

*Departamento de
Patología.
Área de Microbiología*

“Transmisión horizontal de genotipos de *Streptococcus mutans* entre párvulos chilenos de 3 a 4 años de edad, con diferentes experiencias de caries, pertenecientes al mismo grupo curso”

Javiera Roa Fonseca

Trabajo de Investigación

Requisito Para Optar al Título de
Cirujano Dentista

TUTOR PRINCIPAL

Prof.Marta Gajardo Ramírez

TUTORES ASOCIADOS

Dr. Andrés Celis Sersen

*Departamento de
Patología.
Área de Microbiología*

“Transmisión horizontal de genotipos de *Streptococcus mutans* entre párvulos chilenos de 3 a 4 años de edad, con diferentes experiencias de caries, pertenecientes al mismo grupo curso”

Javiera Roa Fonseca

Trabajo de Investigación

Requisito Para Optar al Título de
Cirujano Dentista

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Marta Gajardo Ramírez

TUTORES ASOCIADOS

Dr. Andrés Celis Sersen

Agradecimientos

Quiero dar las gracias a todos quienes me acompañaron durante este último proceso de mi etapa formativa: familiares, amigos, y en especial a mi novio, quien me apoyó (y soportó) incondicionalmente en los días críticos.

Agradecer a mis tutores, quienes me apoyaron y animaron ante los numerosos obstáculos que se nos presentaron durante todo el desarrollo de este trabajo, a pesar de lo ocupados que siempre están. Son los mejores ¡muchas gracias!

Y por supuesto, agradecer a todo el equipo del laboratorio de microbiología por la excelente disposición y ayuda que siempre me brindaron (Dani, Darna, sin ustedes no sé qué habría hecho), haciendo muy ameno el desarrollo de mi trabajo en aquel lugar.

ÍNDICE

1. Marco teórico	2
1.1 Introducción	2
1.2 Microbiota bucal	3
1.3 Adquisición de la microbiota bucal normal	4
1.4 Formación del biofilm dental	5
1.5 Caries dental	7
1.6 Patogénesis de la caries dental	8
1.7 Factores de riesgo	10
1.8 <i>Streptococcus mutans</i>	12
1.9 Epidemiología de la caries en preescolares chilenos	17
2. Hipótesis	20
3. Objetivo general	20
3.1 Objetivos específicos	20
4. Materiales y métodos	21
4.1 Tipo de estudio	21
4.2 Evaluación clínica y selección de niños	21
4.3 Toma de muestra para cultivo microbiológico	21
4.4 Procedimientos microbiológicos	21
4.5 Detección de adn genómico bacteriano mediante PCR y partidores universales	22
4.6 Identificación a nivel de especie de <i>S. mutans</i> mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
4.7 Identificación a nivel de genotipo de <i>s. mutans</i> mediante reacción en cadena de la polimerasa con partidores arbitrarios (AP-PCR)	24

4.8 Análisis de datos	24
5. Resultados	25
5.1 Caracterización de la muestra	25
5.2 Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) por muestra.	26
5.4 Obtención de aislados de <i>S. mutans</i>	28
5.5 Identificación de los aislados a nivel de especie mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
5.6 Identificación a nivel de genotipo mediante reacción en cadena de la polimerasa con partidores arbitrarios (AP-PCR)	30
5.7 Evaluación y comparación de diversidad genotípica de <i>S. mutans</i>.	32
6. Discusión	36
7. Conclusiones	42
8. Referencias bibliográficas	43
9. Anexos y apéndices	49
9.1. Anexo 1. Consentimiento informado	49
9.2 Anexo 2. Certificado aprobación bioética.	53

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la consitución del biofilm de placa dental de Kolenbrander y cols.....	6
Figura 2. Matrix extracelular del biofilm en sacarosa, de Lemos y cols.....	7
Figura 3. Diagrama del proceso de caries, de Selwitz y cols.....	9
Figura 4. Esquema de factores involucrados en el desarrollo de caries, de Selwitz y cols.....	11
Figura 5. Cadenas y colonias de <i>S. mutans</i> , del Laboratorio de Microbiología Oral, FOUCH.....	12
Figura 6. Áreas de la microbiología favorecidas por el estudio de la especie <i>Streptococcus mutans</i> , de Lemos y cols.....	13
Figura 7. Esquema de factores de virulencia de <i>S. mutans</i> involucrados en la colonización y formación de biofilm, de Krzysciak y cols.....	14
Figura 8. Dendograma de la diversidad genética de <i>S. mutans</i> en preescolares, de Pieralisi y cols.....	16
Figura 9. Prevalencia de historia de caries en párvulos, de MINSAL.....	19
Figura 10. Colonias de <i>S. mutans</i> sembradas en agar TYCSB.....	26
Figura 11. Aislados bacterianos de <i>S. mutans</i>	28
Figura 12. PCR para identificación ADN bacteriano.....	29
Figura 13. PCR para identificación de <i>S. mutans</i>	30
Figura 14. AP-PCR para identificación de huellas dactilares de <i>S. mutans</i>	31
Figura 15. Identificación distintos genotipos de <i>S. mutans</i>	32
Figura 16. Dendograma de la diversidad genética de <i>S. mutans</i> en preescolares..	33

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribución de sujetos según sexo.....	26
---	----

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización de las muestras mediante género, edad, experiencia de caries y recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de <i>S. mutans</i>	27
Tabla 2. Muestras y genotipos de <i>S. mutans</i>	34
Tabla 3. Relación UFC / genotipos.....	35

Resumen

Introducción: *Streptococcus mutans* está presente en más del 90% de los seres humanos como parte de la microbiota comensal de la cavidad bucal, y ha sido reportado como factor etiológico de caries dental. Mayor diversidad de genotipos de *S. mutans* se ha asociado con la habilidad de colonizar y resistir el stress ambiental, pero aún no existe consenso respecto de la relación entre la patogenicidad de los genotipos aislados de la cavidad oral de los preescolares chilenos y su experiencia de caries.

Estudios que han usado metodologías que permiten la fenotipificación y/o genotipificación sugieren que la madre es la principal fuente de infección en niños portadores de *S. mutans* y que la saliva es el vehículo principal para esta transferencia. Sin embargo, la detección de genotipos que no son encontrados en las madres o en otros miembros cercanos de la familia indica que *S. mutans* puede ser adquirido de otras fuentes. Entender la distribución y comportamiento de distintos genotipos de *S. mutans* resulta útil para establecer grupos de riesgo.

Materiales y métodos: Se obtuvieron muestras de saliva mediante gotario, de un grupo de 21 niños con distinta experiencia de caries. A partir de ellas se aislaron colonias de *S. mutans*, identificadas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De estos aislados se identificó, mediante reacción en cadena de la polimerasa con partidores arbitrarios (AP-PCR), la presencia de distintos genotipos de *S. mutans*.

Resultados: 1 a 5 genotipos de *S. mutans* colonizan la cavidad oral de los niños examinados y al menos uno de ellos es compartido por el grupo de párvulos.

Conclusiones: Preescolares chilenos son portadores de distintos genotipos de *S. mutans* en su cavidad bucal y estos podrían ser transmitidos en forma horizontal.

1. Marco Teórico

1.1 Introducción

Entre las especies bacterianas que residen normalmente en la cavidad bucal, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), se reconoce como una de las más importantes en la etiología de la caries. Además, ha cobrado mayor relevancia debido a que, aparte de ser acidogénico y acidúrico, utiliza la sacarosa para producir glucanos insolubles en la matriz del biofilm, los que juegan un rol fundamental en la adherencia microbiana y el desarrollo de la enfermedad. Esta serie de sucesos modifican las características físicas y químicas del biofilm, un paso fundamental en la progresión de las infecciones orales, resultando en cambios ecológicos que favorecen el crecimiento de *S. mutans* junto a otras especies bacterianas involucradas en el desarrollo de la caries.

Por otro lado, un mayor recuento de *S. mutans* en saliva, ha sido asociado con un valor superior de dientes afectados por lesiones de caries, extraídos y obturados en dentición primaria (ceo-d). Sin embargo, a nivel mundial, continúa sin establecerse la asociación entre la diversidad genética de *S. mutans* y la presencia de caries en niños.

La evidencia disponible actualmente, respecto de la relevancia de la presencia de distintos genotipos de *S. mutans* en el proceso de caries, es reducida y contradictoria. En Chile, la evidencia respecto a la diferencia en la severidad e incidencia de la enfermedad y sus factores relacionados es limitada y, no existe evidencia en relación a la diversidad en la expresión de factores de virulencia de *S. mutans* en niños chilenos.

Con los antecedentes mencionados, *S. mutans* es un microorganismo de gran relevancia, que sustenta el interés de conocer cómo en Chile se presenta la diversidad genotípica en la población infantil y su asociación con la caries dental, a modo de poder enfocar los esfuerzos hacia la prevención y el control de su proliferación, antes que se produzcan lesiones de caries.

1.2 Microbiota bucal

Existe una diversa microbiota formando parte del organismo humano, con la que se está en constante interacción. El término microbioma, es utilizado para describir el conjunto de genomas que constituyen las comunidades microbianas asociadas al hospedero humano. Se ha calculado que la proporción de células humanas a células microbianas es de uno a diez en el organismo humano (Aas y cols., 2005).

Con los recientes avances en la tecnología de secuenciación del ADN, como la pirosecuenciación, se ha revelado una diversidad inesperadamente alta del microbioma bucal humano. Se observó que un pool de placa dental de 98 adultos sanos comprendía cerca de 10.000 especies microbianas diferentes. Lo que corresponde a un orden de magnitud mayor a los 700 filotipos microbianos bucales previamente reportados, identificados por cultivos o clonación y secuenciación tradicional (Cornejo y cols., 2012). No obstante, más del 50% de estas especies no son cultivables, por lo tanto, aún no han sido posibles de caracterizar, motivo por el que sólo se detectan mediante el uso de técnicas moleculares.

Diversos estudios han revelado que diferentes sitios en la cavidad bucal, como superficies dentarias duras, surcos gingivales o mucosas, albergan comunidades microbianas únicas, cuya composición es influenciada por las fluctuaciones químicas y físicas derivadas tanto del consumo de alimentos como del resultado de las medidas de higiene bucal. A pesar de estas variaciones, los últimos estudios han revelado que la comunidad microbiana bucal es relativamente estable, ya que se muestran pocas diferencias entre individuos, en comparación con los microbiomas del tracto gastrointestinal o de la piel (Cornejo y cols., 2012). La composición cuantitativa y cualitativa de la microbiota bucal está estrechamente relacionada con la mantención de un equilibrio compatible con la salud bucal y, generalmente, se acepta que un cambio en la composición de esta comunidad es un paso importante en la progresión de las patologías bucales. Sin embargo, existe poca evidencia que haya demostrado realmente este cambio ecológico asociado a un cambio en la condición de salud (Marsh, P. D., 2003).

1.3 Adquisición de la Microbiota Bucal Normal

La cavidad bucal al momento de nacer es estéril, a excepción de unos pocos microorganismos que son adquiridos durante el paso por el canal de parto. Horas posteriores al nacimiento, microorganismos de la cavidad bucal de la madre, del personal de maternidad o, posiblemente algunos microorganismos del medio ambiente, pueden comenzar a colonizar y establecerse en la cavidad bucal del niño. Se ha reportado que estas especies bacterianas pioneras son generalmente del género *Streptococcus* y que tendrían capacidad de unirse al epitelio de la mucosa, por ejemplo, *Streptococcus salivarius* (Crielaard y cols., 2011).

Posterior a la adhesión y colonización, la actividad metabólica de la comunidad pionera modifica el medio local, facilitando la colonización de otras especies bacterianas (Lakshman, 2006).

Durante y luego de la erupción de los dientes, ocurre un cambio importante en el ecosistema bucal del lactante, ya que se agregan dos nuevos hábitats a la cavidad bucal, que son susceptibles a la colonización: la superficie del esmalte dental y el surco gingival. Las especies *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* y *Actinomyces spp* son aquellas que prefieren la colonización de tejidos duros, colonizando de modo selectivo la superficie del esmalte recubierta por la película dental adquirida (PDA) (Listgarten y cols., 1994).

Por otro lado, especies que prefieren un ambiente anaeróbico y que requieren ligandos y condiciones micro ambientales provistas por colonizadores tempranos son: *Prevotella spp*, *Porphyromonas spp* y algunas espiroquetas, las cuales colonizan la zona del surco gingival (Kunomiwa, Lamort, 2010).

Desde el primer año de vida, la microbiota bucal consta mayoritariamente de especies del tipo *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Neisseriae* junto con algunas especies anaeróbicas de los géneros *Fusobacterium* y *Veillonella*. En menor frecuencia se encuentran especies de *Actinomyces* y *Prevotella* (Li, Y. y Caufield, P. W., 1995). Se ha reportado que las especies anaerobias no aparecen en un número significativo sino hasta la adolescencia (Kunomiwa, Lamort, 2010).

1.4 Formación del Biofilm Dental

El biofilm o biopelícula de placa dental, es una comunidad microbiana estructurada, compleja y organizada, compuesta por uno o varios tipos de microcolonias que están rodeadas de un glicocálix, compuesto principalmente por exopolisacáridos producidos por las bacterias residentes, que ocupan un lugar y ejercen una función determinada dentro del mismo. Se desarrolla sobre tejidos blandos y superficies duras de la cavidad bucal. Se compone tanto de bacterias vivas y muertas, además de productos metabólicos bacterianos y componentes derivados del hospedero (Listgarten y cols., 1994).

La matriz orgánica que rodea a los microorganismos del biofilm dental, representa un 75 % a 80 % del volumen total de éste. Donde esta matriz actúa como adherente entre microorganismos y diversas superficies, como una reserva de nutrientes, además, mantiene la integridad estructural del biofilm. Las especies bacterianas se organizan en él en microcolonias intercaladas por canales que transportan metabolitos, nutrientes y productos de desecho. A su vez, este biofilm proporciona a la comunidad bacteriana una protección ante cambios en el medio ambiente, defensas del hospedero y sustancias tóxicas externas, como la presencia de antibióticos (Brescó-Salinas y cols., 2006).

La formación del biofilm es un proceso complejo que comprende varias etapas: desde la formación de la PDA, la adhesión bacteriana a las proteínas de esta película, la coagregación bacteriana, formación de microcolonias y finalmente la estructuración de la biopelícula (Lakshman, 2006).

Entre los microorganismos que colonizan selectivamente la PDA, se encuentran grupos de cocáceas y bacilos Gram-positivo. Estas especies son sucedidas en el tiempo de acuerdo a la presión selectiva de determinantes ecológicos, por especies cocáceas, bacilos, cocobacilos y fusobacterias Gram-negativo.

Finalmente se pueden agregar al biofilm especies filamentosas, espirilos y espiroquetas (Figura 1).

