Lang P., Richards V., Eilertson K., Do T., Beighton D., Zeng L., Ahn S., Burne R., Siepel A., Bustamante C., Stanhope M. (2012) Evolutionary and population genomics of the cavity causing bacteria *Streptococcus mutans*. *Mol Biol Evol* 30: 881–893.
- Crielaard W., Zaura E., Schuller A., Huse S., Montijn R., Keijser B. (2011) Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. *BMC Med Genom* 4: 22-34.
- Crociani F., Biavatti B., Alessandrini A, Chiarini C., Scardovi V. (1996). *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov., two new species isolated from human dental caries. *Int J Syst Bacteriol* 46: 564-557.
- Dewhirst F., Chen T., Izard J., Paster B., Tanner A., Yu W., Lakshmanan A., Wade W. (2010) The Human Oral Microbiome. *J Bacteriol* 192: 5002-5017.

- Featherstone J., Adair S., Anderson M., Berkowitz R., Bird W., Crall J., Den Besten P., Donly K., Glassman P., Milgrom P., Rothe J., Snow R., Stewart R. (2002). Caries management by risk assessment: consensus statement. *J Calif Dent Assoc* 31: 257–269.
- Fejerskov O., Kidd E. (2003) Dental caries: the disease and its clinical management. Copenhagen, Denmark. *Blackwell Monksgaard*.
- Gamonal J., Mendoza C., Espinoza I., Munoz A., Urzúa I., Aranda W., Carvajal P., Arteaga O. (2010). Clinical attachment loss in Chilean adult population: First Chilean National Dental Examination Survey. *J Periodontol* 81: 1403 – 1410.
- Goodfellow M., Kampf P., Busse H., Trujillo M., Suzuki K., Ludwig W., Withman W. (2012) *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. 2nd rev. ed. New York: Springer.
- Gueimonde M., Bottacini F., van Sinderen D., Ventura M., Margolles A., Sánchez B. (2012). Genome sequence of *Parascardovia denticolens* IPLA 20019, isolated from human breast milk. *J Bacteriol* 194: 4776-4777.
- Guillarte C., Perrone M. (2004). Microorganismos de la placa dental relacionados con la etiología de la periodontitis. *Acta Odontol Venez* 42: 213-217.
- Haukioja A., Söderling E., Tenovu J. (2008). Acid production from sugars and sugar alcohols by probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria in vitro*. *Caries Res* 42: 449–453.
- Hemmens E., Blaney J., Bradel S., Harrison R. (1946) The microbic flora of dental plaque in relation to the beginning of caries. *J Dent Res* 25: 195-205
- Hirayama Y., Sakanaka M., Fukuma H., Murayama H., Kano Y., Fukiya S., Yokota A. (2012). Development of a double-crossover markerless gene deletion system in *Bifidobacterium longum*: functional analysis of the α -galactosidase gene for raffinose assimilation. *Appl Environ Microbiol* 78: 4984-4994.

- Hojo K., Nagaoka S., Ohshima T., Maeda N. (2009). Bacterial interactions in dental biofilm development. *J Dent Res* 88: 982-990.
- Schell M., Karmirantzou M., Snel B., Vilanova D., Berger B., Delley M., Arigoni F. (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14422–14427.
- Jian W., Dong X. (2002). Transfer of *Bifidobacterium inopinatum* and *Bifidobacterium denticolens* to *Scardovia inopinata* gen. nov., comb. nov., and *Parascardovia denticolens* gen. nov., comb. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 809-812.
- Karpinski T., Szkaradkiewicz A. (2013) Microbiology of dental caries. *J Biol Earth Sci* 3: 21-24.
- Kaur R., Gilbert S., Sheehy E., Beighton D. (2013). Salivary levels of Bifidobacteria in caries-free and caries-active children. *International Journal of Paediatric Dentistry* 23: 32-38.
- Kianoush N., Adler C., Nguyen K., Browne G., Simonian M., Hunter N. (2014). Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. *PLoS One* 27: e92940.
- Kidd E., Fejerskov O. (2004). What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J Dent Res* 83: 35–38.
- Klein H., Palmer C., Knutson J. (1938). Studies on dental caries, I, dental status and dental needs of elementary school. *Pub Health Rep* 53:751-765.
- Kuboniwa M., Lamont R. (2010). Subgingival biofilm formation. *Periodontol 2000* 52: 38-52.
- Lakshman S. (2006) Normal oral flora, the oral ecosystem and plaque biofilms. *Essential microbiology for dentistry* 3: 255-265.
- Lederberg J., McCray, A. (2001). ‘Ome sweet ‘omics—A genealogical treasury of words. *The Scientist* 15: 8.

