



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
ÁREA DE BIOQUÍMICA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
ÁREA MICROBIOLOGÍA**

**DIVERSIDAD DE ESPECIES Y GENOTIPOS DE *BIFIDOBACTERIUM* EN SALIVA
Y CARIES DE NIÑOS CHILENOS DE 7 A 11 AÑOS DE EDAD CON Y SIN
CARIES.**

Carolina Andrea Carrasco Leiva

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. Carla Lozano Moraga

Dr. Andrés Celis Sersen

**Adscrito a Proyecto U-inicia Difarp 40/13, VID, U. de Chile
Santiago - Chile
2016**



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS
ÁREA DE BIOQUÍMICA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA Y MEDICINA ORAL
ÁREA MICROBIOLOGÍA**

**DIVERSIDAD DE ESPECIES Y GENOTIPOS DE *BIFIDOBACTERIUM* EN SALIVA
Y CARIES DE NIÑOS CHILENOS DE 7 A 11 AÑOS DE EDAD CON Y SIN
CARIES.**

Carolina Andrea Carrasco Leiva

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dra. Carla Lozano Moraga

Dr. Andrés Celis Sersen

**Adscrito a Proyecto U-inicia Difarp 40/13, VID, U. de Chile
Santiago - Chile
2016**

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por acompañarme, guiarme y cuidarme siempre.

A mi familia, mis papas Verónica y Manuel, mi abuelita Elvira y mi hermano Pablo, por ser un pilar fundamental en mi vida, gracias por su incondicional apoyo y amor, este logro se los dedico a ustedes.

A mis amigos Monse, Vale, Steis, Clau, Javi, Dani, Martita, Ange, Diani, Pía, Jimmy, Ric, Pedro, Pame y Chio, por los excelentes momentos vividos y compartidos a lo largo de estos años.

A la Prof. Dra. Claudia Lefimil, Dr. Andrés Celis y Prof. Dra. Carla Lozano, por su paciencia, cariño y buena disposición para realizar este trabajo.

A las personas que conocí trabajando en el laboratorio, especialmente a Andrea Cortes y Oriana Flores por la compañía y ayuda brindada durante este proceso.

A todos ellos, muchas gracias.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. MARCO TEÓRICO.....	6
3.1 CARIES DENTAL.....	6
3.2 CARACTERÍSTICAS DE LA CAVIDAD ORAL.....	10
3.3 ADQUISICIÓN DE MICROBIOTA ORAL RESIDENTE.....	11
3.4 BIOPELÍCULA DENTAL.....	12
3.5 ETIOPATOGENIA DE LA CARIES DENTAL.....	14
3.6 EL GÉNERO <i>BIFIDOBACTERIUM</i>	17
3.7 <i>BIFIDOBACTERIUM</i> SPP. Y CARIES DENTAL.....	18
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS.....	22
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	22
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1 SUJETOS Y EXAMEN CLÍNICO.....	23
6.2 TOMA DE MUESTRAS DE SALIVA Y DESDE SITIOS DE CARIES.....	24
6.3 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO TRIPTONA - FITONA – EXTRACTO DE LEVADURA MODIFICADO (MTPY).....	24

6.4 AISLAMIENTO Y CRECIMIENTO DE <i>BIFIDOBACTERIACEAE</i> DESDE LAS MUESTRAS.....	24
6.5 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.....	25
6.6 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)....	25
6.7 ELECTROFORESIS HORIZONTAL DE ADN.....	26
6.8 PURIFICACIÓN DE ADN.....	27
6.9 SECUENCIACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES...	27
6.10 DIFERENCIACIÓN DE GENOTIPOS DE LAS ESPECIES POR PCR BASADO EN SECUENCIAS REPETITIVAS (REPETITIVE SEQUENCE-BASED PCR: REP-PCR).....	28
6.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	28
7. RESULTADOS.....	29
7.1 CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN EN ESTUDIO...	29
7.2 CRECIMIENTO BACTERIANO.....	30
7.3 PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	31
7.4 DETERMINACIÓN DE ESPECIES POR SECUENCIACIÓN.....	33
7.4.1 DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES EN CAVIDAD ORAL, SEGÚN EXPERIENCIA DE CARIES DE LOS PARTICIPANTES.....	33
7.4.2 DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES EN CAVIDAD ORAL, SEGÚN TIPO DE MUESTRA.....	34
7.4.3 DISTRIBUCIÓN DE ESPECIES SEGÚN SUJETO, EN RELACIÓN A SU EXPERIENCIA	

DE CARIES.....	36
7.4.4 DISTRIBUCIÓN DE EPECIES SEGÚN SUJETO, EN RELACIÓN AL TIPO DE MUESTRA.....	37
7.5 DIFERENCIACIÓN DE GENOTIPOS DE LAS ESPECIES POR REP-PCR.....	39
8. DISCUSIÓN.....	40
9. CONCLUSIONES.....	46
10. SUGERENCIAS.....	47
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
12. ANEXOS.....	54
12.1 ACTA DE APROBACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE.....	54
12.2 CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	56
12.3 FICHA CLÍNICA.....	59

1. RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La cavidad oral posee una microbiota residente característica, la cual, en un estado de equilibrio, coexiste en armonía con el hospedero y es beneficiosa para el mismo. Esta homeostasis bacteriana puede verse alterada al ser perturbado el hábitat, provocando un desequilibrio de la microbiota residente, lo que induce al desarrollo de patógenos oportunistas que facilitan el progreso de la caries dental, que corresponde a un proceso patológico mediado por bacterias, de origen multifactorial, altamente prevalente y costoso de tratar. Entre estos patógenos, han sido descritas ciertas especies del género *Bifidobacterium*, las cuales corresponden a bacterias Gram positivo, anaerobias, con propiedades acidogénicas y acidúricas, polimórficamente ramificadas, no móviles y no formadoras de esporas. A la fecha no existen estudios publicados sobre la diversidad de especies y genotipos de *Bifidobacterium* spp. en la cavidad oral de niños, ni de su asociación con caries.

OBJETIVO: Analizar la diversidad de especies y genotipos de *Bifidobacterium*, en saliva y caries dentinaria de niños chilenos de 7 a 11 años de edad con caries y en saliva de niños libres de caries.

MATERIAL Y MÉTODOS: Protocolo aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología. Previo consentimiento de los padres, se tomaron muestras de saliva y caries a niños Chilenos de 7-11 años (9 sin caries y 9 con caries), en la Clínica Odontológica, Universidad de Chile. Las muestras fueron sembradas en el medio de cultivo Triptona - Fitona - Extracto de Levadura modificado (MTPY), selectivo para *Bifidobacteriaceae*, e incubadas 72 hrs a 37°C en anaerobiosis. De las colonias crecidas, se seleccionaron 16 al azar desde cada muestra, para aislamiento de ADN. A través de la realización de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos para *Bifidobacteriaceae* y oligonucleótidos específicos para amplificación de un fragmento de ADN del gen de 16S rRNA bacteriano, en los casos que no amplificaron con oligonucleótidos específicos para *Bifidobacteriaceae*. El producto de PCR fue purificado y posteriormente se secuenciaron e identificaron las

especies. Finalmente se diferenciaron los genotipos de las especies pertenecientes a la familia *Bifidobacteriaceae*, mediante PCR basado en secuencias repetitivas (REP-PCR) y se realizaron análisis estadísticos de los resultados.

RESULTADOS: No se detectaron *Bifidobacterium* spp. en la cavidad oral de los sujetos de estudio, sin embargo se aislaron otras especies a partir del medio de cultivo MTPY. *Actinomyces odontolyticus* fue asociado a la saliva de los niños, independiente de su experiencia de caries. *Rothia mucilaginosa* se vio asociada a la cavidad oral de los sujetos libres de caries. *Lactobacillus* spp. se vio asociado a la cavidad oral de sujetos con experiencia de caries. *Parascardovia denticolens* estuvo fuertemente asociada a sitios de caries.

CONCLUSIONES: No se logró validar ni refutar la hipótesis de trabajo del presente estudio, debido a que no fue posible aislar *Bifidobacterium* spp, desde las muestras de los sujetos participantes. Se encontró asociación entre algunas de las especies aisladas en este estudio, con la experiencia de caries de los sujetos y el tipo de muestra. Los aislados de *Parascardovia denticolens* presentaron una amplia variedad de genotipos, pero con un mismo origen filogenético.

2. INTRODUCCIÓN

La cavidad oral es descrita como un ecosistema diverso, dinámico y único en el cuerpo humano, el cual está en constante cambio de sus condiciones ecológicas (Marsh P., 2003). Estas condiciones son óptimas para la colonización de microorganismos que conformarán la microbiota oral normal. Se han detectado más de 700 especies o filotipos bacterianos en boca, de los cuales, según la base de datos del microbioma oral humano HOMD (Human Oral Microbiome Database: www.homd.org), aproximadamente el 35% aún no han sido cultivados (Chen T. y cols., 2010).

La colonización bacteriana se inicia durante el parto, momento en el cual la cavidad oral deja ser un ambiente estéril (Struzycha I., 2014). A medida que el bebé crece y con la erupción de las primeras piezas dentarias, la cavidad oral se transforma, generándose nuevos microambientes, por lo que la microbiota también cambia (Struzycha I., 2014). Los primeros microorganismos en colonizar se denominan especies pioneras, las cuales corresponden principalmente a especies aerobias y anaerobias facultativas, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus oralis*, que son características durante los primeros días de vida (Struzycha I., 2014). Con el tiempo, la diversidad de la microbiota estreptocócica aumenta. Después de la erupción de los primeros dientes y durante el primer año de vida, se describe una mayor frecuencia de aislados de anaerobios obligados y Gram negativos (Struzycha I., 2014). Miembros del género *Neisseria*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Lactobacillus* y *Rothia* son comúnmente aislados desde la cavidad oral de niños (Lakshman S., 2006; Struzycha I., 2014).

Desde el momento de la erupción de las piezas dentarias, el esmalte se cubre de forma permanente de una película dental adquirida, compuesta de una capa de proteínas y glicoproteínas salivales. Esta película forma la interfaz entre el esmalte y la biopelícula dental o *biofilm* (Lee Y. y cols., 2013, Jakubovics N., 2015). La biopelícula es descrita como una comunidad microbiana estructurada, organizada y compleja, donde el número de grupos microbianos que la componen aumenta hasta que se alcanza un equilibrio, lo que se denomina comunidad clímax. La

pérdida de este equilibrio conllevaría al desarrollo de enfermedades orales como la caries dental (Marsh P. y cols., 2009).

La caries dental corresponde a un proceso patológico mediado por bacterias y de origen multifactorial (OMS, 1987). Dentro de las patologías bucales, es considerada la enfermedad crónica más prevalente en la población Chilena (MINSAL, 2011) , y es altamente costosa de tratar (Sheiham A., 2005).

Actualmente, la hipótesis de la placa ecológica, es el modelo más ampliamente aceptado para explicar el papel de la microbiota oral en el desarrollo de la caries (Takahashi N. y Nyvad B., 2011). Este modelo plantea que la homeostasis bacteriana se puede romper, lo que lleva a cambios en el equilibrio de la microbiota y predispone a la presencia de enfermedad en los sitios donde ocurre el desequilibrio. Durante el desarrollo de la caries dental la microbiota de la superficie dentaria se modifica, pasando desde una dominancia de bacterias del grupo *Streptococcus* no-mutans y *Actinomyces*, características en estados de salud donde la acidificación del ambiente es leve e infrecuente, a una dominancia de *Streptococcus* del tipo mutans y otras bacterias, tales como *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. en ambientes con condiciones ácidas severas y prolongadas (Takahashi N. y Nyvad B., 2011).

Diversos estudios señalan una relación entre la presencia de *Bifidobacterium* spp. y el desarrollo de caries dental en adultos (Beighton D. y cols., 2008; Mantzourani M. y cols., 2009; Beighton D. y cols., 2010; Kaur R. y cols., 2013; Kianoush N. y cols., 2014). Sin embargo, no existen reportes sobre la diversidad de especies de *Bifidobacterium* spp. en la cavidad oral de niños, ni de su asociación con la caries dental.

Estudios con *Lactobacillus* spp., bacterias con propiedades similares a *Bifidobacterium* spp., y con quien coexisten en cavidad oral, señalan que existe una mayor diversidad de especies en cavidad oral de niños sin caries que en niños con caries, así como una menor diversidad de genotipos en estas especies (Dige I. y cols., 2014; Kianoush N. y cols., 2014).

Por lo tanto, al no existir estudios nacionales publicados que hayan investigado este tema y considerando el rol primordial de la microbiota oral en el desarrollo de una de las enfermedades crónicas más prevalentes en la población Chilena, como es el caso de la caries dental, se otorga a *Bifidobacterium* spp. una gran relevancia en el campo odontológico, lo que sustenta el estudio en Chile sobre la diversidad de especies y genotipos de *Bifidobacterium* spp. en la población infantil en relación a la prevalencia de caries, para de esta forma diseñar estrategias preventivas y de control del desarrollo de estas cepas bacterianas.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Caries Dental

La caries dental es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como un proceso patológico mediado por bacterias y de origen multifactorial, el cual se inicia después de la erupción dentaria, generando el reblandecimiento del tejido duro del diente y cuyo avance determina la formación de una cavidad (OMS/WHO, 1987). La caries dental es considerada, dentro de las patologías bucales, la enfermedad crónica más prevalente en la población Chilena (MINSAL, 2011). La lesión de caries se inicia con la desmineralización del esmalte, pudiendo avanzar hasta afectar la dentina y generar daño pulpar, produciendo dolor e impotencia funcional. Esta patología puede presentarse a lo largo de toda la vida y, a pesar de ser prevenible, su prevalencia y severidad aumentan con la edad (MINSAL, 2013). Por todos los antecedentes mencionados, la caries dental constituye un problema relevante en salud pública, debido a las consecuencias e impacto en la calidad de vida de quienes la padecen, además del alto costo de su tratamiento (Sheiham A., 2005).

Como se planteó anteriormente, la caries dental corresponde a una patología multifactorial. Dentro de los factores que la condicionan toman lugar los estilos de vida, tales como los hábitos alimenticios e higiénicos, los que pueden favorecer el desarrollo de caries o actuar como factores protectores. Cabe mencionar que los estilos de vida se ven fuertemente influenciados por los factores sociales, tales como el nivel de educación, nivel socioeconómico y condición urbano-rural. En nuestro país existe inequidad en salud, ya que es posible observar un mejor estado de salud bucal en la población de nivel socioeconómico alto en comparación con los niveles más bajos (Soto L. y cols., 2007a; Soto L. y cols., 2007b).

Para medir el estado de salud bucal de los individuos se utilizan índices, que registran numéricamente los resultados de la incidencia de caries en los dientes de un grupo de la población. Los índices descritos para determinar la historia de caries corresponden al índice COPD (COPD: número de dientes permanentes

cariados, obturados y perdidos por caries), propuesto por Klein H. y Palmer C. para dientes permanentes, y el índice ceod (ceod: número de dientes temporales cariados, con indicación de extracción por caries y obturados) para dentición temporal, éste último corresponde a una modificación realizada por Gruebbel A. del índice COPD (Klein H. y Palmer C., 1937; Gruebbel A., 1944).

En niños con dentición mixta, se debe considerar tanto el índice COPD como el ceod. El valor individual de los índices mencionados corresponde a la suma de los dientes cariados, obturados, perdidos o con indicación de extracción. Por otra parte, al evaluar un grupo de personas, el valor grupal corresponde al promedio de los valores individuales de los integrantes del grupo evaluado. Las agenesias, los terceros molares y las piezas extraídas por ortodoncia no son considerados para este índice.

La OMS, en cuanto a la prevalencia de caries, establece diferentes niveles de severidad, descritos según los valores presentados en la Tabla 1 (OMS, 1997):

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

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

Un sistema estandarizado, basado en la mejor evidencia disponible para la detección temprana y evaluación de la severidad de caries en etapa tardías, corresponde al Sistema Internacional para la Detección y Evaluación de Caries (ICDAS) (Ismail A. y cols., 2007). Esta herramienta, dentro de la detección

de la caries dental, evalúa la etapa del proceso de la caries, la topografía (puntos y fisuras o superficie lisa), la anatomía (corona o raíz) y por último el estado de la restauración o del sellador. En cuanto a la evaluación del proceso de la caries, éste se realiza según la etapa (cavitada o no cavitada) y la actividad (activa o detenida). Este sistema presenta 7 categorías (Tabla 2), la primera o código 0, se utiliza cuando no hay evidencia de caries, el código 1 y 2 describe a caries limitadas al esmalte, descritas como manchas blancas a marrones, la diferencia es que en código 1, la lesión es detectable sólo luego de un secado de aproximadamente 5 segundos; las categorías con código 3 y 4 describen a caries que se extienden en esmalte y dentina, estando la dentina aún no expuesta. Cabe mencionar que en el código 4 se observa la presencia de una sombra oscura subyacente en dentina. Las últimas dos categorías, correspondientes a código 5 y 6, indican la presencia de caries con dentina ya expuesta, éstas se diferencian según la extensión de la lesión, al estar afectada más de la mitad de la corona se clasifica como código 6 (International Caries Detection and Assessment System Coordinating Committee, 2005; Shivakumar K. y cols., 2009).

Tabla 2: Descripción de categorías pertenecientes al código ICDAS.

Código	Descripción
0	Sano
1	Primer cambio visual del esmalte (visto sólo después de un secado prolongado con aire o limitada a los confines de un punto o fisura.)
2	Cambio visual distintivo del esmalte.
3	Ruptura localizada del esmalte (sin signos visuales clínicos de afectación de la dentina).
4	Sombra oscura subyacente a dentina.
5	Cavidad distintiva con dentina visible.
6	Extensa cavidad distintiva con dentina visible.

Un nuevo sistema de evaluación, corresponde a una modificación del Sistema Internacional para la Detección y Evaluación de Caries o ICDAS II, el cual adiciona un dígito al análisis, donde además de evaluar el nivel de avance de la caries descrito anteriormente en ICDAS, correspondiente al segundo dígito; presenta un primer dígito con códigos del 0 al 9. De esta forma, del código 0 al 8 se describe el estado y tipo de restauración o sellante, utilizando el código 9 sólo en caso de que el diente esté ausente (Shivakumar K. y cols., 2009).

A nivel nacional, el Ministerio de Salud (MINSAL) ha realizado numerosos estudios diagnósticos de salud oral en poblaciones de diferentes rangos etarios, los cuales buscan establecer la prevalencia de la caries dental en la población Chilena (MINSAL, 2011). En este contexto, Ceballos M. y cols. (2007) realizaron un diagnóstico en salud bucal de niños de 2 y 4 años que asisten a la educación preescolar en la Región Metropolitana en el año 2007, observando que un 83% de los niños de 2 años no presentaba historial de caries. El daño por caries en dentición temporal se midió a través del índice ceod, arrojando un valor promedio de $0,54 \pm 1,53$ piezas dentarias. Este valor está dado prácticamente en su totalidad por el componente caries, ya que en general, no se encontraron piezas obturadas o extraídas a esta edad. En los niños de 4 años, el porcentaje sin historial de caries disminuyó a un 51,98%, y el índice ceod aumentó a $2,32 \pm 3,27$ piezas dentarias, desglosado en 2,07 piezas cariadas, 0,23 piezas obturadas y 0,03 piezas con extracciones por caries.

Según el estudio de Soto L. y cols. (2007a), el porcentaje de niños de 6 años libres de caries disminuye a un 29,64%. El ceod promedio a esta edad fue de 3,71 piezas dentarias, valor que se desglosa en 1,95 piezas cariadas, 1,52 piezas obturadas y 0,24 piezas con extracciones por caries. En cuanto a la dentición definitiva, el COPD promedio obtenido fue de 0,16 piezas dentarias, cuyo valor se desglosa en 0,08 piezas cariadas, 0,07 piezas obturadas y 0,001 piezas con extracciones por caries. Esto indica que, a la temprana edad de 6 años, ya es posible observar un nivel moderado de severidad de prevalencia de caries según la cuantificación de la OMS para índice ceod.

Con respecto a los adolescentes de 12 años, el estudio de Soto L. y cols. (2007b), señala un aumento en el porcentaje de adolescentes libres de caries a 37,5%, como consecuencia al cambio en la dentición desde dentición temporal a definitiva. Sin embargo, quienes poseen caries registran un COPD promedio de 1,9 piezas dentarias, el cual se desglosa en 0,75 piezas cariadas, 1,039 piezas obturadas y 0,112 piezas con extracciones por caries.

En conclusión, la revisión por patologías demuestra que la prevalencia de la caries dental va desde un 16,8% a los 2 años (Ceballos M. y cols., 2007), hasta casi el 100% de la población adulta (Badenier O. y cols., 2007; MINSAL, 2011). Según MINSAL, las condiciones orales repercuten de manera importante en la calidad de vida de las personas, siendo la caries dental representativa en la pérdida de salud en menores de 45 años, y el edentulismo en los de 45 años y más (MINSAL, 2011).

3.2 Características de la cavidad oral

La cavidad oral corresponde a un ambiente húmedo, rico en nutrientes, con una temperatura que varía entre 35/36 °C y un valor de pH salival entre 6,75 y 7,25 (Struzycha I., 2014). Se describe como un ecosistema diverso, dinámico y único en el cuerpo humano, cuyo rasgo característico corresponde a la inestabilidad de sus condiciones ecológicas (Marsh P., 2003; Marsh P., 2005). Estas condiciones son óptimas para la colonización de microorganismos, tales como virus, protozoos, hongos, arqueas y diversas bacterias (Wade W., 2013). La cavidad oral o boca, está constituida por diferentes hábitats, incluyendo dientes y superficies mucosas tales como labios, mejillas, paladar y lengua (Marsh P. y cols., 2009). Estos hábitats promueven el desarrollo de microorganismos, presentando a su vez diversos microbiomas (Struzycha I., 2014).

3.3 Adquisición de microbiota oral residente

En el vientre materno, la cavidad oral del feto corresponde a un ambiente estéril. (Struzycha I., 2014). Durante el parto, se inicia la transmisión vertical, la cual corresponde a la transferencia de microorganismos desde los cuidadores hacia el niño, en este caso de madre a hijo (Berkowitz R., 2006). Por lo tanto, durante el nacimiento y los primeros días de vida del bebé, donde toma gran relevancia el amamantamiento, cientos de microorganismos colonizan la cavidad oral. (Domínguez M., 2010; Zaura E. y cols., 2014).

Los primeros microorganismos en colonizar la cavidad oral se denominan especies pioneras, y en conjunto constituyen la comunidad microbiana pionera, los cuales corresponden principalmente a especies aerobias y anaerobias facultativas. Se ha descrito que, durante los primeros días de vida del recién nacido, los organismos cultivables predominantes en boca corresponden a *Streptococcus* spp., en particular *S. salivarius*, *S. mitis* y *S. oralis* (Struzycha I., 2014). La diversidad de la microbiota aumenta con el tiempo, *Actinomyces odontolyticus* fue aislado desde superficies de mucosa oral en bebés desde los dos meses de edad (Struzycha I., 2014). Por otra parte, especies como *Actinomyces naeslundii* sólo están presentes desde aproximadamente los 12 meses de edad y una vez que los dientes ya han erupcionado (Struzycha I., 2014). Con el inicio de la dentición primaria es posible aislar con mayor frecuencia especies anaerobias obligadas y Gram negativas (Struzycha I., 2014). Especies pertenecientes a los géneros bacterianos, *Neisseria*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Leptotrichia*, *Fusobacterium* y *Rothia*, son descritas como predominantes en niños (Struzycha I., 2014; Lakshman S., 2006).

Con el tiempo, la actividad metabólica de la comunidad pionera modifica el entorno, proporcionando condiciones adecuadas para la colonización de otras poblaciones a través de la sucesión microbiana. Esto implica el desarrollo progresivo de una comunidad pionera (que contiene pocas especies) a través de varias etapas en las que el número de grupos microbianos aumenta, hasta que se alcanza un equilibrio, lo que se denomina comunidad clímax, y que por lo general tiene una gran diversidad de especies (Figura 1). Una comunidad clímax refleja

una situación muy dinámica entre el hospedero, el medio ambiente y la microbiota. En este punto, ciertos cambios transitorios tales como la dieta, la variación en el flujo salival y el consumo de antibióticos, también afectan la estabilidad de la microbiota oral (Sheiham A., 2001).

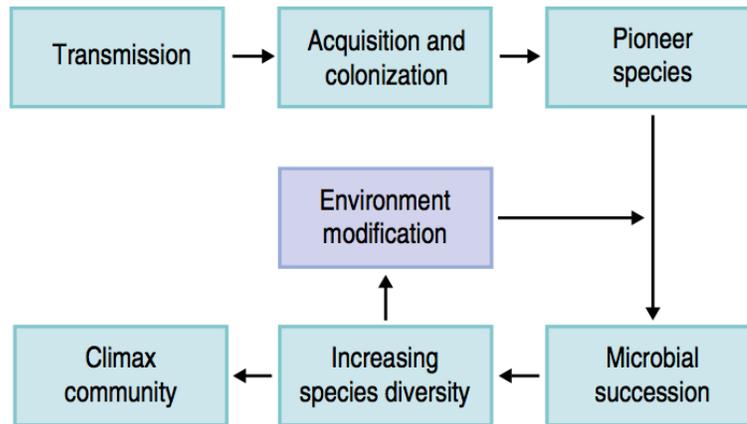


Figura 1. Fases ecológicas en el establecimiento de una comunidad microbiana (Marsh P. y cols., 2009).

3.4 Biopelícula dental

La comunidad microbiana asociada a los dientes se conoce como placa dental, la cual corresponde a un ejemplo de película biológica denominada biopelícula o *biofilm*. El término biopelícula se utiliza para describir las comunidades de microorganismos unidos a una superficie que se encuentran generalmente organizados dentro de una estructura tridimensional y encerrados en una matriz de material extracelular denominado glicocálix (Marsh P. y cols., 2009).

Las superficies dentarias se encuentran cubiertas en forma permanente por una película, compuesta de una capa de proteínas y glicoproteínas que se forma por adsorción selectiva de componentes salivales. Esta película, denominada película salival adquirida, forma la interfaz entre el esmalte y la biopelícula dental, modulando la unión de bacterias que se encuentran en la biopelícula (Lee Y. y cols., 2013; Jakubovics N., 2015).

Durante la colonización bacteriana inicial, la biopelícula está dominada por los colonizadores pioneros, que son los primeros en adherirse a la película de esmalte y son capaces de tolerar la presencia de oxígeno (Jakubovics N., 2015), entre estos colonizadores se describen especies de cocáceas y bacilos Gram-positivo. Éstas son sucedidas en el tiempo, y de acuerdo a la presión selectiva de determinantes ecológicos, por especies de cocáceas, bacilos, cocobacilos y fusobacterias Gram-negativo. Finalmente se pueden agregar especies filamentosas, espirilos y espiroquetas (Kolenbrander P. y cols., 2002) (Figura 2).

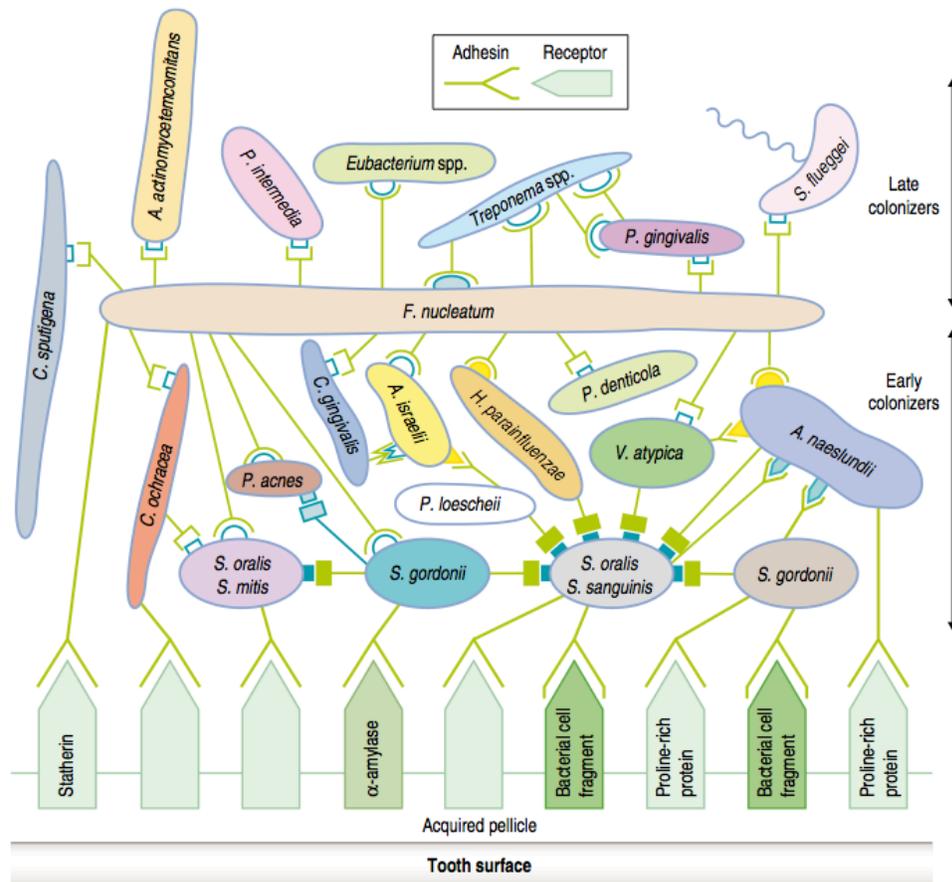


Figura 2. Esquema de la constitución de la biopelícula dental, indicando colonizadores tempranos o pioneros (Early colonizers) y tardíos (Late colonizers) (Marsh P. y cols. 2009).

Las bacterias que forman parte de la comunidad clímax de la superficie de la biopelícula pueden desprenderse y ser transportados a nuevos sitios, entrando en una "fase planctónica", de esta forma se inicia otro ciclo de colonización (Kuboniwa M. y Lamont R., 2010)

3.5 Etiopatogenia de la caries dental

La caries dental corresponde a una interacción compleja a lo largo del tiempo, entre bacterias productoras de ácido y carbohidratos fermentables ingeridos desde los alimentos, además de diversos factores del hospedero y características de los dientes y la saliva (Figura 3) (Selwitz R. y cols., 2007). El proceso usualmente progresa de forma lenta, alternando etapas de desmineralización y remineralización en la superficie dental. La frecuencia de ingesta de azúcares, la baja secreción salival y la pobre higiene bucal, alteran el equilibrio entre los episodios de desmineralización y remineralización favoreciendo la pérdida de minerales desde las piezas dentarias. La supresión del catabolismo de azúcar y de la producción de ácido por el uso de inhibidores metabólicos o edulcorantes artificiales no fermentables, o la estimulación del flujo salival, podrían ayudar en el mantenimiento de la homeostasis en la biopelícula dental (Marsh P., 2006).

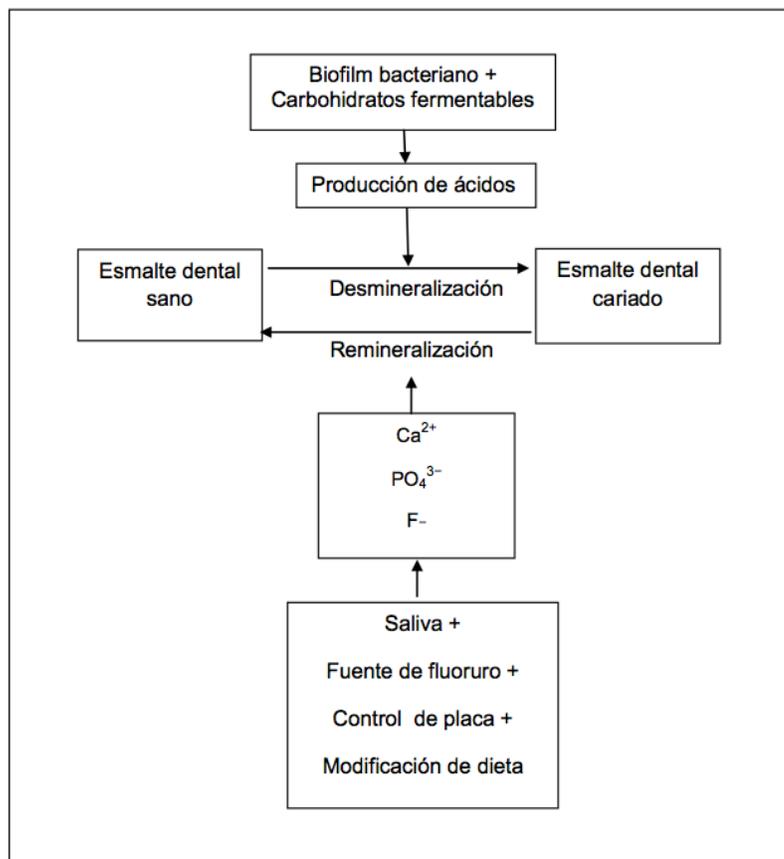


Figura 3. Diagrama del proceso carioso como un balance regular entre desmineralización y remineralización (adaptado de Selwitz R. y cols., 2007).

En la historia, han existido diferentes líneas de pensamiento sobre el papel de las bacterias de la biopelícula dental en la etiología de la caries. Entre ellas, se menciona la “Hipótesis de Placa Específica”, la cual propone que sólo algunas especies son patógenas y están activamente involucradas en la enfermedad. Esta hipótesis ha sido fuertemente debatida, ya que se ha observado que, en ocasiones, la enfermedad se produce en ausencia aparente de estos patógenos putativos, y que a su vez éstos también pueden ser aislados desde sitios sanos. Esto condujo a la “Hipótesis de Placa no Específica”, que propone que la enfermedad se genera como resultado de la actividad global de la microbiota total de la biopelícula, por lo que una mezcla heterogénea de microorganismos podría desempeñar un papel en la enfermedad (Marsh P. y cols., 2009).

Actualmente, la “Hipótesis de la Placa Ecológica”, es el modelo más ampliamente aceptado para explicar el papel de la microbiota oral en el proceso de la caries (Takahashi N. y Nyvad B., 2011). Ésta reúne los elementos clave de las dos hipótesis anteriores, proponiendo que los organismos asociados con la enfermedad también pueden encontrarse en sitios de salud, pero en niveles bajos que no son clínicamente relevantes (Marsh P. y cols., 2009). Este modelo plantea que la biopelícula o placa dental, encontrada en forma natural sobre los dientes, es beneficiosa para el hospedero, ya que ayuda a prevenir la colonización de otras especies exógenas. La biopelícula dental se mantiene relativamente estable frente a cambios ambientales menores, proceso conocido como homeostasis microbiana, que se debe en parte a un equilibrio dinámico entre las interacciones sinérgicas y antagónicas de las bacterias. Sin embargo, la homeostasis se puede romper, lo que lleva a cambios en el equilibrio de la microbiota y predispone a la presencia de enfermedad en los sitios donde ocurre el desequilibrio.

De acuerdo a la “Hipótesis de la Placa Ecológica”, el proceso de caries consta de 3 fases reversibles (Figura 4). La placa dental corresponde a un ecosistema microbiano dinámico en el cual bacterias del tipo no-mutans, principalmente *Streptococcus* no-mutans y *Actinomyces*, son claves para mantener la estabilidad dinámica de un ciclo natural de pH (6,5-7,5), donde la acidificación del medio es leve y poco frecuente (fase de estabilidad dinámica). Al aumentar la frecuencia en el consumo de azúcares, la acidificación del medio se vuelve moderada y

frecuente. Esta acidificación es el mayor determinante de los cambios fenotípicos y genotípicos que ocurren en la microbiota durante el desarrollo de caries, momento en que especies más acidúricas (que resisten ácido manteniendo su metabolismo fermentador) aumentan de forma selectiva. En el tiempo, esto lleva a la pérdida del balance entre desmineralización y remineralización hacia la pérdida de mineral desde las piezas dentarias, llevando al inicio o progresión de la caries dental (fase acidogénica) (Figura 4). En condiciones ácidas severas y prolongadas, las bacterias más acidúricas se vuelven dominantes (fase acidúrica), entre ellas se encuentran *Streptococcus* del tipo mutans y *Lactobacillus* spp. así como ciertas cepas acidúricas de *Streptococcus* no-mutans, *Actinomyces* y *Bifidobacterium* spp. (Takahashi N. y Nyvad B., 2011).

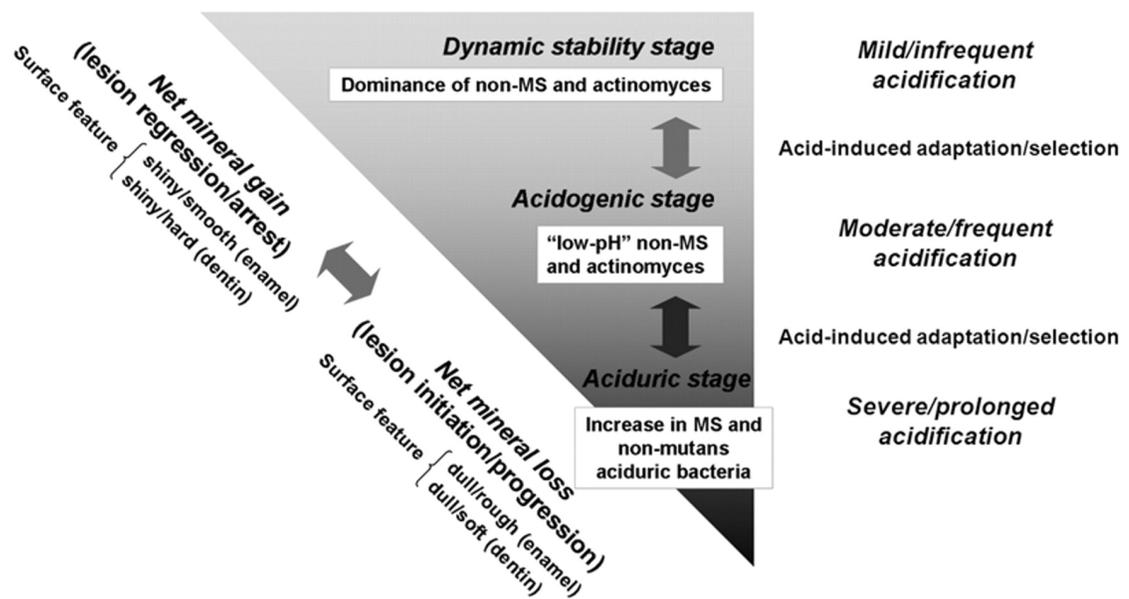


Figura 4: Descripción del proceso de la caries de acuerdo a la Hipótesis de la Placa Ecológica. MS: *Streptococcus* del tipo mutans, non-MS: *Streptococcus* del tipo no mutans (Takahashi N. y Nyvad B. 2011).

Los *Streptococcus* del tipo mutans corresponden a bacterias descritas como buenos marcadores de caries dentarias, pero no necesariamente son los agentes etiológicos de la enfermedad (Beighton D., 2005). Diversos estudios han identificado a *Streptococcus mutans* como el patógeno más importante de la

caries dental, debido a su frecuente aislamiento desde lesiones de caries, sus propiedades acidogénicas y acidúricas, y su capacidad de adhesión tanto a superficies dentarias como a otras bacterias. Sin embargo, sus niveles no necesariamente son altos en biopelículas asociadas a caries dental.

3.6 El género *Bifidobacterium*

Desde el *phylum Actinobacteria* surge el género *Bifidobacterium*, el cual es miembro de la familia *Bifidobacteriaceae*. Fueron aislados por primera vez por Tisser el año 1899, desde las heces de bebés lactantes, momento en el cual recibieron el nombre de *Bacillus bifidus*, debido a que su morfología y fisiología era muy similar a la de *Lactobacillus* spp., siendo clasificados dentro de este género durante gran parte del siglo XX. La familia *Bifidobacteriaceae* consta de 7 géneros: *Bifidobacterium*, *Aeriscardovia*, *Falcivibrio*, *Gardnerella*, *Parascardovia*, *Scardovia* y *Alloiscardovia*, los cuales han sido aislados desde fuentes humanas y animales.

Los miembros del género *Bifidobacterium* son Gram positivo, anaerobios, con propiedades acidogénicas y acidúricas, polimórficamente ramificados, no móviles y no formadores de esporas. Pueden ser agrupados en función a seis diferentes hábitats donde han sido encontrados: el intestino humano, la cavidad oral, los alimentos, el tracto gastrointestinal de los animales, el intestino de insectos y las aguas residuales (Turroni F. y cols., 2010).

A la fecha, han sido reconocidas 53 especies de *Bifidobacterium* (www.bacterio.net/bifidobacterium.html), de las cuales, 45 genomas han sido secuenciados (Sun Z. y cols., 2014). Los análisis comparativos de estos genomas han aportado una gran cantidad de información para la comprensión del proceso que subyace la especiación y evolución del género *Bifidobacterium*, así como la adaptación a su hábitat específico (Turroni F. y cols., 2010).

Estas bacterias son relativamente dominantes en la microbiota intestinal humana, y se clasifican dentro del grupo de bacterias intestinales beneficiosas, utilizadas como probióticos (Ventura M. y cols., 2009). Algunas cepas de bacterias probióticas se han sugerido para mejorar la salud oral, ya que se ha visto que

disminuyen el número de *Streptococcus* del tipo mutans en saliva. Sin embargo, ciertas especies de *Bifidobacterium* han sido asociadas a la progresión de la caries dental (Haukioja A. y cols., 2008).

3.7 *Bifidobacterium* spp. y caries dental

Diversos estudios señalan una relación entre la presencia de *Bifidobacterium* spp. y el desarrollo de caries dental (Modesto M. y cols., 2006; Beighton D. y cols., 2008; Mantzourani M. y cols., 2009; Beighton D. y cols., 2010; Kaur R. y cols., 2013; Kianoush N. y cols., 2014).

En un estudio realizado por Modesto M. y cols. el año 2006, se evaluó la presencia y distribución de miembros de la familia *Bifidobacteriaceae*, en la placa dental y sitios de caries de 34 sujetos entre 25 y 60 años de edad. El estudio concluyó que *Scardovia inopinata* era la especie más frecuentemente aislada desde sitios de caries, mientras que *Bifidobacterium dentium* era más numerosa en la placa dental. Por otra parte, el recuento de *Parascardovia denticolens* era similar en ambos hábitats.

El año 2008, Beighton D. y cols. analizaron la presencia de miembros de la familia *Bifidobacteriaceae* en muestras salivales de 192 individuos adultos dentados y muestras de dentina infectada desde lesiones de caries radiculares de 9 individuos. Desde las muestras obtenidas, *Bifidobacterium dentium* fue la especie aislada e identificada más predominante, seguida por *Bifidobacterium longum*, *Scardovia inopinata*, *Parascardovia denticolens*, *Bifidobacterium scardovii* y *Alloscardovia omnicolens*. En dicho estudio se concluyó que *Bifidobacteriaceae* estaban presentes en altos niveles en la cavidad oral de adultos y que su número estaba significativamente correlacionado con la presencia de microorganismos frecuentemente asociados a caries como *Streptococcus* del tipo mutans, *Lactobacillus* spp. y levaduras.

Mantzourani M. y cols. (2009) evaluaron la diversidad de especies de *Bifidobacteriaceae* en adultos entre 30 y 85 años de edad, analizando muestras de placas dentales supragingival de superficies sanas y de dentina infectada de

lesiones radiculares blandas y activas y de lesiones radiculares rugosas. En los aislados obtenidos se identificó *B. dentium*, *B. subtile*, *P. denticolens*, *S. inopinata*, *S. genomospora* C1, *B. breve* y *B. longum*. *B. dentium* fue la especie más predominante, representando el 80% de los aislados clínicos obtenidos desde lesiones de caries tanto blandas como rugosas. *B. breve* fue aislada desde ambos tipos de lesiones, al igual que *B. subtile*. *B. longum* fue encontrado en un muy bajo nivel en sólo una de las muestras de placa de superficies radiculares sanas expuestas.

En el año 2010, Beighton D. y cols. analizaron muestras de saliva de 156 adultos mayores, determinando los niveles salivales de *Bifidobacterium* spp., encontrando una asociación positiva entre éstos y el número de piezas con caries y obturadas.

Kaur R. y cols. (2013) evaluaron los niveles salivales de *Bifidobacteriaceae* de 22 niños libres de caries y 38 con caries activas. Como resultado, obtuvieron que un 95% de los niños con caries activas presentaron aislados clínicos, en contraste a sólo un 9% de los niños libres de caries. Además, los niveles salivales de *Bifidobacteriaceae* se correlacionaron significativamente con la cantidad y frecuencia de ingesta de azúcares en la dieta y la higiene oral, y significativamente asociados con la experiencia de caries de los niños del estudio.

A la fecha, no existen estudios publicados sobre la diversidad de especies de *Bifidobacterium* spp. o de miembros de la familia *Bifidobacteriaceae* en la cavidad oral de niños, ni de la asociación de determinadas especies de éstos con caries.

El año 2014, Kianoush N. y cols., estudiaron la placa bacteriana asociada a lesiones de caries en dentina y su relación con el pH de la lesión, por medio de secuenciación de los genomas de la microbiota presente. Los resultados del estudio determinaron que la población bacteriana se volvía menos diversa a medida que la caries dentinaria aumentaba en profundidad y disminuía en pH. Sólo algunos géneros bacterianos se encontraban representados en las zonas más profundas de las caries dentinarias, entre los que se mencionan *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. y *Parascardovia* spp., entre otros. Algunas de las especies encontradas pertenecientes a estos géneros fueron identificadas como *B. dentium*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum* y *L. crispatus*. Todos estos

resultados indicarían que existe una selección de los microorganismos que habitarían en esa condición, los que varían dependiendo del sitio en cavidad oral.

Lactobacillus spp. corresponden a bacterias que poseen propiedades similares a *Bifidobacterium* spp. y con las cuales coexisten en cavidad oral (Dige I. y cols., 2014; Kianoush N. y cols., 2014). Piwat S. y cols., realizaron un estudio sobre la diversidad de especies de *Lactobacillus* spp. en la cavidad oral de niños, determinando que existe una mayor diversidad de especies en la cavidad oral de niños sanos y con baja prevalencia de caries que en niños con una moderada a alta prevalencia de caries (Piwat S. y cols., 2010). Junto con esto, realizaron un análisis de la diversidad genotípica de las especies aisladas, a través de PCR con oligonucleótidos arbitrarios (AP-PCR), encontrando que el grupo de niños con alta prevalencia de caries estaba frecuentemente colonizado por más de un genotipo, en contraste a los individuos del grupo con baja prevalencia de caries (Piwat S. y cols., 2010).

En base a todos los antecedentes presentados se puede hipotetizar que en saliva de individuos con caries y en las lesiones de caries, la diversidad de géneros y de especies es menor a la que encontraríamos en la cavidad oral de individuos libres de caries. Al contrario, la diversidad genotípica de las especies encontradas sería mayor en la cavidad oral de los individuos con caries, tanto en saliva como en sitios de lesiones de caries, en comparación a la cavidad oral de individuos sanos.

Como se mencionó anteriormente, no existen estudios publicados sobre la diversidad de especies de *Bifidobacterium* spp. en la cavidad oral de niños, ni de su asociación con caries, así como tampoco estudios sobre su diversidad genotípica en cavidad oral. Especies como *B. dentium* y *B. longum* han sido descritas como microorganismos asociados a caries dental sólo en adultos. Junto con esto, tampoco existen en Chile estudios publicados sobre la presencia de este microorganismo en cavidad oral, ya sea en sujetos sanos o con caries dental, la patología crónica más prevalente en la población Chilena. Debido a esto, y sumado al creciente consumo de probióticos del tipo *Bifidobacterium* en la población, sobre todo infantil, resulta de gran relevancia identificar cuales son las especies relacionadas con el desarrollo de esta patología, sobre todo en niños, y

cuales serían las variantes genóticas de las cepas en relación a estados de salud y desarrollo de caries dental de niños Chilenos. Dados todos estos antecedentes, en este estudio se propuso analizar la diversidad de especies y genotipos de *Bifidobacterium*, en saliva y caries dentinaria de niños Chilenos de 7 a 11 años de edad con caries y en saliva de niños libres de caries.

4. HIPÓTESIS.

Existe una menor diversidad de especies de *Bifidobacterium*, así como una mayor variedad de genotipos de estas especies, en saliva y lesiones de caries de niños chilenos de 7 a 11 años de edad con caries dentinaria, en comparación a saliva de niños sin caries.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL.

Analizar la diversidad de especies y genotipos de *Bifidobacterium*, en saliva y caries dentinaria de niños chilenos de 7 a 11 años de edad con caries y en saliva de niños libres de caries.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar las especies del género *Bifidobacterium* presentes en saliva y caries dentinaria de niños chilenos de 7 a 11 años de edad con caries, y en saliva de niños sin caries.
2. Analizar los genotipos de los aislados de *Bifidobacterium* spp. obtenidos desde saliva y caries dentinaria, de niños chilenos de 7 a 11 años de edad con caries y desde saliva de niños sin caries.
3. Comparar la diversidad de especies y genotipos de los aislados de *Bifidobacterium* spp. obtenidos desde saliva y caries dentinaria de niños chilenos de 7 a 11 años de edad con y sin caries.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 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 reclutados desde la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile. 9 niños sin caries y 9 niños con caries profundas de dentina en diente primer molar permanente. El tamaño muestral fue determinado por conveniencia. Para esto el investigador principal explicó los objetivos del proyecto de investigación al padre/madre del niño, invitándolos a participar voluntariamente. Posterior a su aceptación de participar y previa firma de consentimiento informado, se recolectaron 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: el grupo libre de caries, cuyo COPD y ceod era 0, y el grupo con experiencia de caries, que presentaban una o más caries dentinarias. Desde los sujetos libres de caries se tomó una muestra de saliva, y desde los sujetos con al menos una caries dentinaria se tomó una muestra de saliva y una desde un sitio con caries. Los sujetos con desarrollo de caries pero en ausencia de caries dentinaria, no fueron considerados para este estudio, al igual que los sujetos que hubiesen consumido antibióticos durante el último mes.

Los padres de todos los niños examinados recibieron información acerca del estatus de caries de su hijo, así como recomendaciones para mejorar su salud oral y un kit de limpieza dental.

6.2 Toma de muestras de saliva y desde sitios de caries

Todas las muestras fueron recolectadas bajo luz artificial, en un box dental, utilizando instrumental estéril (sonda de caries y espejo n°5) al menos una hora después de la última comida y del cepillado. Se determinó la experiencia de caries, expresada como índice ceod y COPD (Klein H. y Palmer C., 1937) de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud, 1997. Esto fue realizado por un Cirujano Dentista de la Universidad de Chile, el cual se encuentra calibrado con un índice kappa de Cohen de 0,83. Las muestras desde sitios de caries dentinaria fueron colectadas con cuchareta de caries previamente esterilizada y depositadas en 100 µl de buffer fosfato salino (PBS, pH 7,2) (Kuribayashi M. y cols., 2012). Para las muestras de saliva no estimulada, se les solicitó a los sujetos asumir la posición de cochero (Navazesh M., 1993), depositando saliva durante 5 min en un tubo plástico estéril previamente rotulado, reuniendo aproximadamente 1 ml de saliva por sujeto.

Posteriormente fueron almacenadas a 4°C por un tiempo breve, hasta su traslado al laboratorio de bioquímica y biología oral donde fueron procesadas.

6.3 Preparación del medio de cultivo Triptona - Fitona – Extracto de Levadura modificado (MTPY)

Para el aislamiento de *Bifidobacteriaceae* se utilizó el medio de cultivo descrito como selectivo para estos microorganismos por Beighton D. y cols., (2010). Éste constaba de: peptona 7 g/L, triptona 5 g/L, extracto de levadura 5 g/L, glucosa 15 g/L, rafinosa 5 g/L, K₂HPO₄ 2 g/L, MgCl₂ x 6H₂O 0,5 g/L, ZnSO₄ x 7H₂O 0,25 g/L, CaCl₂ 0,15 g/L, FeCl₃ 0,001 g/L, agar 15 g/L, se esterilizó mediante autoclave a 15 p.s.i. durante 20 min y luego se agregó tween 80 0,1% v/v y mupirocina 5 mg/ml (Beighton D. y cols., 2010).

6.4 Aislamiento y crecimiento de *Bifidobacteriaceae* desde las muestras

Los 100 µL de la muestra de sitios de caries en PBS fueron sometidos a diluciones seriadas 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000 v/v, de las cuales 100 µl 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 D. 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 a 37°C, en anaerobiosis, ambiente logrado mediante el uso de sobres de anaerobiosis Mitsubishi™ AnaeroPack-Anaero, insertos en jarras de anaerobiosis durante 72 h, como se describe previamente (Beighton D. y cols., 2010).

De las unidades formadoras de colonias (U.F.C.) crecidas, presuntamente identificadas como *Bifidobacterium* spp. (colonias blanquecinas, pequeñas, cóncavas, de borde liso) (Whitman W. y cols., 2012), fueron seleccionadas al azar al menos 16 de ellas desde cada muestra, cada una de las cuales fueron resembradas en placas de medio sólido MRS (Oxoid) suplementado con 0,02% p/v de cisteína y 0,34% p/v de ascorbato de sodio (Hirayama Y. y cols., 2012) e incubadas como se indicó anteriormente, para su crecimiento y la posterior extracción de ADN.

6.5 Extracción de ADN genómico

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

6.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Un fragmento de aproximadamente 500 pb del gen de 16S rRNA fue amplificado por PCR, utilizando los oligonucleótidos específicos descritos para *Bifidobacteriaceae* (Bif164mod: 5'-GGGTGGTAATRCCSRATG-3' y Bif662mod: 5'-CCACCGTTACACCGRGAA-3') (Beighton D. y cols, 2010). Para la realización de la PCR se utilizó como templado el ADN genómico fijado en los filtros de disco de

1,2 mm obtenidos desde el proceso anterior; 1 μ M de cada oligonucleótido; 0,2 mM de mezcla de dNTPs (Thermo Scientific®), 0,05 U/ μ l de DreamTaq ADN polimerasa (Thermo Scientific®), y 1x de tampón de PCR que contiene 1,5 mM de $MgCl_2$. La amplificación fue llevada a cabo en el termociclador PCR GeneAmp 2400 (PerkinElmer) y el proceso consistió en una desnaturalización inicial de 94 °C por 2 min, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 30 s, con una etapa final de 72 °C por 5 min. Las muestras que no amplificaron con los oligonucleótidos específicos para *Bifidobacteriaceae* fueron sometidas al mismo programa pero utilizando oligonucleótidos específicos para la amplificación de un fragmento de ADN de aproximadamente 1500 pb del gen de 16S rRNA bacteriano, PU1R: 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' y PU1F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (Cogulu D. y cols., 2008). Posteriormente, se procedió a realizar la reacción con similares condiciones. Todos los oligonucleótidos utilizados en este estudio fueron manufacturados por Integrated DNA Technologies, Inc (<https://www.idtdna.com/site>).

6.7 Electroforesis horizontal de ADN

Alícuotas del producto de PCR fueron analizadas en geles de agarosa al 1% . Brevemente, la agarosa fue suspendida en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM Na_2EDTA) y calentada hasta el punto de ebullición, y posteriormente se dejó enfriar hasta una temperatura de 50°C a 55°C, momento en el cual se le agregó safeview NBS Biologicals Ltda, que permite la visualización de ácidos nucleicos a través de transiluminación ultravioleta. La solución fue vertida en una placa de acrílico provista de una peineta con espaciadores y se dejó gelificar a temperatura ambiente por 20 min. El gel fue trasladado a una cámara de electroforesis que contenía amortiguador TAE 1X. 5 μ l del producto de PCR fueron mezclados con 1 μ l de tampón de carga 6X (30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol, 0,25% de xilencianol, 10 mM Tris-HCl pH 7,6) y posteriormente fueron depositados en los bolsillos del gel. La electroforesis se realizó a 100 V por tiempos variables, después de lo cual los geles de agarosa fueron observados en un transiluminador de radiación ultravioleta. Los geles se fotografiaron con el sistema de captura de imagen GelLogic (Carestream) y la imagen se procesó en un computador (Lefimil C. y cols., 2013).

6.8 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, se cortaron y pesaron trozos de no más de 300 mg de la zona del gel que mostraba visualización de ácidos nucleicos a través de transiluminación ultravioleta, que fueron traspasados a tubos eppendorf a los cuales se le agregaron 500 µl de buffer FADF y se incubaron a 55 °C durante 10 a 15 min hasta disolver completamente el gel. Posteriormente, se traspasaron 800 µl de la muestra a la columna de FADF y se centrifugó durante 30 s descartando el excedente, luego se agregaron 750 µl de Wash buffer a la columna y se volvió a centrifugar durante 30 s descartando el excedente, se centrifugó nuevamente durante 3 min y se dejó secar la columna a temperatura ambiente. Posteriormente, se trasladó la columna a un nuevo tubo eppendorf y se agregaron 40 µl de Elution buffer en el centro de la misma, se esperó durante 2 min para centrifugar posteriormente durante 2 min. El ADN obtenido se conservó a -20 °C.

6.9 Secuenciación e identificación de especies

El producto de PCR purificado fue secuenciado en Macrogen USA. Las secuencias obtenidas fueron analizadas realizando un alineamiento contra la base de datos no-redundante (nr) utilizando el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), y se corroboraron realizando el mismo procedimiento pero utilizando la base de datos de 16S rRNA de bacterias y arqueas del NCBI. Se consideró una identificación positiva cuando existía más de un 90% de identidad de secuencia. El análisis de los resultados de los alineamientos permitió identificar a las especies bacterianas presentes en cada muestra.

6.10 Diferenciación de genotipos de las especies por PCR basado en secuencias repetitivas (Repetitive Sequence-Based PCR: REP-PCR)

Luego de la identificación de especies, las U.F.C. de interés fueron analizadas genotípicamente mediante REP-PCR, como se describe en el estudio de Beighton D. y cols., (2008). El ADN genómico fue purificado como se describió anteriormente en la sección 6.8. Para la REP-PCR se utilizó el oligonucleótido BOX1AR, 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'. La reacción constaba en 0,2 mM de cada dNTP (Thermo Scientific®), 0,05 U/μl DreamTaq ADN polimerasa (ThermoScientific®), y 1x de tampón de PCR que contiene 1,5 mM de MgCl₂. La amplificación comenzó con una denaturación inicial (4 min a 94°C), seguido por 40 ciclos de denaturación (1 min a 94°C), hibridación (2 min a 45°C), y extensión (2 min a 72°C) con una etapa de extensión final (5 min a 74°C) (Alam S. y cols., 1999). Alícuotas de los productos de la REP-PCR fueron analizadas en geles de agarosa al 1,5%, preparados como se describe en la sección 6.7 y comparadas utilizando el programa TreeCon (Van de Peer Y. De Wachter R.; 1994).

6.11 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 ninguno de los grupos presentó distribución normal. Se consideró como hipótesis nula (H_0) que ambos grupos eran similares (poseían medianas similares); como hipótesis alternativa (H_1) que ambos grupos difieren en distribución (sus medianas son diferentes). Se rechazó la hipótesis nula con valores de $p \leq 0,05$.

Con los resultados de secuenciación se realizó un análisis de la prevalencia de las diferentes especies encontradas en saliva y sitios profundos de caries, así como su asociación con la ausencia o presencia de caries. Se utilizó el test exacto de Fisher para 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.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de la población en estudio.

Para el estudio fueron incluidos un total de 18 participantes, con edades entre los 7 y 11 años. De éstos, 9 se encontraban libres de experiencia de caries y 9 con al menos una caries dentinaria.

En la Tabla 3 se muestran las características demográficas de los niños participantes en ambos grupos del estudio. La edad promedio para el grupo libre de caries fue de $9,7 \pm 1,5$ años y para el grupo con experiencia de caries fue de $9,6 \pm 0,5$ años. Las medianas de ambos grupos fueron 10 años. 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 el grupo libre de caries, con 5 sujetos del sexo femenino y 4 del masculino, y asimétrica en el grupo con experiencia de caries, con 6 sujetos del sexo femenino y 3 del masculino. El COPD y ceod promedio del grupo con experiencia de caries arrojó un valor de $0,7 \pm 1$ y de $4 \pm 2,6$, respectivamente.

Tabla 3: Características demográficas de la población en estudio.

	Grupo libre de caries	Grupo con experiencia de caries
N	9	9
Edad Promedio	$9,7 \pm 1,5$ años	$9,6 \pm 0,5$ años
Sexo	5 femenino/ 4 masculino	6 femenino/ 3 masculino
COPD Promedio	0	$0,7 \pm 1$
ceod Promedio	0	$4 \pm 2,6$
Mediana	10 años	10 años

7.2 Crecimiento bacteriano.

A partir del 94% de las muestras de saliva, y desde el 100% de las muestras de sitios de caries, se obtuvo crecimiento en las placas con medio de cultivo MTPY, descrito como selectivo para *Bifidobacteriaceae* (Figura 5). Algunas de las U.F.C. desarrolladas, fueron identificadas presuntivamente como *Bifidobacterium* spp. por su aspecto de colonias blanquecinas, pequeñas, cóncavas y de bordes lisos (Whitman W. y cols., 2012).

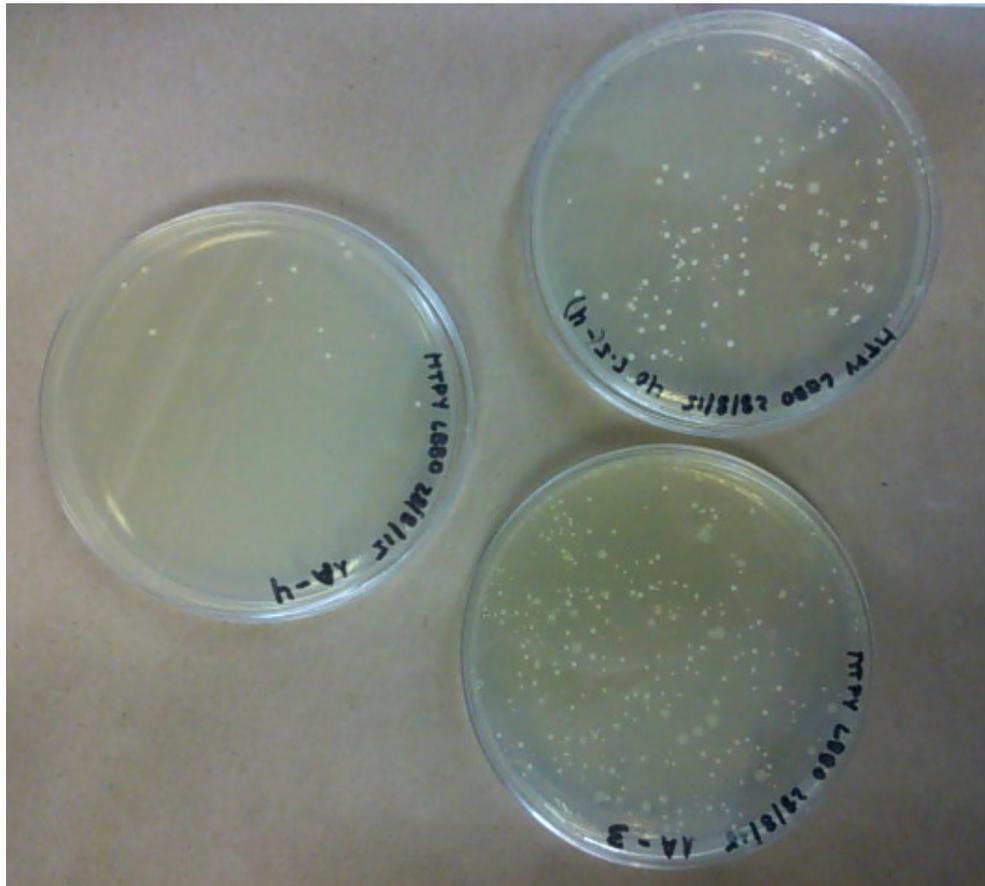


Figura 5: Presuntas U.F.C. de *Bifidobacteriaceae* crecidas en medio MTPY.

7.3 Purificación de ADN genómico y Reacción en Cadena de la Polimerasa.

A partir de las U.F.C. presuntamente identificadas como *Bifidobacterium* spp., se procedió a la purificación del ADN genómico (ADNg), tal como se señala en la sección 6.5 de materiales y métodos. El ADNg obtenido fue utilizado como molde para amplificar mediante PCR un fragmento de aproximadamente 500 pb utilizando oligonucleótidos específicos descritos para *Bifidobacteriaceae* (Beighton D. y cols., 2010). Se utilizó *B. animalis* spp. *lactis* DN173010 como control positivo de amplificación. Sólo un pequeño porcentaje de las muestras obtenidas desde un sitio con caries presentó amplificación positiva de un fragmento de 500 pb (Figura 6).

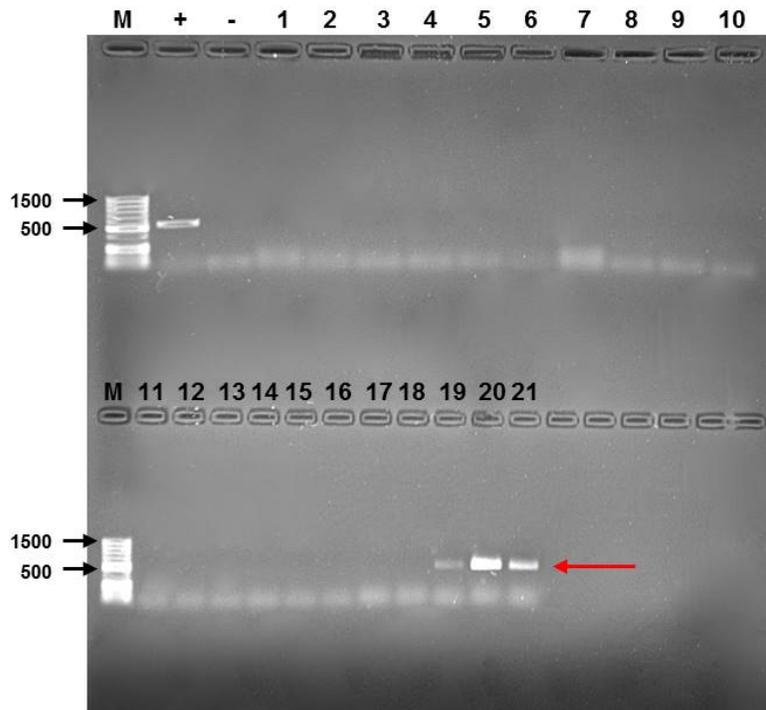


Figura 6: Amplificación por PCR de un fragmento de aproximadamente 500 pb del gen 16S rRNA de diferentes aislados clínicos. Se observa una foto representativa de un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X, que muestra el resultado de la PCR. **M**: marcador de tamaño molecular de ADN, **(+)**: control positivo con la cepa *B. animalis* spp. *lactis* DN173010, **(-)**: control negativo utilizando H₂O en vez de DNA molde en la reacción, **carriles 1-21**: diferentes aislados clínicos, **carriles 19, 20 y 21**: se indica con flecha roja los amplificadores de aproximadamente 500pb.

En ambos grupos, a partir de las muestras salivales, no hubo amplificación con los oligonucleótidos específicos para *Bifidobacteriaceae* lo que indicó ausencia de miembros de esta familia en estas muestras. Por esto, y para determinar a qué correspondían las especies aisladas en el medio MTPY, se realizó amplificación por PCR, mediante oligonucleótidos específicos de un fragmento de ADN de aproximadamente 1500 pb del gen de 16S rRNA bacteriano, como se describe en la sección 6.6 de materiales y métodos (Cogulu D. y cols., 2008). En este caso se utilizó ADNg de la cepa *L. casei* ATCC 334 como control positivo de amplificación (Figura 7). La mayoría de las muestras presentó amplificación positiva, indicando que correspondían a bacterias. Las muestras que no amplificaron fueron descartadas como hongos o levaduras.

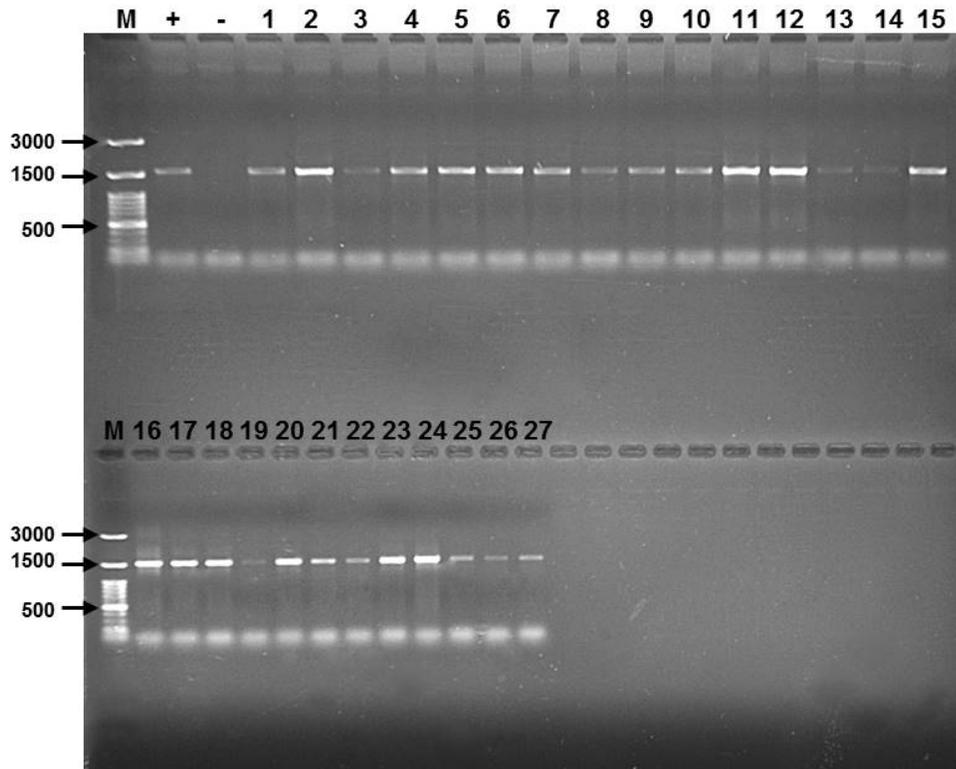


Figura 7: Amplificación por PCR de un fragmento de ADN de aproximadamente 1500 pb del gen de 16S rRNA bacteriano, en diferentes aislados clínicos. Se observa una foto representativa de un gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1X con el resultado de la PCR. **M** : marcador de tamaño molecular de ADN, **(+)**: control positivo con la cepa *L. casei* ATCC 334, **(-)**: control negativo utilizando H₂O en vez de DNA molde en la reacción, **carriles 1-27**: diferentes aislados clínicos con amplificación de aproximadamente 1500 pb.

7.4 Determinación de especies por secuenciación.

Los productos de PCR obtenidos desde las muestras, fueron enviados a Macrogen USA, para su respectiva secuenciación. Al analizar las secuencias obtenidas mediante alineamiento contra la base de datos no-redundante (nr) utilizando el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), y luego de corroborar los resultados utilizando la base de datos de 16S rRNA de bacterias y arqueas del NCBI, se evidenció que, pese a que el medio de cultivo se describe como selectivo para *Bifidobacteriaceae* (Beighton D. y cols., 2010), las especies que crecían en él, en general, no pertenecían a esta familia (Tabla 4 y Tabla 5).

7.4.1 Distribución de especies en cavidad oral, según experiencia de caries de los participantes.

En las muestras obtenidas desde la cavidad oral de los niños libres de caries, se encontró que las especies más predominantes pertenecían al género *Actinomyces*, con un total de 28 aislados (Tabla 4). Dentro de ellas, *A. odontolyticus* resultó ser la especie más abundante, con 21 de los 28 aislados del género. *Rothia mucilaginosa*, resultó ser la segunda especie más predominante en este grupo. Otras especies encontradas en menor proporción fueron, *Eubacterium sulci*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus rhamnosus*.

Con respecto a las muestras desde la cavidad oral de los niños con experiencia de caries, se encontró que las especies más abundantes también pertenecían al género *Actinomyces*, con 31 aislados, siendo *A. odontolyticus* la especie más abundante, con 19 de los 31 aislados del género, seguido por *A. oris*, con 10 aislados. El segundo género más predominante resultó ser *Lactobacillus*, con un total de 20 aislados, siendo *L. gasseri* la especie más abundante. Especies encontradas en menor número correspondieron a *Parascardovia denticolens*, *Pseudomonas* spp., *Rothia dentocariosa* y *Rothia mucilaginosa* (Tabla 4).

Al comparar la presencia de las diferentes especies en ambos grupos de niños se encontraron diferencias estadísticamente significativas para *R. mucilaginosa*, la cual se encontró asociada a la cavidad oral de sujetos libres de caries ($p= 0,023$),

y para *Actinomyces odontolyticus*, asociada a la cavidad oral de sujetos libres de caries (p= 0,039). Por otra parte, el género *Lactobacillus*, se vio fuertemente asociado a la cavidad oral de sujetos con experiencia de caries, en comparación a los libres de caries (p= 0,0095).

Tabla 4: Distribución de especies en cavidad oral de sujetos libres de caries y con experiencia de caries.

Especies	Nº de aislados		Cavidad oral libre de caries/ con experiencia de caries (p)
	Cavidad oral libre de caries *	Cavidad oral con experiencia de caries**	
<i>Actinomyces naeslundii</i>	3	2	0,38
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	21	19	0,039
<i>Actinomyces oris</i>	2	10	0,119
<i>Actinomyces spp.</i>	2	-	0,153
<i>Eubacterium sulci</i>	1	-	0,394
<i>Lactobacillus casei</i>	-	2	0,517
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	2	0,517
<i>Lactobacillus gasseri</i>	3	8	0,52
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	3	0,276
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1	1	1
<i>Lactobacillus salivarius</i>	-	1	1
<i>Lactobacillus spp.</i>	-	3	0,276
<i>Parascardovia denticolens</i>	-	4	0,151
<i>Pseudomonas spp.</i>	-	4	0,151
<i>Rothia dentocariosa</i>	-	1	1
<i>Rothia mucilaginosa</i>	8	3	0,023
TOTAL	41	63	
*Muestra de saliva. ** Muestra de saliva y sitio con caries (p) valores obtenidos mediante test exacto de Fisher, significancia estadística fijada en p<0,05.			

7.4.2 Distribución de especies en cavidad oral, según el tipo de muestra.

Al realizar el análisis por tipo de muestra (Tabla 5), se pudo observar que *A. odontolyticus* presentó asociación positiva con las muestras de saliva de los sujetos libres de caries, al comparar con las muestras provenientes de sitios de

caries ($p= 0,001$). Sin embargo, también se observó que *A. odontolyticus*, se encontraba asociado a muestras de saliva de sujetos con caries, en comparación a muestras desde sitios de caries ($p= 0,012$). *R. mucilaginoso*, asociada a la cavidad oral de sujetos libres de caries, se encontró fuertemente asociada a saliva de éstos, en comparación a sitios de caries ($p= 0,007$).

Por último, el género *Lactobacillus* se vio fuertemente asociado a sitios de caries, en comparación a muestras salivales de sujetos libres de caries ($p= 0,0021$), al igual que la especie *P. denticolens* ($p= 0,035$).

Tabla 5: Distribución de especies aisladas desde muestras de saliva de sujetos libres de caries y desde muestras de saliva y de sitios de caries de sujetos con experiencia de caries.

Especies	Nº de aislados			Saliva sin caries/ saliva caries (p)	Saliva sin caries/ sitios de caries (p)	Saliva con caries/ sitios de caries (p)
	Saliva libre de caries ♦	Saliva con experiencia de caries	Sitios con caries			
<i>Actinomyces naeslundii</i>	3	-	2	0,257	1	0,493
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	21	14	5	0,811	0,001	0,012
<i>Actinomyces oris</i>	2	5	5	0,124	0,23	1
<i>Actinomyces spp.</i>	2	-	-	0,505	0,499	-
<i>Eubacterium sulci</i>	1	-	-	1	1	-
<i>Lactobacillus casei</i>	-	-	2	-	0,195	0,493
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	1	1	0,422	0,445	1
<i>Lactobacillus gasseri</i>	3	4	4	0,445	0,692	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	3	-	0,841	0,239
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1	1	-	1	1	0,476
<i>Lactobacillus salivarius</i>	-	-	1	-	0,445	0,476
<i>Lactobacillus spp.</i>	-	-	3	-	0,084	0,239
<i>Parascardovia denticolens</i>	-	-	4	-	0,035	0,114
<i>Pseudomonas spp.</i>	-	2	2	0,175	0,195	1
<i>Rothia dentocariosa</i>	-	-	1	-	0,445	1
<i>Rothia mucilaginoso</i>	8	3	-	0,335	0,007	0,102
TOTAL	41	30	33			

♦ Se repiten datos de Tabla 4 para realizar comparación entre el total de muestras de ambos grupos. (p) valores obtenidos mediante test exacto de Fisher, significancia estadística fijada en $p<0,05$.

7.4.3 Distribución de especies según sujetos, en relación a su experiencia de caries.

Al realizar la exploración considerando como unidad de análisis los niños portadores de las diferentes especies en su cavidad oral, se pudo determinar que, de los 9 niños libres de caries, 7 (78%) presentaron especies del género *Actinomyces* (Tabla 6), siendo la especie más predominante *A. odontolyticus* (Tabla 7). 4 de los 9 niños (44%) presentaron aislados del género *Rothia*, los cuales fueron en su totalidad pertenecientes a la especie *R. mucilaginoso*, y 3 (34%), presentaron especies del género *Lactobacillus*, siendo la más predominante de ellas *L. gasseri*. Sólo 1 de los 9 sujetos (11%) presentó aislados de la especie *Eubacterium sulci*.

Tabla 6: Distribución de **géneros** bacterianos por sujetos libres de caries y con experiencia de caries.

Género	Nº de sujetos		Libres de caries/ con caries (p)
	% Libre de caries*	% Con experiencia de caries**	
<i>Actinomyces</i>	78% (7/9)	78% (7/9)	1
<i>Lactobacillus</i>	34% (3/9)	56% (5/9)	0,395
<i>Rothia</i>	44% (4/9)	34% (3/9)	1
<i>Parascardovia</i>	-	11% (1/9)	1
<i>Pseudomonas</i>	-	34% (3/9)	0,205
<i>Eubacterium</i>	11% (1/9)	-	1

*Muestra de saliva. ** Muestra de saliva y sitio con caries
Valores entre paréntesis indican número de sujetos que presentan aislados del género de un total de 9.
(p) valores obtenidos mediante test exacto de Fisher, significancia estadística fijada en p<0,05.

En el grupo de los 9 niños con experiencia de caries, las especies predominantes fueron las pertenecientes al género *Actinomyces*, encontrándose en 7 de los 9 sujetos (78%) (Tabla 6). Dentro de ellas, la más predominante resultó ser *A. odontolyticus* (Tabla 7). El segundo género más predominante correspondió a *Lactobacillus*, presente en 5 de los 9 sujetos. Dentro de ellas, *L. gasseri* fue la especie aislada desde un mayor número de sujetos (Tabla 7). Especies

pertenecientes al género *Rothia* fueron encontradas en 3 de los 9 sujetos (34%) al igual que *Pseudomonas* spp. (34%). Sólo a partir de 1 de los 9 sujetos (11%), fue posible aislar *Parascardovia denticolens*.

Tabla 7: Distribución de **especies** por sujetos libres de caries y con experiencia de caries.

Especies	Nº de sujetos		Libre de caries/con caries (p)
	Libre de caries*	Con experiencia de caries**	
<i>Actinomyces naeslundii</i>	3	2	1
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	4	5	0,673
<i>Actinomyces oris</i>	2	3	1
<i>Actinomyces</i> spp.	2	-	0,47
<i>Eubacterium sulci</i>	1	-	1
<i>Lactobacillus casei</i>	-	1	1
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	2	0,47
<i>Lactobacillus gasseri</i>	2	3	1
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	1	1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1	1	1
<i>Lactobacillus salivarius</i>	-	1	1
<i>Lactobacillus</i> spp.	-	1	1
<i>Parascardovia denticolens</i>	-	1	1
<i>Pseudomonas</i> spp.	-	3	0,205
<i>Rothia dentocariosa</i>	-	1	1
<i>Rothia mucilaginosa</i>	4	2	0,619

*Muestra de saliva. ** Muestra de saliva y sitio con caries
(p) valores obtenidos mediante test exacto de Fisher, significancia estadística fijada en p<0,05.

7.4.4 Distribución de especies según sujetos, en relación al tipo de muestra.

Una de las especies más predominante en los sujetos libres de caries fue *R. mucilaginosa*, siendo aislada a partir de muestras de saliva de 4 de los 9 niños libres de caries, es decir se encontró presente en el 44% de estos participantes (Tabla 8). Esta especie se encontró también presente en niños con experiencia de caries, pero sólo a partir de muestras de saliva de 2 de los 9 niños de este grupo

(22,2%). La presencia de este microorganismo en estas dos muestras no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p=0,62$).

Las especies *L. casei*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *P. denticolens* y *R. dentocariosa* fueron encontradas exclusivamente en sitios de caries (Tabla 8). A pesar de ello, ninguna de estas especies presentó una asociación estadísticamente significativa a este tipo de muestra, al comparar con las muestras de saliva pertenecientes al mismo grupo de niños ($p= 1$ en todos los casos), o al comparar con las muestras salivales del grupo libre de caries ($p= 1$ en todos los casos).

Tabla 8: Distribución de especies por sujetos según tipo de muestra (saliva y sitio con caries).

Especies	Nº de sujetos			Saliva sin caries/ saliva caries (p)	Saliva sin caries/ sitios con caries (p)	Saliva con caries/ sitios con caries (p)
	Saliva libre de caries ♦	Saliva con experiencia de caries	Sitios con caries			
<i>Actinomyces naeslundii</i>	3	-	2	0,205	1	0,47
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	4	5	2	0,673	0,619	0,334
<i>Actinomyces oris</i>	2	2	3	1	1	1
<i>Actinomyces spp.</i>	2	-	-	0,47	0,47	-
<i>Eubacterium sulci</i>	1	-	-	1	1	-
<i>Lactobacillus casei</i>	-	-	1	-	1	1
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	1	1	1	1	1
<i>Lactobacillus gasseri</i>	2	3	1	1	1	0,576
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	1	-	1	1
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1	1	-	1	1	1
<i>Lactobacillus salivarius</i>	-	-	1	-	1	1
<i>Lactobacillus spp.</i>	-	-	1	-	1	1
<i>Parascardovia denticolens</i>	-	-	1	-	1	1
<i>Pseudomonas spp.</i>	-	2	2	0,47	0,47	1
<i>Rothia dentocariosa</i>	-	-	1	-	1	1
<i>Rothia mucilaginoso</i>	4	2	-	0,619	0,082	0,47

♦ Se repiten datos de Tabla 7, para realizar comparación entre el total de sujetos del estudio según tipo de muestra.
(p) valores obtenidos mediante test exacto de Fisher, significancia estadística fijada en $p<0,05$.

7.5 Diferenciación de genotipos de las especies por REP-PCR.

Del total de especies identificadas en este estudio, *Parascardovia denticolens* fue la única especie aislada perteneciente a la familia *Bifidobacteriaceae*, obteniéndose un total cuatro aislados de esta cepa desde el sitio con caries de un sólo sujeto del estudio. Los purificados del ADNg de los cuatro aislados de *Parascardovia denticolens*, obtenidos como se señala en la sección 6.5 de materiales y métodos, fueron analizados genotípicamente mediante amplificación por REP-PCR como se describe (Beighton D. y cols., 2008) (Figura 8). A pesar de que los 4 aislados provenían de un solo individuo y a partir exclusivamente desde un sitio con caries, todos exhibieron diferentes genotipos, indicando un alto grado de diversidad, sin embargo, mostraron un origen mono-filético (Figura 8).

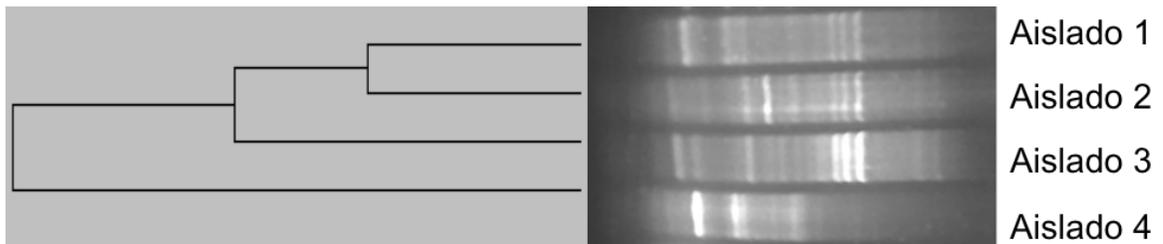


Figura 8: Genotipificación de aislados clínicos de *P. denticolens* por REP-PCR. A la derecha se observa una foto representativa de un gel de agarosa 1,5% en tampón TAE 1X con el resultado de la REP-PCR. A la izquierda, resultado de dendrograma, mostrando el origen mono-filético. La agrupación fue realizada desde los perfiles electroforéticos de REP-PCR utilizando el programa TreeCon.

8. DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como propósito evaluar la diversidad de especies y genotipos de *Bifidobacterium* spp., en saliva y caries dentinaria de niños chilenos de 7 a 11 años de edad con caries, y en saliva de niños libres de caries.

La importancia de este estudio, se basa en el papel primordial asignado a la microbiota oral en el desarrollo de la caries dental, la patología crónica más prevalente en la población Chilena. *Bifidobacterium* spp. han sido ampliamente relacionadas con el desarrollo de caries dental en adultos (Modesto M. y cols., 2006; Beighton D. y cols., 2008; Mantzourani M. y cols., 2009), sin embargo, existe un déficit de información sobre la presencia y el papel que podrían cumplir en cavidad oral de niños. Determinar si *Bifidobacterium* spp. está asociado al desarrollo de caries dental en niños, sería crucial para el desarrollo de estrategias preventivas y de control del desarrollo de estas cepas bacterianas.

Fueron seleccionados para este estudio 18 participantes entre los 7-11 años de edad, 9 sin experiencia de caries y 9 que presentaban al menos una lesión de caries cavitada. El grupo de niños con experiencia de caries fue representativo de la realidad nacional, ya que se pudo observar que el COPD promedio de ellos, cuyo análisis arrojó un valor de 0,66, se encuentra dentro del rango nacional determinado por el MINSAL para niños entre los 6 y 12 años (0,16 y 1,9 respectivamente) (Soto L. y cols., 2007a; 2007b).

La hipótesis planteada en este estudio menciona que existe una menor diversidad de especies de *Bifidobacterium*, así como una mayor variedad de genotipos de estas especies, en saliva y lesiones de caries de niños chilenos de 7 a 11 años de edad con caries dentinaria, en comparación a saliva de niños sin caries. No fue posible refutar ni validar esta hipótesis, ya que desde ninguna de las muestras de los sujetos analizados, se logró aislar especies del género *Bifidobacterium*, pese a que a partir del 94% de las muestras de saliva, y desde el 100% de las muestras de sitios de caries, se obtuvo crecimiento bacteriano en las placas de medio de cultivo MTPY.

Una de las posibles causas de este resultado podría ser la ausencia de este

género bacteriano en el rango etario estudiado, es decir, a la existencia de una edad mínima de colonización de la cavidad oral por estas especies, la que podría ser superior a la evaluada en el presente estudio. El trabajo realizado por Kaur R. y cols. el año 2013, describe recuentos salivales de *Bifidobacteriaceae* en 38 niños con caries con edad promedio de $5,17 \pm 0,34$ y 22 niños libres de caries con una edad promedio de $6,82 \pm 0,46$. Sin embargo, estos recuentos se basan exclusivamente en el crecimiento de U.F.C. en medio de cultivo MTPY, y los autores no corroboraron la presencia de estos microorganismos por estudios moleculares o bioquímicos, por lo que los recuentos podrían corresponder a otros microorganismos, tal como sucedió en este estudio.

Otras posibles razones por la que no se encontraron especies del género *Bifidobacterium*, podrían estar relacionadas con variables metodológicas, tales como condiciones de transporte de la muestra, de cultivo o el medio de crecimiento utilizado. Si bien, las muestras de sitios de caries, así como las diluciones tanto de estas muestras como de las muestras salivales, se realizaron en buffer fosfato salino, tal como se describe en Kuribayashi M. y cols., 2012, , otros estudios han utilizado para el aislamiento de *Bifidobacterium* spp. un medio de transporte suplementado con inhibidores de la absorción de oxígeno (Fastidious Anaerobe Broth o FAB) (Kaur R. y cols. 2013; Beighton D. y cols., 2008), lo que podría favorecer el traslado de estas cepas.

Los estudios realizados por Beighton y cols. el año 2008 y 2010, señalan que el medio de cultivo MTPY, es selectivo para la familia *Bifidobacteriaceae*. Sin embargo, otros autores señalan que especies del género *Bifidobacterium*, pertenecientes a esta familia, poseen características fisiológicas y condiciones de cultivo similares con otras especies bacterianas, tales como *Actinomyces* y *Lactobacillus*, las que fueron obtenidas predominantemente en el presente estudio (Whitman W. y cols., 2012). Por esta razón, se requeriría suplementar este medio de cultivo con pruebas bioquímicas especiales para la correcta diferenciación de las U.F.C. de este género, como se describe en Whitman W. y cols., 2012.

En ambos grupos de estudio, las especies aisladas en mayor número, pertenecían al género *Actinomyces*, las que estuvieron presentes en un 78% de los sujetos de

cada grupo, correspondiendo al 68% de los aislados en los sujetos libres de caries y al 50% de los aislados en los niños con experiencia de caries. Especies pertenecientes al género *Actinomyces*, han sido descritas en la literatura como colonizadores tempranos de la cavidad oral (Lakshman S., 2006; Marsh P. y cols., 2009; Struzycha I., 2014), lo que se correlacionaría con lo encontrado en este estudio. Su frecuencia de aislamiento desde la saliva en niños, aumenta con la edad, encontrándose en un 31% de los niños a los 2 meses y en un 97% a los 2 años, siendo *A. odontolyticus*, la especie mayormente aislada, seguida en frecuencia por *A. naeslundii* y *A. viscosus* (Sarkonen N., 2007). En este estudio, la más predominante también correspondió a *A. odontolyticus*, la que se encontró fuertemente asociado a saliva, tanto de sujetos libres de caries como de sujetos con experiencia de caries, en comparación a sitios de caries ($p= 0,001$ y $p= 0,012$, respectivamente). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas de su presencia en saliva de sujetos libres de caries versus saliva de sujetos con caries, indicando que sería un microorganismo habitualmente presente en saliva en este rango de edad. En el estudio de Mager y cols. (2003), *A. odontolyticus* se encontró en proporciones significativamente más altas en saliva y lengua, en comparación con otros sitios, tales como la encía adherida en adultos sanos.

Si bien estos colonizadores iniciales han sido asociados en diversos estudios al desarrollo de la caries dental (Marsh P. y cols., 2009; Karpinski T., Szkaradkiewicz A., 2013), según los resultados obtenidos en el presente estudio, no es posible realizar una asociación del género *Actinomyces* a estados de salud (libres de caries) o enfermedad (con experiencia de caries), ya que se encuentra ampliamente distribuido en la saliva de los niños pertenecientes a ambos grupos (con y sin caries).

Otra especie que apareció abundantemente en este estudio resultó ser *Rothia mucilaginosa*, la que se vio asociada de forma estadísticamente significativa, a la cavidad oral de los sujetos libres de caries en comparación a los con experiencia de caries ($p= 0,023$) y a muestras de saliva de sujetos libres de caries, en comparación a sitios de caries ($p= 0,0072$). La literatura señala que el género *Rothia* coloniza la cavidad oral desde la erupción de los primeros dientes y durante el primer año de vida (Struzycha I., 2014, Lakshman S., 2006). Sin embargo,

también lo mencionan como un género bacteriano que participa en el avance de lesiones dentinarias (Marsh P. y cols., 2009; Karpinski T. y Szkaradkiewicz A., 2013). *R. dentocariosa* y *R. mucilaginoso* han sido comúnmente aisladas desde la cavidad oral y faringe, respectivamente. A pesar de que estudios previos, señalan una mayor prevalencia del género *Rothia* en sitios de caries y saliva de sujetos con experiencia de caries en comparación a sujetos libres de caries (Jagathrakshakan S. y cols., 2015), el resultado del presente estudio no se condice con ello, ya que se obtuvo el doble de aislados de este género en el grupo libre de caries en comparación al con experiencia de caries. En este estudio, se obtuvo un solo aislado de *Rothia dentocariosa* a partir desde un sitio con caries.

Lactobacillus spp. fueron especies mayormente aisladas desde los sujetos con experiencia de caries, presentes en un 56% de los sujetos de este grupo. Este género se vio fuertemente asociado a la cavidad oral de sujetos con experiencia de caries ($p= 0,0095$), y a sitios de caries, en comparación a muestras salivales de sujetos libres de caries ($p= 0,0021$). Las especies que forman parte de este género son anaeróbicas o aerotolerantes, altamente acidogénicas y acidúricas, y cuya predominancia se describe en hábitats retentivos, en condiciones ácidas severas y prolongadas (Takahashi N. y Nyvad B., 2011). En la literatura han sido clasificadas como colonizadores oportunistas, de alta prevalencia en lesiones de caries avanzadas de dentina (Marsh P. y cols., 2009; Jagathrakshakan S. y cols., 2015), y baja prevalencia en sujetos libres de caries (Caufield P. y cols., 2015). Por otra parte, se ha descrito que *Lactobacillus* spp. posee propiedades similares a *Bifidobacterium* spp., con las cuales coexiste en la cavidad oral (Dige I. y cols., 2014; Kianoush N. y cols., 2014). Toda la información anteriormente planteada, se condice con los resultados obtenidos, ya que las cepas pertenecientes a este género, fueron en su mayoría aisladas desde sujetos con experiencia de caries y desde los mismos sitios de caries. El bajo nivel de aislados desde saliva de ambos grupos, podría deberse a la característica de estas cepas de colonizar hábitats específicamente retentivos, por lo que su rol en el proceso de la caries dental sería principalmente como invasor secundario, en lugar de iniciador de éstas.

La única especie aislada del estudio perteneciente a la familia *Bifidobacteriaceae* fue *Parascardovia denticolens*, la que se vio fuertemente asociada a sitios de

caries en comparación a saliva de sujetos sin caries ($p= 0,035$). El género *Parascardovia*, conformado a la fecha exclusivamente por *P. denticolens* (<http://www.bacterio.net/-allnamesmr.html>), comparte las mismas características que *Bifidobacterium*, correspondiendo a cepas Gram positivas, anaeróbicas, no formadoras de esporas, no móviles, acidúricas y acidogénicas (Whitman W. y cols., 2012). Modesto M. y cols., (2006), en un estudio sobre prevalencia y distribución de *Bifidobacteriaceae* en la placa dental y sitios de caries de adultos, señaló que el recuento de *P. denticolens* se distribuye de manera similar tanto en sitios de caries como en la placa dental. Como se mencionó anteriormente, *Bifidobacterium* spp. comparte características similares en cuanto a su crecimiento, con especies pertenecientes al género *Lactobacillus* con las que coexiste en boca, por lo que probablemente también requieren de un hábitat retentivo específico para su asentamiento en la cavidad oral, razón presuntiva por la cual en el presente estudio, *P. denticolens* fue aislada en su totalidad desde un sitio con caries.

En el análisis de los genotipos bacterianos de los cuatro aislados de *P. denticolens* mediante REP-PCR, se observó que, pese a que provenían desde un mismo sitio con caries a partir de un sujeto, fueron genotípicamente diferentes entre ellos, lo que indicaría una alta diversidad. Estos resultados se condicen con lo descrito en *Lactobacillus* spp. en estudio realizado por Piwat S. y cols. el año 2010, que analizó la diversidad de especies y genotipos presentes en la cavidad oral de niños, y concluyó que existe una mayor variedad de genotipos de estas especies en el grupo de alta prevalencia de caries, en comparación a los individuos del grupo de baja prevalencia de caries. Esto podría deberse al hecho de que en un ambiente carioso, con una alta disponibilidad de azúcares en el medio, se podría ver favorecida la diversificación genética de las cepas (Beighton y cols., 1996), otorgando diferentes características fenotípicas, las cuales se relacionarían con la sobrevivencia de estas cepas.

La incorporación de conocimiento con respecto a la adquisición, conformación y composición de la microbiota oral, tanto en estados de salud, como durante el desarrollo de patologías orales, tales como la caries dental, resulta primordial en el ámbito odontológico al momento de centrar esfuerzos en su prevención y

temprana intervención. Diversos estudios señalan una relación entre la presencia de *Bifidobacterium* spp. y el desarrollo de caries dental, por lo que el control de variables responsables de su proliferación en la cavidad oral, tales como la higiene oral, dieta, frecuencia del consumo de azúcar, y factores relacionados con el hospedero, junto con una temprana detección de las cepas bacterianas, mediante pruebas tanto bioquímicas como microbiológicas, ayudaría en el diseño de estrategias preventivas y de control del desarrollo de las mismas.

9. CONCLUSIONES

- En este estudio no se logró validar ni refutar la hipótesis de trabajo, debido a que no fue posible aislar *Bifidobacterium* spp. desde las muestras de los sujetos participantes.
- Se encontró asociación entre algunas de las especies aisladas en este estudio con la experiencia de caries de los sujetos y el tipo de muestra. *Actinomyces odontolyticus* fue asociado a la saliva de los niños, independiente de su experiencia de caries. *Rothia mucilaginosa* fue asociada a la cavidad oral de los sujetos libres de caries. *Lactobacillus* spp. se vio asociado a la cavidad oral de sujetos con experiencia de caries.
- *Parascardovia denticolens* estuvo fuertemente asociada a sitios de caries. Los aislados presentaron una amplia variedad de genotipos, pero con un mismo origen filogenético.

10. SUGERENCIAS

- Se recomienda realizar estudios longitudinales, que ayuden a dilucidar el rango etario de colonización de *Bifidobacterium* spp. en la microbiota oral de niños Chilenos.
- Aumentar el número de individuos evaluados por grupo, en un futuro estudio.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alam S., Brailsford S., Whiley R., Beighton D. (1999). PCR-based methods for genotyping Viridans group Streptococci. *J Clin Microbiol* 37:2772–2776.
- Badenier O., Moya R., Cueto A. (2007). Prevalencia de las enfermedades buco dentales y necesidades de tratamiento en la V Región. Proyecto FONIS.
- Banco Mundial de Datos OMS, citado en el informe del Comité de Expertos de la OMS. Métodos y Programas de Prevención de las Enfermedades Buco-Dentales. Ginebra 1983.
- Beighton D., Adamson A., Rugg-Gunn A. (1996). Associations between dietary intake, dental caries experience and salivary bacterial levels in 12-year-old english schoolchildren. *Arch Oral Biol* 41:271-280.
- Beighton D. (2005). The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol* 33:248–255.
- 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.
- 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 Dent Res* 89:970-974.
- Berkowitz R. (2006). Mutans streptococci acquisition and transmission. *Pediatr Dent* 2:106-109.
- Bowden G., Hamilton I. (1998). Survival of oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 9:54-85.
- Caufield P., Schön C., Saraithong P., Li Y., Argimón S. (2015). Oral Lactobacilli and Dental Caries: A Model for Niche Adaptation in Humans. *JDR Clinical Research Supplement* 94:110S-8S.
- Ceballos M., Acevedo C., Corsini G., Jans A. (2007). Diagnóstico en Salud Bucal de niños de 2 y 4 años que asisten a la educación preescolar en la Región Metropolitana. Chile. MINSAL.
- Chen T., Yu W-H., Izard J., Baranova O., Lakshmanan A. y Dewhirst F. (2010). The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource

for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database*. doi: 10.1093/database/baq013

- 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.
- Costello E., Lauber C., Hamady M., Fierer N., Gordon J., Knight R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 326:694–1697.
- Dewhist F., Chen T., Izard J., Paster B., Tanner A., Yu H., Lakshmanan A., Wade W. (2010). The Human Oral Microbiome. *J Bacteriol* 192:5002–5017.
- Dige I., Gronkjær L., Nyvad B. (2014). Molecular studies of the structural ecology of natural occlusal caries. *Caries Res* 48:451-460.
- Domínguez M., Costello E., Contreras M., Magris M., Hidalgo G., Fierer N. (2010). Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:11971–11975.
- Gruebbel A. (1944). A measurement of dental caries prevalence and treatment service for deciduous teeth. *J Dent Res* 23:163-168.
- Haukioja A., Söderling E., Tenovuo J. (2008). Acid production from sugars and sugar alcohols by probiotic lactobacilli and bifidobacteria *in vitro*. *Caries Res* 42:449-453.
- 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.
- International Caries Detection and Assessment System Coordinating Committee. (2005). Criteria Manual: International Caries Detection and Assessment System (ICDAS II). Workshop held in Baltimore, Maryland.
- Ismail A., Sohn W., Tellez N., Amaya A., Sen A., Hasson H., Pitts N. (2007). The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 35:170–178.

- Jagathrakshakan S., Sethumadhava R., Mehta D., Ramanathan A. (2015). 16S rRNA gene-based metagenomic analysis identifies a novel bacterial co-prevalence pattern in dental caries. *European Journal of Dentistry* Vol 9.
- Jakubovics N. (2015). Intermicrobial interactions as a driver for community composition and stratification of oral biofilms. *J Mol Biol* 427:3662-3675.
- Karpinski T., Szkaradkiewicz A. (2013). Microbiology of dental caries. *J Biol Earth Sci* 3: M21-M24
- Kaur R., Gilbert S., Sheehy E., Beighton D. (2013). Salivary levels of Bifidobacteria in caries-free and caries-active children. *Int J Paediatr Dent* 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* 9:e92940.
- Klein H. y Palmer C. (1937). Dental caries in the American Indian children. *Public Health Bulletin* 239.
- Kolenbrander P., Andersen R., Blehert D. (2002). Communication among oral bacteria. *Microbiol Molec Biol Rev* 66: 486-505.
- Kuboniwa M. y Lamont R. (2010). Subgingival biofilm formation. *Periodontol* 2000 52:38-52.
- Kuribayashi M., Kitasako Y., Martin K., Sadr A., Shida K., Tagami J. (2012). Intraoral pH measurement of carious lesions with qPCR of cariogenic bacteria to differentiate caries activity. *J Dent* 40:222-228.
- Lakshman S. (2006). Normal oral flora, the oral ecosystem and plaque biofilms. *Essential microbiology for dentistry Third Ed* 255-265.
- Lee Y., Zimmerman J., Custodio W., Xiao Y., Besiri T., Hatibovic K. (2013). Proteomic evaluation of acquired enamel pellicle during *in vivo* formation. *PloS One* 8:e67919.
- Lefimil C., Lozano C., Morales-Bozo I., Plaza A., Maturana C., Urzúa B. (2013). DNA from oral bacteria by sodium hydroxide–paper method suitable for polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 433:129-131.
- Mager D., Ximenez L., Haffajee A., Socransky S. (2003). Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol* 30 Issue 7: 644-654.

- 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 P. (1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res* 8:263-271.
- Marsh P. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes?. *Microbiology* 149:279-94.
- Marsh P. (2005). Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *J Clin Periodontol* 32 Suppl 6:7-15.
- Marsh P. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health* 6:S14.
- Marsh P., Martin M., Lewis M., Williams D. (2009). Oral Microbiology. Fifth edition. Edinburgh London New York Oxford Philadelphia St Louis Sydney Toronto. Churchill Livingstone Elsevier.
- MINSAL. (2008). Informe final: Estudio de carga de enfermedad y carga atribuible. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile.
- MINSAL. (2011). Metas 2011-2020, Elige vivir sano. Estrategia Nacional de Salud para el cumplimiento de los objetivos sanitarios de la década 2011-2020. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile.
- MINSAL. (2013). Guía clínica AUGE salud oral integral para niños y niñas de 6 años. Serie Guías Clínicas MINSAL, Ministerio de Salud. Gobierno de Chile.
- Modesto M., Biavalti B., Mattarelli P. (2006). Occurrence of family Bifidobacteriaceae in human dental caries and plaque. *Caries Res* 40:271-276.
- 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.
- Navazesh M. (1993). Methods for collecting saliva. *Ann N Y Acad Sci* 694: 72-77.
- OMS, World Health Organization (WHO). (1987). Oral health surveys. Basic Methods. 3rd ed. Geneva: WHO.

- OMS, World Health Organization (WHO). (1997). Oral health surveys: Basic methods. 4th ed. Geneva: WHO.
- Piwat S., Teanpaisan R., Thitasomakul S., Thearmontree A. y Dahlén G. (2010). *Lactobacillus* species and genotypes associated with dental caries in Thai preschool children. *Mol Oral Microbiol* 25:157-164.
- Sarkonen N. (2007). Oral *Actinomyces* Species in Health and Disease: Identification, Occurrence and Importance of Early Colonization. Publications of the National Public Health Institute. A8/2007, 77 Pages
- Selwitz R., Ismail A., Pitts N. (2007). Dental Caries. *Lancet* 369:51-59.
- Sheiham A. (2005) Oral health, general health and quality of life. *Bull World Health Organ* 83:644.
- Shivakumar K., Sumanth P., Chandu G. (2009). International Caries Detection and Assessment System: A new paradigm in detection of dental caries. *J Conserv Dent* 12:10–16.
- Soto L., Tapia R., Jara G., Rodríguez G. (2007). Diagnóstico Nacional de Salud Bucal de los niños de 6 años. Santiago: MINSAL.
- Soto L., Tapia R., Jara G., Rodríguez G., Urbina T., Venegas C. (2007). Diagnóstico nacional de salud bucal del adolescente de 12 años y evaluación del grado de cumplimiento de los objetivos sanitarios de salud bucal 2000-2010. Santiago: MINSAL
- Struzycka I. (2014). The oral microbiome in dental caries. *Pol J Microbiol* 63:127-135.
- Sun Z., Zhang W., Guo C., Yang X., Liu W. , Wu Y., Song Y., Kwok L., Cui Y., Menghe B., Yang R., Hu L., Zhang H. (2014). Comparative genomic analysis of 45 type strains of the genus *Bifidobacterium*: A snapshot of its genetic diversity and evolution. *PLoS ONE* 10:e0117912.
- Takahashi N. y Nyvad B. (2008). Caries ecology revisited: Microbial dynamics and the caries process. *Caries Res* 42:409-418.
- Takahashi N. y Nyvad B. (2011). The role of bacteria in the caries process: Ecological perspectives. *J Dent Res* 90:294-303.
- Turroni F., Van Sinderen D., Ventura M. (2010). Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *Int J Food Microbiol* 149:37–44.

- Van de Peer Y., De Wachter R. (1994). TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Applic Biosci* 10: 569-570.
- Ventura M., Turrone 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 Gene* 5:e1000785.
- Wade W. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res* 69:137–143.
- 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.
- Zaura E., Nicu E., Krom B., Keijser B. (2014). Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. *Front Cell Infect Microbiol* 26:4-85.
- Zhou Y., Gao H., Mihindukulasuriya K., La Rosa P., Wylie K., Vishnivetskaya T. (2013). Biogeography of the ecosystems of the healthy human body. *Genome Biol* 14.

12.- ANEXOS

12.1 Acta de Aprobación del Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile



04/12/2012

ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

ACTA N°: 2012/18

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

Dr. Juan Cortes
Presidente

Valentina Fajreldin
Miembro permanente del CEC

Dr. Eduardo Rodríguez
Miembro permanente del CEC

Dr. Alejandro Escobar
Miembro permanente del CEC

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

8. Carácter de la población

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

9. Fundamentación de la aprobación

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

ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

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

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

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

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Aprueba por unanimidad de sus miembros el estudio: Regulación de la respuesta de tolerancia a ácido en *Lactobacillus casei*: 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 Lefimil como Investigador Principal.

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



Dr. Juan Cortés
Presidente del CE



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

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



Fecha firma / /

1

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 / /



2

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 / /

12.3 Ficha Clínica



Fecha: / /

FICHA CLÍNICA

Nombre: _____ Fecha de Nacimiento: / /

Edad: _____ Nacionalidad: _____ Nombre Apoderado: _____

Nacionalidad Apoderado: _____ Tel: _____

Colegio: _____ Curso: _____

Examen Clínico

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

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

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

Examen Dentario

1.7	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7
<input type="checkbox"/>													

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

⊕ Indicadores de Riesgo

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

Diagnóstico:

Derivaciones:

Plan de Tratamiento:

Evolución:

Fecha	Acciones	Firma

Evolución de Indicadores durante el tratamiento

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

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