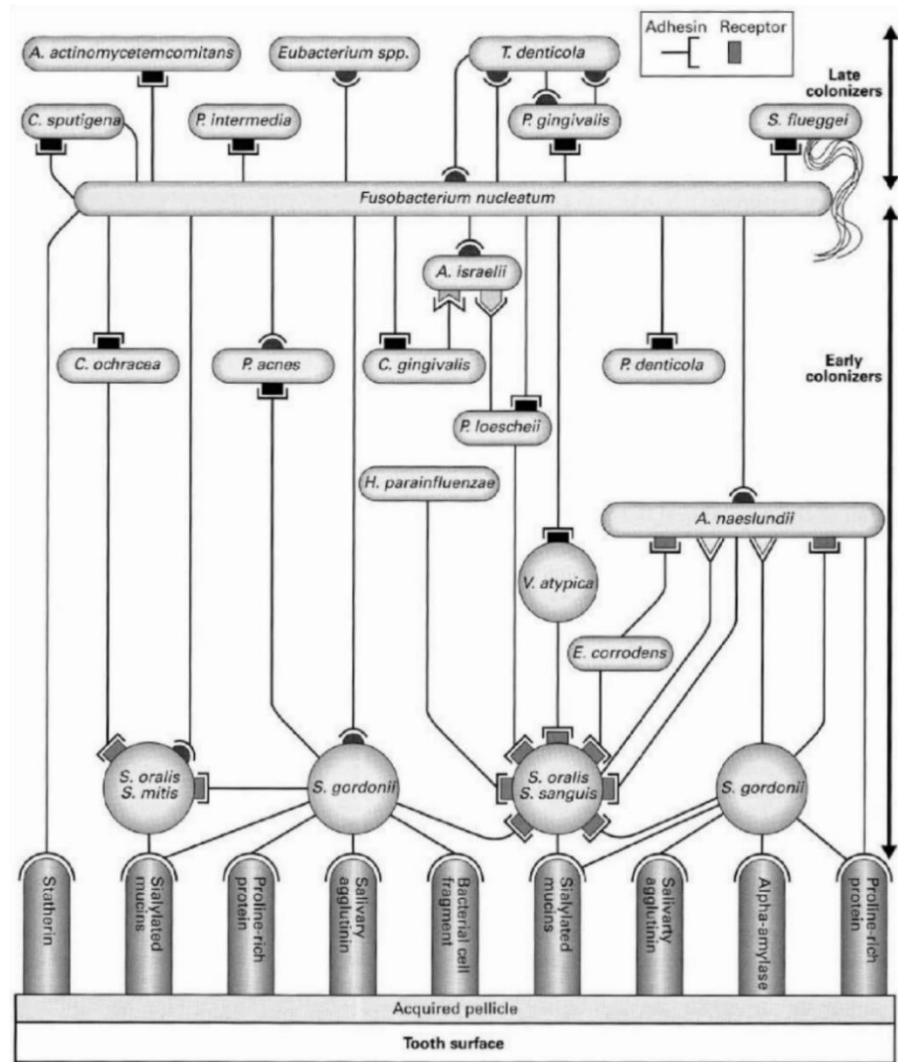


Figura 1. Esquema de la constitución del biofilm de placa dental, indicando colonizadores tempranos y tardíos. Tomado de Kolenbrander y cols., 2002.

Los productos metabólicos de los colonizadores tempranos alteran radicalmente el medio ambiente, generando un potencial redox más bajo, lo que permite la incorporación de colonizadores de tipo anaeróbicos. De este modo, aumenta gradualmente la complejidad de la comunidad, biomasa y el grosor del biofilm. Cuando la biomasa del biofilm llega a un tamaño crítico, se logra un equilibrio entre los depósitos y pérdida de placa, estableciéndose una comunidad clímax (Lakshman, 2006).

Las bacterias que están en la superficie del biofilm y que forman parte de una comunidad clímax, pueden desprenderse y entrar a una fase planctónica, quedando suspendidas en saliva o en el fluido crevicular gingival, desde donde pueden ser

transportadas a nuevos sitios para iniciar un nuevo ciclo de colonización y diseminación (Kuboniwa y Lamont, 2010).

Es posible mantener la estructura compleja del biofilm a través de un sistema de comunicación bacteria-bacteria llamado Quorum Sensing. Este sistema mediado por moléculas, está relacionado con: la regulación del crecimiento, activación de genes involucrados en la producción de polisacáridos extracelulares, la regulación del metabolismo y la producción de factores de virulencia, entre los que se incluye la expresión de genes resistentes a antibióticos (Fig. 2) (Kolenbänder y cols., 2002).

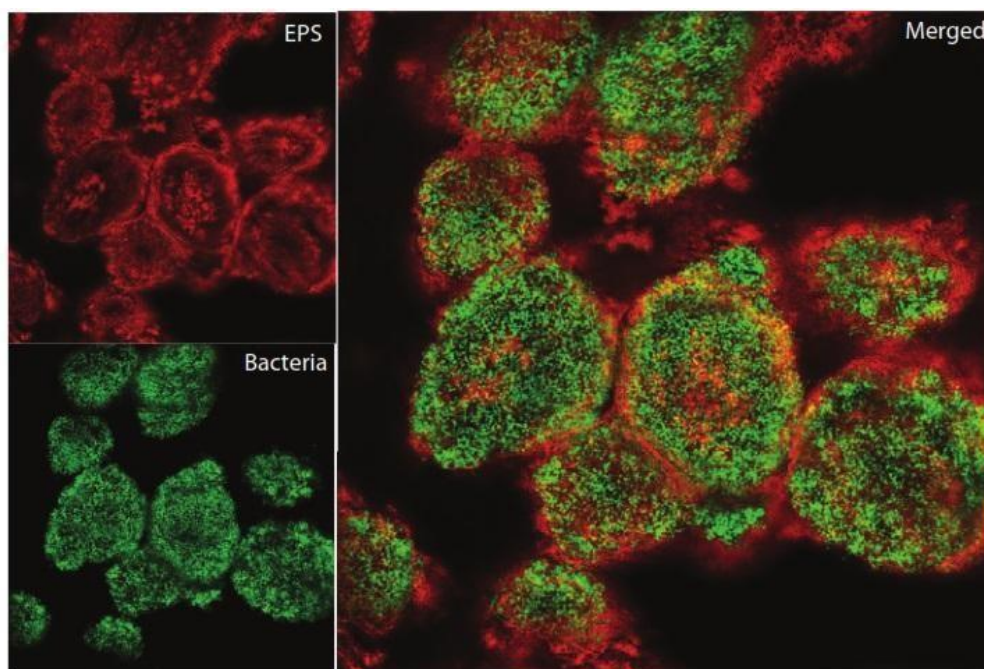


Figura 2. La matriz extracelular del biofilm dental generado en presencia de sacarosa (rojo) proporciona diferentes microambientes para la constitución de una compleja red de comunicaciones que permiten que una diversa microbiota bacteriana (verde) conviva en la superficie del diente. Tomado de Lemos y cols., 2013.

1.5 Caries dental

La caries dental es considerada, entre las patologías bucales, la enfermedad crónica más prevalente en la población chilena (MINSAL, 2011). La Organización Mundial de la Salud (OMS) la define como un proceso patológico de origen multifactorial y mediado por bacterias, el cual inicia después de la erupción dentaria, provocando el reblandecimiento del tejido duro del diente y cuyo avance determina la formación de una cavidad (OMS/WHO, 1987).

Al ser un proceso multifactorial, la caries inicia con cambios microbiológicos que ocurren en el biofilm dental, estando en directa relación el flujo y composición de la saliva, la disponibilidad de flúor, una dieta rica en azúcares refinados y pobres hábitos de higiene bucal. Es por ello que corresponde a una interacción compleja a lo largo del tiempo, entre bacterias productoras de ácido y carbohidratos fermentables obtenidos por la dieta, además de variados factores del hospedero y características de los dientes y la saliva (Selwitz y cols., 2007).

La caries en dientes temporales se denomina caries de inicio precoz.

1.6 Patogénesis de la caries dental

La lesión de caries se inicia con la desmineralización del esmalte, avanzando progresivamente hasta afectar la dentina y generar daño pulpar, provocando dolor e impotencia funcional. Esta patología puede presentarse a lo largo de toda la vida y, a pesar de ser prevenible, su prevalencia y severidad aumentan con la edad (MINSAL, 2013^a).

Actualmente, la hipótesis de la placa ecológica es el modelo más ampliamente aceptado para explicar el papel de la microbiota oral en el proceso de la caries (Takahashi y Nyvad, 2011). Este modelo plantea que la placa dental, que se encuentra de forma natural sobre los dientes, es beneficiosa para el hospedero, ya que ayuda a prevenir la colonización de otras especies exógenas. Esta placa o biopelícula dental, se mantiene relativamente estable frente a cambios ambientales menores, proceso conocido como homeostasis microbiana, que se debe en parte a un equilibrio dinámico entre las interacciones sinérgicas y antagónicas de las bacterias. Sin embargo, si esta homeostasis se pierde, ocurren una serie de cambios en el equilibrio de la microbiota, lo que predispone a la presencia de enfermedad en los sitios donde ocurre el desequilibrio. Por ejemplo, la exposición frecuente de la placa a un pH bajo. El pH salival normal (6,5-7,5) conduce a la selección de organismos con una fisiología acidúrica (resisten ácido manteniendo su metabolismo fermentador), tales como *Streptococcus* del tipo *mutans* y *Lactobacillus spp.*

Las lesiones de caries se desarrollan en superficies donde no se restablece el equilibrio, ni se favorece la remineralización, creando nichos ecológicos donde se seleccionarán por presión positiva las especies capaces de tolerar y adaptarse a las condiciones de pH y disponibilidad de nutrientes del entorno, además de proveer una protección mecánica a la eliminación del biofilm por las medidas de control del medio bucal (Figura 3) (Selwitz y cols., 2007).

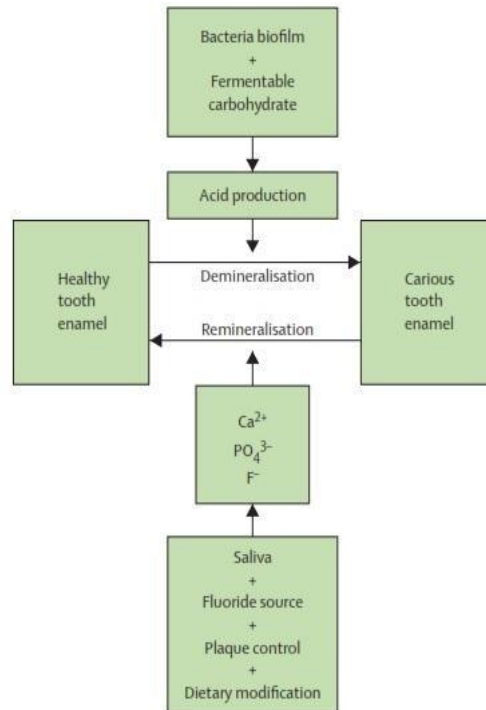


Figura 3. Diagrama del proceso de caries como un flujo constante de desmineralización (destrucción) y remineralización (reparación). (Tomado de Selwitz y cols., 2007)

La caries de inicio precoz es una manifestación agresiva del desequilibrio en el proceso que afecta la estructura de los dientes temporales en preescolares y lactantes, que generalmente inicia en las superficies de los dientes anteriores comenzando como una lesión de mancha blanca detectable en la zona del margen gingival. De no ser modificados los factores involucrados en el proceso, la progresión de la lesión de caries es mucho más agresiva y sucede en un tiempo menor en comparación a la progresión en dentición permanente (De Grauwe y cols., 2004).

1.7 Factores de riesgo

Siendo la caries una patología multifactorial, se debe considerar entre los factores que la condicionan el estilo de vida: hábitos alimenticios e higiénicos, los que pueden favorecer el desarrollo de caries o actuar como factores protectores. Se debe tener en cuenta que los estilos de vida se ven fuertemente influenciados por los factores sociales, tales como: el nivel de educación, el nivel socioeconómico y la condición urbano-rural (Locker, 1997).

El riesgo de un individuo a presentar caries es variable en el tiempo, dependiendo del momento de la vida, donde a su vez, varía la epidemiología según la población estudiada. Se han descrito como principales factores de riesgo la composición y flujo salival, el número de bacterias cariogénicas, la exposición a fluoruros, componentes inmunológicos, necesidades especiales de tratamiento y factores genéticos, entre otros (Featherstone y cols., 2002).

Otros factores que han sido relacionados con un mayor riesgo de caries es el acceso a la atención dental, uso de sellantes de puntos y fisuras, presencia de aparatos ortodóncicos o restauraciones dentales defectuosas (Fig. 4) (Selwitz y cols., 2007).

Entre los factores de riesgo relevantes para el niño con caries de inicio precoz, es la historia de caries de su madre y cercanos, reflejando la importancia en la adquisición de microorganismos relaciones en el proceso de caries a partir de la familia y cómo las conductas del entorno donde se desarrolla el niño favorecen la aparición de lesiones (Kozai y cols., 1999).

La colonización temprana por especies bacterianas asociadas a la etiología de la caries de inicio precoz se debe considerar como un factor de riesgo clave en el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, el rol de *S. mutans* como principal factor etiológico aún es controversial debido a la complejidad de la microbiota bucal, en la que conviven cientos de especies junto con millones de células creciendo en el biofilm dental (Caufield y cols., 1993).

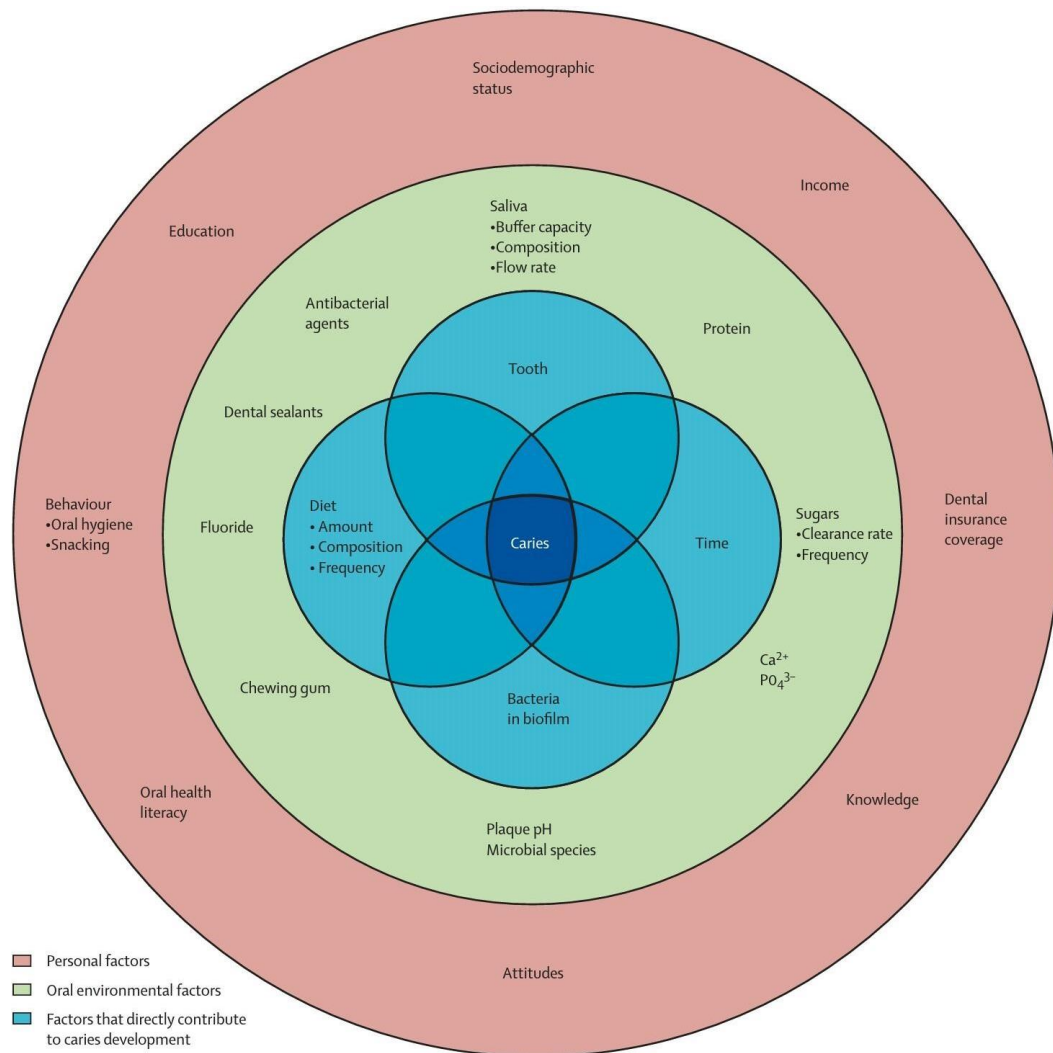


Figura 4. Esquema de factores involucrados en el desarrollo de caries dental. Tomado de Selwitz y cols., 2007.

Estudios que han usado metodologías que permiten la fenotipificación y/o genotipificación sugieren que la madre es la principal fuente de infección en niños portadores de *S. mutans* y que la saliva es el vehículo principal para esta transferencia (Pattanaporn y cols., 2013). Sin embargo, la detección de genotipos que no son encontrados en las madres o en otros miembros cercanos de la familia indican que *S. mutans* puede ser adquirido de otras fuentes (Pattanaporn y cols., 2013). Además, la variabilidad en la transmisión puede ser asociada a las susceptibilidades individuales de los niños como el número y tipo de dientes erupcionados, la presencia de hipoplasias de esmalte, la cantidad de carbohidratos disponibles, acción de factores salivales y las condiciones inmunológicas de los niños (Li y cols., 1994).

Es difícil predecir el comportamiento y desarrollo de la enfermedad atribuyendo su manifestación a sólo una especie bacteriana. Pero se ha demostrado que el conocimiento acabado de los factores involucrados en el desarrollo de la enfermedad permite una mejor toma de decisiones por parte del clínico, además de la determinación de protocolos especiales de atención y cuidados en grupos de riesgo (Amos-Gomez FJ y cols., 2002).

1.8 *Streptococcus mutans*

S. mutans es una especie de bacterias cocáceas Gram-positivo del género *Streptococcus*, cuyo hospedero principal es el ser humano. Es característica su asociación en parejas, cadenas largas o cortas según la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo. Carecen de catalasa y son anaerobios facultativos. Cuando se desarrollan en presencia de oxígeno, su crecimiento se ve favorecido por una concentración de 5 % a 10 % de CO₂.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 36 ± 1°C. Su metabolismo es fermentativo, produciendo abundantes ácidos que hacen descender drásticamente el pH del medio en el que se desarrollan, lo que obliga al uso de medios de cultivo amortiguadores para evitar su muerte, siendo común la utilización del medio especial selectivo TYCSB (Tryptone Yeast Cysteine Sucrose Bacitracin) para su crecimiento en el laboratorio (Figura 5) (A.Lemos y cols., 2013).

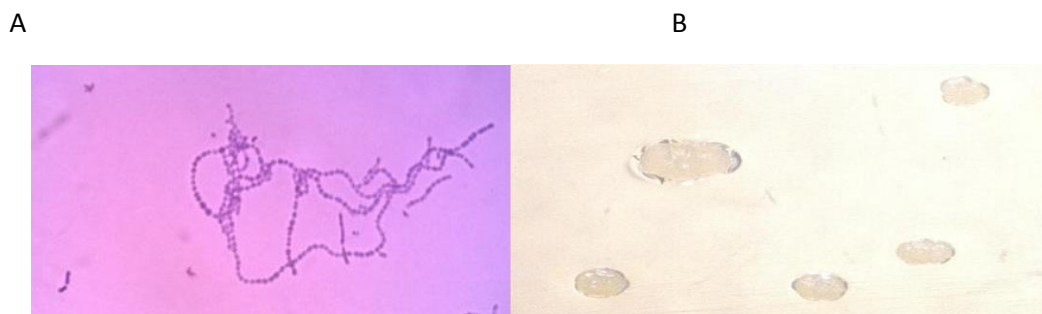


Figura 5: A; Cadenas de *S. mutans* teñidas con tinción de Gram, B; Colonias de *S. mutans* crecidas en agar TYCSB.

Fotos obtenidas en el Laboratorio de Microbiología Oral, Facultad de Odontología Universidad de Chile.

El crecimiento en caldo de *S. mutans* es variable, desde turbidez homogénea a granular, pasando por formas descritas de cometas a depósitos en las paredes o el fondo del tubo.

Desde el punto de vista estructural, difieren de otras especies de *Streptococcus* en la ausencia de cápsula y polisacárido C, y en los complejos fibrilares y fimbrias que, cuando están presentes, no son muy prominentes al microscopio electrónico (A.Lemos y cols., 2013).

La evidencia disponible atribuye a *S. mutans* factores de virulencia que justifican su asociación con el proceso de deterioro del diente, destacándose como los principales la síntesis de polisacáridos extracelulares solubles e insolubles, síntesis de polisacáridos intracelulares, capacidad de formación de biofilm, aciduria y acidogénesis. Actualmente el análisis de estos factores de virulencia ha cobrado relevancia para comprender procesos similares en otros patógenos humanos (W.Krysciak y cols., 2014) (Figura 6).

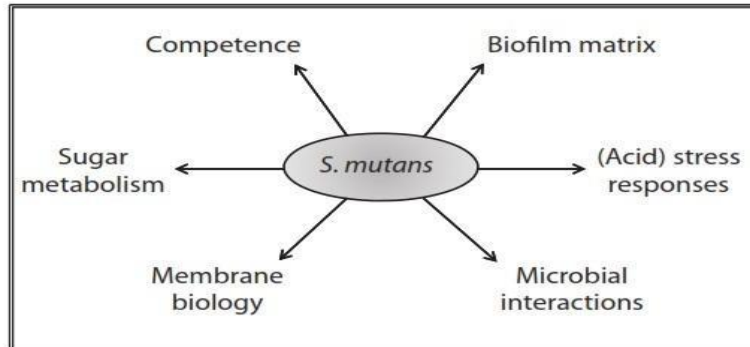


Figura 6. Áreas de la microbiología que han sido ampliamente favorecidas por estudios conducidos en la especie *Streptococcus mutans*. Tomado de Lemos y cols. (2013)

El sustrato más importante para estos microorganismos, como agente etiológico del proceso de caries, es la sacarosa. De su metabolización deriva la mayor producción de ácidos y la síntesis de polisacáridos intra y extracelulares. La mayor parte de ella es empleada como fuente energética para su desarrollo. Solo una pequeña parte de la sacarosa es derivada para la formación de polisacáridos estructurales, dextranos, mutanos y fructanos (Touger-Decker, Van Loveren, 2003).

La formación de estos productos se debe a la acción de una o varias enzimas denominadas glucosiltransferasas (GTFs) y fructosiltransferasas (FTFs) las que escinden la molécula de sacarosa y polimerizan los monosacáridos transfiriendo grupos glucosídicos o fructosídicos respectivamente a aceptores de glucanos o fructanos preexistentes.

Las glucosiltransferasas que producen glucanos insolubles son de peso molecular elevado (GTF-I), mientras que las que producen glucanos solubles poseen un peso molecular bajo (GTF-S). Estas proteínas enzimáticas pueden aparecer localizadas en las superficies bacterianas, libres en el medio ambiente o adsorbidas a la película adquirida. En todos estos casos, mantienen su capacidad de sintetizar glucanos, lo que les permite ser el nexo de unión entre bacterias que posean proteínas fijadoras de glucano (Alaluusua y cols., 1997).

De los diferentes polisacáridos producidos por *S. mutans*, se estima que los glucanos solubles y los fructanos son fácilmente degradables por enzimas bacterianas, por lo que suelen desaparecer con facilidad del biofilm. Por el contrario, los glucanos insolubles son degradados con dificultad por las bacterias, ya que poseen propiedades adherentes y forman parte importante en la matriz acelular del biofilm, a la que se unirán las proteínas fijadoras interviniendo en el fenómeno de agregación bacteriana (Ahn SJ y cols., 2008) (Figura 7).

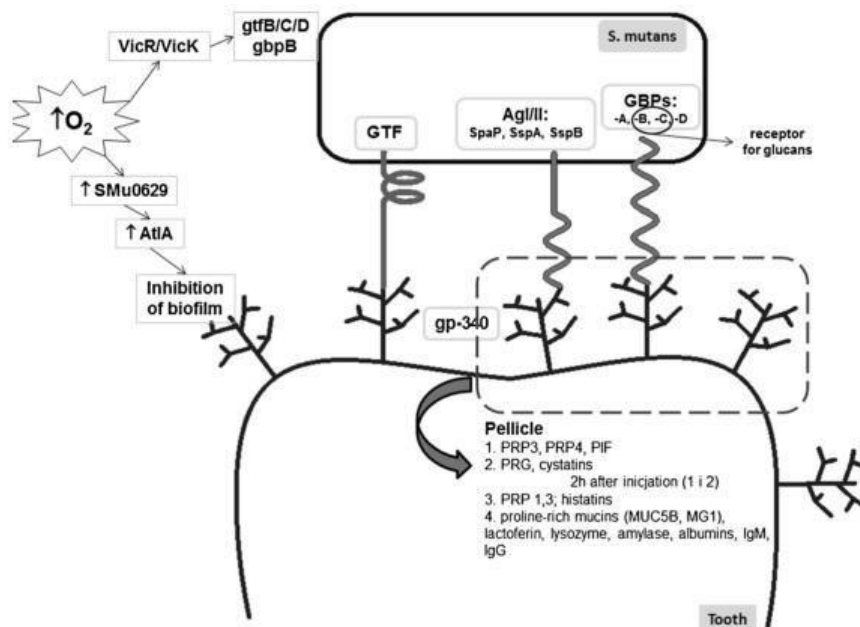


Figura 7. Esquema con los factores de virulencia de *Streptococcus mutans* involucrados en la colonización de la superficie dental y en la formación del biofilm. En una primera etapa en el desarrollo del biofilm, *S. mutans* se adhiere a la superficie del diente a través de enzimas de la familia de las glucosiltransferasas (GTF), elementos indispensables para la adhesión de *S. mutans*. Otro grupo de adhesinas denominadas antígeno I/II y proteínas de unión a glucanos (GBP's) interactúan con proteínas de la película adquirida y del biofilm, favoreciendo la colonización. Tomado de Krzysciak y cols., (2014).

Estudios en relación a la colonización inicial de *S. mutans* indican que es necesaria la presencia de superficies dentarias para el establecimiento del microorganismo (Caulfield y cols., 1993), pero métodos más sensibles, basados en técnicas moleculares, sugieren que el dorso de la lengua puede funcionar como reservorio en lactantes edéntulos para la posterior colonización de los tejidos dentarios (Wan y cols., 2001). No obstante, existe poca evidencia en relación a la estabilidad de los genotipos detectados al momento de la adquisición inicial.

1.8.1 Genotipos de *S. mutans* en niños

Se ha descrito que los niños poseen entre una a cinco cepas diferentes de *S. mutans* a distintas edades y que su distribución entre distintos sitios de la cavidad bucal es homogénea (Tanner y Milgrom, 2002). También se ha observado que la colonización de *S. mutans* en los niños va en aumento con la edad (Pattanaporn y cols., 2013).

Se han reportado evidencias sugiriendo que cepas de *S. mutans* capaces de colonizar tempranamente la cavidad bucal, pueden mantenerse de manera estable por muchos años, sin embargo, algunas de estas cepas pueden no ser detectadas en los mismos individuos en años posteriores (Masuda y cols., 1979). En un estudio realizado en un grupo de niños, se encontró un total de 52 genotipos distintos, de los cuales solo 16 eran compartidos con la madre, observando una tendencia a la mantención de dichos genotipos en los niños (Klein y cols., 2004). Una posible explicación para este fenómeno es que la interacción entre dichos genotipos y la respuesta del hospedero interfiera con la colonización de otros genotipos, menos preparados para ocupar el nicho ecológico correspondiente. Además, el rol de la madre en la infección también sugiere la transmisión de anticuerpos IgAs presentes en su saliva, los que permitirían la sobrevivencia selectiva de las cepas mejor adaptadas (Alaluusua y cols., 1994).

En un estudio realizado en adultos jóvenes, se encontró un máximo de siete genotipos distintos en sujetos con historia de caries (RedmoEmanuelsson y cols., 2003). Esto es consistente con ensayos en una población de Brasil (Napimoga y

cols., 2004), quienes obtuvieron resultados similares. Estudios en una población de niños brasileños entre cinco y ocho años de edad, demostraron que era posible encontrar entre uno a tres genotipos diferentes de *S. mutans* en dicha población, y que los genotipos encontrados en niños con lesiones de caries activas tenían una mejor respuesta a stress por ácido en relación a las cepas de los niños libres de caries (Napimoga y Kamiya, 2004).

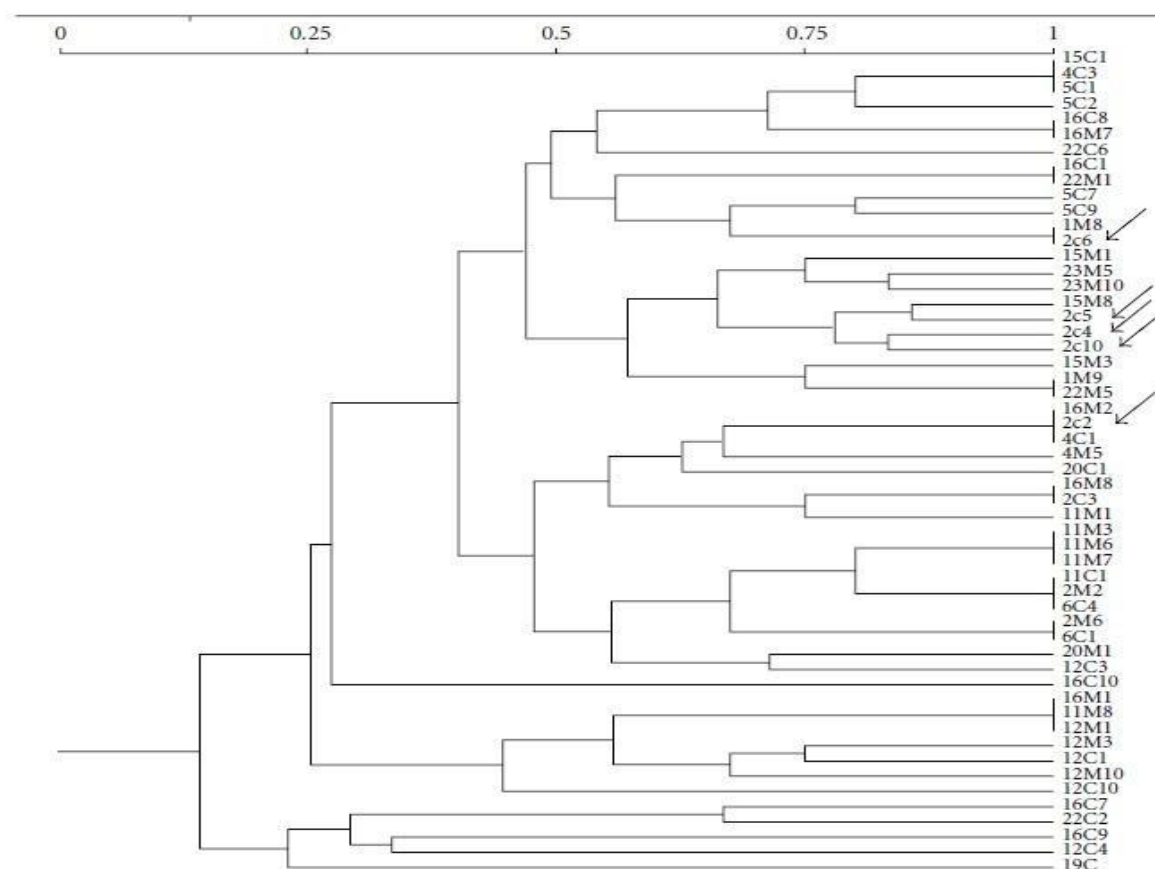


Figura 8. Dendrograma que ilustra la diversidad genética de aislados de *S. mutans* obtenidos de preescolares con diferentes experiencias de caries. Tomado de Peralisi y cols., (2013)

Se ha visto que los niños usualmente portan un menor número de genotipos de *S. mutans* que los adultos, lo que demuestra que cepas adicionales se adquieren a medida que crecen. Así también, en este estudio realizado en niños preescolares, se observó que niños no relacionados biológicamente compartían genotipos (Kyounga y cols., 2013), lo que incita a nuevas investigaciones sobre la

transmisión horizontal de *S. mutans* y el impacto que tiene en el riesgo de caries en niños preescolares.

En un estudio realizado en preescolares en España (Baca y cols., 2012) se analizaron los posibles patrones de transmisión horizontal en niños de 6 a 7 años de una misma clase, identificando genotípicamente cepas de *S. mutans* y asociando estos resultados con experiencia de caries. Como resultado, se encontró que entre los 30 niños portadores de *S. mutans*, existían 34 genotipos distintos, y a su vez, 11 de estos niños compartían al menos un genotipo con los otros niños de la clase. No obstante, en un estudio realizado a preescolares de 4 y 5 años, de una misma clase en China (Hu y cols., 2014) se encontraron 37 distintos genotipos de *S. mutans*, pero no se pudo evidenciar transmisión horizontal entre los participantes. La evidencia sobre la transmisión horizontal de genotipos de *S. mutans* sigue siendo controversial.

La existencia de varios genotipos de *S. mutans* en el biofilm se podría entender como una consecuencia de la mayor capacidad de adaptación de dichas cepas al medio, pero también sería posible que la acción simultánea de diferentes cepas, con distinta expresión de factores de virulencia, pudiese incrementar el riesgo de caries (Lembo y Longo, 2007).

1.9 Epidemiología de la caries en preescolares chilenos.

La caries dental constituye un problema relevante en materia de salud pública, debido a las consecuencias e impacto en la calidad de vida de quienes la padecen, además del alto costo de su tratamiento (Sheiham, 2005).

En nuestro país existe inequidad en salud, lo que se puede evidenciar al observar un mejor estado de salud bucal en la población de nivel socioeconómico alto en comparación con los niveles socioeconómicos más bajos (Soto y cols., 2007a; Soto y cols., 2007b). La caries de inicio precoz está etiológicamente relacionada con la colonización bacteriana en la dentición primaria, y significativamente afecta la salud bucal y calidad de vida de los niños preescolares (Pattanaporn y cols., 2013).

En Chile la información a nivel nacional sobre la salud bucal de niños preescolares aún es limitada. Un estudio del año 2003 sobre caries de inicio precoz en niños de 2 a 4 años de edad, pertenecientes a jardines infantiles JUNJI de la R.M. de Santiago, evidenció que el 33.7% de los niños presentaban caries dental y destacó la necesidad de incorporar programas educativos y preventivos desde el primer año de vida (Echeverría y Soto, 2003). En el año 2007, un estudio sobre la salud bucal de niños pre-escolares de 2 a 4 años de edad de la RM de Santiago, conducido por el MINSAL mostró que el 83 % de los niños de 2 años no presentaba historia de caries dental, mientras que, a los 4 años, el porcentaje de niños sin caries disminuía al 52 % (Acevedo y Corsini, 2007).

La evidencia disponible señala que las actividades preventivas y educativas son fundamentales para reducir los niveles de enfermedades de la cavidad bucal, pero a nivel de intervenciones masivas comunitarias, estas han sido poco eficaces en reducir de modo considerable los niveles de caries en niños menores de 6 años (Nowak J., 2011).

Entre los objetivos Estratégicos y Metas de Salud Bucal para el período 2011-2020 del MINSAL, el objetivo en salud bucal de prevenir y reducir la morbilidad bucal de mayor prevalencia en menores de 20 años, con énfasis en los más vulnerables, tiene como meta aumentar en un 33 % la ausencia de caries en niños de 6 años (MINSAL, 2007). Con este propósito, es fundamental cambiar el paradigma actual en base a los resultados obtenidos en nuestro país, y a las experiencias internacionales que evidencian que la salud bucal a los 6 años de niños en situación de pobreza sólo mejorará comenzando por prevenir, controlar y sanar la patología en la niñez temprana, donde se debe hacer partícipe de ello a toda la comunidad involucrada en el desarrollo del sujeto (Nowak J., 2011).

En el año 2010, se estudió la prevalencia de caries en niños preescolares de 3 a 5 años de dos comunas de la R.M. donde se reportó que el 24 % de los niños de Maipú estaban libres de caries, contrastando con el 55 % de Peñalolén, diferencia que se asoció al uso de agua potable fluorada en esta última, comparado a la no disponibilidad de ella en Maipú (Zaror y cols., 2011). De esto se puede inferir que la

población chilena presenta distintos niveles de riesgo, debido a los diversos factores que actúan en el desarrollo de la caries (Figura 9).

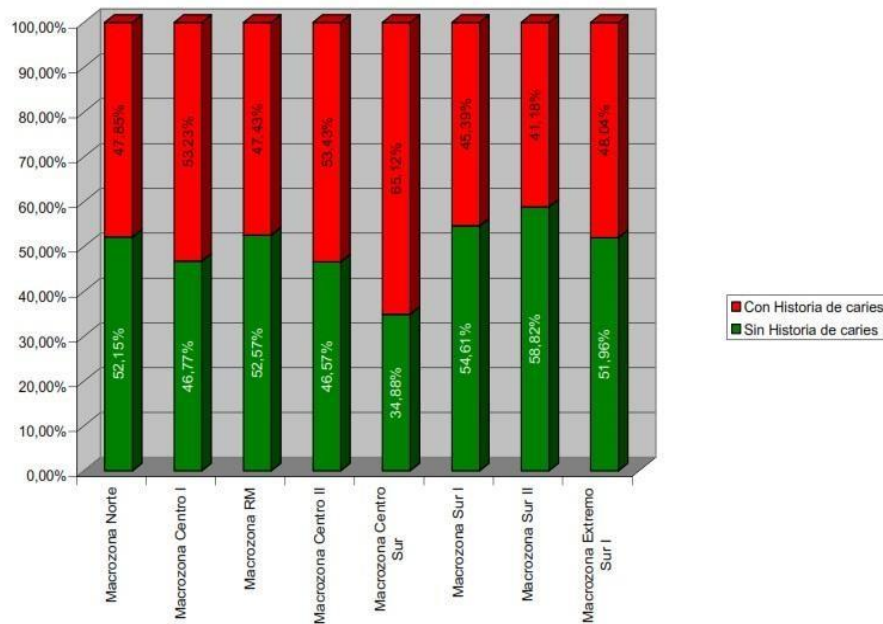


Figura 9. Prevalencia de historia de caries según macrozona en párvulos de 4 años. Chile 2007-2010. Tomado de MINSAL (2010)

Actualmente no existe ningún estudio a nivel nacional que caracterice genóticamente cepas de *S. mutans* provenientes de preescolares, y a nivel mundial, la evidencia respecto a la relación entre diversidad de cepas presentes en la cavidad bucal, su impacto en la experiencia de caries y la transmisión horizontal no es concluyente. Entender cómo se comportan y se distribuyen distintos genotipos de *S. mutans* resulta útil para establecer grupos de riesgo en los que sean necesarias medidas específicas de promoción, prevención y control de la caries dental.

Permitir sentar bases para la mejor comprensión del proceso patológico y del rol que juegan diferentes genotipos en la etiopatogenia y epidemiología de la caries, es de interés de acuerdo a la literatura analizada. Es por ello que en este estudio se propone evaluar la correlación que pueda existir entre la presencia de genotipos idénticos de *S. mutans* y la experiencia de caries en preescolares, a modo de poder entregar resultados que hagan hincapié a la necesidad de considerar la implementación de nuevos programas de salud odontológicos a niños preescolares de distintos rangos etarios.

2. HIPÓTESIS

Párvulos de un mismo curso con distinta experiencia de caries, presentan genotipos idénticos de *S. mutans*.

3. OBJETIVO GENERAL

Demostrar la presencia de genotipos idénticos de *S. mutans* en párvulos pertenecientes a un mismo curso, independiente de su experiencia de caries.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.1.1 Identificar a nivel de especie, cepas de *S. mutans* provenientes de la cavidad bucal de párvulos de 3 a 4 años de edad con diferentes experiencias de caries, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.1.2 Identificar genotipos de *S. mutans* provenientes de la cavidad bucal de párvulos de 3 a 4 años de edad con diferentes experiencias de caries, mediante reacción en cadena de la polimerasa con partidores arbitrarios (AP-PCR),

3.1.3 Establecer si genotipos idénticos de *S. mutans*, están presentes en la cavidad bucal de párvulos pertenecientes al mismo curso.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Tipo de estudio

Este estudio es descriptivo, transversal.

4.2 Evaluación clínica y selección de niños

Niños sanos entre 3 a 4 años de edad (n=21) pertenecientes al nivel pre-básico medio mayor, fueron invitados a someterse a un examen clínico, en un jardín infantil de la Región Metropolitana, para determinar evolución de la dentición primaria y el índice ceo-d por un único evaluador calibrado.

Quienes presentaron enfermedades crónicas, que hayan recibido tratamiento con antibióticos durante los 3 meses previos al examen o que usen aparatos ortodóncicos fueron excluidos del estudio.

Aprobación ética: A los padres o tutores de todos los niños seleccionados se les solicitó la firma de un consentimiento informado para participar en este estudio. A cada niño se le pidió verbalmente su consentimiento y, después de obtenida la muestra microbiológica, participaron, si así lo desearon, en diversas actividades preventivas, educativas. Los niños que presentaban caries serían atendidos en el contexto del programa “Odontología Social y Educación” de la Dirección de Extensión de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, o se asesorará su derivación donde corresponda.

4.3 Toma de muestra para cultivo microbiológico

Muestras de saliva no estimulada fueron obtenidas de los pre-escolares entre comidas (desayuno y almuerzo) mediante un gotario, de la cavidad bucal. Las muestras se mantuvieron en tubos eppendorf a 4°C hasta su procesamiento, a lo más hasta 3 horas desde su obtención.

4.4 Procedimientos microbiológicos.

En el laboratorio, las muestras fueron agitadas vigorosamente por 45 segundos y luego diluidas en forma seriada en una batería de tubos conteniendo 900 µl de PBS estéril, a 4°C. 100 µl de las diluciones apropiadas (10^{-2} o 10^{-3}) fueron sembradas en

placas de agar TYCSB suplementado con 10% de sacarosa y 0,2 U/ml de bacitracina. Las placas sembradas fueron cultivadas por 2 días en jarras de capnofilia, en una estufa de cultivo a 37°C. La identificación inicial de aislados de *S. mutans* se realizó mediante el aislamiento de colonias cuya morfología era compatible con la definida para la esta especie.

4.5 Detección de ADN genómico bacteriano mediante PCR y partidores universales.

Para determinar la presencia de ADN genómico bacteriano se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los partidores universales PU1F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y PU1R (5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'). Estos partidores amplifican un fragmento de 1505 pares de bases (pb), correspondiente a la secuencia del rRNA 16S de la subunidad menor del ribosoma procariotico. Como control positivo de la reacción de PCR, se utilizó ADN genómico purificado de ATCC 25175 de *S. mutans*. Para controles negativos de la reacción se reemplazó el volumen correspondiente a la muestra de ADN blanco, por agua estéril. Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo en un volumen final de 15 µl que contenía: 1.5 µl de Tampón PCR 10X pH 8.4 (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3); 0.3 µl de dNTP's 10 mM, Invitrogen^R; 0,6 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,6 µl de cada partididor Forward y Reverse 25 µM, Alpha DNA^R; 0.2 µl de la enzima ADN polimerasa de *Thermus Aquaticus*, Biolase^R; y 1, 3 o 5 µl de ADN obtenido. El programa de ciclaje térmico, se realizó en un termociclador y consistió en un paso de denaturación inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos con denaturación a 94°C por 15 segundos, 31 alineamiento a 54°C durante 15 segundos y extensión a 72°C por 45 segundos, con un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos.

4.6 Identificación a nivel de especie de *S. mutans* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La extracción del ADN genómico de los aislados de *S. mutans* obtenidos según lo indicado en 4.5, y caracterizados mediante las pruebas convencionales descritas, se realizó mediante la utilización del kit Wizard[®] Genomic DNA Purification, siguiendo las recomendaciones del proveedor. Para la detección a nivel de especie

se realizó una PCR con partidores específicos para el gen *gtfB*, que codifica para una glucosiltransferasa (forward 5´ ACTACACTTTTCGGGTGGCTTGG3´ y reverse 5´ CAGTATAAGCGCCAGTTTCATC3´) dando como producto de la reacción un amplicón de 517 pb.

Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo en un volumen final de 15 µl que contenía: 1.5 µl de Tampón PCR 10X pH 8.4 (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3); 0.3 µl de dNTP's 10 mM, Invitrogen®; 0,6 µl de MgCl₂ 50 mM; 0,6 µl de cada partidor Forward y Reverse 25 µM, Alpha DNA®; 0.2 µl de la enzima ADN polimerasa de *Thermus Aquaticus*, Biolase®; y 1, 3 ó 5 µl de ADN obtenido. El programa de ciclaje térmico se realizó en un termociclador Labnet® y consistió en un paso de denaturación inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de denaturación a 95°C por 15 segundos, alineamiento a 59°C durante 30 segundos y extensión a 72°C por 60 segundos, con un paso de extensión final a 72°C por 10 minutos. Como control positivo se utilizó la cepa de referencia ATCC 25175 de *S. mutans* y como control negativo se utilizó agua. Todos los productos obtenidos en PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 1,5%. La agarosa fue disuelta en tampón TAE pH 7,9 (40mM Tris-HCl, 5mM acetato de sodio, 1mM EDTA), al que luego se agregó Gel Red™. Se llevó por calentamiento a ebullición y luego se dejó enfriar hasta que la solución alcanzó una temperatura aproximada de 50°C a 55°C, para ser vertida en una placa de acrílico provista de una peineta con espaciadores de 0,5 mm. Se dejó gelificar a temperatura ambiente por 20 minutos.

El gel fue dispuesto en una cámara de electroforesis horizontal que contenía tampón TAE. Los productos de la PCR se mezclaron con 4 µl de tampón de carga 6X (35% glicerol, 2% ficoll, 0,25% azul de bromofenol, tampón TBE 6X) y se depositaron 18 µl de cada muestra de PCR en los bolsillos del gel. Para la determinación del tamaño molecular de los fragmentos de ADN amplificados, se utilizó como estándar los DNA ladder 100 pb plus de Fermentas®. La electroforesis se corrió a 65 Volts, durante 1 a 2 horas, después de lo cual los geles de agarosa fueron observados en un transiluminador dual UV DNA light, Labnet International® a una longitud de onda 302nm. Cada gel fue registrado tomando una foto con una cámara digital con un filtro polarizador.

4.7 Identificación a nivel de genotipo de *S. mutans* mediante reacción en cadena de la polimerasa con partidores arbitrarios (AP-PCR)

La genotipificación de los aislados identificados como *S. mutans* en el paso anterior se realizó mediante la estrategia AP-PCR usando los primers OPA-02 (5' – TGC CGA GCT G – 3') y OPA-03 (5'- AGTCAGCCAC- 3') (Saarela y cols., 1996) siguiendo el protocolo planteado por Li y cols., (2001). Brevemente, la reacción se realizó en mezclas de 50ul que contenían buffer 1x PCR, 2,5 U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen), 200 µm de cada dNTP, 50 pmol de cada primer, MgCl² 7 mM y 5 µl de ADN genómico de cada aislado. Las reacciones se llevaron a cabo con las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 min, seguido por 45 ciclos de 94° durante 30 s, 36°C por 30 s y 72°C durante 1 min, y una extensión final 72°C durante 5 min.

Los productos de AP-PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% utilizando el tampón TAE y se tiñeron con Gel RedTM. Las imágenes fueron capturadas con el sistema Fotográfico Carestream^{MR} y las bandas generadas por los productos de AP-PCR se evaluaron y compararon para analizar su diversidad genotípica con la ayuda del programa GelCompar II (Applied Maths®). Para asegurar la reproducibilidad, las reacciones se realizaron dos veces en al menos dos amplificaciones independientes. En cada serie de reacciones, el ADN de *S. mutans* ATCC 25175 se incluyó como control positivo.

4.8 Análisis de datos

Para analizar si existía asociación entre la presencia de algún genotipo específico o la presencia de más de un genotipo de *S. mutans* con la experiencia de caries o con el recuento de UFC/ml de saliva se realizó Test de Fisher, que permite analizar asociación entre dos variables dicotómicas en muestras con *n* pequeño. Se consideró como hipótesis nula (H_0) la independencia entre las dos variables y la significancia estadística fue fijada en $p < 0,05$. Los análisis se realizaron mediante el programa STATA 11.0.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterización de la muestra

Con la totalidad de los consentimientos informados enviados y firmados por los apoderados, durante el período de septiembre a noviembre de 2015 se examinaron un total de 21 pre-escolares con distinta experiencia de caries. No hubo exclusión de los examinados (n=21). Se obtuvo una muestra de saliva por examinado, las cuales fueron denominadas M1 al M21 respectivamente.

El rango de edad de los examinados con distinta experiencia de caries en promedio es de 3.8 años (Tabla 1) y su distribución por género tiene una proporción de 67 % de mujeres (n=14) y 33 % de hombres (n=7) (Gráfico 1).

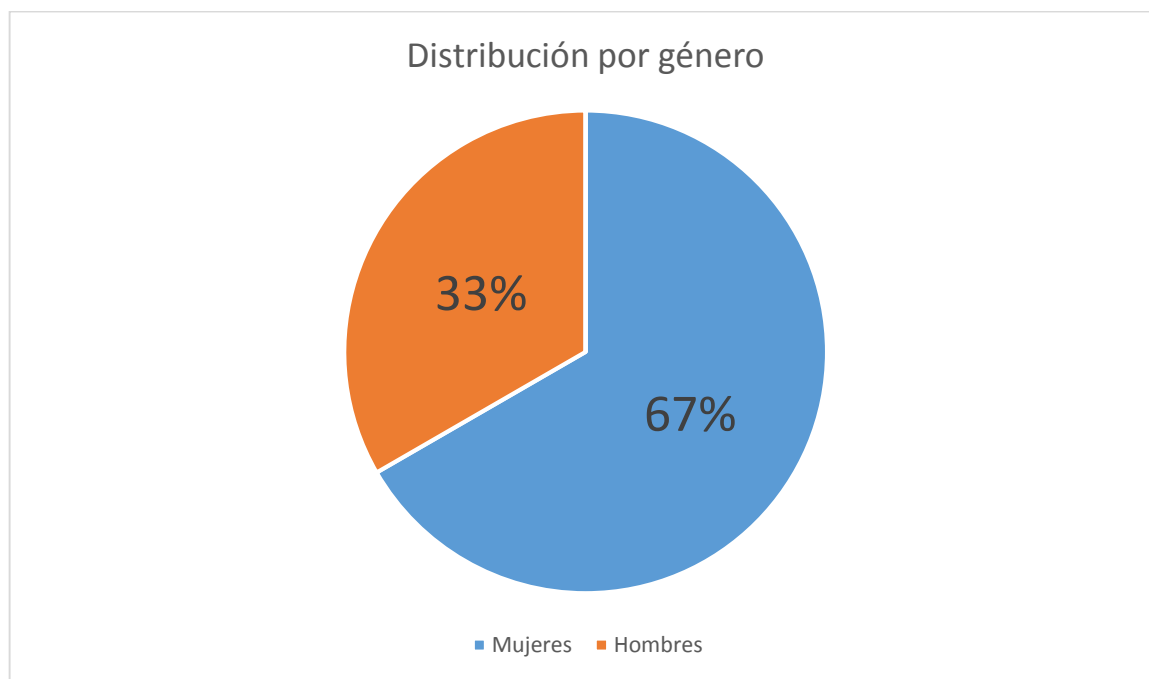


Gráfico 1. Distribución por género. Gráfico circular que muestra la distribución por género de los sujetos examinados.

5.2 Recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por muestra.

La siembra y cultivo de las muestras en condiciones de capnofilia resultó en un abundante crecimiento bacteriano de todas las muestras, exceptuando la muestra M16 en la que no fue posible observar crecimiento.

El total de la microbiota cultivada se expresó en unidades formadoras de colonias por ml de muestra (UFC/ml) como se observa en la tabla 1. La visualización macroscópica de colonias de *S. mutans* bajo lupa, fue el primer paso en su identificación (Figura 10) pero la determinación definitiva de especie se obtuvo mediante PCR.

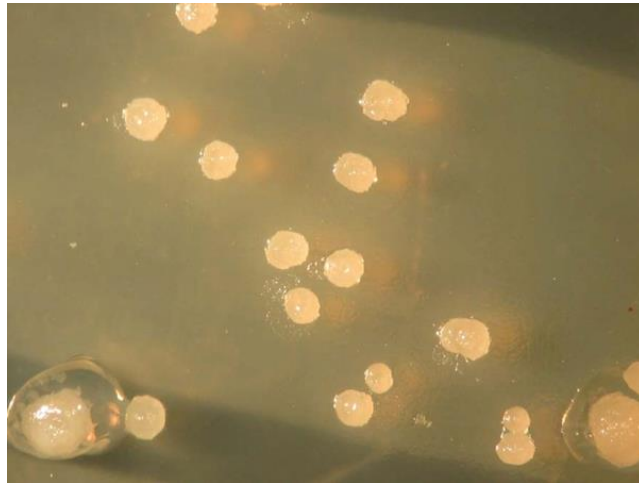


Figura 10. Colonias de *S. mutans* sembradas en agar TYCSB y cultivadas en jarras de capnofilia en una estufa de cultivo.

Tabla 1. Caracterización de las muestras por género, edad, experiencia de caries mediante el indicador ceo-d y recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *S. mutans*.

N° MUESTRA	Género	Edad (años)	ceo-d	UFC/ml
M1	Masculino	3.7	4	6,5 X10 ⁴
M2	Masculino	3.9	3	1,78X10 ⁶
M3	Femenino	3.5	5	1,38X10 ⁶
M4	Femenino	3.5	4	1,33X10 ⁶
M5	Masculino	4	13	1,02X10 ⁶
M6	Femenino	3.7	0	1,90X10 ⁶
M7	Femenino	3.8	0	2,29X10 ⁶
M8	Femenino	4	2	8,5X10 ⁴
M9	Femenino	3.6	0	3,41X10 ⁶
M10	Femenino	3.9	4	2,15X10 ⁶
M11	Femenino	4	0	1,12X10 ⁶
M12	Masculino	3.8	5	5,8X10 ⁴
M13	Femenino	4	8	6,2X10 ⁴
M14	Femenino	3.9	0	6,7X10 ⁴
M15	Femenino	4	4	1,08X10 ⁶
M16	Masculino	3.7	3	NHDB*
M17	Masculino	4	7	5,26X10 ⁶
M18	Femenino	3.9	3	3,7X10 ⁴
M19	Masculino	4	0	6,6X10 ⁴
M20	Femenino	3.6	0	6,6X10 ⁴
M21	Femenino	3.8	2	9,3X10 ⁴
		\bar{X} : 3.8	\bar{X} : 4.1	

*NHBD: No hubo desarrollo bacteriano.

5.4 Obtención de aislados de *S. mutans*

Aislados bacterianos para la detección de *S. mutans* fueron obtenidos a partir de las muestras sembradas en agar TYCSB, seleccionados en base a sus características macroscópicas coloniales, similares o compatibles con la morfología descrita para *S. mutans* en el medio de cultivo utilizado (Figura 11).

De las primeras 5 muestras (M1-M5), sólo se pudieron obtener 4 aislados bacterianos. De todo el resto de las muestras (M6-M21), se obtuvieron 5 aislados bacterianos de cada una (n= 98). Cada aislado obtenido se utilizó para las reacciones de PCR.

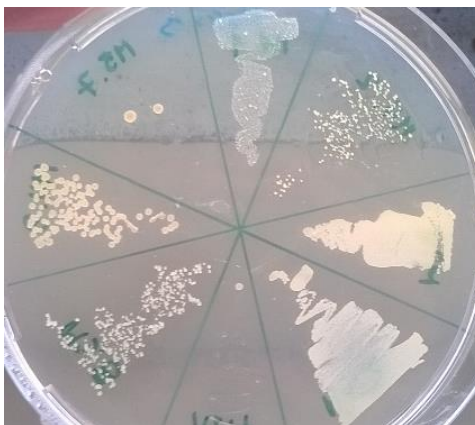


Figura 11. Aislados bacterianos compatibles con la morfología colonial macroscópica descrita para *S. mutans*.

5.5 Identificación de los aislados a nivel de especie mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

5.5.1 Obtención e identificación de DNA genómico bacteriano

La detección de ADN bacteriano de las muestras mediante PCR, utilizando partidores universales para bacteria, mostró que 81 de las cepas de los aislados bacterianos, es decir un 82.6% de las muestras de los sujetos, eran positivas para la presencia de ADN bacteriano (n=81) (Figura 12).



Figura 12. Detección ADN bacteriano en las muestras de los aislados bacterianos. Gel de agarosa al 1.5% en tampón TAE 10X que muestra los resultados de la detección de ADN bacteriano en las muestras de los aislados bacterianos mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), usando partidores universales PU1F (1505pb). Carril PM: marcador de tamaño molecular ladder 100pb. Carril 1: control positivo ADN genómico de ATCC 25175 de *S. mutans*. Carril 2: control negativo. Carriles 3-24: 22 muestras de aislados bacterianos representativos, de un total de 81 aislados bacterianos.

5.5.2 Identificación a nivel de especie de los aislados bacterianos

Posteriormente, el análisis por PCR usando partidores específicos de especie (para el gen *gtfB*), reveló la presencia del fragmento de 517 pb, correspondiente a *S. mutans* en el 81.8% (n=72) de las cepas analizadas en el trabajo (Figura 13).

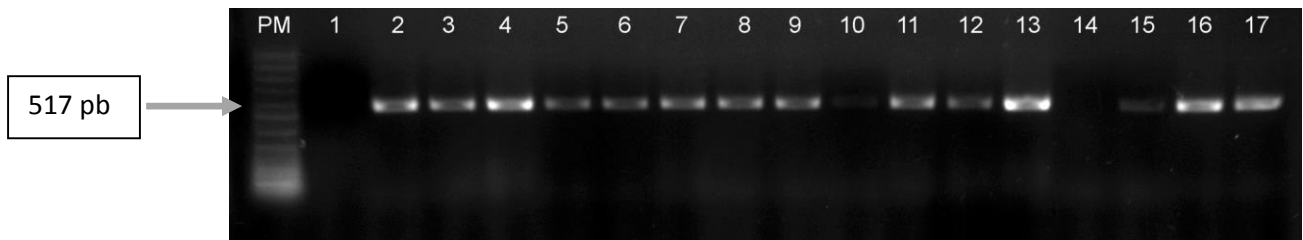


Figura 13. Detección ADN bacterianos en aislados positivos a *S. mutans*. Gel de agarosa al 1.5% en tampón TAE 10X que muestra los resultados de la detección de ADN bacteriano en los aislados bacterianos positivos a *S. mutans* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), usando partidores específicos de especie. Carril PM: marcador de tamaño molecular ladder 100pb. Carril 1: control negativo. Carril 2: control positivo ADN genómico ATCC 25175 de *S. mutans*. Carilles3-17: ADN de 15 aislados representativos (de un total de 72), mostrando una banda equivalente a 517pb que identifica al fragmento del gen *gtfB* de *S. mutans*.

Respecto a la distribución de los individuos según sexo, el 27.7 % (n=20) de las cepas positivas a *S. mutans* corresponde a hombres y el 72.3 % corresponde a mujeres (n=52)

5.6 Identificación a nivel de genotipo mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa con partidores arbitrarios (AP-PCR)

El resultado de la identificación de genotipos de *S. mutans*, mediante el uso de partidores arbitrarios (OPA-02 y OPA-3), mostró que de las 72 cepas positivas para la presencia de *S. mutans*, en el 75 % de cepas (n= 54) se pudo distinguir una huella dactilar característica, mientras que en el 25 % de las cepas no fue posible tipificar genotipos de *S. mutans* (Figura 14).

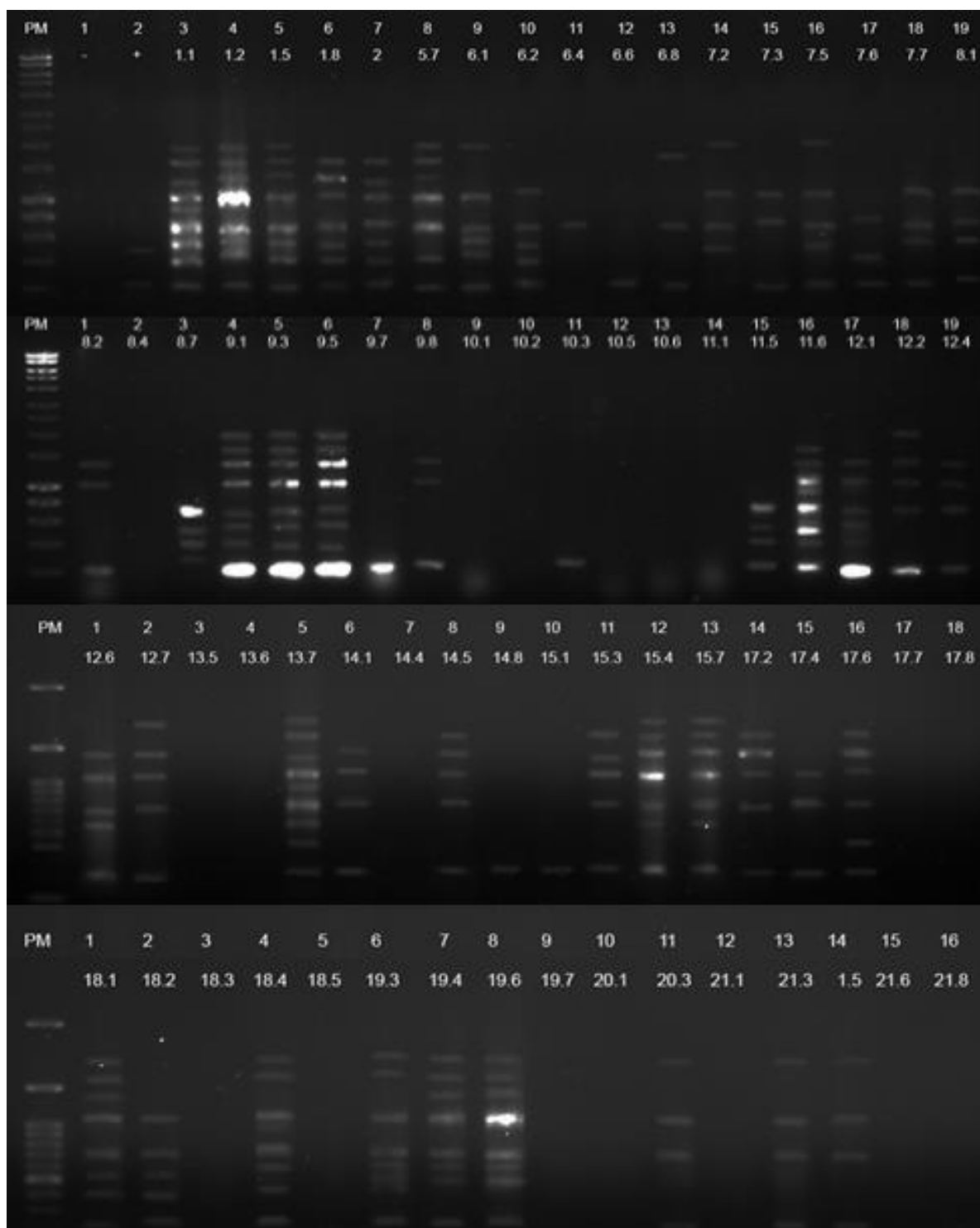


Figura 14. Detección de huellas dactilares características de *S. mutans*. Gel de agarosa al 1.5% en tampón TAE 10X que muestra los resultados de la detección de huellas dactilares características de los aislados bacterianos positivos a *S. mutans* mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa con partidores arbitrarios (AP-PCR). Carril PM: marcador de tamaño molecular ladder 100pb. Carril 1-19: diferentes cepas de los sujetos muestreados.

5.7 Evaluación y comparación de diversidad genotípica de *S. mutans*.

Mediante el uso del programa GelCompar II (Applied Maths®) a través de comparación de imágenes, un total de 26 genotipos distintos fueron identificados de las 52 cepas positivas para huella dactilar de *S. mutans* (Figura 15). De las huellas dactilares encontradas, se observó que 10 de ellas eran compartidas entre los sujetos (Tabla 2).

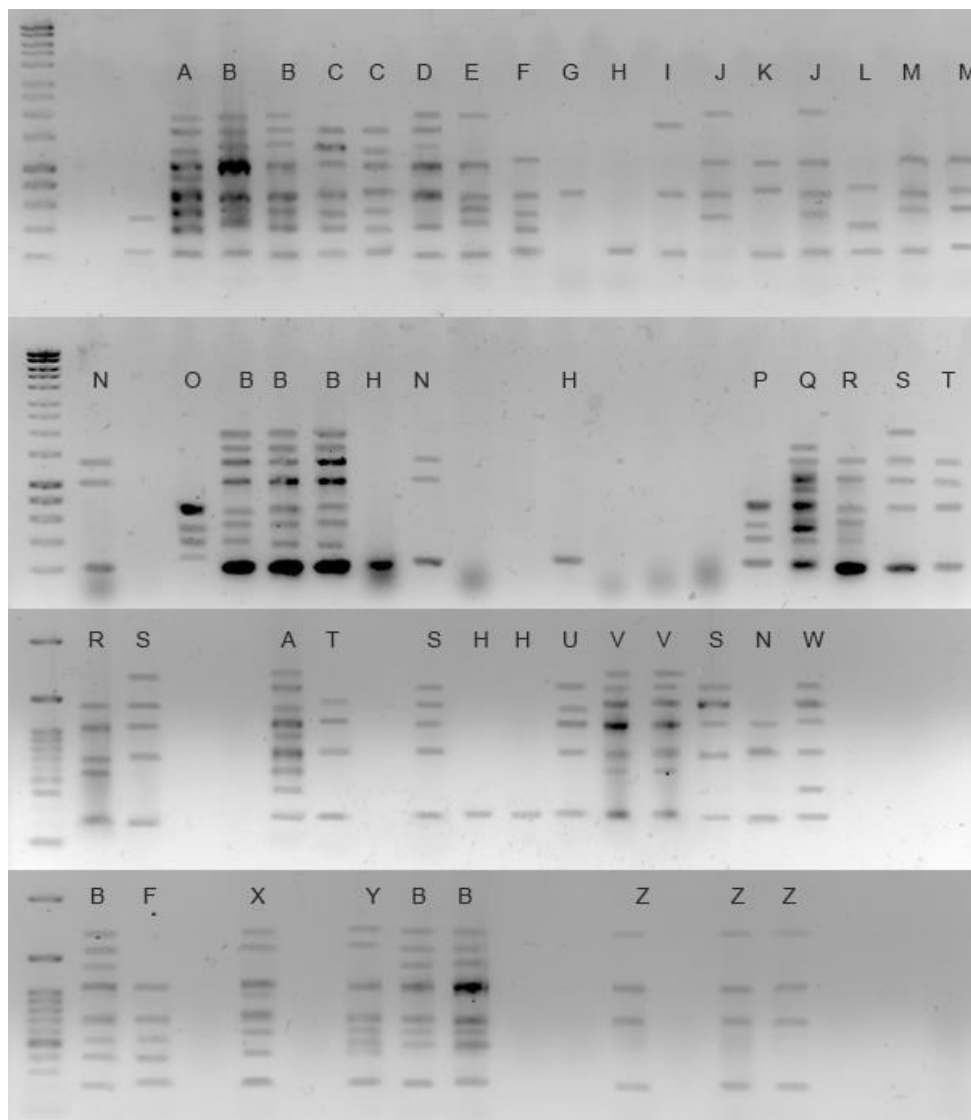


Figura 15. Identificación de huellas dactilares de *S. mutans* en preescolares. Identificación de distintos genotipos de *S. mutans* mediante comparación de huellas dactilares obtenidas de los aislados de los sujetos muestreados, usando el programa GelCompar II (Applied Maths®)

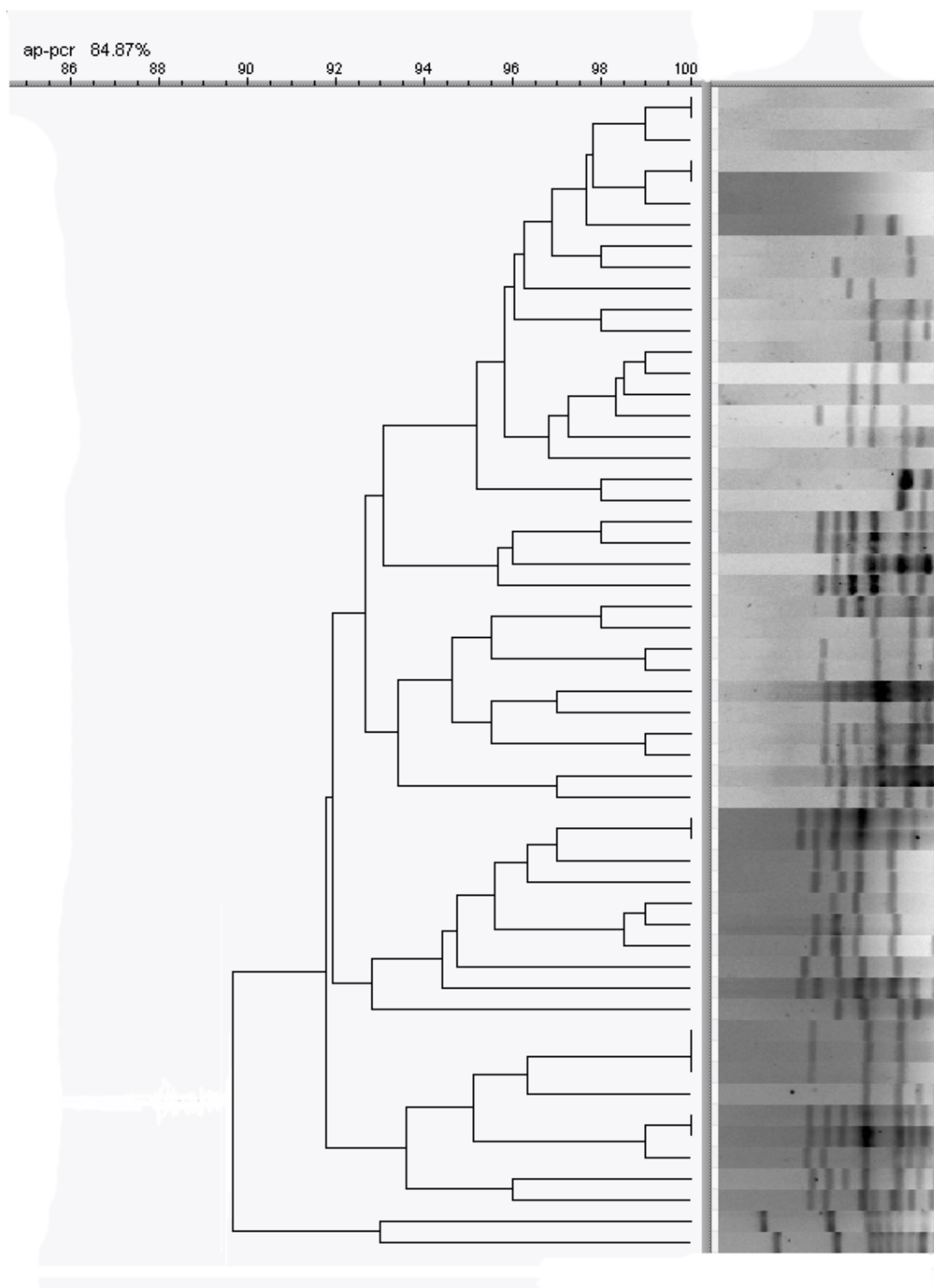


Figura 16. Dendrograma de la diversidad genética de *S. mutans* en preescolares. Dendrograma que ilustra la diversidad genética de aislados de *S. mutans* obtenidos de los sujetos con distintas experiencias de caries.

Al comparar la cantidad de genotipos por niño con el índice ceo-d, no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre una mayor experiencia de caries y una mayor portación de genotipos de *S. mutans* en las muestras analizadas ($p>0,05$). Por último, al analizar la presencia de algún genotipo específico con un valor mayor de ceo-d, no se encontró asociación estadísticamente significativa entre alguno de los genotipos y una mayor experiencia de caries ($p>0,05$). A la vez no se asoció de manera significativa algún genotipo con niños sin experiencia de caries ($p>0,05$).

Tabla 2. Muestras y genotipos de *S. mutans*

N° MUESTRA	CANTIDAD GENOTIPOS	TIPO GENOTIPOS
M1	3	a-b-c
M2	1	d
M5	1	d
M6	5	e-f-g-h-i
M7	4	j-k-l-m
M8	3	m-n-o
M9	3	b-h-n
M10	1	h
M11	2	p-q
M12	3	r-s-t
M13	1	a
M14	3	t-s-h
M15	3	h-t-u
M17	3	s-n-v
M18	3	b-f-w
M19	2	b-x
M20	1	y
M21	1	y

Tabla 3. Relación UFC / genotipos

N° MUESTRA	UFC	CANTIDAD GENOTIPOS
M1	6,5 X10 ⁴	3
M2	1,78 X10 ⁶	1
M5	1,02 X10 ⁶	1
M6	1,90 X10 ⁶	5
M7	2,29 X10 ⁶	4
M8	8,5 X10 ⁴	3
M9	3,41 X10 ⁶	3
M10	2,15 X10 ⁶	1
M11	1,12 X10 ⁶	2
M12	5,8 X10 ⁴	3
M13	6,2 X10 ⁴	1
M14	6,7 X10 ⁴	3
M15	1,08 X10 ⁶	3
M17	5,26 X10 ⁶	3
M18	3,7 X10 ⁴	3
M19	6,6 X10 ⁴	2
M20	6,6 X10 ⁴	1
M21	9,3 X10 ⁴	1

6. DISCUSIÓN

Siendo *Streptococcus mutans* la principal especie bacteriana asociada con el desarrollo de caries dental, el objetivo de este estudio fue investigar la presencia de distintos genotipos de *S. mutans*, en un mismo grupo curso de niños entre 3 y 4 años, con distinta experiencia de caries, ya que se ha descrito que *S. mutans* está ampliamente distribuido, no solamente en poblaciones con una alta o moderada prevalencia de caries, sino también, en poblaciones con baja o nula experiencia de caries dental (Kamiya y Napimoga, 2005; Herczegh y Ghidán, 2008).

La importancia de conocer la diversidad genotípica radica en el hecho de que, una vez que las especies se establecen como parte de la microbiota bucal, estas tienden a persistir y mantenerse de modo estable a lo largo de la vida del individuo (Klein y cols., 2004). Si *S. mutans* es una especie asociada a estados de enfermedad, su detección temprana permitiría establecer medidas para evitar o retrasar el desarrollo de la enfermedad en los individuos. Diversas hipótesis han planteado como posible explicación, la diversidad genotípica de *S. mutans* en la cavidad bucal de distintas poblaciones humanas, la que podría determinar distintos niveles de riesgo de presentar la enfermedad, asociados a la expresión diferencial de los factores de virulencia (Caulfield y Walker, 1989; Do y Gilbert, 2012).

Actualmente, se reconoce la heterogeneidad genética entre las distintas cepas de *S. mutans* (Napimoga y Kamiya, 2004), sin embargo, la relación entre dicha diversidad genética de *S. mutans* y la actividad e historia de caries aún es controversial. Se sugiere que niños con caries activas y alto consumo de sacarosa son portadores de una mayor cantidad de biotipos de *S. mutans*, en comparación con niños libres de caries (Alaluusua y cols., 1996). En cambio, en otros estudios, se ha evidenciado una correlación negativa entre la actividad de caries y la diversidad genotípica de la especie en la cavidad bucal (Kreulen y cols., 1997). Es por ello que resulta de gran interés y relevancia el poder obtener datos de esta situación en la población infantil chilena.

Al realizar el cultivo microbiológico de las muestras de saliva obtenidas, se pudo apreciar la presencia de una abundante microbiota cultivable en la mayoría de los niños. De los 21 niños estudiados, el 94.7 % presentó colonias con morfología compatible descrita para *S. mutans*, no obstante, la identificación mediante PCR de las cepas de las colonias representativas aisladas, confirmó el diagnóstico presuntivo para el 81.8 % de ellas (n=72), lo que reafirma la relevancia de complementar mediante distintos métodos, la detección de una especie bacteriana en particular.

De la muestra M16, no fue posible observar microbiota cultivable, tanto al sembrar las diluciones al 10^{-2} , 10^{-3} y directamente la muestra de saliva. Esto puede ser por la poca cantidad de microorganismos cultivables presentes en saliva, dada la temprana edad del sujeto.

Con el conocimiento de que la caries es una enfermedad transmisible, y que ocurre dentro de una “discreta ventana de infectividad” (Nowak, 2011, Baca y cols., 2012) es que resulta de interés conocer cómo se comporta la transmisión horizontal de *S. mutans* dentro de un mismo grupo curso, ya que existe poca evidencia en comparación a la disponible respecto a la transmisión vertical.

Entre los sujetos que participaron del estudio, las muestras M3 y M4 provenían de gemelas, lo que resultó interesante al momento de realizar el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), ya que ambas presentaron valores similares, situación esperada de acuerdo a la literatura revisada, por el hecho del parentesco. Además, en ellas no fue posible detectar la presencia de *S. mutans* mediante la prueba de PCR para la especie.

Por otro lado, las muestras M11 y M12, que correspondían a primas, mostraron recuentos distintos de UFC, así también, como a nivel de huellas dactilares de *S. mutans*, donde no se pudo observar genotipos en común, pero sí genotipos compartidos con otros niños del mismo nivel, en la muestra M12.

De las cepas que fueron positivas para la presencia de *S. mutans*, mediante la reacción en cadena con partidores arbitrarios (AP-PCR), se pudo identificar un total de 26 genotipos distintos. Donde se observó que 10 huellas dactilares de *S. mutans* eran compartidos entre los niños. El encontrar los mismos genotipos en los preescolares de la misma clase, sugiere la ocurrencia de la transmisión horizontal.

Estos resultados concuerdan con varios estudios realizados en niños preescolares, donde se observó que niños no relacionados biológicamente compartían genotipos (Kyounga y cols., 2013). Sin embargo, la evidencia sigue siendo contradictoria respecto a la transmisión horizontal de genotipos de *S. mutans*, tal como sucede en el estudio realizado en 20 preescolares, de 4 a 5 años de edad en China (Hu y cols., 2014) donde se observaron 37 genotipos distintos, pero ninguno compartido entre los integrantes de un mismo nivel. Pero sí encontraron que dos niños de distintas clases compartían un mismo genotipo.

Un hallazgo superior a 10^5 UFC de *Streptococcus mutans* por mililitro de saliva, remite a un elevado riesgo de caries (Krasse, 1988; Andersson y cols., 1993). En este estudio se pudo evidenciar que 12 de los 19 niños, es decir un 57.8 % presenta un alto riesgo para la enfermedad de caries. Se reconoce que un elevado recuento bacteriano implica siempre un alto riesgo de caries, o un peligro de caries latente, debido a la naturaleza multicausal de la enfermedad. Sin embargo, no puede hacerse en general ningún pronóstico fiable a partir de la sola observación de un único factor etiológico (Holbrook y cols., 1993)

La mayoría de los sujetos muestreados (8 de 19), es decir un 42 % portaban 3 genotipos distintos. Entre los que portaban solo un genotipo, se encontraron 5 niños (31.5 %). Las excepciones fueron los sujetos M11 y M19 que portaban 2 genotipos (10.5 %), M7 que portaba 4 genotipos distintos y M6 que portaba 6 genotipos (5.2 %).

Un estudio de cohorte longitudinal realizado en Estados Unidos (Cheon y cols., 2013), reportó que, en un total de 67 niños de 5 a 6 años de edad, con alto riesgo de caries, se encontraron 22 genotipos únicos de *S. mutans*, de los cuales 13 eran compartidos entre los niños. Además, se observó que la cantidad de genotipos no estaba significativamente relacionada con el número de UFC, pero sí fue positivamente asociado al índice de caries. También, se pudo observar que la presencia de un único genotipo fue asociada a un menor valor de ceo-d, mientras que aquellos niños que presentaron una variación en la cantidad de genotipos durante la duración del estudio, se asociaron a un mayor valor de ceo-d

En otro estudio realizado en Brasil (Pieralisi y cols., 2009), 28 pre-escolares de 4 y 5 años de edad, con hábitos y estilos de vida similares, se identificaron 62 genotipos distintos de *S. mutans*, donde se encontró una relación positiva entre la cantidad de genotipos y el índice ceo-d. También se pudo observar que los niños con caries poseían 2 a 5 genotipos mientras que los libres de caries solo poseían 2.

Para lograr mantener una adecuada salud bucal, es indispensable comprender la relación entre la microbiota comensal con el hospedero, ya que su comprensión permite canalizar los esfuerzos de prevención de la salud bucal, al realizar un adecuado control de las variables (entre ellas: la higiene bucal, dieta y factores relacionados con el hospedero) responsables de la proliferación de especies bacterianas con potencial patológico conocido, cobrando una mayor relevancia la necesidad de incluir una detección temprana de estas bacterias en niños, que tienen distintos reservorios en la cavidad bucal, y que de acuerdo a la evidencia revisada, tienen a mantenerse estables en el tiempo, donde su proliferación excesiva requiere intervenciones preventivas y terapéuticas.

A pesar de que la evidencia no es concluyente respecto de una mayor severidad de la enfermedad respecto a la cantidad de genotipos detectados, si se ha observado en otros estudios que hay ciertos genotipos que presentan una mayor virulencia y patogenicidad (Napimoga y cols., 2004) lo cual es un riesgo inminente en los posibles sujetos portadores de estos genotipos.

Es posible que un mayor nivel de colonización y número de distintos genotipos de *S. mutans* puedan ser resultado de una dieta cariogénica, junto a otros factores que puedan favorecer el desarrollo de la enfermedad. Además, como la microflora oral de los niños no es completamente estable, pueden adquirir nuevas cepas que podrían alterar el microbioma, y con ello, podrían favorecer la progresión de la caries dental.

Por otro lado, en el estudio longitudinal de Cheon y cols en 2013, se observó que los genotipos de *S. mutans* en los individuos quedan establecidos antes de la erupción del primer molar permanente, y que su erupción no tiene relación con un aumento del número de genotipos. De ser así, se refuerza la idea de la necesidad imperiosa de establecer grupos de riesgos y programas preventivos a temprana edad. Este estudio sugiere que sí podría ocurrir la transmisión horizontal de genotipos de *S. mutans* en un mismo nivel pre-escolar. Por lo tanto, estos niños ya poseerían un mayor riesgo para desarrollar la enfermedad de caries a través de una posible facilitación de la colonización por un aumento en la exposición a la especie, sin embargo, dicho riesgo no guardaría relación con la presencia de algún genotipo específico ni el con número total de genotipos de *S. mutans* colonizando la cavidad oral de los niños.

La caries dental es la enfermedad más común y prevenible a nivel individual que afecta a toda la población, pero es influida por múltiples factores (Brunotto y cols., 2014). Los niveles de enfermedad varían entre los países. Y aunque han mejorado las cifras desde la implementación del flúor a las pastas dentales y el consumo de agua fluorada, aún existen altos niveles de individuos con enfermedad de caries, que requieren de un tratamiento terapéutico, que implica el inicio de un ciclo irreversible de restauraciones en un diente (Nowak, 2011). Por ello, es que cobra gran relevancia el poder otorgar evidencia científica para validar y centrar los esfuerzos en programas de salud para la educación, prevención y detección temprana de riesgos descritos para la enfermedad en niños.

Si reflexionamos, los médicos siguen programas y citas periódicas desde el nacimiento del niño para prevenir las enfermedades comunes de la infancia. Situación que es un hecho, y que los padres suelen seguir estrictamente. Sin embargo, respecto a la atención dental, existe muy poca cultura aún de que, a fin de cuentas, es un chequeo periódico más que se debería realizar, y no simplemente esperar y acudir a la atención cuando el niño presenta molestias o se puede apreciar el daño producido por la caries, resultando meramente en una atención terapéutica.

La habilidad de identificar correctamente a un niño en riesgo de desarrollar caries es difícil. Las estrategias preventivas requieren de recursos, tanto financieros como personales, que no permiten que todos los niños puedan recibir intervenciones óptimas, dada la inequidad en salud que existe en la mayoría de las sociedades, y en particular, en Chile.

Con los distintos programas de salud implementados en el sistema público para los pre-escolares en los últimos años (por mencionar: GES embarazada, Control sano de los 2 y 4 años, “Sembrando Sonrisas” y el programa GES de 6 años), se ha visto una mayor inclusión de niños a la atención dental, otorgando nuevas instancias de educación y refuerzo de conceptos de salud oral, una mayor posibilidad de realizar acciones preventivas en niños y buscar modificar tempranamente factores de riesgo. Sin embargo, aún muchos niños llegan a su primera atención dental con severas lesiones, que pudieron ser prevenidas. O en otras situaciones, y las más lamentables, llegan a su evaluación GES de los 6 años con una gran destrucción en su dentición, pese a haber acudido a programas con fines preventivos años anteriores. Es necesaria una mayor cantidad de tiempo dedicada a la educación en prevención de salud bucal, tanto para los padres y las educadoras de los niños, ya que estos son quienes acompañan la mayor cantidad de tiempo a los pre-escolares, y son quienes instauran y refuerzan los hábitos en los niños.

7. CONCLUSIONES

- Se valida la hipótesis de este estudio. Se detectó la presencia de *S. mutans* mediante PCR en muestras provenientes de la cavidad bucal de párvulos de 3 a 4 años de edad, con distinta experiencia de caries.
- Se identificaron distintos genotipos de *S. mutans* mediante AP-PCR
- Se pudo establecer que genotipos idénticos de *S. mutans* están presentes en la cavidad bucal de los niños pertenecientes al mismo grupo curso.
- Al corroborar la presencia de genotipos idénticos de *S. mutans* en niños, se sugiere la ocurrencia de la transmisión horizontal de estos genotipos, en un mismo curso.
- No existió asociación entre un mayor número de genotipos o la presencia de algún genotipo específico de *S. mutans* con una mayor experiencia de caries en los niños analizados.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo C, Corsini G, (2007) Diagnosis of buccal health of children of 2 and 4 years, that attend the preschool education in the Metropolitan Region. Chilean Health Ministry; 2007.
- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*, 43(11), 5721-5732.
- Ahn, S. J., Wen, Z. T., Brady, L. J., & Burne, R. A. (2008). Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. *Infect Immun*, 76(9), 4259-4268.
- Alaluusua, S., Alaluusua, S. J., Karjalainen, J., Saarela, M., Holttinen, T., Kallio, M., et al. (1994). The demonstration by ribotyping of the stability of oral *Streptococcus mutans* infection over 5 to 7 years in children. *Arch Oral Biol*, 39(6), 467-471.
- Alaluusua, S., Grönroos, L., Zhu, X., Saarela, M., Mättö, J., Asikainen, S., et al. (1997). Production of glucosyltransferases by clinical *mutans streptococcal* isolates as determined by semiquantitative cross-dot assay. *Arch Oral Biol*, 42(6), 417-422.
- Alaluusua, S., Mättö, J., Grönroos, L., Innilä, S., Torkko, H., Asikainen, S., et al. (1996). Oral colonization by more than one clonal type of *mutans streptococcus* in children with nursing-bottle dental caries. *Arch Oral Biol*, 41(2), 167-173.
- Arthur, R. A., Cury, A. A., Graner, R. O., Rosalen, P. L., Vale, G. C., Paes Leme, A. F., et al. (2011). Genotypic and phenotypic analysis of *S. mutans* isolated from dental biofilms formed in vivo under high cariogenic conditions. *Braz Dent J*, 22(4), 267-274.
- Baca, P., Castillo, A. M., Liébana, M. J., Castillo, F., Martín-Platero, A., & Liébana, J. (2012). Horizontal transmission of *Streptococcus mutans* in schoolchildren. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 17(3), e495-500.
- Becker, M. R., Paster, B. J., Leys, E. J., Moeschberger, M. L., Kenyon, S. G., Galvin, J. L., et al. (2002). Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol*, 40(3), 1001-1009.
- Carlsson, P., Olsson, B., & Bratthall, D. (1985). The relationship between the bacterium *Streptococcus mutans* in the saliva and dental caries in children in Mozambique. *Arch Oral Biol*, 30(3), 265-268.
- Caufield, P. W., Cutter, G. R., & Dasanayake, A. P. (1993). Initial acquisition of *mutans streptococci* by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res*, 72(1), 37-45.

- Caufield, P. W., & Walker, T. M. (1989). Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphisms. *J Clin Microbiol*, 27(2), 274-278.
- Cheon, K., Moser, S. A., Wiener, H. W., Whiddon, J., Momeni, S. S., Ruby, J. D., et al. (2013). Characteristics of *Streptococcus mutans* genotypes and dental caries in children. *Eur J Oral Sci*, 121(3 Pt 1), 148-155.
- Cornejo, O. E., Lefébure, T., Bitar, P. D., Lang, P., Richards, V. P., Eilertson, K., et al. (2013). Evolutionary and population genomics of the cavity causing bacteria *Streptococcus mutans*. *Mol Biol Evol*, 30(4), 881-893.
- Crielaard, W., Zaura, E., Schuller, A. A., Huse, S. M., Montijn, R. C., & Keijser, B. J. (2011). Exploring the oral microbiota of children at various developmental stages of their dentition in the relation to their oral health. *BMC Med Genomics*, 4, 22.
- De Grauwe, A., Aps, J. K., & Martens, L. C. (2004). Early Childhood Caries (ECC): what's in a name? *Eur J Paediatr Dent*, 5(2), 62-70.
- Do, T., Gilbert, S. C., Clark, D., Ali, F., Fatturi Parolo, C. C., Maltz, M., et al. (2010). Generation of diversity in *Streptococcus mutans* genes demonstrated by MLST. *PLoS One*, 5(2), e9073.
- Dobrindt, U., & Hacker, J. (2001). Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 4(5), 550-557.
- Echeverría S., Soto D. (2003) Prevalencia de caries de la Lactancia en niños de 2 a 4 años de la región Metropolitana. Diagnóstico actualizado. *Revista Dental de Chile*, 94,14-8.
- Featherstone, J. D., Adair, S. M., Anderson, M. H., Berkowitz, R. J., Bird, W. F., Crall, J. J., et al. (2003). Caries management by risk assessment: consensus statement, April 2002. *J Calif Dent Assoc*, 31(3), 257-269.
- Herczegh, A., Ghidán, A., Deseo, K., Kamotsay, K., & Tarján, I. (2008). Comparison of *Streptococcus mutans* strains from children with caries-active, caries-free and gingivitis clinical diagnosis by pulsed-field gel electrophoresis. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 55(4), 419-427.
- Hu, D., Cui, W., Luo, Y., Yang, J., Deng, B., Xu, J., et al. (2014). [Horizontal transmission of *Streptococcus mutans* in caries-active preschool children]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 34(5), 636-640.
- Kamiya, R. U., Napimoga, M. H., Höfling, J. F., & Gonçalves, R. B. (2005). Frequency of four different mutacin genes in *Streptococcus mutans* genotypes isolated from caries-free and caries-active individuals. *J Med Microbiol*, 54(Pt 6), 599-604.

- Klein, M. I., Flório, F. M., Pereira, A. C., Höfling, J. F., & Gonçalves, R. B. (2004). Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nursery children. *J Clin Microbiol*, *42*(10), 4620-4626.
- Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N., Blehert, D. S., Eglund, P. G., Foster, J. S., & Palmer, R. J. (2002). Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, *66*(3), 486-505, table of contents.
- Kozai, K., Nakayama, R., Tedjosasongko, U., Kuwahara, S., Suzuki, J., Okada, M., et al. (1999). Intrafamilial distribution of mutans streptococci in Japanese families and possibility of father-to-child transmission. *Microbiol Immunol*, *43*(2), 99-106.
- Kreulen, C. M., de Soet, H. J., Hogeveen, R., & Veerkamp, J. S. (1997). *Streptococcus mutans* in children using nursing bottles. *ASDC J Dent Child*, *64*(2), 107-111.
- Krzyściak, W., Jurczak, A., Kościelniak, D., Bystrowska, B., & Skalniak, A. (2014). The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, *33*(4), 499-515.
- Kuboniwa, M., & Lamont, R. J. (2010). Subgingival biofilm formation. *Periodontol 2000*, *52*(1), 38-52.
- Lakshman, S. (2006). Normal oral flora, the oral ecosystem and plaque biofilms. Essential microbiology for dentistry, Third Ed., 255-265.
- Lembo, F. L., Longo, P. L., Ota-Tsuzuki, C., Rodrigues, C. R., & Mayer, M. P. (2007). Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children. *Oral Microbiol Immunol*, *22*(5), 313-319.
- Lemos, J. A., Quivey, R. G., Koo, H., & Abranches, J. (2013). *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? *Microbiology*, *159*(Pt 3), 436-445.
- Li, Y., & Caufield, P. W. (1995). The fidelity of initial acquisition of mutans streptococci by infants from their mothers. *J Dent Res*, *74*(2), 681-685.
- Li, Y., Caufield, P. W., Emanuelsson, I. R., & Thornqvist, E. (2001). Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations. *Oral Microbiol Immunol*, *16*(1), 16-23.
- Li, Y., Navia, J. M., & Caufield, P. W. (1994). Colonization by mutans streptococci in the mouths of 3- and 4-year-old Chinese children with or without enamel hypoplasia. *Arch Oral Biol*, *39*(12), 1057-1062.
- Listgarten, M. A. (1994). The structure of dental plaque. *Periodontol 2000*, *5*, 52-65.

- Locker D. (1997) Concepts of oral health, disease and the quality of life. In: Slade GD, editor. Measuring oral health and quality of life. Chapel Hill: University of North Carolina, Dental Ecology, pp. 11-23
- Loesche, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*, 50(4), 353-380.
- Marsh, P. D. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*, 149(Pt 2), 279-294.
- Masuda, N., Tsutsumi, N., Sobue, S., & Hamada, S. (1979). Longitudinal survey of the distribution of various serotypes of *Streptococcus mutans* in infants. *J Clin Microbiol*, 10(4), 497-502.
- Mattos-Graner, R. O., Li, Y., Caufield, P. W., Duncan, M., & Smith, D. J. (2001). Genotypic diversity of mutans streptococci in Brazilian nursery children suggests horizontal transmission. *J Clin Microbiol*, 39(6), 2313-2316.
- MINSAL (2007). Programa de Promoción y Prevención de Salud Bucal en Preescolares.
- MINSAL (2011). Metas 2011-2020, Elige vivir sano. Estrategia Nacional de Salud para el cumplimiento de los objetivos sanitarios de la década 2011-2020. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile.
- MINSAL (2013). Guía clínica AUGE salud oral integral para niños y niñas de 6 años. Serie Guías Clínicas MINSAL, Ministerio de Salud. Gobierno de Chile.
- MINSAL (2013). Guía clínica Salud oral en adolescentes de 10 a 19 años. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile.
- Napimoga, M. H., Kamiya, R. U., Rosa, R. T., Rosa, E. A., Höfling, J. F., Mattos-Graner, R., et al. (2004). Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries-active individuals. *J Med Microbiol*, 53(Pt 7), 697-703.
- Nascimento, M. M., Höfling, J. F., & Gonçalves, R. B. (2004). *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. *Caries Res*, 38(5), 454-463.
- Nascimento, M. M., Lemos, J. A., Abranches, J., Gonçalves, R. B., & Burne, R. A. (2004). Adaptive acid tolerance response of *Streptococcus sobrinus*. *J Bacteriol*, 186(19), 6383-6390.
- Nowak, A. J. (2011). Paradigm shift: Infant oral health care--primary prevention. *J Dent*, 39 Suppl 2, S49-55.
- Paddick, J. S., Brailsford, S. R., Kidd, E. A., Gilbert, S. C., Clark, D. T., Alam, S., et al. (2003). Effect of the environment on genotypic diversity of *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus oralis* in the oral biofilm. *Appl Environ Microbiol*, 69(11), 6475-6480.

- Pattanaporn, K., Saraithong, P., Khongkhunthian, S., Aleksejuniene, J., Laohapensang, P., Chhun, N., et al. (2013). Mode of delivery, mutans streptococci colonization, and early childhood caries in three- to five-year-old Thai children. *Community Dent Oral Epidemiol*, 41(3), 212-223.
- Ramos-Gomez, F. J., Weintraub, J. A., Gansky, S. A., Hoover, C. I., & Featherstone, J. D. (2002). Bacterial, behavioral and environmental factors associated with early childhood caries. *J Clin Pediatr Dent*, 26(2), 165-173.
- Redmo Emanuelsson, I. M., Carlsson, P., Hamberg, K., & Bratthall, D. (2003). Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiol Immunol*, 18(1), 24-29.
- Russell, R. R. (1994). The application of molecular genetics to the microbiology of dental caries. *Caries Res*, 28(2), 69-82.
- Sánchez-Acedo, M., Montiel-Company, J. M., Dasí-Fernández, F., & Almerich-Silla, J. M. (2013). Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus detection by Polymerase Chain Reaction and their relation to dental caries in 12 and 15 year-old schoolchildren in Valencia (Spain). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 18(6), e839-845.
- Selwitz, R. H., Ismail, A. I., & Pitts, N. B. (2007). Dental caries. *Lancet*, 369(9555), 51-59.
- Sheiham A. (2005) Oral health, general health and quality of life. *Bull World Health Organ*;83:644.
- Soto L., Tapia R., Jara G., Rodríguez G. (2007). Diagnostico Nacional de Salud Bucal de los niños de 6 años. Santiago: MINSAL.
- Soto L., Tapia R., Jara G., Rodríguez G., Urbina T., Venegas C. (2007). Diagnóstico Nacional de Salud Bucal del Adolescente de 12 años y Evaluación del Grado de Cumplimiento de los Objetivos Sanitarios de Salud Bucal 2000-2010. Santiago: MINSAL
- Tabchoury, C. P., Sousa, M. C., Arthur, R. A., Mattos-Graner, R. O., Del Bel Cury, A. A., & Cury, J. A. (2008). Evaluation of genotypic diversity of Streptococcus mutans using distinct arbitrary primers. *J Appl Oral Sci*, 16(6), 403-407.
- Tanner, A. C., Milgrom, P. M., Kent, R., Mokeem, S. A., Page, R. C., Riedy, C. A., et al. (2002). The microbiota of young children from tooth and tongue samples. *J Dent Res*, 81(1), 53-57.
- Takahashi N. y Nyvad B. (2008). Caries Ecology Revisited: Microbial Dynamics and the Caries Process. *Caries Res*. 42:409-18.
- Touger-Decker, R., & van Loveren, C. (2003). Sugars and dental caries. *Am J Clin Nutr*, 78(4), 881s-892s.

- Wan, A. K., Seow, W. K., Purdie, D. M., Bird, P. S., Walsh, L. J., & Tudehope, D. I. (2001). Oral colonization of *Streptococcus mutans* in six-month-old preerupted infants. *J Dent Res*, *80*(12), 2060-2065.
- Zaror Sánchez, C., Pineda Toledo, P., & Orellana Cáceres, J. J. (2011). Prevalencia de Caries Temprana de la Infancia y sus Factores Asociados en Niños Chilenos de 2 y 4 Años. *International journal of odontostomatology*, *5*, 171-177.

9. ANEXOS Y APÉNDICES

9.1. Anexo 1. Consentimiento Informado



Consentimiento Informado Para Participación en Proyecto de Investigación

Dirigido a Padres y/o Tutores

Título del Protocolo: Transmisión horizontal de genotipos de *Streptococcus mutans* entre párvulos chilenos de 3 a 4 años de edad, con diferentes experiencias de caries, pertenecientes al mismo grupo curso

Investigador Principal: Marta Kelly Gajardo Ramírez

Sede de Estudio: Facultad de Odontología, Universidad de Chile – Sergio Livingstone 943 – Independencia, Santiago.

Nombre del Participante:

.....

Este documento de Consentimiento Informado se aplicará a padres y/o tutores del Jardín Infantil Anti Liwen de La Pintana, 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.

Mi nombre es Marta Kelly Gajardo Ramírez y soy académico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación de la cual le proporcionaré información y a la que lo invitaré a participar. No tiene que decidir hoy si lo hará o no. 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 aclarar sus dudas al respecto. Una vez aclarada todas sus consultas y después que haya comprendido los objetivos de la Investigación y si desea participar, se le solicitará que firme este formulario.

Los aspectos de este formulario tratan los siguientes temas: Justificación de la Investigación, Objetivo, Beneficios, Tipo de Intervención y procedimiento, Riesgos,

Confidencialidad y Difusión de datos, Criterios para selección de los participantes en el estudio y Aclaraciones.

Justificación de la Investigación

En nuestro país, las enfermedades de la boca y los dientes, principalmente caries dental, son muy frecuentes, afectando prácticamente a toda la sociedad. El acceso a atención dental para comunidades de escasos recursos es limitado, ya sea por cuestiones económicas o de oportunidad de atención, y su enfoque es rehabilitar el daño actual, dejando de lado la prevención y la educación de conductas saludables, tanto de higiene como de alimentación. Por esto, los niños corresponden a un grupo que necesita medidas especiales que permitan mejorar su salud, no solamente en relación a su boca y dientes, sino que de su salud general. El daño que se produce en la niñez por caries influye de gran manera en su desarrollo y en su riesgo a futuro de presentar enfermedades en la boca. Estos riesgos se pueden controlar a través de medidas que generen en los niños hábitos de vida saludables que les permitan desarrollarse de manera óptima como personas sanas en sus comunidades.

Objetivo

La presente investigación tiene por objetivo establecer que preescolares chilenos de un mismo grupo curso, en su cavidad bucal comparten mismos genotipos de bacterias que se relacionan con la presencia de caries dental y con un mayor riesgo de daño en los dientes.

Beneficios

Si usted decide que su pupilo participe del proyecto este se beneficiará de manera directa Durante el desarrollo del mismo a través de actividades educativas y preventivas, las cuales consistirán en talleres de educación en salud oral, alimentación saludable e instrucción de higiene oral enfocados a toda la comunidad del jardín infantil. Además, se entregará cepillos de dientes y pastas dentales, junto con los informes de los resultados de los exámenes de salud bucal de los niños a sus apoderados. El beneficio para la comunidad que Ud. estaría aportando, es contribuir a determinar si la muestra obtenida presenta microorganismos dañinos para las estructuras bucales, información que permitirá contribuir a elaborar terapias preventivas para las enfermedades descritas anteriormente

Tipo de Intervención y Procedimiento

Si usted decide que su hijo(a) participe se le realizará un examen de salud bucal y la toma de una muestra, que se realizará obteniendo saliva de la cavidad bucal de su hijo (a) mediante un gotario.

Riesgos

Su hijo(a) no correrá ningún riesgo durante y posterior al procedimiento de la investigación debido a que los métodos utilizados son no invasivos, la toma de muestra de saliva no produce daño ni dolor, y tarda entre 3 y 7 minutos. Si Ud. quisiera estar presente en el momento en que este procedimiento se realiza lo puede solicitar. Además, si el niño/a rechaza el procedimiento no se insistirá y podrá desistir de participar en el momento que lo desee. En caso de presentarse algún problema durante el procedimiento, su pupilo será

tratado de inmediato de acuerdo a los requerimientos del caso y/o derivado al servicio asistencial más cercano.

Criterios para selección de los participantes en el estudio

Los criterios de inclusión serán: ser niños y niñas entre 3 a 5 años de edad

Los criterios de exclusión serán: quiénes presenten enfermedades crónicas, que hayan recibido tratamiento con antibióticos durante los 3 meses previos al examen, o que usen aparatos ortodóncicos.

Confidencialidad y difusión de datos.

La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de participantes, será mantenida con estricta confidencialidad por el investigador. El nombre y datos personales de su pupilo serán codificados para el uso en este estudio y no serán identificados públicamente. Los resultados emanados de este estudio podrán ser publicados en revistas científicas.

Aclaraciones

- La participación es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la intervención.
- Si usted decide puede retirarse cuando lo desee.
- 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.

Carta 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.
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) en cada momento y al requerimiento de la evolución de mi proceso, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria y al criterio del investigador.
6. En caso de cualquier duda puede acudir a Marta Kelly Gajardo Ramírez, a la dirección Sergio Livingstone #943, Independencia, de lunes a viernes de 9:00 a 12:00 horas o vía telefónica al 29781764 o dirigirse a la Dra. María Angélica Torres, Presidente del Comité Ético Científico, Facultad de Odontología, Universidad de Chile al correo electrónico cec.fouch@odontologia.uchile.cl.

Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, a realizar el procedimiento pertinente,

PUESTO QUE SE QUE ES POR MI PROPIO INTERÉS.

Nombre del participante: _____

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, le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. 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:

Firma: _____

Fecha: _____

Nombre del Director del establecimiento donde realiza la investigación o de su representante

Firma:

Fecha: _____

9.2 Anexo 2. Certificado aprobación bioética.



Comité Institucional de Bioseguridad
Administración Conjunta Campus Norte
FDO N°35

Santiago, 16 de Enero de 2014.

C E R T I F I C A D O

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación presentado al Concurso FIOUCH 2013, titulado "Caracterización Genotípica y Fenotípica de *Streptococcus mutans* en un Grupo de Preescolares Chilenos de 0 a 5 Años de Edad y su Relación con la Experiencia de Caries de los Niños". El Investigador Responsable de este proyecto es el Dr. Andrés Celis Sersen, Académico del Departamento de Patología y Medicina Oral.

Los procedimientos experimentales, que involucran el uso y manejo de material biológico y Microorganismos Patógenos se realizarán en el laboratorio de Microbiología Bucal en la Facultad de Odontología cuyo responsable es la Prof. T.M. Leyla Gómez Carranza.

El CIB certifica que el laboratorio y la Facultad mencionada anteriormente, cuenta con las facilidades tanto para el manejo y desecho del material biológico y microorganismos patógenos a utilizar en el proyecto de acuerdo al Manual de Bioseguridad, Conicyt 2008. Además, el investigador se compromete a velar por el cumplimiento de las normas de bioseguridad, durante el desarrollo del proyecto.

Se extiende el presente certificado a solicitud del Dr. Celis para ser presentado a la Dirección de Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Dr. Mario Chiong
Secretario

Dra. Carla Lozano M.
Presidenta