- Lemos J., Quivey R., Jr, Koo H., Abranches J. (2013). *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? *Microbiol* 159: 436–445.
- Liu y., Tang H., Lin Z., Xu P. (2015) Mechanisms of acid tolerance in bacteria and prospects in biotechnology and bioremediation. *Biotechnology Advances* 33: 1484-1492.
- Loesche WJ. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 50: 353-380.
- Mantzourani M., Gilbert S., Sulong H., Sheehy E., Fenlon S., Beighton D. (2009). The isolation of *Bifidobacteria* from occlusal carious lesions in children and adults. *Caries Res* 43: 308-313.
- Mantzourani M., Fenlon M., Beighton D. (2009) Association between *Bifidobacteriaceae* and the clinical severity of root caries lesions. *Oral Microbiol Immunol* 24: 32–37.
- Marsh PD. 2005. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 32: 7-15
- Matsui R., Cvitkovitch D. (2010) Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiol.* 5: 403-417
- Meylan E., Tschopp J., Karin M. (2006) Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 7098: 39-44.
- MINSAL (2006) Encuesta de Calidad de Vida y Salud Chile. En: <http://www.crececontigo.gob.cl/wp-content/uploads/2013/06/ENCAVI-2006.pdf>
- MINSAL (2007) Diagnóstico de Situación de Salud Bucal. En: <http://web.minsal.cl/portal/url/item/7dc33df0bb34ec58e04001011e011c36.pdf>
- MINSAL (2011) Análisis de Situación de Salud Bucal. En: <http://web.minsal.cl/portal/url/item/9c81093d17385cafe04001011e017763.pdf>

- Modesto M., Biavati B., Mattarelli P. (2006). Occurrence of the family *Bifidobacteriaceae* in human dental caries and plaque. *Caries Res* 40: 271-276.
- Munson M., Banerjee A., Watson T., Wade W. (2004). Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol* 42: 3023-3029.
- Nakajo K., Takahashi N., Beighton D. (2010) Resistance to acidic environments of caries-associated bacteria: *Bifidobacterium dentium* and *Bifidobacterium longum*. *Caries Res* 44: 431–437.
- OMS, 2007. Salud Bucodental. Nota informativa N°318. En: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/es/>
- Pasciak M., Ekiel I., Grzegorzewicz A, Mordarska H., Gamian A. (2002) Structure of the major glycolipid from *Rothia dentocariosa*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1594 :199 – 2005.
- Pasciak M., Holst O., Linder B., Mierzchala M., Grzegorzewicz A., Mordarska H., Gamian A. (2004) Structural and serological characterization of the major glycolipid from *Rothia mucilaginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1675: 54 – 61.
- Pérez I., Burgos A., Becker M., Olave A., Lozano C., Urzúa B., Morales I., Lefimil C. (2014). *Bifidobacterium* spp. en saliva de adultos chilenos: relación con caries. XXVI Reunión Anual de IADR División Chile. Santiago.
- Oshima K., Hayashi J., Toh H., Nakano A., Shindo C., Komiya K., Morita H., Honda K., Harttori M. (2015). Complete Genome Sequence of *Parascardovia denticolens* JCM 12538T, Isolated from Human Dental Caries. *Genome Announc* 14: 3.
- Petersen P., Bourgeois D., Ogawa H., Estupinan-Day S., Ndiaye C. (2005). The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bulletin of the World Health Organization* 83: 661-669.

- Pitts N., Stamm J. (2004) International Consensus Workshop on Caries Clinical Trials (ICW-CCT)-Final Consensus Statements: Agreeing Where the Evidence Leads. *J Dent Res* 83: 125-128.
- Sarkonen N., Kônönen E., Summanen P., Karnero A., Takala A., Jousimies-Somer H. (2000) Oral Colonization with Actinomyces Species in Infants by Two Years of Age. *J Dent Res* 79: 864-867.
- Scardovi V., Trovatelli L. (1965) The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacterium*. *Ann Microbiol* 15: 19-29.
- Scheie A., Peterson F. (2004). The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral diseases? *Crit Rev Oral Biol Med* 15: 4–12.
- Schell M., Karmirantzou M., Snel B., Vilanova D., Berger B. (2002) The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *PNAS* 99: 14422-14427.
- Schûpbach P., Osterwalder V., Guggenheim B. (1996) Human Root Caries: Microbiota of a limited number of root caries lesions. *Caries Res* 30: 52-64.
- Selwitz R., Ismail A., Pitts N. (2007). Dental Caries. *Lancet* 369: 51-59.
- Socransky S., Haffajee A. (2002). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 28: 12-55.
- Stephenson A., Wu H., Novak J., Tomana M., Mintz K (2002) The Fap1 fimbrial adhesin is a glycoprotein: antibodies specific for the glycan moiety block the adhesion of *Streptococcus parasanguis* in an *in vitro* tooth model. *Mol Microbiol* 43: 147–157.
- Takahashi N., Nyvad B. (2011). The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res* 90: 294-303.
- Tanzer J., Livingston J., Thompson A. (2001). The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ* 65: 1028-1037.

