



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

“Resistencia a ácido e identificación de aislados clínicos de *Lactobacillus* spp. de la cavidad oral de niños de 7 a 11 años sin experiencia de caries versus con caries dentinarias profundas.”

Claudia Alejandra Luzanto Tapia.

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente, PhD.

TUTORES ASOCIADOS

Dr. Andrés Celis Sersen.

Prof. Marta Gajardo Ramírez.

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

Santiago - Chile

2016



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

“Resistencia a ácido e identificación de aislados clínicos de *Lactobacillus* spp. de la cavidad oral de niños de 7 a 11 años sin experiencia de caries versus con caries dentinarias profundas.”

Claudia Alejandra Luzanto Tapia.

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE

CIRUJANO-DENTISTA

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente, PhD.

TUTORES ASOCIADOS

Dr. Andrés Celis Sersen.

Prof. Marta Gajardo Ramírez.

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

Santiago - Chile

2016

*A mis padres, Claudia y Alejandro
por su apoyo y amor incondicional.
Gracias por la confianza, la paciencia
y el cariño que me han entregado
durante toda mi vida.
Sin ustedes nada de esto sería posible.*

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi tutora principal, la Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente, por su paciencia y dedicación durante el desarrollo de este trabajo de investigación, por su excelente disposición a la hora de aclarar mis dudas y entregarme sus conocimientos siempre con la mejor de sus sonrisas.

A mis tutores asociados, Dr. Andrés Celis Sersen y Prof. Marta Gajardo Ramírez por acompañarme desde mis inicios en el laboratorio de microbiología, por su colaboración y apoyo durante este proceso, pero sobre todo por su amistad y cariño incondicional.

De manera especial quisiera agradecer también a todo el Laboratorio de Bioquímica y Biología Oral, especialmente a la Prof. Dra. Carla Lozano, a Katherine Vera, Andrea Cortes y Oriana Flores, por su ayuda y orientación durante el desarrollo de este trabajo, por su buena disposición y el cariño entregado durante estos 2 años de trabajo en el laboratorio.

Agradezco también a todos los amigos que hice durante estos años de universidad, especialmente a Valentina Arcos, Daniela Mansilla, Gustavo González, Cristobal Olid, María José Alvarado, Macarena Leyton y Daniel Miranda por ser mi gran apoyo cuando las cosas se ponían difíciles, por el cariño y la amistad que siempre me han brindado.

A mi gran amigo Joaquín Morales, por ser mi familia en Santiago, por acompañarme hasta en los peores momentos y siempre confiar en mí.

Por último quisiera agradecer a mi familia, a mis padres, a quienes les debo todo, gracias por la paciencia, por el amor y la confianza que depositaron en mí durante todos estos años de universidad, a “Janito” mi hermano por ser mi gran compañero y amigo, han sido un pilar fundamental durante toda mi vida y sin ustedes nada de esto sería posible.

ÍNDICE

1.- Resumen	1
2.- Marco Teórico	4
2.1.- Caries Dental	4
2.2.- Sistemas de Evaluación y Diagnostico de Caries	6
2.3.- Microbiología de la Caries Dental	8
2.4.- <i>Lactobacillus</i> spp. y Caries Dental	10
2.5.- <i>Lactobacillus</i> spp., Acidogénesis y Resistencia a Ácido.....	14
3.- Hipótesis	17
4.- Objetivo General	17
5.- Objetivos Específicos	17
6.- Materiales y Métodos	18
6.1.- Aislamiento de <i>Lactobacillus</i> spp. a partir de muestras de lesiones de caries dentinarias y saliva de niños de 7-11 años con caries y libres de caries, en base a sus diferentes capacidades de resistencia a ácido.	18
6.1.1 Reclutamiento de sujetos y examen clínico.	18
6.1.2 Toma de muestras de saliva y de sitios de caries dentinarias profundas	19
6.1.3 Crecimiento y aislamiento de <i>Lactobacillus</i> spp. de acuerdo a su capacidad de resistencia a ácido	19
6.2.- Determinación de la identidad de las especies de <i>Lactobacillus</i> aisladas a partir de muestras de lesiones de caries y saliva de niños de 7-11 años con caries dentinarias profundas y de niños sin caries	20
6.2.1 Purificación del ADN genómico	20

6.2.2	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	20
6.2.3	Electroforesis de ADN en geles de agarosa	21
6.2.4	Purificación del producto de PCR	21
6.2.5	Secuenciación y análisis	22
6.3.-	Análisis comparativo de la presencia de las distintas especies de <i>Lactobacillus</i> en las muestras de lesiones de caries y saliva de niños de 7-11 años con caries dentinarias profundas y niños sin caries, y su relación con la resistencia a ácido.....	22
6.3.1	Análisis estadísticos	22
7.-	Resultados	24
7.1.-	Caracterización demográfica de la población en estudio	24
7.2.-	Crecimiento bacteriano	25
7.3.-	Purificación de ADN genómico y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	27
7.4.-	Análisis de secuenciación	28
7.4.1	Distribución de especies según el tipo de muestra	28
7.4.2	Distribución de especies por individuo, según condición de salud oral de los participantes (libres de caries v/s con caries) y tipo de muestra.....	30
7.4.3	Distribución de especies según su capacidad de resistencia a ácido.....	31
8.-	Discusión	34
9.-	Conclusiones	43
10.-	Sugerencias	44

11.- Referencias Bibliográficas	45
12.- Anexos	52
12.1.- Carta de Aprobación del Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile	52
12.2.- Carta Autorización para Toma de Muestras en Unidad de Diagnóstico	54
12.2.- Consentimiento Informado	55
12.3.- Ficha Clínica	58

1.- RESUMEN

La caries dental es una de las enfermedades crónicas infecciosas más prevalentes en el mundo. Las lesiones de caries se desarrollan al producirse la pérdida del equilibrio entre los procesos de desmineralización y remineralización del esmalte y dentina, debido a disminuciones en el pH ambiental, que alcanzan el nivel crítico de desmineralización del esmalte (pH 5,5). Esta disminución en el pH se produce debido a la presencia de una biopelícula bacteriana en la superficie dental, compuesta por bacterias acidogénicas (capaces de producir ácidos) y acidúricas (capaces de sobrevivir en un ambiente ácido y seguir produciendo ácido), que producen ácidos orgánicos como producto de la fermentación de carbohidratos de la dieta.

Una de las especies dominantes en la biopelícula bacteriana dental corresponde a *Lactobacillus*, uno de los géneros más grandes y diversos de bacterias productoras de ácido láctico, las que han sido consideradas por décadas como agentes etiológicos de la caries dental, siendo aisladas desde sitios activos de caries y asociadas sistemáticamente con la presencia y progresión de esta patología.

Mientras que la habilidad para producir ácido vía fermentación de azúcares es considerada como una característica innata de las distintas especies de *Lactobacillus*, su habilidad para sobrevivir y funcionar en ambientes ácidos (aciduria) es una característica fundamental para su supervivencia. En lesiones activas de caries podemos encontrar valores de pH cercanos a 4,5 y si consideramos el microambiente que rodea a cada célula bacteriana en la placa dental podemos alcanzar valores menores a 3. Además se ha descrito que las especies de *Lactobacillus* aisladas desde sujetos con alta experiencia de caries son más acidogénicas, por lo que es posible suponer que estas especies también estarían expuestas a ambientes más ácidos, por lo que poseerían una mayor capacidad para resistir estas condiciones ambientales.

Por todos estos antecedentes, en este estudio se buscó determinar si las especies de *Lactobacillus* aisladas desde sitios de caries dentinaria profunda poseían una mayor resistencia a ácido y diferían de las especies aisladas desde saliva de individuos con o sin caries. Además, se propuso que las especies de *Lactobacillus* encontradas en cada sitio serían diferentes.

Para esto se analizaron muestras provenientes de saliva y lesiones de caries de 17 niños de 7-11 años, 8 sin experiencia de caries y 9 con al menos una caries en dentina, a fin de determinar las diferentes especies de *Lactobacillus* presentes en cada condición y la resistencia a ácido de cada una de éstas. Para esto, cada muestra se sembró y cultivó en placas de medio MRS a pH 6,2 y pH 4,2, y luego se identificaron las especies presentes, mediante el uso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación.

Los resultados obtenidos indican que las muestras obtenidas desde sitios de caries poseen *Lactobacillus* spp. más resistentes a ácido que las muestras de saliva de los mismos niños con caries ($p=0,084$).

Si bien las especies de *Lactobacillus* aisladas desde diferentes sitios no difieren entre sí, pudimos observar que *L. fermentum* y *L. rhamnosus*, se encontrarían significativamente asociadas a saliva de niños sin caries ($p=0,0007$ y $p=0,002$) y especies como *L. salivarius* y *L. johnsonii* / *L. gasseri* se encontrarían asociadas a saliva de niños con caries ($p<0,0001$ y $p=0,0391$). Del mismo modo, *L. casei* / *L. paracasei* se encontraría significativamente asociada a las muestras de caries ($p=0,0005$).

Por lo tanto, se concluye que las especies de *Lactobacillus* aisladas desde sitios de caries de niños de 7-11 años de edad, poseen una mayor resistencia a ácido que las obtenidas desde muestras de saliva de los mismos niños con caries, además, estos niños presentan mayor diversidad de especies de *Lactobacillus* en boca, que los niños sin lesiones de caries para el mismo rango de edad. Y que existen especies de *Lactobacillus* (*L. fermentum* y *L. casei* / *L. paracasei*) que poseerían mayor resistencia ácido y que se encontrarían principalmente habitando sitios de caries.

También, se concluye que existen especies de *Lactobacillus* relacionadas a la ausencia de caries (*L. fermentum* y *L. rhamnosus*) y otras relacionadas a la presencia de caries, específicamente a saliva (*L. salivarius* y *L. johnsonii* / *L. gasseri*) o a sitios de caries (*L. casei* / *L. paracasei*).

2.- MARCO TEÓRICO

2.1.- Caries dental

La caries dental es una de las enfermedades crónicas infecciosas más prevalentes en el mundo (Petersen P., 2003; Kassebaum N. y cols., 2015). Se considera como una enfermedad infecciosa, multifactorial y transmisible. Corresponde a un proceso dinámico de periodos alternados de desmineralización y remineralización, caracterizado por la destrucción localizada y progresiva de los tejidos duros del diente. Se encuentra asociada tanto a factores genéticos, relacionados con las características individuales de los dientes, saliva y sistema inmune, como a factores sociales y familiares (Sujlana A. y Pannu P., 2015; Opal S. y cols., 2015). Así como también se encontraría asociada a una dieta con alto contenido de azúcares fermentables, en la que microorganismos presentes en la cavidad oral jugarían un papel fundamental, metabolizando estos azúcares y produciendo ácidos que serían los responsables de la desmineralización de los tejidos dentarios (esmalte y dentina), es decir, de las lesiones de caries (Takahashi N. y Nyvad B., 2010).

La caries dental se relaciona muy estrechamente con los estilos de vida y conductas individuales de las personas. Algunos factores de riesgo asociados al proceso de caries incluyen deficiente higiene oral, hábitos dietéticos poco saludables, consumo frecuente de carbohidratos refinados e inadecuados métodos de alimentación durante la infancia, como por ejemplo lactancia materna inferior a 6 meses (Azevedo T. y cols., 2005; Sayegh A. y cols., 2005). También, se ha observado que una mujer que posee hábitos de cuidado oral deficientes repetirá estos patrones en sus hijos, creando así las condiciones ideales para el desarrollo de lesiones de caries (MINSAL, 2012).

Existen además diversos determinantes sociales que tendrían un impacto considerable en la situación de salud oral de las personas. Los hijos de madres con un menor nivel educacional presentarían peores condiciones orales que aquellos con madres con un nivel educacional mayor (Hallett K. y O'Rourke P., 2003). De la misma forma, también se observan diferencias entre la población rural y la urbana, presentando mejores condiciones orales aquellos que viven en

sectores urbanos, debido principalmente a que poseen un mayor acceso tanto a medidas preventivas como a la atención odontológica (Gao X. y cols., 2011).

El riesgo individual de generar lesiones de caries puede variar en el tiempo, siempre y cuando los factores relacionados con el proceso de caries también cambien (MINSAL, 2012). Selwitz R. y cols., (2007) elaboraron un modelo en base a lo publicado por Fejerskov O. y Manji F., (1990), que permite visualizar todos los factores involucrados en el proceso de caries y clasificarlos en 3 grupos (Figura 1).

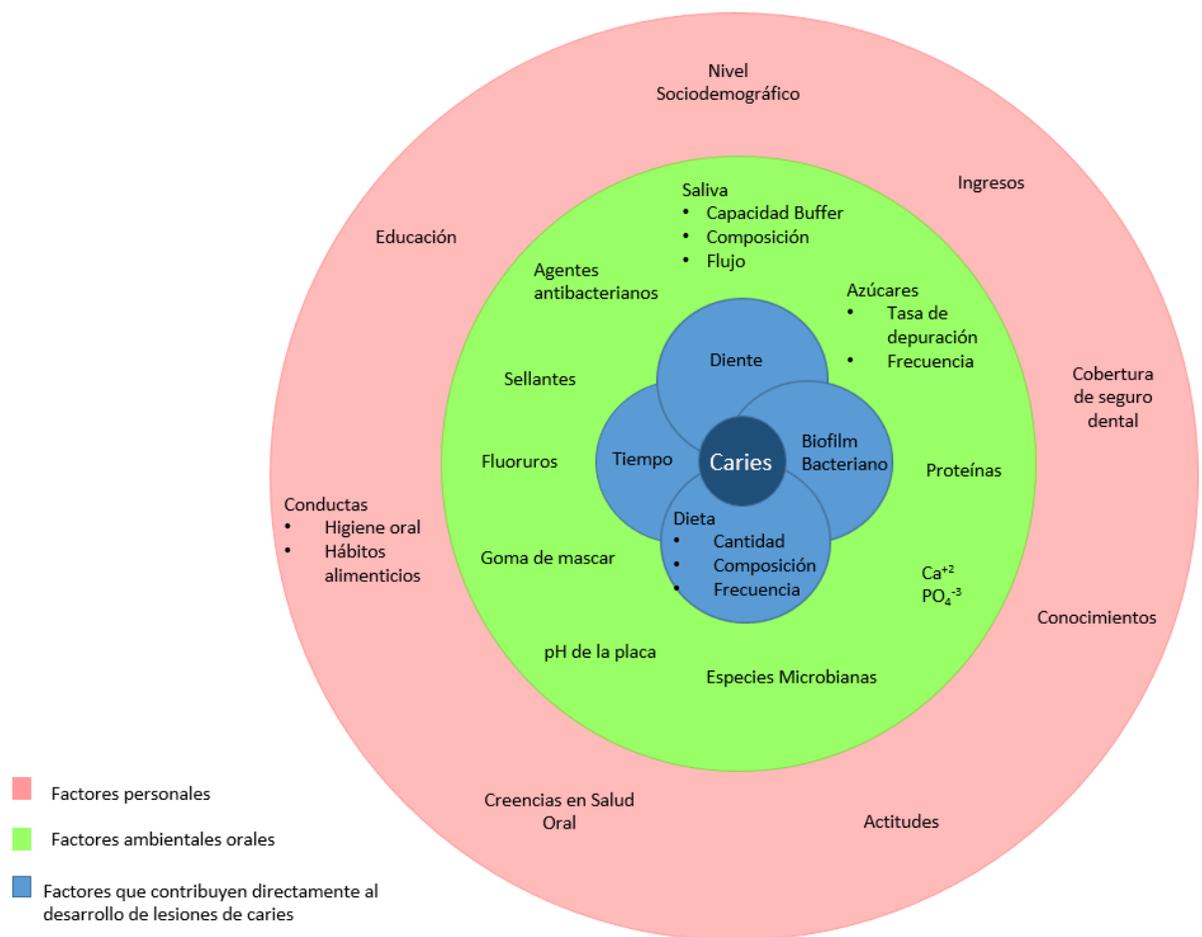


Figura 1. Factores de riesgo asociados al proceso de caries (Selwitz R. y cols., 2007).

Existirían factores que contribuyen directamente al desarrollo de lesiones de caries, como lo serían los hábitos dietéticos de la persona, las características individuales de los dientes, el tiempo y las bacterias que formarían parte de la

biopelícula dental (o *biofilm*) (Figura 1, parte central en celeste), factores ambientales orales, como la composición y características de la saliva, exposición a fluoruros o el uso de agentes antibacterianos (Figura 1, en verde) y factores personales, como el acceso a la atención dental, el nivel educacional o nivel socioeconómico de la persona (Figura 1, en rosa).

2.2.- Sistemas de Evaluación y Diagnóstico de Caries

Para realizar una valoración del estado de salud dental en las poblaciones se han utilizado diferentes índices, que ayudarían a cuantificar la prevalencia de la caries dental. El más utilizado en los distintos estudios epidemiológicos es el índice COPD/ceod. Este índice fue desarrollado por Klein H., Palmer C. y Knutson J. en 1938 y considera tanto la experiencia pasada como actual de caries, al tomar en consideración no sólo las lesiones activas de caries sino también aquellos dientes que fueron tratados o perdidos producto de estas lesiones. El índice COPD se utiliza en dentición permanente y se obtiene de la sumatoria de dientes **C**ariados, **O**bturados y **P**erdidos (Tabla 1). En dentición temporal se utiliza su equivalente que corresponde al índice ceod que se obtiene de la sumatoria de piezas dentales temporales **C**ariadas, **E**xtraídas (o con indicación de exodoncia) y **O**bturadas (Tabla 2).

Tabla 1. Índice COPD

Código	Significado
C	Diente con caries.
O	Diente obturado.
P	Diente perdido.
D	Se considera un total de 28 dientes en boca.

Tabla 2. Índice ceod

Código	Significado
c	Diente temporal con caries.
e	Diente temporal extraído.
o	Diente temporal obturado.
d	Se considera un total de 20 dientes en boca.

Para la detección y evaluación de la caries dental existen alrededor de 29 sistemas que varían según país y autor (Ismail A. y cols., 2007). El Sistema Internacional para la Detección y Evaluación de Caries (ICDAS) corresponde a uno de estos sistemas de diagnóstico de caries, creado para la práctica clínica, investigación y desarrollo de programas de salud pública (Ismail A. y cols., 2007). Este sistema posee alrededor de un 70 – 85 % de sensibilidad, y una especificidad que va entre un 80 – 90 % para la detección de caries ya sea en dentición temporal o permanente, variando de acuerdo al grado de entrenamiento y calibración del personal examinador. El sistema ICDAS lo comprenden 7 códigos que van del 0 al 6 (Tabla 3). El código 0 corresponde a un diente sano, los códigos 1 y 2 corresponden a caries limitadas al esmalte dental, los códigos 3 y 4 se consideran caries que afectan tanto al esmalte como a la dentina pero sin exponer esta última, y finalmente los códigos 5 y 6 se consideran lesiones de caries con dentina expuesta y sólo varían en la extensión de esta lesión (Tabla 3).

Tabla 3. Códigos del sistema ICDAS.

Código	Significado
0	Diente sano.
1	Mancha blanca o marrón visible en esmalte dental seco.
2	Mancha blanca o marrón visible en esmalte dental húmedo.
3	Microcavidad en esmalte, menor a 5 mm, sin exposición de dentina.
4	Sombra oscura de dentina bajo esmalte sin cavitación visible.
5	Cavidad mayor a 0,5 mm con exposición de dentina.
6	Cavidad que abarca más de la mitad de la superficie dental con exposición de dentina.

2.3.- Microbiología de la caries dental

Durante las últimas décadas, se han desarrollado tres hipótesis principales que intentan explicar la etiología de la caries dental: la hipótesis de placa específica, la de placa no específica, y la de placa ecológica. La hipótesis de placa específica postulaba que sólo unas pocas especies, como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, estaban involucradas activamente en la enfermedad de caries (Loesche W., 1992). La hipótesis de placa no específica sostenía que la caries dental sería el resultado de la actividad total de la microbiota oral, la cual incluiría una gran diversidad de especies microbianas (Theilade E., 1986). Por último, la hipótesis de placa ecológica, la más aceptada hoy en día, sugiere que la caries es el resultado de un desbalance en la microbiota residente, producto de cambios en las condiciones ambientales locales en la cavidad oral (Marsh P. y cols., 1994).

Como se mencionó anteriormente, las lesiones de caries se desarrollan producto de un desequilibrio entre los procesos de desmineralización y remineralización del esmalte y dentina. Este fenómeno, se debe a disminuciones en el pH ambiental, que alcanzan el nivel crítico de desmineralización del esmalte (pH 5,5) (Dong Y. y cols., 1999). Esta disminución en el pH se produce debido a la presencia de una biopelícula bacteriana en la superficie dental, compuesta por bacterias

acidogénicas (capaces de producir ácidos) y acidúricas (capaces de sobrevivir en un ambiente ácido y seguir produciendo ácido), que producen ácidos orgánicos como producto de la fermentación de carbohidratos de la dieta (Hojo K. y cols., 2009).

Takahashi N. y Nyvad B., en el año 2011, propusieron una extensión a la hipótesis de placa ecológica, para explicar la relación entre los cambios dinámicos en las propiedades fenotípicas y genotípicas de la placa bacteriana y el equilibrio de desmineralización y remineralización del proceso de caries, proponiendo 3 etapas: i) etapa de estabilidad dinámica, ii) etapa acidogénica y iii) etapa acidúrica (Figura 2) (Takahashi N. y Nyvad B., 2011). En esta hipótesis, la placa dental corresponde a un ecosistema microbiano dinámico donde especies de *Streptococcus* del tipo no-mutans y *Actinomyces* principalmente, juegan un papel fundamental manteniendo la estabilidad de esta dinámica (Etapa de estabilidad dinámica).

Frente a ciertos fenómenos, como una dieta rica en hidratos de carbono fermentables o pobre higiene oral, estos microorganismos producirían ácidos en forma permanente, generando una adaptación microbiana, con la subsecuente selección inducida por ácido de bacterias no-mutans más resistentes a ácido y acidogénicas. Esto, sería crítico en la desestabilización de la homeostasis de la placa, facilitando de esta forma un desbalance en el proceso de desmineralización/remineralización que se inclinaría hacia la desmineralización de los tejidos dentarios (Etapa acidogénica).

Una vez que ya se ha establecido un ambiente ácido, especies de *Streptococcus* del tipo mutans y otras bacterias acidúricas aumentarían, promoviendo el desarrollo de la lesión de caries al mantener un ambiente caracterizado por la acidez del medio y la pérdida neta de mineral desde la superficie dentaria (Etapa acidúrica).

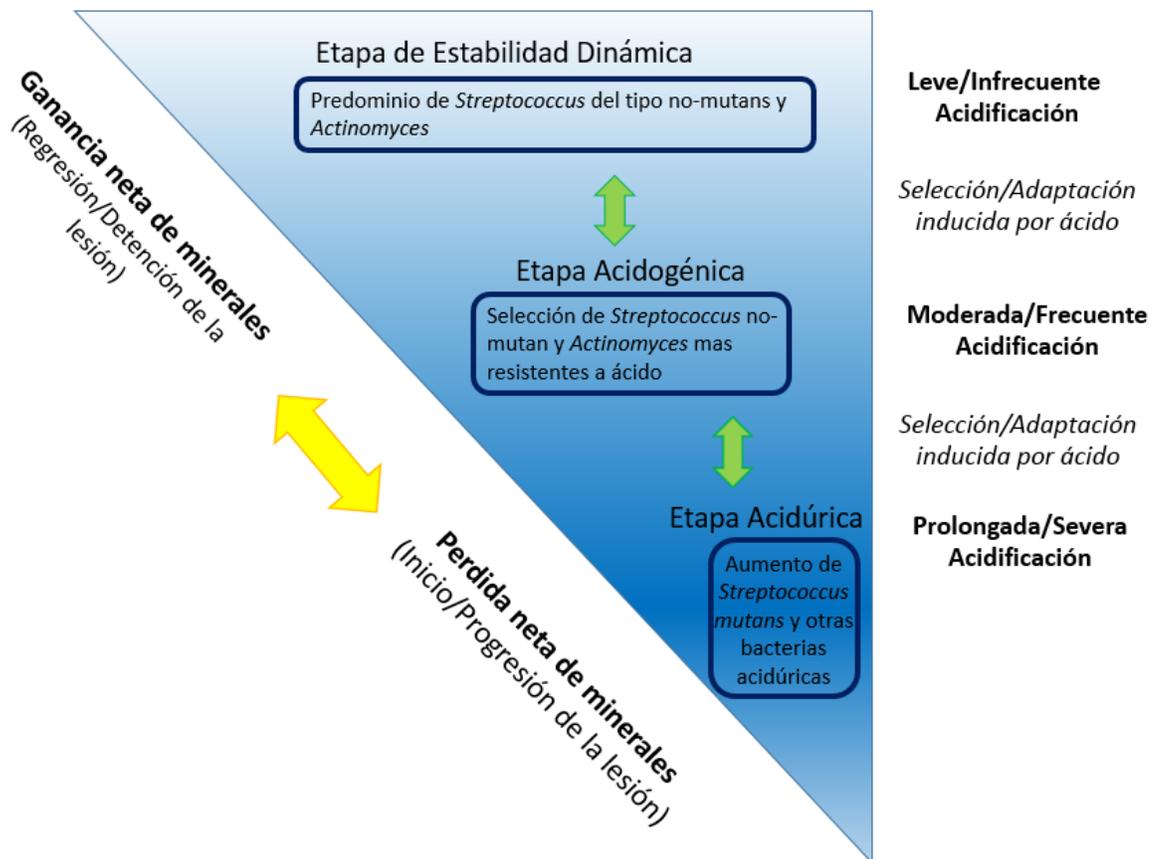


Figura 2. El proceso de caries de acuerdo a la hipótesis de placa ecológica extendida. (Takahashi N. y Nyvad B., 2011).

2.4.- *Lactobacillus* spp. y caries dental

Diversos estudios clínicos, en conjunto con análisis microbiológicos y de biología molecular, indican que las especies dominantes en la biopelícula bacteriana dental serían *Streptococcus mutans*, otras especies de *Streptococcus* del tipo no-mutans, *Lactobacillus*, *Actinomyces* y *Bifidobacterium* (Hojo K. y cols., 2009).

Lactobacillus es uno de los géneros más grandes y diversos de bacterias productoras de ácido láctico, al cual pertenecen actualmente 237 especies (<http://www.bacterio.cict.fr/>). Pertenecen al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli* y familia *Lactobacillaceae*. Corresponden a bacilos anaerobios facultativos, Gram positivo y no formadores de esporas (Figura 3).

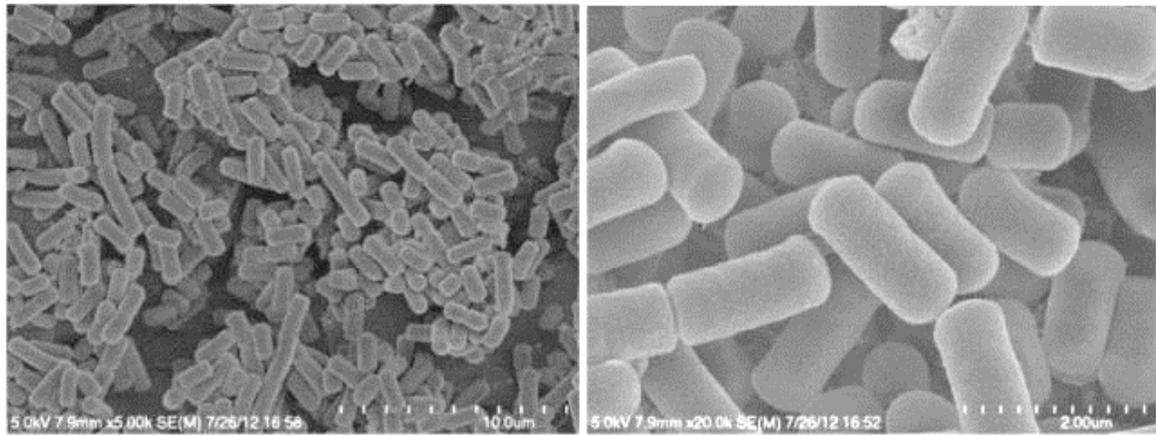


Figura 3. Fotomicrografía por microscopía electrónica de barrido (SEM) de *Lactobacillus acidophilus* sobre discos de hidroxiapatita a) Magnificación 5.000X b) Magnificación 20.000X (Blumhagen A. y cols., 2014).

Lactobacillus spp. han sido aislados a partir de una amplia variedad de hábitats, que incluyen productos lácteos fermentados y no fermentados, tracto gastrointestinal y sistema reproductor humano (Klander O. y Weiss N., 1986). *Lactobacilli* aislados a partir del tracto gastrointestinal humano o vagina son considerados miembros de la microbiota humana autóctona y confieren efectos beneficiosos al hospedero, debido a que estimulan la inmunidad y contribuyen al balance natural de la microbiota, al impedir la colonización de patógenos exógenos (Saulnier D. y cols., 2009). Todas estas características, junto al hecho de poseer una gran adaptabilidad y a su extenso uso industrial, han hecho de *Lactobacillus* spp. organismos de gran interés para su uso como probióticos, siendo actualmente incorporados a distintos productos lácteos, así como también, han sido utilizados como tratamiento de diferentes enfermedades que afectan el tracto gastrointestinal (Ouwenhand A. y cols., 2002; Tsai E. y cols., 2012).

Algunas especies de *Lactobacillus* han sido propuestas como agentes probióticos que contribuirían a la mantención del estado de salud oral, principalmente debido a investigaciones que indican que poseerían una actividad inhibitoria sobre *Streptococcus* del tipo mutans y patógenos periodontales como *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Koll-Klais P. y cols., 2005; Teanpaisan R. y cols., 2011).

Sin embargo, otras especies de *Lactobacillus* han sido consideradas por décadas como agentes etiológicos de la caries dental, siendo aisladas desde sitios activos de caries y asociadas sistemáticamente con la presencia y progresión de esta patología (van Houte J. y cols., 1981; Nancy J. y Dorignac G., 1992; Marchant S. y cols., 2001; Caufield P. y cols., 2007; Aas J. y cols., 2008; Preza D. y cols., 2009; Piwat S. y cols., 2010; Lima K. y cols., 2011; Wolff D. y cols., 2013; Martínez-Pabón M. y cols., 2013; Kianoush N. y cols., 2014).

En 1981, van Houte J. y cols. publicaron un estudio sobre la microbiota presente en la superficie dental de sujetos con experiencia de caries, aislando *Lactobacillus* spp. del 50% de las placas asociadas a caries. Nancy J. y Dorignac G. (1992) analizaron la presencia de *Lactobacillus* spp. en saliva, placa dental y placa de dentina cariada en niños de 5-15 años de edad, encontrando que estaba presente en el 100% de las muestras de dentina cariada, en el 70% de las muestras de saliva y 29% en las muestras de placa dental, determinando una correlación directa entre los índices ceod-COPD y la presencia de *Lactobacillus* spp. en dentina.

Siguiendo con los estudios, Marchant S. y cols. (2001) estudiaron la microbiota predominante en muestras de dentina infectada proveniente de lesiones de caries en niños, siendo las especies de *Lactobacillus* más frecuentemente aisladas *L. casei*, *L. fermentum* y *L. rhamnosus*. Caufield P. y cols. (2007), analizaron la diversidad de *Lactobacillus* spp. en la cavidad oral de mujeres jóvenes con lesiones de caries y determinaron que *L. vaginalis*, *L. fermentum* y *L. salivarius* estaban presentes en muchos de los sujetos estudiados. Preza D. y cols. (2009) analizaron los perfiles bacterianos de superficies radiculares sanas y lesiones de caries radiculares en adultos mayores, observando una mayor diversidad bacteriana en las superficies radiculares sanas que en las lesiones de caries, siendo *L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus* las especies más asociadas en lesiones de caries radiculares.

Uno de los primeros estudios a nivel de identificación de especies de *Lactobacillus* en cavidad oral de niños fue el de Piwat S. y cols. (2010). Ellos estudiaron la distribución de *Lactobacillus* spp. en muestras de saliva de niños tailandeses, con

y sin experiencia de caries, observando que *L. salivarius* y *L. casei* eran las especies más prevalentes en niños con moderada a alta experiencia de caries y *L. fermentum* era la especie más predominante en todos los grupos estudiados.

Siguiendo con los estudios en adultos, Lima K. y cols. (2011) analizaron la microbiota presente en diferentes capas de dentina infectada en lesiones de caries, encontrando que *L. casei* y *L. fermentum* estaban presentes en todas las capas analizadas. Wolff D. y cols. (2013) utilizaron PCR en tiempo real para analizar la composición bacteriana de muestras de caries dentinarias de sujetos adultos y de muestras de placa dental de adultos libres de caries, encontrando *Lactobacillus* spp. más frecuentemente en las muestras de caries. Entre las especies encontradas estaban *L. casei*, *L. rhamnosus* y *L. lactis*, entre otros. También en el año 2013, Martínez-Pabón M. y cols. analizaron las características microbiológicas de la saliva de pacientes colombianos, en relación a su experiencia de caries, asociando mayores recuentos de *Streptococcus mutans* con la presencia de lesiones de mancha blanca, mientras que mayores recuentos de *Lactobacillus* spp. fueron asociados a la presencia de lesiones de caries cavitadas.

En un estudio publicado por Kianoush N. y cols. (2014), analizaron el perfil bacteriano de lesiones de caries dentinaria, mediante secuenciación masiva de los ARNs ribosomales 16S (pirosecuenciación 454). Ellos compararon comunidades microbianas en diferentes capas de dentina, y el impacto del pH en la diversidad bacteriana. Las capas más profundas mostraron pH más ácidos, y estas condiciones acídicas fueron asociadas con una baja diversidad de las poblaciones microbianas. El Filo *Firmicutes* fue el más abundante en esta condición (78% a pH 4,5-5,0), y *Lactobacillus* fue el *Firmicutes* más abundante en estas comunidades (77%), indicando que estas bacterias poseen mecanismos moleculares que les permiten sobrevivir a estas condiciones, de mejor manera que otros microorganismos.

2.5.- *Lactobacillus* spp., Acidogénesis y Resistencia a Ácido

Las distintas especies de *Lactobacillus* son conocidas por ser prolíficas productoras de ácido láctico (acidogénicas) aún en condiciones de acidez del medio, lo cual implica una serie de ajustes en su metabolismo que les permiten tolerar pHs ácidos (acidúricas). La producción de ácido la logran mediante la fermentación de distintos hidratos de carbono, como por ejemplo glucosa (Piwat S. y cols., 2012). En el proceso de fermentación, *Lactobacillus* transporta ácido láctico fuera de la célula utilizando un sistema de simporte protón-lactato, disminuyendo el pH del medio celular externo, lo que provoca el ingreso de protones al medio intracelular. Si la tasa de acumulación de protones excede la capacidad tampón del citoplasma y la capacidad del sistema de eflujo de éstos, el pH interno comienza a descender y eventualmente alcanzará un punto crítico y las funciones celulares se verán afectadas (Hutkins R. y Nannen L., 1993). Por esta razón, *Lactobacillus* spp. ha debido desarrollar mecanismos fisiológicos que le permitan sobrevivir a la disminución del pH externo.

La capacidad de vivir en un ambiente ácido genera una respuesta que se conoce como resistencia a ácido, que involucra un control específico en la regulación de ciertos genes. Esta respuesta puede ser sostenida en el tiempo para garantizar la mantención del pH celular interno (Cotter P. y Hill C., 2003; Matsui R. y Cytikovitch D., 2010). Por otra parte, al someter a la célula a estrés ácido en condiciones sub-letales se induce una respuesta adaptativa diferente, conocida como respuesta de tolerancia al ácido, que protege a la célula de la muerte por ácido (Cotter P. y Hill C., 2003; Matsui R. y Cytikovitch D., 2010). La capacidad acidúrica en los microorganismos puede estar dada por la resistencia a ácido, la respuesta de tolerancia a ácido, o ambas.

Numerosos sistemas de resistencia a ácido han sido caracterizados en bacterias Gram negativo, sin embargo, en bacterias Gram positivo hay relativamente poca información al respecto. Uno de los sistemas más descritos en bacterias Gram positivo corresponde a una bomba de protones F_1F_0 – ATPasa, localizada en la membrana celular. Esta proteína compleja actúa translocando protones a través de la membrana celular, regulando de esta forma el pH interno celular (Sturr M. y

Marquis R., 1992; Cooter P. y Hill C., 2003). En muchas especies de *Lactobacillus*, la bomba de protones F_1F_0 – ATPasa también juega un papel importante en los mecanismos de resistencia y tolerancia a ácido (Sturr M. y Marquis R., 1992; Hutkins R. y Nannen L., 1993). Sin embargo, también se han descrito otros sistemas que formarían parte de los mecanismos de respuesta de tolerancia a ácido en estas bacterias, como cambios en el contenido lipídico de la membrana citoplasmática o el aumento en el transporte de ciertos aminoácidos como la histidina, que permitiría a las bacterias combatir los efectos negativos de la acidificación citoplasmática (Broadbent J. y cols., 2010).

Se ha reportado que las especies de *Lactobacillus* poseen la habilidad de fermentar distintas fuentes de carbono (glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, manitol, xilitol, sorbitol, galactosa y trehalosa), dependiendo de la especie, produciendo una disminución del pH del medio de cultivo (Zayed G. y cols., 2004; Haukioja A. y cols., 2008; Pham L. y cols., 2009; Almstahl A. y cols., 2012). Esto indicaría que las especies de *Lactobacillus* diferirían en su capacidad acidogénica, producto de variaciones en su habilidad metabólica para fermentar distintos tipos de azúcares. Lo que les permitiría tener una mayor cantidad y variedad de fuentes de hidratos de carbono para metabolizar, a diferencia de otras especies presentes en el biofilm.

Junto con esto, estudios in vitro han mostrado que dependiendo de su origen, los aislados clínicos de *Lactobacillus* difieren en su capacidad acidogénica, siendo los obtenidos a partir de lesiones de caries más productores de ácido (acidogénicos) que aquellos provenientes saliva de individuos con baja o nula experiencia de caries (Piwat S. y cols., 2012).

Mientras que la habilidad para producir ácido vía fermentación de azúcares es considerada como una característica innata de las distintas especies de *Lactobacillus*, su habilidad para sobrevivir y funcionar en ambientes ácidos (aciduria) es una característica fundamental para su supervivencia. Se ha reportado que en lesiones activas de caries podemos encontrar pHs cercanos a 4,5 (Kianoush N. y cols., 2014), y si consideramos el microambiente que rodea a cada célula bacteriana en la placa dental podemos alcanzar valores menores a 3

(Matsui R. y Cyitkovitch D., 2010). Considerando que las especies de *Lactobacillus* aisladas desde sujetos con alta experiencia de caries son más acidogénicas, es posible suponer que estas especies también estarían expuestas a ambientes más ácidos por lo que poseerían una mayor capacidad para resistir estas condiciones ambientales.

Dado estos antecedentes, en este estudio propusimos que, en la cavidad oral, las especies de *Lactobacillus* que habitan en sitios profundos de caries son más resistentes a ácido que sus pares presentes en saliva. Por lo tanto, desde sitios profundos de caries sería posible obtener aislados clínicos con una capacidad de resistencia a ácido aumentada.

Actualmente no existen reportes en Chile acerca de la caracterización de especies de *Lactobacillus* presentes en la cavidad oral de la población infantil o su asociación con caries. Debido a esto, estudiamos las especies de *Lactobacillus* presentes en la cavidad oral de niños de 7-11 años de edad. Para esto se analizaron las especies de *Lactobacillus* presentes en saliva de niños sin experiencia de caries y niños con caries cavitadas, así como también las especies predominantes en los sitios de lesiones de caries dentinarias profundas. Junto a esto, se analizó también la presencia de *Lactobacillus* spp. con resistencia a ácido aumentada en cada una de las muestras, de modo de determinar si existen diferencias en esta capacidad entre las distintas especies y los sitios a partir de los cuales fueron obtenidos.

Este análisis es de gran importancia en salud pública debido a que estas especies se encuentran presentes en muchos productos lácteos y los niños están constantemente expuestos a incorporar estos microorganismos a su cavidad oral. Además, la caries dental posee carácter epidémico en Chile y es crucial determinar cuáles especies de *Lactobacillus* están mayormente asociadas a caries en la población infantil del país con el fin de determinar grupos de riesgo y medidas preventivas específicas.

3.- HIPÓTESIS

Especies de *Lactobacillus* aisladas desde sitios de caries dentinaria profunda en niños de 7-11 años, poseen una mayor resistencia a ácido y difieren de las especies aisladas desde saliva de niños con o sin caries.

4.- OBJETIVO GENERAL

Determinar si especies de *Lactobacillus* aisladas desde sitios de caries dentinaria profunda en niños de 7-11 años, poseen una mayor resistencia a ácido y difieren de las especies aisladas desde saliva de niños con o sin caries.

5.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar *Lactobacillus* spp. a partir de muestras de lesiones de caries dentinarias y saliva de niños de 7-11 años con caries y libres de caries, en base a sus diferentes capacidades de resistencia a ácido.
2. Determinar la identidad de las especies de *Lactobacillus* aisladas a partir de muestras de lesiones de caries y saliva de niños de 7-11 años con caries dentinarias profundas y de niños sin caries.
3. Analizar comparativamente los recuentos y la presencia de las distintas especies de *Lactobacillus* en las muestras de lesiones de caries y saliva de niños de 7-11 años con caries dentinarias profundas y niños sin caries.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

Este protocolo de estudio fue aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo 12.1). Por cada niño participante en esta investigación se obtuvo un consentimiento informado de los padres del menor (Anexo 12.2).

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.

6.1.- Aislamiento de *Lactobacillus* spp. a partir de muestras de lesiones de caries dentinarias y saliva de niños de 7-11 años con caries y libres de caries, en base a sus diferentes capacidades de resistencia a ácido.

6.1.1 Reclutamiento de sujetos y examen clínico.

17 niños entre 7 a 11 años de edad fueron invitados a participar en este estudio indicándoles que asistieran a la Unidad de Diagnóstico de la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, en un horario especificado. Se reclutaron 8 niños sin experiencia de caries y 9 niños con presencia de caries en dentina profunda. El tamaño muestral fue determinado por conveniencia. Para esto se les explicaron los objetivos del proyecto de investigación a los niños y sus padres, invitándolos a participar voluntariamente. Luego de haber aceptado participar y firmado el consentimiento informado, los niños fueron sometidos a un examen intraoral donde se registró su COPD/ceod, según correspondiera, en una ficha clínica (Anexo 12.3), de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud del año 1997 (OMS, 1997).

A partir de los sujetos sin experiencia de caries se tomó una muestra de saliva no estimulada y a partir de los sujetos con caries dentinarias profundas se tomó una muestra de saliva no estimulada y una muestra de un sitio de caries dentinaria profunda obtenida a partir de primeros molares definitivos. Los sujetos con experiencia de caries pero sin caries dentinaria profunda no fueron incluidos en este estudio (no se realizó toma de muestras). 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.

Los padres de todos los niños examinados recibieron información sobre el estado de salud oral de sus hijos, así como también, recomendaciones para mejorarlo y un kit de higiene oral. Además, fueron provistos de tratamiento odontológico en el colegio donde asistían, como parte de un programa de la Dirección de Extensión de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

6.1.2 Toma de muestras de saliva y de sitios de caries dentinarias profundas.

Las muestras de sitios de caries fueron recolectadas con una cuchareta de caries estéril, y depositadas en 200 μ L de tampón fosfato salino PBS (NaCl 138 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,2), tal como se describe (Kuribayashi y cols., 2012). Las muestras fueron obtenidas a partir de premolares y molares con lesiones de caries dentinarias profundas.

Las muestras de saliva fueron recolectadas en tubos de plástico estériles y se tomó aproximadamente 1 ml de saliva no estimulada.

Todas las muestras fueron almacenadas a 4°C por un corto periodo de tiempo (máximo 1 hora), hasta su procesamiento en el laboratorio de Bioquímica y Biología Oral.

6.1.3 Crecimiento y aislamiento de *Lactobacillus* spp. de acuerdo a su capacidad de resistencia a ácido.

A partir de 100 μ L de la muestra de sitio de caries dentinaria en PBS, se realizaron diluciones seriadas 1:10 y 1:100 v/v, y 100 μ L de la dilución 1:100 fueron sembrados. Las muestras de saliva fueron diluidas de la misma forma en PBS y 100 μ L de las diluciones 1:100 y 1:1000 v/v fueron sembradas. Todas estas diluciones fueron sembradas sobre la superficie de placas con medio MRS (Oxoid) agarosa 1% a pH 6,2 (pH normal de crecimiento) y MRS agarosa 1% a pH 4,2 (para aislar las cepas más resistentes a ácido). Para esto se preparó MRS a pH normal (pH 6,2) y fue llevado a pH 4,2 utilizando HCl 1M. Todas las placas fueron

incubadas a 37°C durante 48 horas, en presencia de 5% de CO₂ como se describe (Piwat S. y cols., 2010). El medio MRS en las placas fue preparado con agarosa en vez de agar, debido a que es más estable a pH menor a 5.

Se utilizó un método de muestreo al azar para seleccionar desde cada placa, 10 unidades formadoras de colonias (U.F.C.) presuntamente identificadas como *Lactobacillus* spp. (colonias redondas, convexas y blancas de bordes lisos), fueron sembradas nuevamente y crecidas para su aislamiento y posterior extracción de ADN genómico.

6.2.- Determinación de la identidad de las especies de *Lactobacillus* aisladas a partir de muestras de lesiones de caries y saliva de niños de 7-11 años con caries dentinarias profundas y de niños sin caries.

6.2.1 Purificación del ADN genómico.

Las muestras de ADN genómico fueron aisladas utilizando el kit FTA-Cards Whatman®, siguiendo las recomendaciones del proveedor. Colonias de aislados de *Lactobacillus* spp. fueron resuspendidas en 50 µL de PBS y depositadas en cartas de filtros FTA (Whatman®). Posteriormente fueron dejadas secar cercanas a un mechero. A partir de cada filtro FTA con los 50 µL de resuspensión bacteriana vertida, se obtuvieron 2 perforados de 1,2 mm que fueron lavados de forma seriada con 200 µL de reactivo FTA (Whatman®) durante 5 minutos en tres ocasiones, y tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) de igual forma. Finalmente los perforados fueron secados a 55 °C, quedando de esta forma el ADN genómico depositado sobre éstos.

6.2.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Un fragmento de aproximadamente 232 pb del gen de 16S rRNA fue amplificado por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando los partidores específicos descritos para *Lactobacillus* spp. (Lacto16s Fw: 5'-TGGAAACAGATGCTAATACCG-3' y Lacto16s Rev: 5'-GTCCATTGTGGAAGATTCCC -3') (Caufield P. y cols., 2007).

Para la realización del PCR se utilizó el ADN genómico en 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 MgCl₂.

La amplificación se realizó en el equipo PCR GeneAmp 2400 (PerkinElmer), y el proceso consistió en una desnaturalización inicial de 94 °C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos, con una etapa final de 72 °C por 5 minutos. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa.

6.2.3 Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Las muestras de ADN se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% usando tampón TAE 1x (Tris-acetato 40 mM, Na₂EDTA 1 mM, pH 8,3) que contenía Safeview NBS Biologicals Ltda. que permite la visualización de ácidos nucleicos con luz ultravioleta. La electroforesis se realizó a 80-100 V por tiempos variables en amortiguador TAE 1x y los ácidos nucleicos se visualizaron en un transiluminador de radiación UV. Los geles fueron fotografiados y la imagen procesada mediante el sistema Carestream.

6.2.4 Purificación del producto de PCR.

El producto de PCR fue purificado utilizando el kit FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (Favorgen Biotech Corp.) a partir del gel de electroforesis de ADN en agarosa y siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se cortó cada banda desde el gel, que contenía el ADN a purificar, con un bisturí, bajo trans-iluminación con luz UV. El protocolo consistió en agregar 500 μ l de buffer FADF a la banda de agarosa, e incubarla por 15 min a 55° C mezclando por inversión cada 3 min, hasta su disolución completa en la solución. Luego, se esperó hasta que la solución alcanzara la temperatura ambiente, para posteriormente transferir 800 μ l de la mezcla a una columna de colección (columna FADF), la cual fue centrifugada a 14.000 r.p.m. por 30 s., descartando el sobrenadante. Luego se agregó a la columna 750 μ l de solución de lavado, se centrifugó por 30 s., se descartó el sobrenadante y se centrifugó por 3 min más. Finalmente, se transfirió la columna a

un tubo eppendorf y se agregó 40 µl de buffer de elución de ADN al centro de la membrana, incubando a temperatura ambiente por 2 min, para luego centrifugar por 2 min a 14.000 r.p.m., eliminando posteriormente la columna y obteniendo el fragmento purificado en un tubo eppendorf nuevo.

El ADN obtenido fue conservado a -20°C hasta su envío a USA para la posterior secuenciación.

6.2.5 Secuenciación y análisis.

Los productos purificados del PCR fueron enviados a Macrogen USA para su secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron analizadas realizando un alineamiento de cada secuencia obtenida contra la base de datos no-redundante (nr) utilizando el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), no fue modificado ningún valor base para la realización de la alineación. El análisis de los resultados obtenidos permitió identificar las especies de *Lactobacillus* presentes en cada una de las muestras. Se consideró una identificación positiva cuando existía más de un 95% de identidad de secuencia.

6.3.- Análisis comparativo de la presencia de las distintas especies de *Lactobacillus* en las muestras de lesiones de caries y saliva de niños de 7-11 años con caries dentinarias profundas y niños sin caries, y su relación con la resistencia a ácido.

6.3.1 Análisis estadísticos.

Para determinar si existe asociación entre la procedencia de la muestra y el pH de crecimiento, se utilizó el test exacto de Fisher, que permite analizar asociación entre dos variables dicotómicas en muestras con n pequeño. Se consideró como hipótesis nula (H_0) la independencia entre las dos variables y la significancia estadística fue fijada en $p < 0,1$ para este análisis.

Con los resultados obtenidos de secuenciación se realizó un análisis de asociación de las distintas especies encontradas, tanto a las muestras de saliva como a las muestras de lesiones de caries dentinaria profunda, mediante Test de

Fisher con significación estadística de $p < 0,05$. También se llevó a cabo un análisis de la relación existente entre las distintas especies encontradas con su capacidad de resistencia a ácido.

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

7.- RESULTADOS

7.1.- Caracterización demográfica de la población en estudio.

Para la realización de este estudio se incluyeron un total de 17 participantes con edades entre los 7 y 11 años de edad. De éstos, 8 se encontraban libres de lesiones de caries y 9 poseían al menos una lesión de caries cavitada.

La edad promedio de los participantes del grupo libre de lesiones de caries fue de $10 \pm 1,2$ años y del grupo que presentaba al menos una lesión de caries cavitada, fue de $10,4 \pm 1,1$ años, y sus medianas fueron 10,5 y 11 años, respectivamente (Tabla 4). Ambos grupos presentaron una distribución etaria similar, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Test Wilcoxon-Mann-Whitney $p=0,53$).

La distribución por sexo no fue similar en ambos grupos, existiendo en el grupo sin lesiones de caries un porcentaje de hombres del 75% y de mujeres del 25%, mientras que en el grupo que presentaba al menos una lesión de caries cavitada el porcentaje de hombres alcanzó un 66,6% y el de mujeres un 33,3%. El promedio de COPD y ceod en el grupo sin lesiones de caries fue de 0 en ambos casos, mientras que en el grupo que si presentaba lesiones de caries el promedio de COPD fue de 2,22 y de ceod de 2,33 (Tabla 4).

Tabla 4. Características demográficas de la población en estudio.

	SIN CARIES	CARIES
<i>Nº de participantes</i>	8	9
<i>% de hombres</i>	75% (6/8)	66,6% (6/9)
<i>% de mujeres</i>	25% (2/8)	33,3% (3/9)
<i>\bar{X} edad (años)</i>	$10 \pm 1,2$	$10,4 \pm 1,1$
<i>Mediana edad (años)</i>	10,5	11
<i>\bar{X} COPD</i>	0	$2,22 \pm 2,10$
<i>\bar{X} ceod</i>	0	$2,33 \pm 2,23$

7.2.- Crecimiento bacteriano.

Todas las muestras recolectadas, tanto de saliva como de sitios de caries, fueron cultivadas en medio de cultivo MRS, descrito como selectivo para *Lactobacillus* spp., a pH 6,2 (pH normal de crecimiento) y a pH 4,2, para el aislamiento de las cepas con mayor resistencia a ácido

Las colonias fueron identificadas presuntivamente como *Lactobacillus* spp. por sus características redondas, convexas y blancas de bordes lisos (Figura 4).



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

De las muestras de saliva recolectadas a partir de los niños sin presencia de lesiones de caries, se obtuvo crecimiento en el 100% de las muestras sembradas en medio MRS a pH 6,2, mientras que a pH 4,2 se obtuvo crecimiento bacteriano sólo en 3 de las 8 muestras, es decir en un 37,5% de ellas (Tabla 5).

De las muestras de saliva recolectadas a partir de los niños que presentaban al menos una lesión de caries cavitada, se obtuvo crecimiento en 8 de las 9

muestras (88,9 %) sembradas en medio MRS a pH 6,2, y en 2 de las 9 muestras (22,2%) a pH 4,2 (Tabla 5). Mientras que desde las muestras obtenidas a partir de sitios de lesiones de caries se observó crecimiento en el 88,9% de las muestras sembradas a pH 6,2 y en el 66,7% a pH 4,2 (Tabla 5).

Tabla 5. Crecimiento bacteriano de muestras de saliva y caries de participantes.

Grupo	Muestra	% Crecimiento a pH 6,2	% Crecimiento a pH 4,2
Niños sin experiencia de caries	Saliva	100%	37,5%
	n=8	(8/8)	(3/8)
Niños con al menos una caries cavitada	Saliva	88,9%	22,2%
	n=9	(8/9)	(2/9)
	Caries	88,9%	66,7%
	n=9	(8/9)	(6/9)

Al analizar si existe relación entre la procedencia de la muestra y el crecimiento a pH 4,2, se pudo determinar que existe una diferencia estadísticamente significativa al comparar el crecimiento desde las muestras obtenidas desde sitios de caries versus las muestras de saliva desde los niños con caries (Test exacto de Fisher, $p=0,084$), indicando que existe una asociación entre las muestras de caries y el crecimiento a pH 4,2. Esto nos permite señalar que las muestras obtenidas desde sitios de caries poseen *Lactobacillus* spp. con mayor capacidad de resistencia a ácido que las muestras de saliva de los mismos niños con caries.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el crecimiento a pH 4,2 de las muestras de saliva de niños sin caries versus los niños con caries (Test exacto de Fisher, $p=0,62$), indicando que no existe asociación entre estas muestras y el crecimiento a este pH.

No fue posible realizar recuentos de colonias de *Lactobacillus* en las distintas muestras debido a que luego de realizar los análisis de PCR y secuenciación se evidenció que existió crecimiento de otras especies bacterianas. Por lo tanto, se

consideró que los recuentos no eran representativos de la cantidad de *Lactobacillus* en cada condición.

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

A partir de las U.F.C. presuntivamente identificadas como *Lactobacillus* spp. se procedió a la purificación de ADN genómico (ADNg), de 10 aislados por muestra (360 aislados en total), tal como se señala en la sección materiales y métodos.

El ADNg obtenido fue utilizado como molde para amplificar mediante PCR un fragmento específico de 232 pb del gen 16S rRNA. Se utilizó además ADNg de la cepa *Lactobacillus casei* ATCC 334 como control positivo de amplificación.

Se encontró amplificación positiva por PCR en más de un 90% de las cepas analizadas, lo que se evidencia por la presencia de un fragmento de aproximadamente 232 pb, amplificado de forma específica (Figura 5).

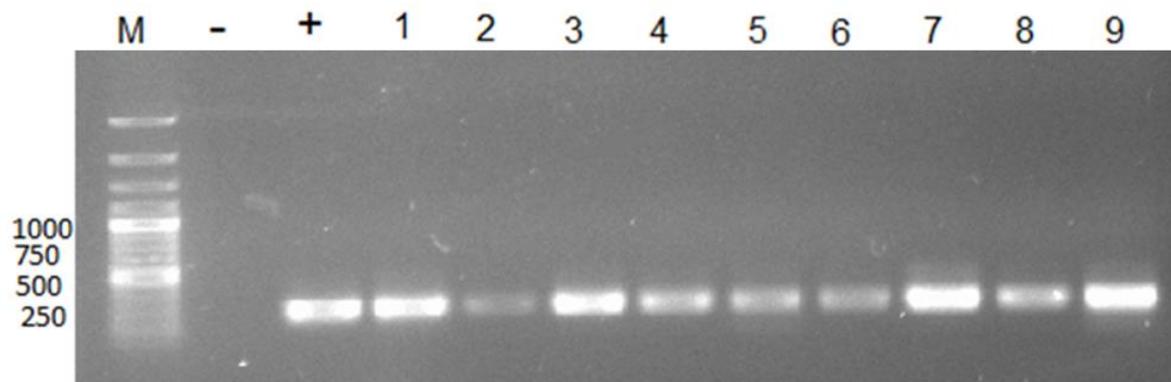


Figura 5. Amplificación por PCR de un fragmento del gen 16S rRNA en diferentes aislados clínicos. Se muestra una foto representativa de un gel mostrando el resultado del PCR. El amplificado es de aproximadamente 232 pb. M: marcador 100 pb de tamaño molecular de ADN (Thermo Scientific®), carriles 1- 9: diferentes aislados clínicos, (-): control negativo utilizando H₂O como molde y (+): control positivo con la cepa *Lactobacillus casei* ATCC 334.

7.4.- Análisis de secuenciación.

Los productos de PCR fueron purificados y enviados a MacroGen USA para su secuenciación (160 productos purificados). Se obtuvo datos de secuencia para el 94,1% de los productos de PCR purificados enviados (143 secuencias). Luego de realizar el alineamiento de las secuencias obtenidas contra la base de datos no-redundante (nr), utilizando el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), fue posible evidenciar que a pesar de que el medio utilizado para el cultivo de las muestras se describe como selectivo para *Lactobacillus* spp., crecieron también algunas especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Porphyromonas* (Tabla 6 y 7).

7.4.1 Distribución de especies según el tipo de muestra.

Las especies de *Lactobacillus* más frecuentemente aisladas a partir de las muestras de saliva de los participantes sin lesiones de caries fueron *L. fermentum* y *L. rhamnosus*. Un gran número de aislados de *Streptococcus vestibularis* y *Streptococcus salivarius* fueron también obtenidos a partir de estas muestras (Tabla 6).

La especie más frecuentemente aislada a partir de las muestras de saliva de los participantes que presentaban al menos una lesión de caries cavitada fue *L. salivarius*, seguido de *L. johnsonii*/*L. gasseri*, mientras que en el mismo grupo, a partir de las muestras de caries, las especies más frecuentemente aisladas fueron *L. casei* / *L. paracasei* y *L. rhamnosus* (Tabla 6).

Especies como *L. hokkaidonensis*, *L. vaginalis*, *L. acetotolerans* / *L. kitasatoni*, *L. mellis*, *L. gastricus* y *L. equigenerosi* fueron aislados con muy baja frecuencia y sin significancia estadística (Tabla 6).

Al comparar la presencia de las diferentes especies en las muestras de saliva de los niños con caries versus sin experiencia de caries, se observaron diferencias estadísticamente significativas para *L. fermentum* y *L. rhamnosus*, que se encontrarían asociadas a las muestras de saliva en ausencia de caries ($p=0,0007$ y $p=0,0196$ respectivamente) y para *L. salivarius* y *L. johnsonii* / *L. gasseri*, que se

encontrarían asociadas a las muestras de saliva en presencia de caries ($p < 0,001$ y $p = 0,0391$) (Tabla 6).

Tabla 6. Especies aisladas en muestras de saliva y caries del total de los participantes y análisis de test exacto de Fisher al comparar la presencia de las diferentes especies de *Lactobacillus* presentes en cada tipo de muestra.

<i>Especie</i>	Nro. de Aislados Clínicos			Test Exacto de Fisher		
	Saliva sin Caries	Saliva con Caries	Lesión de Caries	Saliva sin caries v/s Saliva con caries	Saliva sin caries v/s caries	Saliva con caries v/s caries
<i>L. fermentum</i>	18	2	4	0,0007*	0,0006*	1
<i>L. rhamnosus</i>	12	2	16	0,0196*	0,5100	0,0029*
<i>L. salivarius</i>	6	25	5	$p < 0,0001^*$	0,7582	$p < 0,0001^*$
<i>L. casei</i> / <i>L. paracasei</i> ⁽¹⁾	2	-	16	0,5000	0,0005*	$p < 0,0001^*$
<i>L. hokkaidonensis</i>	2	-	-	0,5000	0,2380	---
<i>L. johnsonii</i> / <i>L. gasserii</i> ⁽¹⁾	1	6	1	0,0400*	1	0,0391*
<i>L. vaginalis</i>	-	-	3	---	0,2430	0,2300
<i>L. acetotolerans</i> / <i>L. kitasatonis</i> ⁽¹⁾	-	2	-	0,2000	---	0,1770
<i>L. mellis</i>	-	-	1	---	0,5000	1
<i>L. gastricus</i>	-	-	2	---	1	0,5060
<i>L. equigenosii</i>	-	-	1	---	0,5000	1
<i>Porphyromonas somerae</i>	-	-	1			
<i>Staphylococcus epidermis</i>	-	-	3			
<i>S. vestibularis</i> / <i>S. salivarius</i> ⁽²⁾	10	2	-			
TOTAL	51	39	53			

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

(2) Se presentan estas dos especies en una categoría única para simplificar el análisis.

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

Al comparar la presencia de las diferentes especies en las muestras de saliva de los niños sin caries versus en los sitios de caries, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para *L. fermentum* que se encontraría asociada a la saliva en ausencia de caries ($p=0,0006$) y *L. casei* / *L. paracasei* que se encontraría asociada a las muestras de caries ($p=0,0005$) (Tabla 6).

Por último, al analizar las diferentes especies presentes en las muestras de saliva de niños con caries y compararlas a las muestras de caries, se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la distribución de *L. salivarius* y *L. johnsonii* / *L. gasseri* que se encontrarían asociadas a las muestras de saliva ($p<0,0001$ y $p=0,0391$ respectivamente) y para *L. rhamnosus* ($p=0,003$) y *L. casei* / *L. paracasei* ($p<0,0001$), que se encontrarían fuertemente asociadas a los sitios de caries (Tabla 6).

7.4.2 Distribución de especies por individuo, según condición de salud oral de los participantes (Libres de Caries v/s con Caries) y tipo de muestra.

Al realizar el análisis considerando como unidad de análisis los niños portadores de las diferentes especies, la más presente en los participantes sin lesiones de caries fue *L. fermentum*, siendo aislada a partir de muestras de saliva de 4 de los 8 niños sin lesiones de caries, es decir se encontró presente en el 50% de los participantes sin experiencia de caries (Tabla 7). Esta especie se encontró también presente en niños con caries, pero sólo 2 de los 9 niños con caries lo portaban en saliva (22,2%). La presencia de este microorganismo en estos dos grupos no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p=0,33$).

L. casei / *L. paracasei* se encontró en sitios de caries de 5 de los 9 niños participantes del estudio (55,6%), y sólo en una de las muestras de saliva de los niños sin experiencia de caries (12,5%) (Tabla 7). Sin embargo, esta distribución no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p=0,13$).

Tabla 7. Número de individuos que presentan las especies identificadas.

<i>Especie</i>	<i>Sin caries</i>	<i>Con caries</i>	
	Saliva	Saliva	Caries
<i>L. fermentum</i>	4	2	1
<i>L. rhamnosus</i>	2	1	3
<i>L. salivarius</i>	3	6	4
<i>L. casei / L. paracasei</i>	1	0	5
<i>L. hokkaidonensis</i>	2	0	0
<i>L. johnsonii / L. gasseri</i>	1	1	1
<i>L. vaginalis</i>	0	0	1
<i>L. acetotolerans / L. kitasatonis</i>	0	1	0
<i>L. mellis</i>	0	0	1
<i>L. gastricus</i>	0	0	1
<i>L. equigenerosi</i>	0	0	1
<i>Porphyromonas somerae</i>	0	0	1
<i>Staphylococcus epidermis</i>	0	0	2
<i>S. vestibularis / S. salivarius</i>	2	1	0

La especie que se presentó en el mayor número de niños con caries fue *L. salivarius*, que fue aislada a partir de 6 de las 9 muestras de saliva, es decir, se encontró en el 66,7% de los niños. A partir de las muestras de lesiones de caries se aisló desde 4 de los 9 niños con caries, es decir en el 44,4% de las muestras de lesiones de caries (Tabla 7). Sin embargo, esta especie también fue encontrada en 3 de los 8 niños libres de caries (37,5%), por lo que no existiría una asociación estadísticamente significativa para ninguna de las condiciones analizadas ($p= 0,35$ y $p=1$).

7.4.3 Distribución de especies según su capacidad de resistencia a ácido.

De las especies aisladas a partir de muestras de saliva de participantes sin lesiones de caries, sólo *L. fermentum* y *L. rhamnosus* fueron posibles de aislar a pH 4,2, obteniendo 9 y 5 aislados respectivamente, encontrados en 3 de los 8 participantes (37,5%). Mientras que a pH 6,2 fue posible aislar una mayor variedad de especies de *Lactobacillus*, incluyendo también *L. rhamnosus* y *L. fermentum*

encontrados en 2 y 4 de los 8 participantes respectivamente (25% y 50%) (Tabla 8). Se encontró diferencia estadísticamente significativa para el crecimiento de *L. fermentum* a pH 4,2 ($p=0,026$) no así para *L. rhamnosus* ($p=0,3$).

Tabla 8. Especies aisladas según su capacidad de resistencia a ácido en muestras de saliva de participantes sin lesiones de caries.

Especies	Número de aislados	
	Saliva pH 6,2	Saliva pH 4,2
<i>L. fermentum</i>	9	9
<i>L. rhamnosus</i>	7	5
<i>L. salivarius</i>	6	0
<i>L. casei / paracasei</i>	2	0
<i>L. hokkaidonensis</i>	1	1
<i>L. johnsonii / L. gasseri</i>	1	0
<i>S. vestibularis / S. salivarius</i>	10	0
TOTAL	36	15

De las especies aisladas a partir de muestras de saliva de participantes con al menos una lesión de caries cavitada fue posible aislar *L. salivarius*, *L. johnsonii / L. gasseri* y *L. acetotolerans* a pH 4,2, obteniendo 5, 3 y 2 aislados respectivamente, encontrados en 2 de los 9 participantes (22,2%). Sin embargo, la diferencia de distribución no fue estadísticamente significativa para ninguna de las tres especies mencionadas ($p=0,45$, $p=0,16$ y $p=0,06$, respectivamente). Mientras que a pH 6,2 fue posible aislar una mayor variedad de especies de *Lactobacillus* incluyendo también *L. salivarius* y *L. johnsonii / L. gasseri*, encontrados en 6 y 1 de los 9 participantes respectivamente (66,7% y 11,1%) (Tabla 9).

De las especies aisladas a partir de muestras de lesiones de caries fue posible aislar una mayor variedad de especies a pH 4,2 que las encontradas en saliva tanto de participantes sin experiencia de caries, como con caries (Tabla 9). Las más predominantes fueron *L. rhamnosus* con 6 aislados encontrados en 3 de los 9 participantes (33,3%) y *L. fermentum* y *L. casei/L. paracasei* ambos con 4 aislados, encontrados en 1 y 5 de los 9 participantes respectivamente (11,1% y

55,6%). Se determinó significancia estadística para la asociación entre *L. fermentum* (p=0,043) a pH 4,2 y para *L. casei/L. paracasei* a este pH (p=0,041), sin embargo no para *L. rhamnosus* (p=0,38).

Mientras que a pH 6,2 las especies más presentes en las muestras de lesiones de caries también correspondieron a *L. casei/L. paracasei* y *L. rhamnosus* con 12 y 10 aislados respectivamente, encontrados en 5 y 3 de los 9 participantes respectivamente (55,6% y 33,3%) (Tabla 9).

Tabla 9. Especies aisladas dependiendo del pH en muestras de saliva y caries de participantes con al menos una lesión de caries cavitada.

Espece	Saliva pH 6,2	Saliva pH 4,2	Caries pH 6,2	Caries pH 4,2
<i>L. fermentum</i>	2	0	0	4
<i>L. rhamnosus</i>	2	0	10	6
<i>L. salivarius</i>	20	5	2	3
<i>L. casei / L. paracasei</i>	0	0	12	4
<i>L. johnsonii / L. gasseri</i>	3	3	0	1
<i>L. vaginalis</i>	0	0	0	3
<i>L. acetotolerans / L. kitasatonis</i>	0	2	0	0
<i>L. mellis</i>	0	0	1	0
<i>L. gastricus</i>	0	0	0	2
<i>L. equigenerosi</i>	0	0	0	1
<i>Porphyromonas somerae</i>	0	0	0	1
<i>S. vestibularis / S. salivarius</i>	2	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermis</i>	0	0	3	0
TOTAL	29	10	28	25

8.- DISCUSIÓN

El presente estudio planteó como hipótesis que especies de *Lactobacillus* aisladas desde sitios de caries dentinaria profunda en niños de 7-11 años, poseen una mayor resistencia a ácido y difieren de las especies aisladas desde saliva de niños con o sin caries.

Luego de analizar los resultados obtenidos es posible observar que, si bien las especies identificadas no difieren significativamente de acuerdo al sitio de toma de muestra, si se observa una mayor diversidad y presencia de bacterias del género *Lactobacillus* en aquellas muestras que provenían desde lesiones de caries de los participantes con al menos una lesión de caries cavitada. También fue posible observar que las muestras provenientes de lesiones de caries, mostraron una mayor resistencia a ácido.

De acuerdo a esto se valida parcialmente la hipótesis planteada en esta investigación.

Características Demográficas de la Población en Estudio

Fueron seleccionados para este estudio 17 participantes entre los 7-11 años de edad, 8 sin experiencia de caries y 9 que presentaban al menos una lesión de caries cavitada. Fue difícil enrolar en el estudio sujetos libres de caries, debido a que en el rango de edad con el cual se trabajó los índices de COPD y ceod promedio a nivel nacional son bastante altos, 1,9 y 3,7 respectivamente (MINSAL, 2007), similar a los valores que fueron determinados en el grupo que presentaba lesiones de caries (COPD 2,22 y ceod 2,33).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las edades promedio de los participantes de ambos grupos. La edad promedio del grupo de participantes libres de caries fue de $10 \pm 1,2$ años y del grupo que presentaba al menos una lesión de caries cavitada fue de $10,4 \pm 1,1$ años, edad en que la mayoría de los niños se encuentran en proceso de recambio dentario, pasando de dentición mixta primera fase a dentición mixta segunda fase. Esto podría de alguna forma alterar los valores correspondientes al ceod aumentando el valor “e”

dependiendo de en qué etapa del recambio dentario se encontrara el participante. Sin embargo, los valores del grupo en estudio se acercan bastante al promedio nacional de acuerdo a la edad (MINSAL,2007).

La distribución por sexo no fue similar en ambos grupos, existiendo en ambos casos un porcentaje de hombres significativamente mayor al de mujeres, esto debido a que, a modo general, los hombres se mostraron más receptivos a colaborar con el estudio que las mujeres.

Toma de Muestras

Se recolectaron muestras de saliva no estimulada en todos los participantes y a partir de los participantes que presentaban lesiones de caries se obtuvieron además, muestras de sitio de caries. Ambos tipos de muestra fueron almacenados a 4°C por un corto periodo de tiempo hasta su procesamiento, lo cual limitó la cantidad de muestras que era posible recolectar cada vez.

A pesar de que en otros estudios (Caufield y cols., 2005 y Martínez-Pabón y cols., 2013) se utilizó saliva estimulada, en este estudio se optó por utilizar saliva no estimulada para la toma de muestras debido a que como se pretendía realizar los recuentos de U.F.C. en cada placa, el uso de saliva estimulada podría afectar los resultados de esto, junto con que debido a la edad de los participantes, se consideró peligroso el procedimiento de masticar parafina para estimular la producción de saliva, por el riesgo de asfixia o deglución de ésta por los participantes.

Otra metodología de toma de muestra fue la usada por Piwat y cols. (2010), quienes la realizaron mediante un método de espátula modificado, donde ésta era humedecida y colocada directamente sobre medio MRS. Sin embargo, este método tampoco habría permitido realizar recuentos de U.F.C.

Por su parte la recolección de muestras de sitio de caries se realizó de la misma forma que la descrita por Caufield y cols. (2005), pero su procesamiento fue inmediato y no se congelaron muestras para procesarlas de forma posterior.

Se realizó el procesamiento de las muestras no más allá de 1 hora posterior a la toma, a fin de evitar cualquier tipo de degradación o alteración que pudieran sufrir tanto las muestras de saliva como las de sitio de caries.

Crecimiento Bacteriano

Todas las muestras recolectadas tanto de saliva como de sitios de caries fueron cultivadas en medio de cultivo MRS (Oxoid) agarosa 1%, descrito como selectivo para *Lactobacillus* spp. (de Man J. y cols., 1960), a pH 6,2 (pH normal de crecimiento) y a pH 4,2, para el aislamiento de las cepas con mayor resistencia a ácido. Es importante destacar que el pH óptimo de crecimiento de bacterias ácido lácticas es 6,2 y se ha observado un crecimiento disminuido cuando éstas son cultivadas a pH 4,2 (Horiuchi M. y cols. 2009; Svensäter G. y cols. 2003).

Si bien diversos estudios indican que el medio de cultivo, agar MRS, es selectivo para *Lactobacillus* (de Man J. y cols., 1960; Siegumfeldt H. y cols., 2000; Colombo M. y cols., 2014), fue posible evidenciar, luego de obtener los resultados de secuenciación, que se obtuvo crecimiento de otros tipos de bacterias, como algunas especies de *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Porphyromonas*.

Debido a esto no fue posible realizar los recuentos bacterianos y tampoco comparar si el número de unidades formadoras de colonias (U.F.C.) a pH 6,2 era mayor o menor que a pH 4,2. Por esto el análisis realizado fue solamente considerando el crecimiento total o no de bacterias por placa a los diferentes pH.

A pesar de esta limitación metodológica, de todas formas fue posible determinar la existencia de una relación entre la procedencia de la muestra y el crecimiento a pH 4,2. Se pudo determinar que si existe una diferencia estadísticamente significativa al comparar el crecimiento desde las muestras obtenidas desde sitios de caries versus las muestras de saliva desde los niños con caries (Test exacto de Fisher, $p=0,084$), indicando que existiría una asociación entre las muestras de caries y el crecimiento a pH 4,2. Esto permite indicar que las muestras obtenidas desde sitios de caries poseen *Lactobacillus* spp. con mayor capacidad de resistencia a ácido que las muestras de saliva de los mismos niños con caries.

De la misma forma no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el crecimiento a pH 4,2 de las muestras de saliva de niños sin caries versus los niños con caries (Test exacto de Fisher, $p=0,62$), indicando que no existe asociación entre estas muestras y el crecimiento a este pH.

Estos resultados validan parcialmente la hipótesis, ya que las especies de *Lactobacillus* en saliva no poseerían una capacidad de resistencia a ácido aumentada. Esto puede deberse a que el pH salival se encuentra generalmente cercano a la neutralidad (Hojo K. y cols., 2009), y los microorganismos no requerirían este tipo de mecanismos de supervivencia al habitar este ambiente.

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

Se encontró amplificación positiva por PCR en más de un 90% de las cepas analizadas. No fue posible amplificar el 100% de las cepas, probablemente debido a que en algunos casos no existía suficiente ADN para una correcta amplificación o también debido a que podrían no tratarse de bacterias o ser otras especies bacterianas, por lo que los partidores utilizados para la amplificación no serían útiles.

Los partidores utilizados para la amplificación del fragmento de 232 pb fueron descritos como específicos para *Lactobacillus* spp. (Caufield P. y cols., 2007; Byun R. y cols., 2004), sin embargo posteriormente al realizar la secuenciación de los fragmentos obtenidos se observó que amplificaron también para otras especies bacterianas como *S. salivarius* y *S. vestibularis*, entre otras. Esto implicaría que los partidores no serían completamente específicos para el género *Lactobacillus*.

Análisis de Secuenciación

Se obtuvo datos de secuencia para el 94,1% de los productos de PCR purificados enviados a Macrogen USA, esto podría deberse a que durante el traslado muchas veces se degradan algunos de los fragmentos purificados. O bien a que las condiciones de secuenciación no fueran óptimas para todos los fragmentos de ADN.

Distribución de Especies Según el Tipo de Muestra

Las especies más frecuentemente aisladas a partir de muestras de saliva de los participantes sin lesiones de caries fueron *L. fermentum* y *L. rhamnosus* observándose diferencias estadísticamente significativas que las asociarían a muestras de saliva de participantes sin lesiones de caries. Estos resultados coinciden con lo expuesto por Piwat S. y cols. (2010), donde también *L. fermentum* fue una de las especies más prevalentes en el grupo de participantes libres de caries.

De la misma forma, también se encontró una asociación estadísticamente significativa para la presencia de *L. salivarius* y *L. johnsonii* / *L. gasseri* en muestras de saliva de participantes con al menos una lesión de caries cavitada. Esto también coincidiría con lo expuesto anteriormente por Piwat S. y cols. (2010) quien también encontró una asociación positiva para la presencia de *L. salivarius* en muestras de saliva de niños con alta experiencia de caries.

Streptococcus vestibularis y *Streptococcus salivarius* también fueron encontrados asociados a muestras de saliva provenientes de participantes sin lesiones de caries. Estos han sido mencionados en diversas publicaciones como microorganismos comensales que formarían parte de la biopelícula dental, corresponden a *Streptococcus* del tipo no-mutans y han sido asociados más a estados de salud que por su participación en el proceso de caries mismo, siendo incluso postulados para su uso como probióticos (Burton J. y cols., 2011; Wescombe P. y cols., 2012; Delorme C. y cols., 2015 y Gao X. y cols., 2016). Ambos corresponden a bacterias comensales que habitarían tanto en la cavidad

oral como en la vía aérea superior y tracto gastrointestinal de los humanos (Mignolet J. y cols., 2016), poseen la capacidad de fermentar azúcares y producir ácido láctico como resultado de esto. Son similares a las especies del género *Lactobacillus*, ya que ambas pertenecen al orden *Lactobacillales*, lo que podría explicar la presencia de estas bacterias en las muestras obtenidas y su crecimiento en las placas de MRS.

Las especies más frecuentemente aisladas a partir de muestras de saliva de los participantes que presentaban al menos una lesión de caries cavitada fueron *L. salivarius* y *L. johnsonii* / *L. gasseri*, que al ser comparadas con las muestras de sitio de lesión de caries, donde las especies más frecuentemente aisladas fueron *L. casei* / *L. paracasei* y *L. rhamnosus*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas, pudiendo asociar la presencia de *L. salivarius* y *L. johnsonii* / *L. gasseri* a las muestras de saliva de participantes con al menos una lesión de caries cavitada y *L. casei* / *L. paracasei* y *L. rhamnosus* a las muestras obtenidas a partir de lesiones de caries. Esto coincide con lo encontrado por Pivat S. y cols. (2010) donde *L. salivarius* y *L. casei* fueron las especies más presentes en niños con alta experiencia de caries. También concuerda con lo encontrado en adultos por Marchant S. y cols. (2001) y Wolff D y cols. (2013), donde *L. casei* y *L. rhamnosus* fueron las especies más prevalentes en muestras de dentina infectada.

Distribución de especies por individuo, según condición de salud oral de los participantes (Libres de Caries v/s con Caries) y tipo de muestra.

En los participantes libres de caries la especie más presente fue *L. fermentum*, la cual fue encontrada en el 50% de los participantes con esta condición. Esta especie también fue posible de aislar a partir de las muestras obtenidas a partir de los participantes que presentaban al menos una lesión de caries cavitada, pero sólo en el 22,22% de éstos, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas para la presencia de esta especie en ambos grupos ($p=0,33$). De la misma forma en que fue reportado por Pivat S. y cols. (2010) quien encontró que *L. fermentum* era la especie más prevalente en muestras de saliva de niños tailandeses sin importar la condición de salud oral de éstos.

La especie más presente en niños con caries fue *L. casei* / *L. paracasei*, que se encontró en sitios de caries de 5 de los niños participantes del estudio (55,5%), y sólo en una de las muestras de saliva de los niños sin experiencia de caries (12,5%). Sin embargo, a pesar de que esta distribución no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p=0,13$), este hallazgo coincide con lo descrito previamente en la literatura por Marchant S. y cols. (2001); Lima K. y cols. (2011); Wolff D. y cols. (2013) donde describen a *L. casei* como una de las especies más prevalentes en muestras de dentina de sitios de lesiones de caries.

L. salivarius fue la especie más presente entre en los participantes que presentaban al menos una lesión de caries cavitada, siendo aislada a partir del 66,7% de las muestras de saliva de los niños con caries, y a partir del 44,4% de las muestras de lesiones de caries. Sin embargo, esta especie también fue encontrada en el 37,5% de los niños libres de caries por lo que no existiría una asociación con ninguna de las dos condiciones analizadas ($p= 0,35$ y $p=1$), a diferencia de lo expuesto por Piwat S. y cols. (2010) quien asoció esta especie con una alta experiencia de caries.

Distribución de especies según su capacidad de resistencia a ácido

De las especies aisladas a partir de muestras de saliva de participantes sin lesiones de caries fue posible aislar *L. rhamnosus* y *L. fermentum* a pH 4,2, y a partir de muestras de saliva de participantes con al menos una lesión de caries cavitada fue posible aislar *L. salivarius*, *L. johnsonii*/*L. gasseri* y *L. acetotolerans* a este pH.

Finalmente, de las especies aisladas a partir de muestras de lesiones de caries fue posible aislar una mayor variedad de especies a pH 4,2 que las encontradas en saliva tanto de participantes libres de caries así como con caries. Las más predominantes fueron *L. rhamnosus*, *L. casei*/*L. paracasei* y *L. fermentum*.

Esto indicaría que estas especies podrían poseer mecanismos de resistencia a ácido mayores a las demás especies de *Lactobacillus* aisladas a partir de estas muestras. A la fecha, se han descrito mecanismos de resistencia a ácido en un

gran número de especies de *Lactobacillus*, lo que podría corresponder a los mecanismos que les permitirían sobrevivir en estas condiciones ácidas (Cooter P. y Hill C., 2003). Estos resultados además, son concordantes con los expuestos previamente en la literatura por Kianoush N. y cols., (2014) quien observó que en capas más profundas de dentina en lesiones de caries existían pHs más bajos, siendo el Filo *Firmicutes* el más abundante en esta condición (78% a pH 4,5-5,0), y *Lactobacillus* el *Firmicutes* más presente en estas comunidades (77%).

Si bien las distintas especies de *Lactobacillus* que fueron posibles aislar tanto a pH 6,2 y 4,2 no difieren significativamente, si es posible determinar una asociación entre el sitio de toma de muestra y el crecimiento a pH ácido (4,2). Los aislados obtenidos a partir de muestras de sitio de caries mostraron una capacidad de resistencia a ácido mayor que los obtenidas a partir de muestras de saliva de los niños con de caries. Esto nos permitiría concluir que si bien las especies son las mismas, existirían mecanismos fisiológicos que le permitirían a las bacterias generar una mayor resistencia a ácido de acuerdo al pH ambiental al que se ven expuestas.

Tal como propusieron Takahashi N. y Nyvad B. (2011), en su extensión a la hipótesis de placa ecológica, existiría una relación entre los cambios dinámicos en las propiedades fenotípicas y genotípicas de la placa bacteriana, ya que frente a ciertos fenómenos, como un cambio en la acidez del medio, se generaría una adaptación microbiana, con la subsecuente selección inducida por ácido de bacterias más resistentes a ácido y acidogénicas.

***Lactobacillus* spp. y su uso como Probiótico**

Algunas especies de *Lactobacillus* han sido propuestas como agentes probióticos que contribuirían a la mantención del estado de salud oral, principalmente debido a investigaciones que indican que poseerían una actividad inhibitoria sobre *Streptococcus* del tipo mutans y patógenos periodontales como *P. gingivalis* y *A. actinomycetencomitans* (Koll-Klais P. y cols., 2005; Teanpaisan R. y cols., 2011).

En este estudio se observó que cepas tanto de *L. rhamnosus* como de *L. salivarius*, ambos considerados para su uso como probióticos, fueron posibles de aislar a partir de muestras de dentina infectada, inclusive encontrando una asociación positiva para la presencia de *L. salivarius* en muestras de saliva de pacientes con al menos una lesión de caries cavitada.

En el año 2012 Juneja A. y Kakade A., evaluaron los cambios en los niveles de *Streptococcus mutans* en saliva de niños luego de una intervención con leche suplementada con probióticos *L. rhamnosus* hct 70, encontrando que los niveles de *S. mutans* disminuían inmediatamente luego del consumo del probiótico. Otro estudio de Nishihara T. y cols. (2014) determinó que el uso de probióticos en forma de tabletas que contenían *L. salivarius* aumentaba la resistencia a los factores de riesgo para caries, disminuyendo los niveles de *S. mutans* y mejorando además la capacidad buffer de la saliva, a pesar de aumentar los niveles de *Lactobacilli* en la saliva de los individuos que consumían el probiótico.

Si bien *Lactobacillus* spp. no tendría un rol importante en el inicio del proceso de caries, si lo tendría en la progresión de este al encontrarse asociado en mayor medida a lesiones de caries ya cavitadas (Martínez-Pabón M. y cols., 2013) y sería de gran importancia considerar esto al momento de pensar en utilizar estas bacterias como probióticos, más aun considerando que una de las especies más utilizada como tal corresponde a *L. rhamnosus* que ha sido asociada tanto en este estudio, como en otros (Marchant S. y cols., 2001 y Wolff D. y cols. 2013), como un participante importante en el desarrollo y progresión de lesiones de caries.

9.- CONCLUSIONES

Las especies de *Lactobacillus* aisladas desde sitios de caries de niños de 7-11 años de edad, poseen una mayor resistencia a ácido que las obtenidas desde muestras de saliva de los mismos niños con caries.

Los niños de 7-11 años con al menos una lesión de caries cavitada presentan mayor diversidad de especies de *Lactobacillus* en boca, que los niños sin lesiones de caries para el mismo rango de edad.

Existen especies de *Lactobacillus* relacionadas a la ausencia de caries (*L. fermentum* y *L. rhamnosus*) y otras relacionadas a la presencia de caries, específicamente a saliva (*L. salivarius* y *L. johnsonii* / *L. gasseri*) o a sitios de caries (*L. casei* / *L. paracasei*).

Existen especies de *Lactobacillus* (*L. fermentum* y *L. casei* / *L. paracasei*) que poseerían mayor resistencia ácido y que se encontrarían principalmente habitando sitios de caries.

Lactobacillus fermentum se encontraría asociado positivamente al crecimiento a pH 4,2 tanto a partir de muestras provenientes de lesiones de caries como de saliva de niños de 7-11 años sin experiencia de caries.

Lactobacillus casei/*Lactobacillus paracasei* se encontraría asociado positivamente al crecimiento a pH 4,2 a partir de muestras provenientes de lesiones de caries de niños de 7-11 años con experiencia de caries.

10.- SUGERENCIAS

Se sugiere aumentar el número de participantes en el estudio, tanto sin experiencia de caries como con lesiones de caries a fin de aumentar el poder estadístico de los resultados, así como también sería interesante profundizar más en relación a los mecanismos de resistencia a ácido que poseerían las distintas especies de *Lactobacillus*.

11.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aas J., Griffen A., Darlis S., Lee A., Olsen I., Dewhirst F., Leys E. and Paster B. (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 46:1407-1417.
2. Almstahl A., Lingström P., Eliasson L. and Carlén A. (2012). Fermentation of sugars and sugar alcohols by plaque *Lactobacillus* strains. *Clin Oral Invest* 17:1465-1470.
3. Azevedo T., Becerra A. and de Toledo O. (2005). Feeding habits and severe early childhood caries in Brazilian preschool children. *Pediatr Dent* 27:28-33.
4. Blumhagen A., Singh P., Mustapha A., Chen M., Wang Y. and Yu Q. (2014). Plasma deactivation of oral bacteria seeded on hydroxyapatite disks as tooth enamel analogue. *Am J Dent* 2:84-90.
5. Broadbent J., Larsen R., Deibel V. and Steele J. (2010). Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress. *J Bacteriol.* 192:2445-2458.
6. Burton J., Wescombe P., Cadieux P. and Tagg J. (2011). Beneficial microbes for the oral cavity: time to harness the oral *Streptococci*?. *Benef Microbes.* 2:93-101.
7. Byun R., Nadkarni M., Chhour K., Martin F., Jacques N. and Hunter N. (2004). Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *J Clin Microbiol.* 42:3128–3136.
8. Caufield P., Li Y., Dasanayake A. and Saxena D. (2007). Diversity of *Lactobacilli* in the oral cavities of young women with dental caries. *Caries Res.* 41:2-8.
9. Colombo M., de Oliveira A., de Carvalho A. and Nero L. (2014). Development of an alternative culture medium for the selective enumeration of *Lactobacillus casei* in fermented milk. *Food Microbiol.* 39:89-95.
10. Cotter P. and Hill C. (2003). Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67:429-453.

11. Delorme C., Abraham A., Renault P. and Guédon E. (2015). Genomics of *Streptococcus salivarius*, a major human commensal. *Infect Genet Evol.* 33:381-392.
12. Dong Y., Pearce E., Yue L., Larsen M., Gao X. and Wang J. (1999). Plaque pH and associated parameters in relation to caries. *Caries Res* 33:428-436.
13. Fejerskov O. and Manji F. (1990). Risk assessment in dental caries. In: Bader JD, editor. *Risk assessment in dentistry. Chapel Hill: University of North Caroline Dental Ecology*; 1990:215–7.
14. Gao X., McGrath C. and Lin H. (2011). Oral health status of rural-urban migrant children in South China. *Int J Paediatr Dent.* 21:58-67.
15. Gao X., Jiang S., Koh D. and Hsu C. (2016). Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontol 2000.* 70:128-41.
16. Hallett K. and O'Rourke P. (2003). Social and behavioral determinants of early childhood caries. *Aus Dent J.* 48:27-33.
17. Haukioja A., Söderling E. and Tenovuo J. (2008). Acid production from sugars and sugar alcohols by probiotic *Lactobacilli* and *Bifidobacteria in vitro*. *Caries Res* 42:449-453.
18. Horiuchi M., Washio J., Mayanagi H. and Takahashi N. (2009). Transient acid-impairment of growth ability of oral *Streptococcus*, *Actinomyces*, and *Lactobacillus*: a possible ecological determinant in dental plaque. *Oral Microbiol Immunol.* 24:319-24.
19. Hojo K., Nagaoka S., Ohshima T. and Maeda N. (2009). Bacterial Interactions in dental biofilm development. *J Dent Res* 88:982-990.
20. Hutkins R. and Nannen L. (1993). pH homeostasis in lactic acid bacteria. *J Dairy Sci.* 76:2354-2365.
21. Ismail A., Sohn W., Tellez M., Amaya A., Sen A., Hanson H. and Pitts N. (2007). The International Caries and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dent Oral Epidemiol* 35:170-178.

22. Juneja A. and Kakade A. (2012). Evaluating the effect of probiotic containing milk on salivary *mutans streptococci* levels. *J Clin Pediatr Dent* 37:9-14.
23. Kassebaum N., Bernabé E., Dahiya M., Bhandari B., Murray C. and Marcenes W. (2015). Global burden of untreated caries: A systematic review and metaregression. *J Dent Res.* 94:650-8.
24. Kianoush N., Adler C., Nguyen K., Browne G., Simonian M. and Hunter N. (2014). Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. *Plos One.* 9:e92940.
25. Klander O. and Weiss N. (1986). Genus *Lactobacillus*. In: Sneath P., Mair N., Sharpe M., Holt J., editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology, 9th edition.* Baltimore (MD): Williams & Wilkins. P. 1063-1065.
26. Klein H., Palmer C, and Knutson J. (1938). Studies in dental caries: Dental status and needs of elementary school children. *Public Health Reporter* 53:751-765.
27. Koll-Klais P., Mandar R., Leibur E., Marcotte H., Hammarstrom L. and Mikelsaar M. (2005). Oral *Lactobacilli* in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiol Immunol.* 20:354-361.
28. Lima K., Coehlo L., Pinheiro I., Rocas I. and Siqueira J. (2011). Microbiota of dentinal caries as assessed by reverse-capture checkerboard analysis. *Caries Res.* 45:21-30.
29. Loesche W. (1992). The specific plaque hypothesis and the antimicrobial treatment of periodontal disease. *Dent Update.* 19: 68.
30. de Man J., Rogosa M. and Sharpe M. (1960). A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. *J Appl Bact.* 23:130–135.
31. Marchant S., Brailsford S., Twomey A., Roberts G. and Beighton D. (2001). The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res* 35:397-406.

32. Marsh P. (1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 8:263-271.
33. Martínez-Pabón M., Morales-Ushima S. and Martínez-Delgado C. (2013) Dental caries in young adults regarding saliva's microbiological and physical-chemical characteristics. *Rev Salud Pública.* 15:844-856.
34. Matsui R. and Cvitkovitch D. (2010). Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiol.* 5:403–417.
35. Mignolet J., Fontaine L., Kleerebezem M. and Hols P. (2016). Complete genome sequence of *Streptococcus salivarius* HSISS4, a human commensal bacterium highly prevalent in the digestive tract. *Genome Announc.* 4:e01637-15.
36. MINSAL. (2012). Diagnóstico nacional de salud bucal de los niños y niñas de 2 y 4 años que participan en la educación parvularia. Chile 2007 – 2010.
37. MINSAL. (2007). Diagnóstico Nacional de Salud Bucal de los niños de 6 años. Chile, 2007.
38. Nancy J. and Dorignac G. (1992). *Lactobacilli* from the dentin and saliva in children. *J Clin Pediatr Dent.* 16:107-111.
39. Nishihara T., Suzuki N., Yoneda M. and Hirofuji T. (2014). Effects of *Lactobacillus salivarius*-containing tablets on caries risk factors: a randomized open-label clinical trial. *BMC Oral Health.* 14:110.
40. Opal S., Garg S., Jain J. and Walia I. (2015). Genetic factors affecting dental caries risk. *Aust Dent. J* 60: 2–11.
41. Organización Mundial de la Salud (OMS). (1997) Encuestas de Salud Bucodental. Métodos Básicos. 4 ed. Ginebra, Organización Mundial de la Salud.
42. Ouwehand A., Salminen S. and Isolauri E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek.* 82:279-289.
43. Petersen P. (2003). The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century – the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Comm Dent Oral Epidemiol.* 31:3–24.

44. Pham L., van Spanning R., Roling W., Prosperi A., Terefework Z., ten Cate J., Crielaard W. and Zaura E. (2009). Effects of probiotic *Lactobacillus salivarius* W24 on the compositional stability of oral microbial communities. *Arch Oral Biol.* 54:132-137.
45. Piwat S., Teanpaisan R., Thitasomakul S., Thearmontree A. and Dahlén G. (2010). *Lactobacillus* species and genotypes associated with dental caries in Thai preschool children. *Mol Oral Microbiol.* 25:157-164.
46. Piwat S., Teanpaisan R., Dahlen G., Thitasomakul S. and Douglas C. (2012). Acid production and growth by oral *Lactobacillus* species *in vitro*. *J Inv Clin Dent.* 3:56-61.
47. Preza D., Olsen I., Willumsen T., Boches S., Cotton S., Grinde B. and Paster B. (2009). Microarray analysis of the microflora of root caries in elderly. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 28:509-517.
48. Saulnier D., Kolida S. and Gibson G. (2009). Microbiology of the human intestinal tract and approaches for its dietary modulation. *Curr Pharm Des.* 15:1403-1414.
49. Sayegh A., Dini E., Holt R. and Bedi R. (2005). Oral health, sociodemographic factors, dietary and oral hygiene practices in Jordanian children. *J Dent.* 33:379-88.
50. Selwitz R., Ismail A. and Pitts N. (2007). Dental Caries. *Lancet* 369: 51-59.
51. Siegumfeldt H., Rechinger K. and Jakobsen M. (2000). Dynamic changes of intracellular pH in individual lactic acid bacterium cells in response to a rapid drop in extracellular pH. *Appl Environ Microbiol.* 73:2661-2672.
52. Sturr M. and Marquis R. (1992). Comparative acid tolerances and inhibitor sensitivities of isolated F-ATPases of oral acid lactic bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 58:2287-2291.
53. Sujlana A. and Pannu P. (2015). Family related factors associated with caries prevalence in the primary dentition of five-year-old children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 33:83-87.

54. Svensäter G., Borgström M., Bowden G. and Edwardsson S. (2003). The acid-tolerant microbiota associated with plaque from initial caries and healthy tooth surfaces. *Caries Res.* 37:395-403.
55. Takahashi N. and Nyvad B. (2011). The role of bacteria in the caries process: Ecological perspective. *J Dent Res.* 90:264-303.
56. Teanpaisan R., Piwat S. and Dahlén G. (2011). Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. *Lett Appl Microbiol.* 53:452-459.
57. Theilade E. (1986). The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 13:905-911.
58. Tsai Y., Cheng P. and Pan T. (2012). The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Appl Microbiol Biotechnol.* 96:853-862.
59. Twetman S. and Stecksén-Blicks C. (2008). Probiotics for caries prevention and control. *Adv Dent Res.* 24:98-102.
60. Van Houte J., Aasenden R. and Peebles T. (1981). *Lactobacilli* in human dental plaque and saliva. *J Dent Res.* 60:2-5.
61. Wescombe P., Hale J., Heng N. and Tagg J. (2012). Developing oral probiotics from *Streptococcus salivarius*. *Future Microbiol.* 7:1355-71.
62. Wolff D., Frese C., Maier-Kraus T., Krueger T. and Wolff B. (2013). Bacterial biofilm composition in caries and caries-free subjects. *Caries Res* 47:69-77.
63. World Health Organization. 2002. The world health report. Reducing risks, promoting healthy life. <http://www.who.int/whr/2002/en/>.
64. Wu C., Zhang J., Chen W., Wang M., Du G. and Chen J. (2012). A combined physiological and proteomic approach to reveal lactic-acid-induced alterations in *Lactobacillus casei* Zhang and its mutant with enhanced lactic acid tolerance. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93:707-722.

65. Wu R., Zhang W., Sun T., Wu J., Yue X., Meng H. and Zhang H. (2011). Proteomic analysis of responses of a new probiotic bacterium *L. casei* Zhang to low acid stress. *Int J Food Microbiol.* 147:181-187.
66. Zayed G. and Roos Y. (2004). Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process Biochem.* 39:1081-1086.

12.- ANEXOS

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

- > Respecto a la metodología, aclaró el mecanismo exacto de difusión de información hacia el sujeto. Y operacionalizó la categoría de "niños chilenos."
- > Respecto a aspectos éticos cambió en el CI "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 Carta Autorización para Toma de Muestras en Unidad de Diagnóstico



SANTIAGO, noviembre 06 de 2012

Señor Profesor
Dr. Juan CORTES ARAYA
Presidente Comité Ético Científico
Vicedecano Facultad Odontología, U. de Chile
Presente

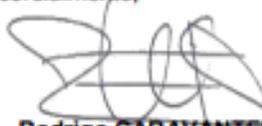
Estimado Sr. Vicedecano:

Mediante la presente me dirijo a Usted para dejar constancia que estoy en conocimiento del Proyecto de investigación titulado: "Regulación de la respuesta de tolerancia a ácido en *Lactobacillus casei*: entendiendo su propiedad acidúrica en la progresión de la caries dental", que será presentado al concurso Programa U-Inicia, Concurso de Reforzamiento de Inserción Productiva de Nuevos Académicos, VID 2012, por la Investigadora Responsable Profesora Dra. Claudia Lefimil Puente.

De ser aprobado este proyecto, los pacientes, niños de 7-11 años de edad, serían citados al Servicio de Diagnóstico, donde se les realizaría un examen clínico de su cavidad oral para determinar sus índices ceod y COPD y se realizaría toma de muestras de saliva (con pipeta plástica estéril desechable) y desde sitios de caries (con espátula esterilizada, para aquellos que posean caries cavitadas), previa información verbal, escrita y firma de consentimiento informado por parte del padre o tutor del niño.

Informo a Usted que autorizo el desarrollo de dicha investigación y las acciones clínicas requeridas para ello, junto con facilitar el acceso a las dependencias del Servicio de Diagnóstico para los propósitos previamente enunciados.

Sin otro particular le saluda cordialmente,


Rodrigo CARAVANTES FUENTES
Director
Clínica Odontológica U. de Chile



C.C.:

-Prof. Dr. Raúl Sáez S. – Jefe Servicio de Diagnóstico, Clínica Odontológica
-Prof. Dra. Claudia Lefimil Puente – Investigadora Responsable del Proyecto
archivo.

RCJ/jmar.

AV. LA PAZ N° 750 – FONOS 9785011 – 9785021 - FONO FAX 9785018 - SANTIAGO-CHILE
e-mail: clinicas@odontologia.uchile.cl

12.3 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 / /

		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:	