- Touger-Decker R., van Loveren C. (2003). Sugars and dental caries. *Am J Clin Nutr* 78: 881–892.
- Turrioni F., Van Sinderen D., Ventura M. (2010) Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *Int J Food Microbiol* 149: 37-44.
- van Houte J. (1994) Role of Micro-organisms in Caries Etiology. *J Dent Res* 73: 672-681
- Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G., Chater K., and van Sinderen D. (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient *Phylum*. *Microbiol Mol Biol Rev* 71: 495-548.
- Ventura M., Canchaya C., Fitzgerald G., Gupta R., van Sinderen D. (2007) Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 91: 351-372.
- Ventura M., Turrioni F., Zomer A., Foroni E., Giubellini V., Bottacini F., Canchaya C., Claesson M., He F., Mantzourani M., Mulas L., Ferrarini A., Gao B., Delledonne M., Henrissat B., Coutinho P., Oggioni M., Gupta R., Zhang Z., Beighton D., Fitzgerald G., O'Toole P., van Sinderen D. (2009). The *Bifidobacterium dentium* Bd1 genome sequence reflects its genetic adaptation to the human oral cavity. *Plos Genetics* 5: 1-18.
- Whitman W., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H., Trujillo M., Ludwig W., Suzuki K. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria*. 2nd Edition, 170-205.
- *World Health Organization (1987) Oral health surveys. Basic Methods*. 3rd. Geneve, Suiza, WHO.
- Wright C., Burns L., Jack A., Back C., Dutton L., Nobbs A., Lamont R. and Jenkinson H. (2013). Microbial interactions in building of communities. *Mol Oral Microbiol* 28:83-101.

- Yévenes I., Hernández B., Apip A., Neira M., Maass P., Petrasic L. (2010). Dental caries in preschoolers from communes with fluoridated and non-fluoridated public water supplies in Chile. *Rev Odonto Ciênc* 25: 20-24.

X. ANEXOS Y APÉNDICES

A. Acta de aprobación del Comité de ética



04/12/2012

ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

ACTA N°: 2012/18

1. **Acta De Aprobación De Protocolo De Estudio N° 2012/28.**
2. **Miembros del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:**

Dr. Juan Cortes
Presidenta

Valentina Fajreldin
Miembro permanente del CEC

Dr. Eduardo Rodríguez
Miembro permanente del CEC

Dr. Alejandro Escobar
Miembro permanente del CEC

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

8. **Carácter de la población**

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

9. **Fundamentación de la aprobación**

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



04/12/2012

ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

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

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

> Respecto a la metodología, aclaró el mecanismo exacto de difusión de información hacia el sujeto. Y operacionalizó la categoría de "niños chilenos."

> Respecto a aspectos éticos cambió en el CI "hombre del paciente" por sujeto de estudio

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

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


Dr. Juan Cortés
Presidente del CE



B. Consentimiento Informado

Ed 27/11/2012



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



CONSENTIMIENTO INFORMADO (TUTORES DE NIÑOS MENORES DE 11 AÑOS)

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

Investigador Principal: Prof. Dra. Claudia Lefimil
Área Bioquímica
Departamento de Ciencias Básicas y Comunitarias
Facultad de Odontología, Universidad de Chile
Sergio Livingstone Pohlhammer 943
Independencia, Santiago
Teléfono 9781792

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

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

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

Sujeto de estudio: _____

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

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

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

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



Fecha firma / /

Ed 27/11/2012

EXPLICACION DEL PROYECTO

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

Objetivo de la Investigación

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

Beneficio de la Investigación.

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

Tipo de Intervención y Procedimiento.

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

Riesgo de la Investigación.

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

Aclaraciones

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

Fecha firma / /



Ed 27/11/2012

Formulario de Consentimiento Informado

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

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

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

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

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

Sección a llenar por el Investigador Principal

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

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

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



Fecha firma / /

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

Indicadores de Riesgo

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

Diagnóstico:

Derivaciones:

Plan de Tratamiento:
