



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

**RECuento DE 5 ESPECIES BACTERIANAS EN MUESTRAS DE
PLACA SUPRAGINGIVAL Y DE SALIVA EN ESCOLARES DE 8 AÑOS DE
EDAD, DEL SECTOR NORTE DE LA RM DE SANTIAGO, CON Y SIN
EXPERIENCIA DE CARIES.**

Daniel Adolfo Velozo Henríquez

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Patricia Palma Fluxá

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dr. Gino Corsini Acuña

Prof. Ismael Yévenes López

**Adscrito a Proyecto de investigación en salud Fonis SAE 13 120 205
Santiago Chile
2016**



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

**RECuento DE 5 ESPECIES BACTERIANAS EN MUESTRAS DE
PLACA SUPRAGINGIVAL Y DE SALIVA EN ESCOLARES DE 8 AÑOS DE
EDAD, DEL SECTOR NORTE DE LA RM DE SANTIAGO, CON Y SIN
EXPERIENCIA DE CARIES.**

Daniel Adolfo Velozo Henríquez

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

TUTOR PRINCIPAL

Prof. Dra. Patricia Palma Fluxá

TUTORES ASOCIADOS

Prof. Dr. Gino Corsini Acuña

Prof. Ismael Yévenes López

**Adscrito a Proyecto de investigación en salud Fonis SAE 13 120 205
Santiago Chile
2016**

DEDICATORIA

A mi madre María Josefina Henríquez Henríquez...

AGRADECIMIENTOS

A Dios por sobretodo que me permitió llegar hasta estas instancias, al fin!

A todo el equipo Fonis de la Universidad Diego Portales por su ayuda y dedicación.

A Valentina Morales y Carlos Navarrete, mis compañeros de tesis que desinteresadamente me ayudaron y guiaron en todo el manejo del laboratorio.

A mis profesores tutores, en especial a la profe Patricia Palma por su dedicación a pesar de su agitada agenda, al profe Gino Corsini e Ismael Yévenes por sus consejos prácticos.

A toda mi familia, en especial a mi novia Camila Pérez por acompañarme todos estos años de universidad con paciencia y amor.

A mi abuelita Guillermina que me cuidó desde pequeño.

A mi madre Josefina Henríquez y Marcelo Sura quienes siempre me dieron lo mejor.

Infinitas gracias!

INDICE

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
MARCO TEORICO.....	2-9
HIPOTESIS.....	10
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	10
MATERIALES Y METODOS.....	11-19
RESULTADOS.....	20-32
DISCUSION.....	33-40
CONCLUSIONES.....	41
BIBLIOGRAFIA.....	42-47
ANEXOS.....	48-60

RESUMEN

La generación de álcali en saliva y biopelícula es producto de la actividad enzimática de bacterias mediante dos vías produciendo como resultado final amonio. La alcalogenicidad de ciertas bacterias podría estar asociada positivamente con un menor índice de caries, por lo que determinar el recuento de estas bacterias y relacionarlo con COPD/ceod, podría ayudar a dilucidar la relación entre presencia o ausencia de caries y la capacidad alcalogénica de 4 especies bacterianas.

23 niños escolares de 8 años de edad de la zona norte de la región Metropolitana fueron evaluados por examinadores calibrados y categorizados según su índice CEOP/ceod en dos grupos: Con Experiencia de Caries y otro grupo Sin Experiencia de Caries, y se determinó el recuento de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii* y *Actinomyces naeslundii*, mediante qPCR.

Los resultados obtenidos en el recuento de cada bacteria expresado en copias de DNA/mL, fueron analizados con la estadística no paramétrica Test de Mann-Whitney para muestras independientes. Al comparar el recuento de cada especie entre los grupos antes señalados, tanto en placa supragingival como en saliva, no se obtuvo diferencias significativas ($p > 0.005$).

Estos resultados dan cuenta de la complejidad de la biopelícula y del proceso de desarrollo y progresión de la caries dental.

Palabras clave: *S. mutans*, caries, álcali, placa supragingival, saliva.

INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad multifactorial que afecta a una gran parte de la población, es microbiológicamente inducida y uno de los principales agentes biológicos involucrados es *Streptococcus mutans*. Sin embargo, el equilibrio existente entre las diversas especies bacterianas que conforman la biopelícula, puede determinar la mantención de la salud o un desequilibrio hacia la enfermedad, teniendo como consecuencia lesiones de caries. Para la mantención de este equilibrio dinámico donde interactúan más de 700 especies microbianas, debe existir una adecuada proporción de especies que produzcan álcali, ya que se ha sugerido que este es el más efectivo mecanismo de acción capaz de contrarrestar la acción de los ácidos producidos por bacterias acidogénicas como *S. mutans*, especie que cumple un importante rol en la etiología de la caries dental debido a su alta capacidad acidogénica y acidúrica. La producción de álcali se logra por medio de dos vías: el sistema arginina deiminasa y ureasa. Dentro de la gran diversidad de especies que conforman la biopelícula oral, se destacan 4 productores de álcali: *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii* y *Actinomyces naeslundii*. Este trabajo forma parte del proyecto de investigación en salud Fonis, en el que participaron 80 niños de 8 años, y de los cuales 23 niños fueron seleccionados para completar este proyecto.

MARCO TEÓRICO

La caries dental es una enfermedad multifactorial (Linossier y cols., 2011) con alta prevalencia y severidad en la población mundial. Afecta a más de la mitad de la población en países industrializados y el número de individuos afectados aumenta con la edad (Griffin y cols., 2005). En Chile, la prevalencia de caries, aumenta sostenidamente con la edad, llegando casi al

100% en la población adulta (Fig. 1.B). Lo mismo sucede con la severidad, medida a través del número de dientes afectados por caries, tanto en dentición temporal (ceod) (Fig.1.C), como en dentición definitiva (COPD) (Fig. 1.A) (Ceballos y cols., 2007; Soto y cols., 2007; Soto y cols., 2009).

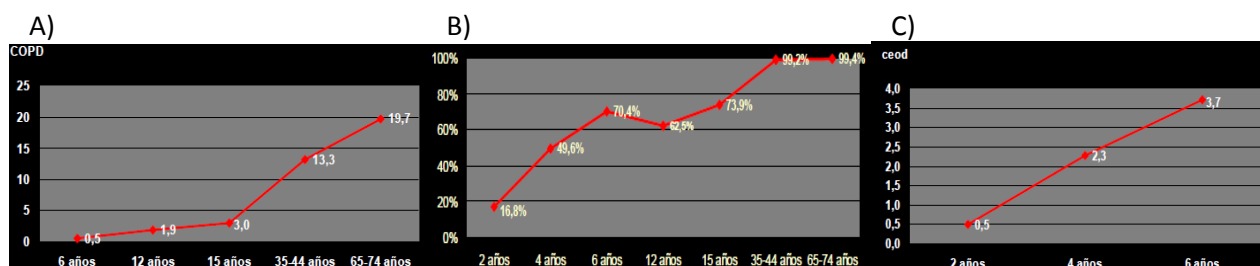


FIGURA 1: A) Índice COPD en mayores de 6 años. B) Prevalencia de caries en Chile. C) Prevalencia de caries en base al índice ceod desde los 2 hasta los 6 años. Tomado de ANÁLISIS DE SITUACIÓN SALUD BUCAL, MInsal 2009.

La caries es un proceso dinámico de desmineralización y remineralización, producto del metabolismo bacteriano sobre la superficie dentaria, que con el tiempo produce pérdida neta de minerales, y posiblemente, pero no siempre, resulte en la presencia de una cavidad (Ojeda- Garcés y cols., 2013).

La biopelícula oral está definida como una comunidad bacteriana fuertemente adherida a la superficie dentaria, organizada, jerarquizada en sus funciones, adaptable al medio, de cooperación entre microorganismos, activa, localizada según su ubicación en supragingival o subgingival. La placa supragingival posee una microbiota predominantemente Gram positivo, comúnmente asociada a microorganismos cariogénicos, vale decir acidogénicos y acidófilicos. Por otra parte, la placa subgingival está compuesta por

anaerobios Gram negativo y está formada preferentemente por periodonto patógenos (Astorga y cols., 2015).

Las biopelículas dentales están organizadas por comunidades bacterianas cuya composición abarca más de 1000 especies, siendo la segunda biopelícula más compleja del cuerpo humano después del colon (Dewhirst y cols., 2010). Además, en ella se encuentran una balanceada proporción de microorganismos residentes (Fujiwara y cols., 1991), de los cuales solo el 1% resulta ser patogénicos (Ojeda- Garcés y cols., 2013). Las biopelículas están constantemente desafiadas por cambios en las condiciones del ambiente, como la ingesta de alimentos, temperatura, cambios en el pH y el flujo salival (Kolenbrander y cols., 2006). En un estado de salud, la comunidad bacteriana restringe a bacterias potencialmente dañinas protegiendo al hospedero (Kreth y cols., 2008). Así también se ha demostrado que en niños con bajo riesgo de caries y en ausencia de enfermedad, el número relativo de las especies de estreptococos se mantiene constante por un periodo de 3 a 24 meses, por lo que en salud, el balance microbiológico es mantenido (Kim Seow y cols., 2009), sin embargo cambios en el ambiente como prolongados periodos de acidificación, permite la emergencia de microbiota acidúrica y desmineralización del esmalte dental (Lemos y cols., 2005).

La formación de la biopelícula oral comprende varias etapas que van desde la formación de la película salival adquirida, la adhesión bacteriana a las proteínas de la película adquirida, coagregación bacteriana, formación de microcolonias intercaladas y finalmente, su estructuración y maduración (Francia y cols., 2007). La biopelícula oral comprende microorganismos comensales beneficiosos para el hospedero, debido a la exclusión de microorganismos patogénicos que pueden inducir enfermedad (Marsh PD.2006; Kuramitsu y cols., 2007). La patogénesis de la caries dental es

caracterizada por cambios metabólicos y de composición de la biopelícula (Burne y cols., 1994; Burne y cols., 2000), donde no sólo participan microorganismos, sino que también factores abióticos (Linossier y cols., 2011).

Existen muchos microorganismos asociados a la presencia de caries dental, dentro de ellos se destaca *S. mutans*, con un rol importante en la etiología (Low y cols., 1999; Parisotto y cols., 2010). Un ambiente cariogénico crea condiciones para ciertos patógenos, con el fin de competir por la superficie del diente, facilitando la aparición de lesiones de caries (Marsh, 2010). Los cambios en el medio dentro de la misma biopelícula favorecen la proliferación de especies acidúricas y acidogénicas, principalmente, la acidificación del medio es determinante en los cambios fenotípicos y genotípicos que se producen en la microbiota durante la caries (Ojeda- Garcés y cols., 2013; Astorga y cols., 2015). Diversos estudios sugieren que la abundancia de microbiota cariogénica está en concordancia con la poca población de especies asociadas a salud oral, existiendo diferencias significativas (Corby y cols., 2005).

Los miembros de la biopelícula oral han evolucionado para hacer frente a los cambios y competir con otras bacterias orales por su nicho ecológico (Nobbs y cols., 2007); por ejemplo, cerca de un 20% de las bacterias orales corresponde a estreptococos quienes son pioneros en la formación de placa dental y tienen una distribución espacial y temporal que es crucial para el desarrollo de la biopelícula oral (Marsh, 2006). Así como también estreptococos orales corresponden al 80% de los colonizadores primarios del desarrollo inicial de la biopelícula (Rosan, 2000).

Diversos estudios han registrado que el recuento de *S. mutans* es significativamente mayor en niños con caries temprana de la infancia, comparado con niños libres de caries, esto debido a que el dominio de *S. mutans* depende de la competencia, entre otros, con *S. sanguinis* y es influenciado por la producción de compuestos antimicrobianos, como bacteriocinas (Kreth y cols., 2008). *S. mutans* puede llegar a ser dominante a través de la producción de ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético, y ácido fórmico cuando metaboliza carbohidratos fermentables como sacarosa, fructosa y glucosa. Estos ácidos circulan desde la placa hacia el esmalte poroso, disociándose y disolviendo el mineral del esmalte, generando calcio y fosfato, los cuales difunden hacia fuera del esmalte (Ojeda- Garcés y cols., 2013).

Existe dependencia de la colonización bacteriana con la edad. La concentración bacteriana aumenta desde los 5 años hasta los 12 años, manteniéndose hasta los 19 años y de ahí comienza a declinar paulatinamente para caer bruscamente pasado los 30 años. El recuento de *S. mutans*, aumenta desde los 5 años ($4,7 \times 10^5$ UFC/mL de saliva), hasta los 12 años ($6,0 \times 10^5$ UFC/mL de saliva), y se correlaciona con el daño dentario por caries que se incrementa entre los 6 y 8 años (Linossier, 2004).

S. sanguinis es reconocido por tener un rol antagonista en la caries dental y en la enfermedad periodontal, ya que compete con el grupo streptococci por la colonización de los sitios en la superficie de los dientes (Caufield y cols., 2000), ya que ambos grupos requieren la presencia de dientes para la colonización, sin embargo *S. sanguinis* precede la colonización de *S. mutans* (Carlsson y cols., 1970). Cuando se presentan en un gran número, *S. gordonii* y *S. sanguinis* pueden antagonizar con *S. mutans* (Becker y cols., 2002). Caufield y cols., han demostrado que *S. sanguinis* se adquiere

aproximadamente a los 9 meses de edad y su aparición está correlacionada con la erupción de los primeros dientes y que la colonización temprana de *S. sanguinis* produce una declinación en la colonización de *S. mutans* (Caufield y cols., 2000). Aunque la producción de ácido por la placa dental es la causa directa de caries, es notable que el incremento en la proporción de especies acidúricas, da lugar a un descenso de especies que son menos acidúricas y generalmente asociadas a salud dental, tales como *S. sanguinis* y *S. gordonii* (Bowden y cols., 1984; Becker y cols., 2002; Aas y cols., 2008).

La caries es una enfermedad que no ocurre sin la producción de un pH bajo en la biopelícula oral, de ahí entonces se puede predecir que la producción de álcali ayuda a promover un pH más neutral teniendo un fuerte efecto inhibitorio en el desarrollo de lesiones de caries (Burne y cols., 2012).

Las principales fuentes para la mantención de la biopelícula oral en homeostasis son: la urea; presente en todas las secreciones de las glándulas salivales y en el fluido gingival crevicular, con valores similares a los del suero, y la arginina; que está presente en bajas cantidades en las secreciones salivales, pero abundantemente en moléculas peptídicas. Las enzimas ureasas son producidas por un pequeño número de bacterias orales, tales como *S. salivarius* y bacterias del género *Actinomyces*, como *A. naeslundii*, catalizando la molécula de urea en dos moléculas de amonio y una de CO₂. La vía Sistema Arginina Deiminasa (ADS), es un sistema enzimático que escinde la arginina originando 3 productos principales, los cuales son ornitina, CO₂ y amoníaco (NH₃), con la generación concomitante de ATP (Nascimento M y cols., 2009). De esta forma este sistema enzimático es beneficioso para el pH de la biopelícula, disminuyendo el sobrecrecimiento de especies cariogénicas y reduce el daño al esmalte. Asimismo es provechoso para la misma bacteria debido a que el amonio que genera neutraliza su citoplasma,

protegiéndolo del ataque ácido y el ATP producido puede ser utilizado para su crecimiento u homeostasis (Burne y cols., 2012).

La producción de amonio por bacterias orales puede influenciar positivamente el balance entre remineralización y desmineralización de los dientes y puede ayudar a prevenir la emergencia de microbiota cariogénica (Sissons y cols., 1988; Kleinberg, 2002), por lo tanto la capacidad de la biopelícula oral de generar álcali parece ser el mayor factor inhibidor de caries (Burne, 2000).

Diversos estudios han demostrado una fuerte correlación entre elevados niveles de arginina libre en saliva y resistencia a la caries (Van Wuyckhuysse y cols., 1995), y se ha visto también que un incremento en el riesgo de caries está asociado con una reducida capacidad de producir álcali por parte de la población microbiana que coloniza la cavidad oral (Nascimento y cols., 2009).

La generación de álcali a partir de los sustratos salivales como urea y arginina, pueden jugar un importante rol en el pH de la biopelícula, la homeostasis y en la inhibición de las caries dentales (Reyes y cols., 2012). Existe una asociación positiva entre la generación de álcali, expresada en altos niveles de ureasa y la actividad del sistema arginina deiminasa, y la resistencia a la caries, en pacientes libres de caries comparado con pacientes con caries activa. El grupo de Gordan observó una relación positiva entre *S. salivarius* con su actividad ureasa y una relación negativa entre los recuentos de *S. mutans* y arginina deiminasa (Gordan y cols., 2010), por lo que puede ser un importante factor inhibitorio endógeno contra la microbiota acidogénica y su consecuente desarrollo de caries, neutralizando los ácidos.

Con todos los antecedentes propuestos, este trabajo de investigación busca determinar el recuento de 5 especies bacterianas en niños libres de caries y

en niños con lesiones de caries cavitadas, de las cuales 4 especies bacterianas son productoras de álcali, correlacionando los niveles de estas bacterias en función a que el potencial alcalogénico puede ser una estrategia para el control y prevención de la caries dental.

HIPÓTESIS.

El recuento de *S.salivarius*, *S. sanguinis*, *S. gordonii* y *A. naeslundii* es mayor en el grupo de niños sin experiencia de caries al compararlo con el grupo con experiencia de caries. El recuento de *S. mutans* es mayor en el grupo con experiencia de caries al compararlo con el grupo sin experiencia de caries.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el recuento de 5 especies bacterianas en muestras de placa supragingival y de saliva en escolares de 8 años de edad, del sector norte de la RM Santiago, con y sin experiencia de caries.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer la experiencia y severidad de caries, por medio de índice COPD/ceod en un grupo de niños(as) de 8 años de la zona norte de la Región Metropolitana.
2. Determinar niveles de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus gordonii*, y *Actinomyces naeslundii* provenientes de muestras de placa supragingival y saliva de niños de 8 años de edad mediante PCR en tiempo real (qPCR).
3. Comparar los recuentos bacterianos obtenidos de las muestras con los parámetros clínicos de caries dental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio: Estudio descriptivo transversal a realizarse en niños de 8 años que asisten a colegios de la zona norte de la región Metropolitana.

a) Grupo de estudio

Para este estudio se determinó al azar, una muestra de 23 niños, de 8 años de edad, de ambos sexos, pertenecientes a escuelas municipales del área norte de la RM, que cumplieran con los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

- I. **Criterios de inclusión:** Tener 8 años de edad, sistémicamente sano, no tener contraindicaciones para participar de un examen dental.

- II. **Criterios de exclusión:** Pacientes con flujo salival reducido, con enfermedades sistémicas, que hayan estado en terapia antibiótica y/o con colutorios orales antisépticos durante las últimas 4 semanas.

Los padres de los niños que cumplieran con los criterios de inclusión, aceptaron que sus hijos participaran en el estudio dejando constancia de ello a través de la firma del Formulario de Consentimiento Informado (Anexo 3). Tanto el examen dentario como la toma de muestras biológicas fueron exámenes no invasivos para los niños.

El Protocolo de esta investigación está aprobado por el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile (Anexo 2)

b) Procedimiento

Evaluación clínica: Índice COPD/ceod fue evaluado por un examinador

calibrado y de acuerdo a las normas emitidas por la OMS. Terminada la evaluación se entregó un informe de estado de salud (Anexo 5) y a los pacientes con caries activa se les indicó su tratamiento de acuerdo a las pautas emitidas por la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

c) Obtención de muestras

Los niños examinados debían abstenerse de cualquier procedimiento de higiene oral en las últimas 12 horas (Gordan y cols., 2010).

- I. **Obtención de saliva**: Se recolectó 3 ml. de saliva no estimulada, en las primeras horas de la mañana sin cepillado previo, que se depositó en un tubo de plástico estéril (Falcon), el cual se mantuvo a 4°C hasta su traslado al laboratorio de Química de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, donde se transfirió a tubos de microcentrífuga de 1,5 mL para su posterior análisis microbiológico en el laboratorio de Microbiología, perteneciente al Departamento de Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

- II. **Obtención de placa dental**: La placa supragingival se recogió de todas las superficies dentarias lisas de dientes anteriores y posteriores, con curetas periodontales estériles (GR 4 and 5, Gracey finishing curettes, Ransom and Randolph, Toledo, OH, USA). Este raspado se transfirió a tubos de microcentrífuga de 1,5 ml. estériles que contenían 500 µL de solución de K_2HPO_4 10 mM (pH 7), el cual se mantuvo a 4°C hasta su traslado a los laboratorios nombrados anteriormente.

Las muestras de saliva y placa bacteriana previamente rotuladas, se almacenaron a -80°C para su posterior procesamiento.

d) Materiales

- **Agar TYCS:** Sulfito de sodio 0,1 g/L, L-cistina 0,2 g/L, Cloruro de sodio 1.0 g/L, Fosfato disódico 2 g/L, extracto de levadura 5 g/L, Casitona 15 g/L, Acetato de sodio 20 g/L, Sacarosa 50 g/L, Agar 15 g/L.
- **Caldo Tryptic Soy Broth (TSB):** Bacto Triptona (digerido pancreático de caseína) 17,0 g/L, Bacto Soytone (digerido péptico de harina de soja) 3,0 g/L, Glucosa (dextrosa) 2,5 g/L, Cloruro sódico 5,0 g/L, Fosfato dipotásico 2,5 g/L.
- **Kit de extracción DNA MasterPure™ DNA purification, Epicentre®**
- **Caldo Brain Heart Infusion (BHI):** Infusión cerebro 12,5 g/L, infusión de corazón de res 5,0 g/L, Proteosa peptona 10 g/L, Glucosa 2 g/L, Cloruro de sodio 5 g/L, fosfato disódico 2,5 g/L

e) Cepas bacterianas

Streptococcus mutans (UA159): especie de bacteria Gram positivo, anaerobia facultativa, cocácea, crece en pares o en cadena. Es un patógeno primario en la caries dental y colonizador secundario de la biopelícula.

Streptococcus sanguinis (ATCC 10556): especie de bacteria Gram positivo, anaerobia facultativa cocácea no móvil, crece en pares o en cadena. Colonizador primario de la biopelícula dental.

Streptococcus gordonii (ATCC 10558): bacteria Gram positivo, anaerobia facultativa, cocácea, no móvil, crece en pares o en cadena. Colonizador primario de la biopelícula.

El cultivo de estas tres especies bacterianas se realizó bajo el mismo protocolo; se sembraron desde un criopreservado a -80°C en medio TYCSB y cultivadas en condiciones de capnofilia y a una temperatura de 37°C por 48 horas, en la estufa de Incubación (Incubator BiosLabChile®).

Actinomyces naeslundii (ATCC 12104): bacteria Gram positivo, anaerobia facultativa, baciliforme. Colonizador primario de la biopelícula. Su cultivo se realizó a partir de un criopreservado sembrado en agar BHI e incubado a 37°C durante 72 h.

Streptococcus salivarius (ATCC 13419): bacteria Gram positivo, aerobio. Colonizador primario de la biopelícula. Su cultivo se realizó a partir de un criopreservado a -80°C sembrado en agar TYCSB e incubado a 37°C durante 24 h.

f) Partidores

Se utilizaron los siguientes partidores:

TABLA 1: Detalle de los partidores utilizados

Bacteria	Nombre partidor	Secuencia partidor	Tamaño amplicón
<i>S. mutans</i>	<i>Smut 3368-F</i>	5'-GCC TAC AGCTCAGAGATGCTATTCT-3'	114 pb
	<i>Smut 3481-R</i>	5' GCCATACACCACTCATGAATTGA-3'	
<i>S. sanguinis</i>	<i>SagP-F</i>	5' GATGCTATAACGGTGGTGGTG3'	200 pb
	<i>SagP-R</i>	5' AGACATACAGCGTGGTCCAC3'	
<i>S. gordonii</i>	<i>Gordonii-F</i>	5' GGTGTTGTTTGACCCGTTTCAG 3'	96 pb
	<i>Gordonii-R</i>	5'AGTCCATCCCACGAGCACAG3'	
<i>A. naeslundii</i>	Ure-A F	5'ACGAAGACGCAAGGACAGACC3'	297 pb
	Ure-A R	5' GTAGGCCATGAGATCCGTGACC- 3'	
<i>S. salivarius</i>	grSs- F	5' ACGTTGACTTACGCTAGCG 3'	200 pb
	grSs-R	5' TGCTACGATA CCGTAACGTG 3'	

g) Extracción de DNA genómico de *S. mutans* UA159, *S. sanguinis* ATCC 10556, *S. gordonii* ATCC 10558, *A. naeslundii* ATCC 12104, *S. salivarius* ATCC 13419.

Se agregó 1,5 mL de caldo TSB con bacteria (*S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *A. naeslundii*, o *S. salivarius*), en tubo de microcentrifuga de 1,5 mL. Se sometió a centrifugación a 13.000 rpm durante 10 min (Centrifuga eppendorf 5415-D (Arquimed®)). Se eliminó el sobrenadante y se agregó 1,5 mL de caldo nuevamente al tubo. Se repitió el paso de centrifugación. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 300 µL de solución T y C (sistema comercial MasterPure DNA purification, Epicentre), luego se agregó 5 µL de Lisozima (20 mg/mL). Se incubó en estufa a 37° C durante 5 horas y 30 min. Se agregó 1 µL de proteinasa K (50 mg/mL) y se incubó a 37 °C durante 1 hora, agitando en vórtex cada 5 min (vórtex VM-300 Arquimed®).

Luego se agregó 2 µL RNasa (5 mg/mL) y se incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente, se agregó 150 µL de la solución MPC (sistema convencional Epicentre MasterPure DNA purificatin Epicentre), y se agitó en vórtex por 10 segundos. La mezcla se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min. Se transfirió 500 µL del sobrenadante a un tubo nuevo, al cual se le agregó 300 µL de isopropanol (se invirtió el tubo 30-40 veces y se incubó a -20°C por 1 hora: Luego, se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 min. 4°C (Centrifuga eppendorf 4°C 5804-R Arquimed®) y se eliminó el isopropanol. El precipitado obtenido se lavó con 150 µL de etanol al 75% se volvió a centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min, y se eliminó el etanol. El sedimento obtenido se secó a una temperatura de 40°C (Termoblock Thermolyne Type17600 Dri-Bath Arquimed®) y se rehidrató posteriormente en 35 µL de

agua miliQ estéril. El DNA obtenido se almacenó a -20°C para su posterior uso.

h) Extracción de DNA genómico de saliva y placa dental

Las muestras de saliva y placa dental se descongelaron a temperatura ambiente utilizando el protocolo para extracción del sistema comercial MasterPure™ DNA purification, Epicentre®, y es similar al descrito en el punto g), agregando algunas modificaciones. Se resuspendieron las muestras mediante vórtex por 30 segundos. Se depositaron 150 μL de saliva o placa dental en tubos de microcentrífuga, y se les agregó 150 μL de solución 2x T y C. Luego se agregó 5 μL de Lisozima (20 mg/mL), y se incubó por 1 hora a 37°C . Posteriormente se agregó 1 μL de proteinasa K (50 mg/mL), se incubó a 37°C durante una hora agitando cada 5 minutos. Luego se agregó 2 μL RNAsa (5 mg/mL) y se incubó en hielo 5 minutos. Inmediatamente después se agregó 150 μL de MPC y se agitó en vórtex por 10 segundos. Luego se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos a 37°C y se transfirieron 400 μL del sobrenadante a un tubo de microcentrífuga nuevo. Se agregaron 400 μL de isopropanol. Se mantuvo en hielo durante 1 hora y se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos, a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, se agregó 50 μL de etanol 75% y centrifugó la muestra durante 5 min. Se retiró el etanol, se secó el sedimento a 40°C y se resuspendió en 40 μL de agua miliQ. El DNA obtenido se almacenó a -20°C para su posterior uso.

i) Separación de DNA mediante electroforesis

El análisis de integridad de las muestras de DNA se realizó mediante una separación electroforética en gel de agarosa al 1%, empleando amortiguador

TAE 0,5X. Las condiciones de la corrida fueron de 70 volts por 50 min. y 500 mA y luego un recorrido a 20 Volts por 20 min (PS300-B Hoefer®). Una vez cumplido el tiempo se colocó en bromuro de etidio (EtBr), a una concentración de 0.5 ug/mL por 10 min. y se visualizó en el transiluminador a una longitud de onda de 254 nm. (Transiluminador UV FOTO/UV 21 Fotodyne®).

j) Cuantificación total de ADN bacteriano

Para determinar la concentración del ADN total de las muestras de placa y saliva obtenido mediante la técnica de extracción, se realizó una cuantificación mediante fluorimetría con el sistema Qubit® 2.0 FLourometer, utilizando 199 µL de Qubit® dsDNA HS Buffer, 1µL de Qubit® dsDNA HS reagent y 1 µL de muestra del DNA siguiendo las especificaciones del fabricante. Los valores obtenidos de DNA total se llevaron a una concentración final de 20 ng/µL para la elaboración de la curva estándar para cada bacteria.

k) Cuantificación mediante qPCR

Para cuantificar el DNA en tiempo real se utilizó el equipo qPCR (ECO Real Time Illumina®) y se realizó la curva estándar de cada bacteria. Para ello se preparó una dilución seriada factor 10, se tomó 1 µL de cada bacteria más 9 µL de agua miliQ, 5 veces. Se realizó un “master mix” para la qPCR (10 µL Mix 2X Sybr Green, 0,5 µL Partidor -F 25 pmol, 0,5 µL Partidor -R 25 pmol (partidores correspondientes a cada bacteria en específico y detallado en la Tabla 1), 4 µL agua miliQ estéril para cada pocillo de placa a utilizar. Para determinar la cuantificación de cada bacteria en las muestras, se procedió a utilizar los protocolos específicos para cada bacteria (Tabla 2).

TABLA 2: Protocolo de temperaturas para qPCR

<i>S. mutans</i>	95°(5min); 40 ciclos de 95°C (30 s), 58°C (30 s) y 72°C (1min), terminando con una extensión final de 72°C
<i>S. sanguinis</i>	95°(5min); 40 ciclos de 95°C (30 s), 66°C (30 s) y 72°C (1min), terminando con una extensión final de 72°C
<i>S. gordonii</i>	94°(5min); 50 ciclos de 94°C (30 s), 58°C (30 s) y 72°C (30 s), terminando con una extensión final de 72°C
<i>A. naeslundii</i>	94°(4min); 40 ciclos de 94°C (4 min), 61°C (1 min) y 72°C (1min), terminando con una extensión final de 95°C
<i>S. salivarius</i>	95°(5min); 50 ciclos de 95°C (30 s), 58°C (30 s) y 72°C (1min), terminando con una extensión final de 95°C

En cada pocillo del portamuestras se cargó 15 µL de “master mix” más 5 µL de DNA de las muestras, esta determinación se realizó por duplicado. Las muestras se dispusieron en orden en los pocillos de la placa de qPCR de forma vertical y decreciente en las concentraciones con sus respectivos duplicados en los primeros 10 pocillos, colocando un control negativo de agua miliQ estéril en los últimos dos. Posteriormente se cubrió la placa con sello óptico según instrucciones del fabricante. Con todo lo anterior en orden, se da inicio al proceso obteniendo como resultado la curva estándar de cada una de las bacterias control.

El DNA extraído de las muestras de placa y saliva se descongeló, una vez medida su concentración inicial mediante Qubit® 2.0 Fluorometer, se realizó qPCR con el “master mix” anteriormente descrito, los partidores específicos para cada bacteria y el agua miliQ estéril. Cuando la concentración de alguna muestra con el DNA extraído superaba los 20 ng/µL, se procedió a diluirlo de manera tal que quedase con esta concentración (20 ng/µL). Del mismo modo, aquellas muestras con concentraciones menores a 20 ng/µL, se concentró hasta alcanzar dicha concentración.

EL procesamiento de las muestras de placa supragingival y saliva se realizó de la misma forma que para obtener la curva estándar. En la placa de 48 pocillos se completó la placa con 24 muestras y sus duplicados respectivos.

En base al tamaño del genoma de cada bacteria, se calculó el n° bacterias de saliva y placa dental por mL, en base a la pendiente rectilínea de las diluciones y de las muestras de saliva y placa dental cuantificada en este estudio mediante la técnica qPCR.

I) Análisis estadístico

Los datos obtenidos se procesaron mediante planilla Excel 2013 y posteriormente se empleó en la estadística del tipo no paramétrica el Test de Mann-Whitney para muestras independientes.

RESULTADOS

A. Caracterización de la muestra

En este estudio se seleccionaron 23 niños de la zona norte de la región metropolitana, escolares, que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión, de los cuales 11 correspondieron a niños que no presentaban Experiencia de caries, es decir un COPD/ceod = 0, y 12 niños que presentaban Experiencia de caries, es decir COPD/ceod >0. Los niños con Experiencia de caries presentaban en promedio un COPD/ceod= 3,8 (DS: ± 1.3).

TABLA 3. Características demográficas de la población en estudio

	Con Experiencia de caries		Sin Experiencia de caries		Total	
Nº niños	12	52%	11	48%	23	100%
Nº hombres	8	66%	8	72%	16	70%
Nº mujeres	4	33%	3	28%	7	30%
Promedio COPD	0		0		-	
Promedio ceod	3.8		0		-	

B. Determinación de las cantidades de *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. gordonii*, y *A. naeslundii* de muestras de placa y saliva.

b.1 Cultivo

Una vez cultivada cada bacteria según lo descrito en Materiales y Métodos, se analizó su morfología, tamaño, consistencia y ausencia de contaminación, mediante observación directa, para comprobar la pureza del inóculo sembrado. La estructura macroscópica se observa en la Figura 2.

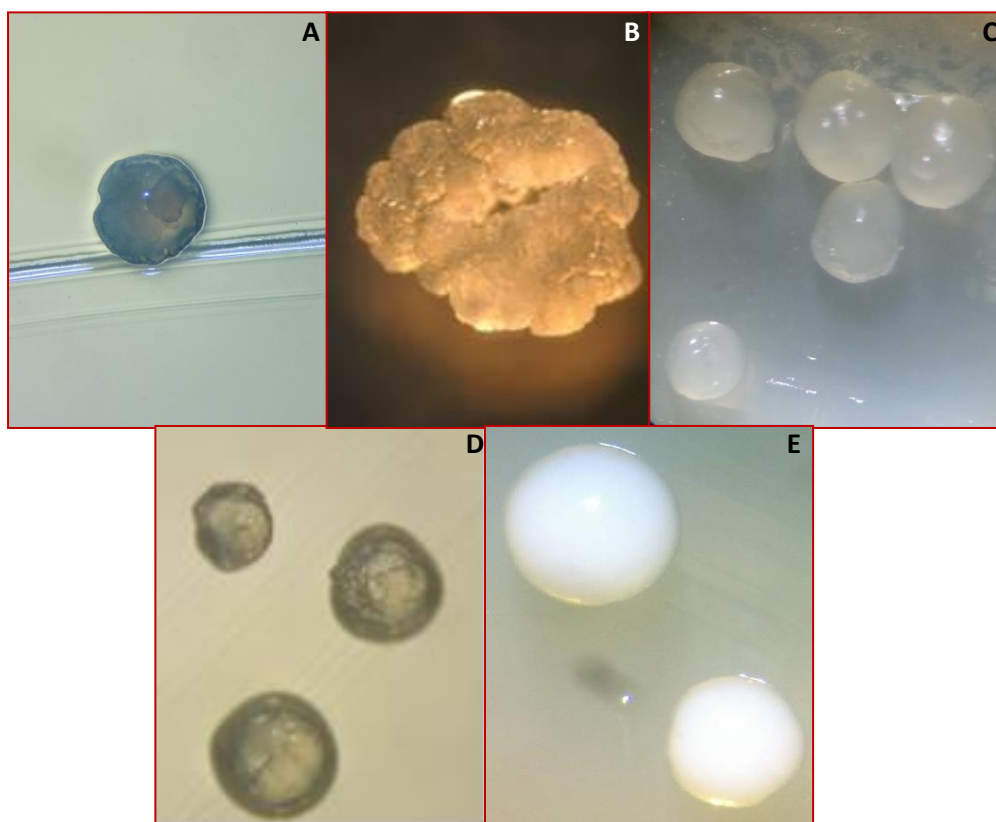


FIGURA 2. Estructura macroscópica de cultivo de bacterias: A) *S. sanguinis*, B) *S. mutans*, C) *S. gordonii*, D) *S. salivarius* y E) *A. naeslundii*.

b.2 Extracción y separación de DNA genómico de *S. mutans* cepa UA159, *S. sanguinis* cepa ATCC 10556, *S. gordonii* cepa ATCC 10558, *A. naeslundii* cepa ATCC 12104, *S. salivarius* cepa ATCC 13419 y de muestras de placa y saliva.

Siguiendo la metodología propuesta, se realizó la extracción del DNA de las muestras de saliva y placa supragingival, y se analizó su integridad mediante la separación electroforética en un gel de agarosa al 1%, como se ejemplifica en la Figura 3.

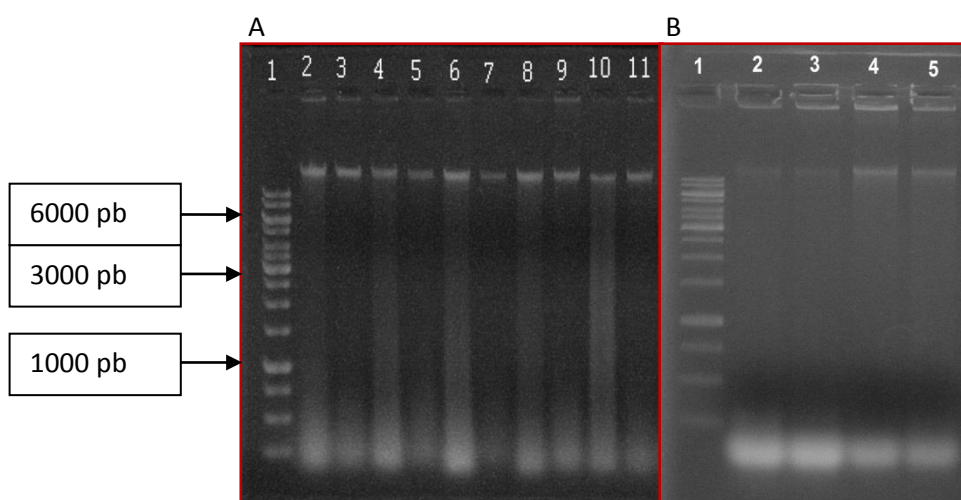


FIGURA 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de DNA genómico de muestras de saliva y placa dental. **A) Carril 1** Estándar de tamaño molecular 1 kb DNA ladder. **Carril 2** muestra A10 Saliva (S). **Carril 3** muestra A10 Placa Bacteriana (PB). **Carril 4** muestra C7 S. **Carril 5** muestra C7 PB. **Carril 6** muestra C1 S. **Carril 7** muestra C1 PB. **Carril 8** muestra B3 S. **Carril 9** muestra B3 PB. **Carril 10** muestra A8 S. **Carril 11** muestra A8 PB. **B) Carril 1** Estándar de tamaño molecular 1 kb DNA ladder, **Carril 2, 3, 4, 5** DNA genómico *Streptococcus salivarius*.

b.3 Cuantificación de *S. mutans* cepa UA159, *S. sanguinis* cepa ATCC 10556, *S. gordonii* cepa ATCC 10558, *A. naeslundii* cepa ATCC 12104, *S. salivarius* cepa ATCC 13419, mediante qPCR a partir de cultivos puros.

b.3.1 Obtención de curva estándar

Para cada bacteria analizada mediante qPCR se realizó una curva estándar, empleando partidores y programas descritos anteriormente, como se muestra en la Figura 4.

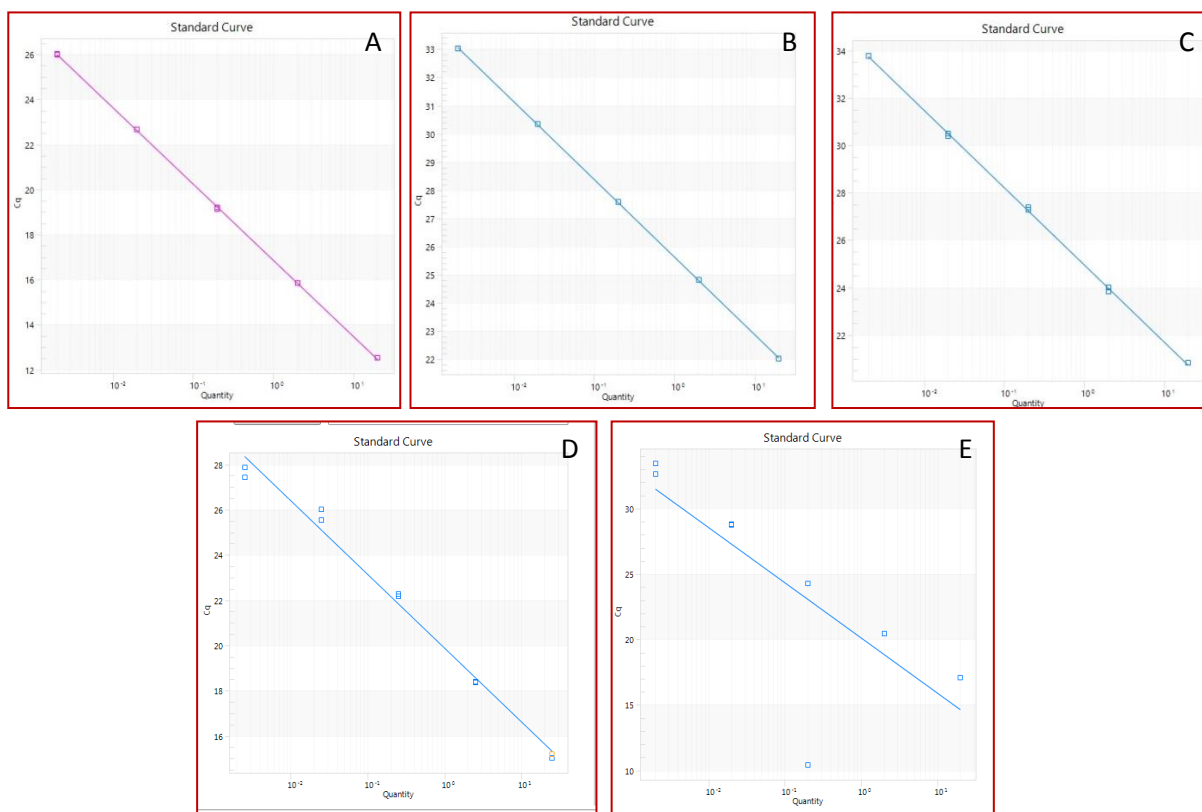


FIGURA 4. Curvas estándar de cultivos puros correspondientes a: A) *S. sanguinis*, B) *S. mutans*, C) *S. gordonii*, D) *S. salivarius* y E) *A. naeslundii*.

b.3.2 Obtención de curva de amplificación

En el gráfico de la curva de amplificación (Figura 5), se pueden observar las distintas etapas de la reacción en cadena de la polimerasa. Cuando el producto está amplificado, los amplicones abundan y los reactivos ya están en su mayoría utilizados, comenzando la etapa final, donde la fluorescencia toma un patrón de meseta, producto de la disminución en su emisión.

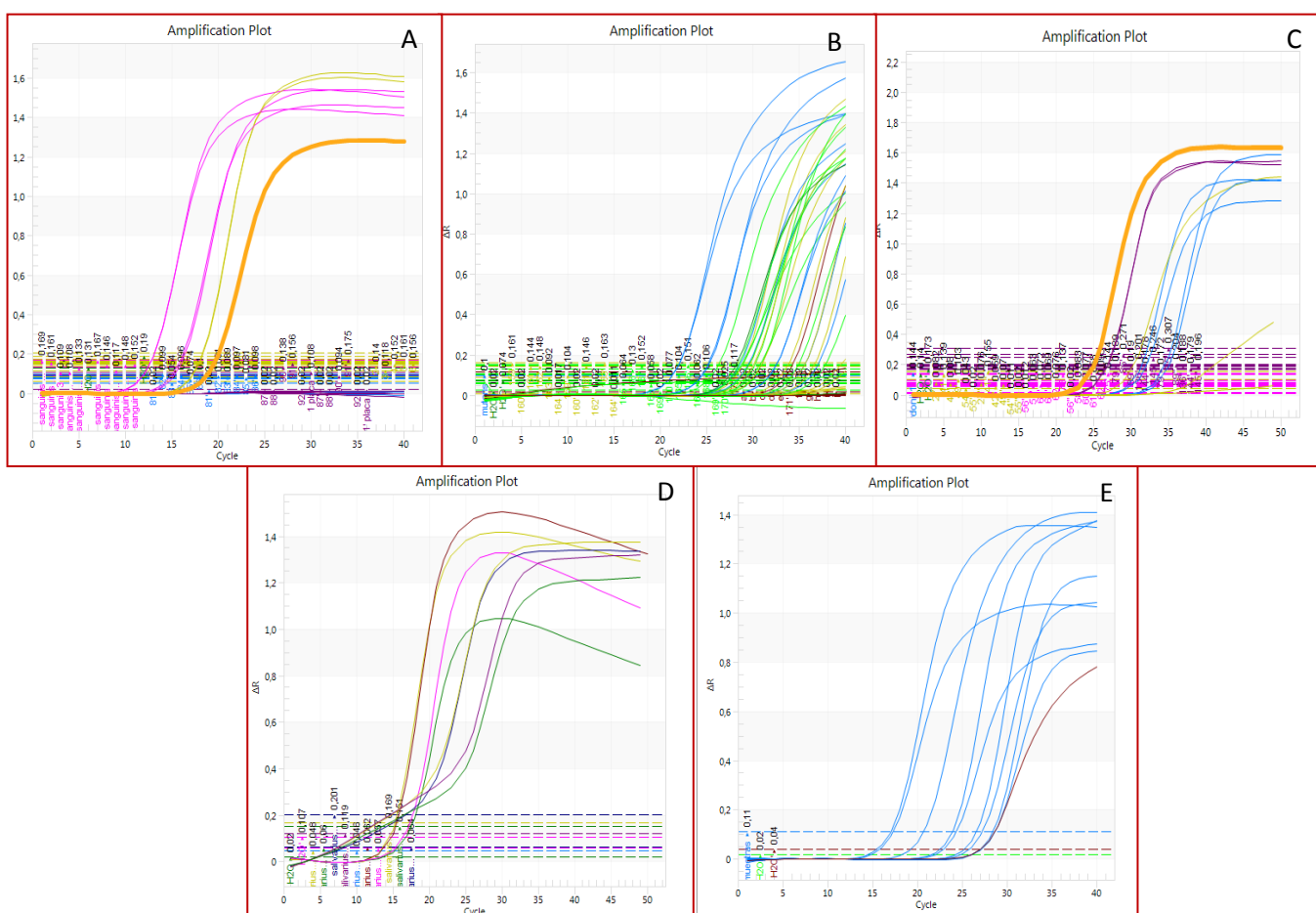


FIGURA 5: Amplificación de material genómico de A) *S. sanguinis*, B) *S. mutans*, C) *S. gordonii*, D) *S. salivarius* y E) *A. naeslundii*. Se puede observar en cada gráfico una línea de base, la amplificación y una fase de meseta.

b.3.3 Obtención de curva de disociación

Las curvas Melting (Figura 6), representan la curva de disociación, mostrando la especificidad de la reacción. Aquí se observa la temperatura de fusión o *melting temperature* (T_m), distinguiéndose por aquel punto más alto de la curva que se repite para las distintas muestras.

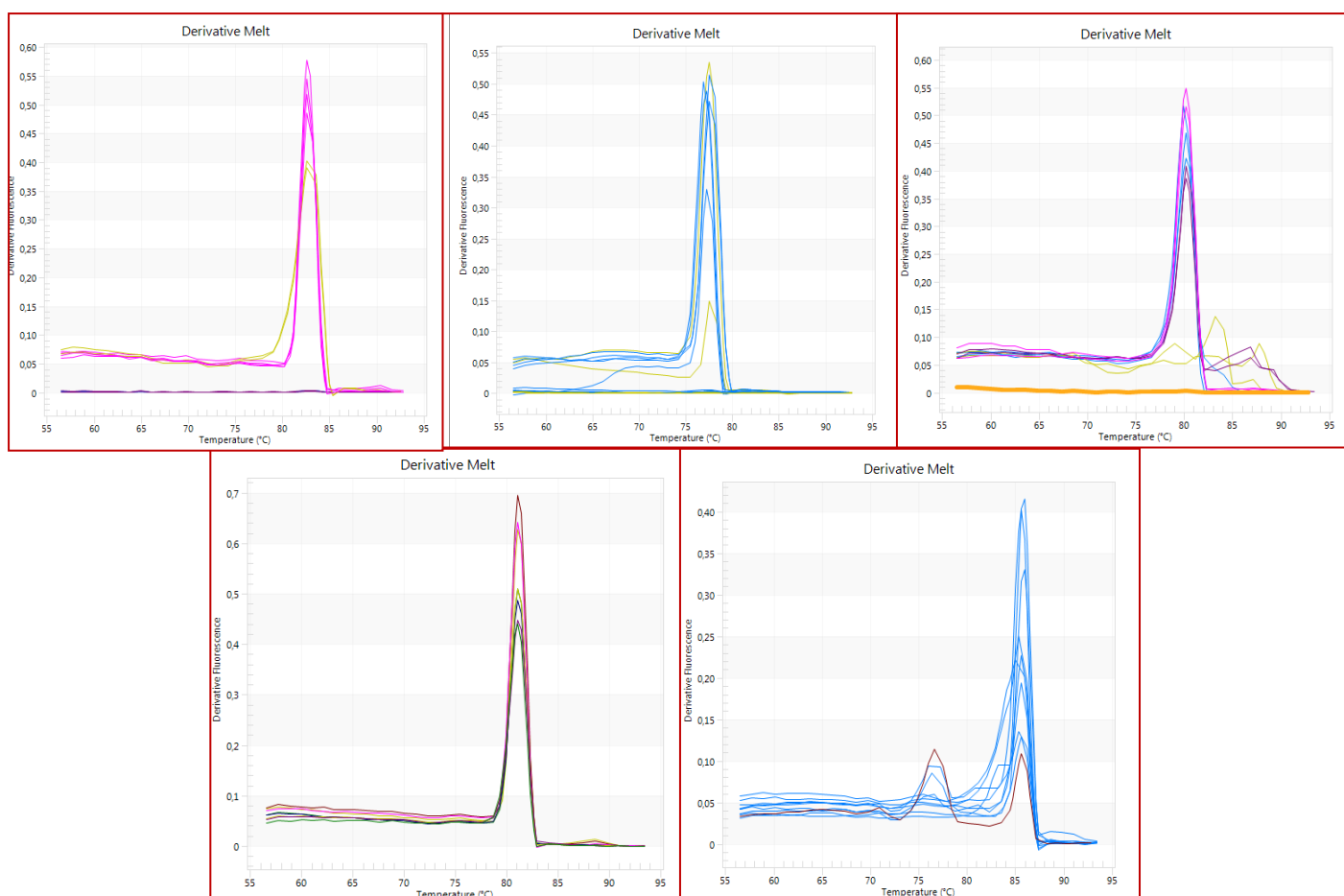


FIGURA 6: Curvas de disociación correspondientes a: A) *S. sanguinis*, B) *S. mutans*, C) *S. gordonii*, D) *S. salivarius* y E) *A. naeslundii*. El punto más alto describe una única temperatura de disociación.

b.3.4 Cuantificación de *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. gordonii*, y *A. naeslundii*, mediante qPCR a partir de muestras de placa supragingival y saliva provenientes de niños de 8 años con y sin Experiencia de caries.

Con los protocolos establecidos de los cultivos puros de bacteria, los programas de amplificación y los partidores específicos, junto con las curvas estándar, se obtuvieron los resultados de cada muestra procesada mediante el qPCR, entregando un valor “Cq” que corresponde al Ciclo de cuantificación. El promedio de este valor Cq (se realizó mediante duplicado), se utilizó para determinar la cantidad de DNA bacteriano específico en cada muestra, utilizando la ecuación de la recta obtenida para cada curva estándar de las 5 bacterias estudiadas. Con el volumen inicial de placa supragingival o saliva utilizada para realizar la extracción de DNA de cada sujeto, se obtuvo la cantidad de copias de DNA/mL. La cuantificación de bacterias de cada muestra expresada en copias/mL, se observa en el Anexo 1.

Los datos obtenidos para este parámetro en ambos grupos de estudio no presentaron una distribución normal al realizar el T- test. Por lo tanto, se utilizó la estadística no paramétrica Test de Mann-Whitney para muestras independientes.

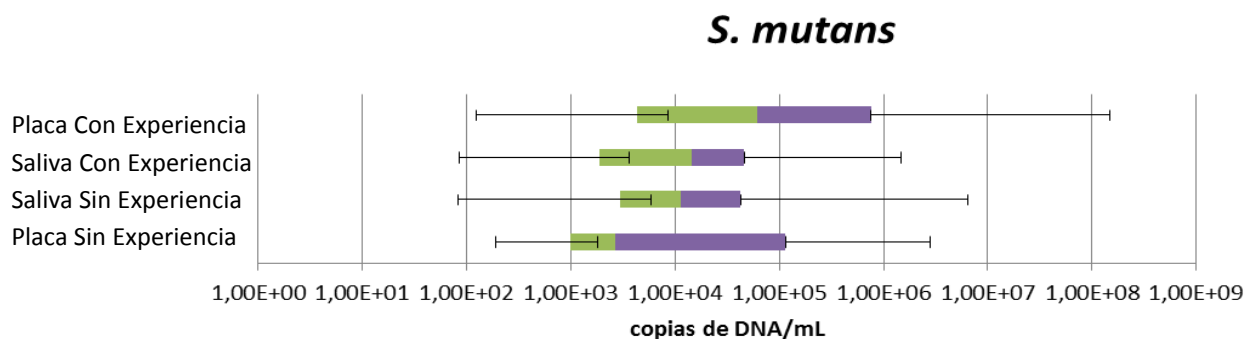


FIGURA 7: Comparación de medianas para *S. mutans* en muestras de placa y saliva en el grupo Con y Sin Experiencia de caries, expresado en copias/mL. Se puede observar el máximo y el mínimo.

En la Figura 7 se aprecian los resultados al analizar el recuento de *S. mutans* en los grupos Con y Sin Experiencia de caries en las muestras de placa supragingival y saliva. Se observa una mayor cantidad en el grupo Con Experiencia de Caries en placa (mediana $6,10 \times 10^4$), respecto al grupo Sin Experiencia de caries en placa (mediana $2,64 \times 10^3$), y respecto a la saliva en el grupo Sin Experiencia (mediana $1,14 \times 10^4$), y a saliva en el grupo Con Experiencia de caries (mediana $1,46 \times 10^4$). Al analizar por la media (Figura 8), el mayor recuento nuevamente se observa en las muestras de placa del grupo Con Experiencia de caries, pero no hay diferencias significativas ni en placa ($p=0.1955$), ni en saliva ($p=0.7117$).

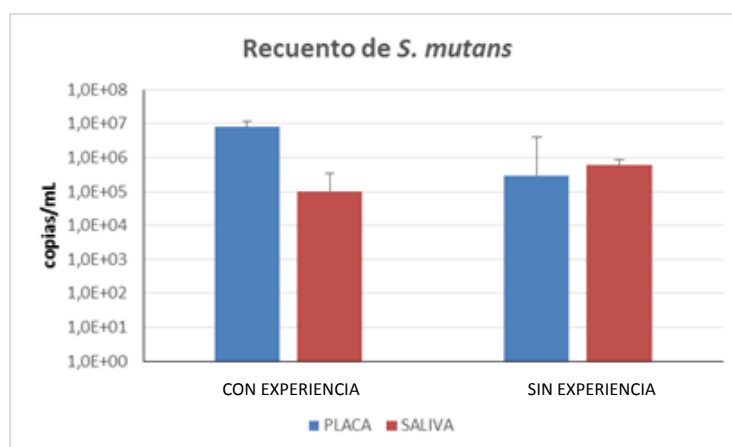


FIGURA 8: Promedio de *S. mutans* en muestras de placa y saliva expresado en copias de DNA/mL.

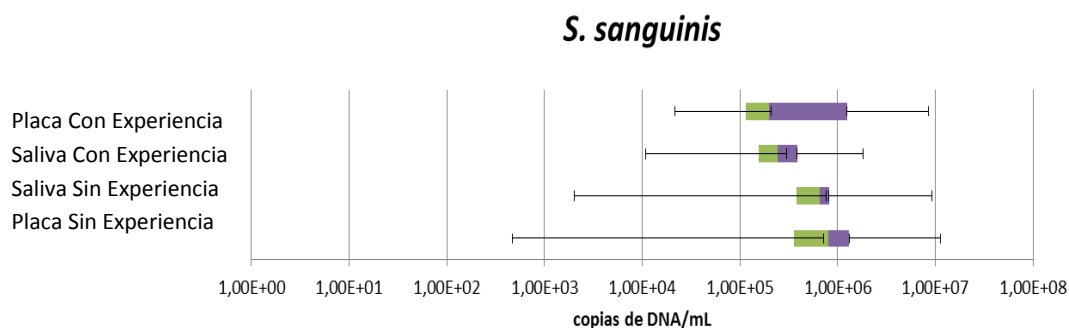


FIGURA 9: Comparación de medianas para *S. sanguinis* en muestras de placa y saliva en el grupo Con y Sin Historia de caries, expresado en copias de DNA/mL. Se puede observar el máximo y el mínimo.

En la Figura 9 se aprecian los resultados al analizar el recuento de *S. sanguinis* en los grupos Con y Sin Experiencia de caries en las muestras de placa supragingival y saliva. Al comparar los recuentos, basándose en la mediana, se observa una mayor cantidad en placa del grupo Sin Experiencia de caries (mediana $7,96 \times 10^5$) que en placa del grupo Con Experiencia de caries (mediana $1,98 \times 10^5$). Asimismo en saliva del grupo Sin Experiencia, su recuento fue mayor (mediana $6,51 \times 10^5$), que el grupo Con Experiencia de caries (mediana $2,43 \times 10^5$). Al observar la media (Figura 10), al igual que en el gráfico anterior, se observa que el mayor recuento se encuentra en placa del grupo Sin Experiencia de caries. No se encontraron diferencias significativas ni en saliva ($p=0.4978$), ni en placa ($p=0.2390$).

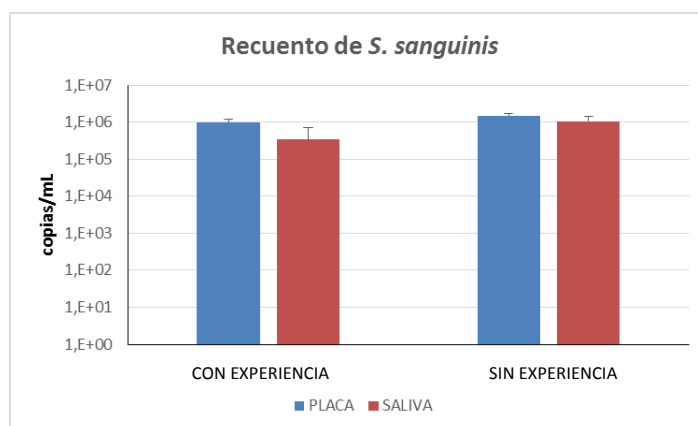


FIGURA 10: Promedio de *S. sanguinis* en muestras de placa y saliva expresado en copias/mL

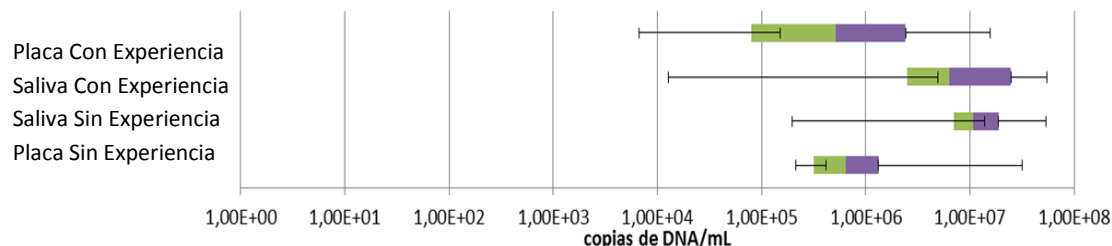
S. salivarius

FIGURA 11: Comparación de medianas para *S. salivarius* en muestras de placa y saliva en el grupo Con y Sin Historia de caries, expresado en copias/mL. Se puede observar el máximo y el mínimo.

En la Figura 11 se aprecian los resultados al analizar el recuento de *S. salivarius* en los grupos Con y Sin Experiencia de caries en las muestras de placa supragingival y saliva. Al comparar los recuentos, basándose en la mediana, se observa una mayor cantidad en saliva de ambos grupos, destacando en saliva del grupo Con Experiencia de caries (mediana $6,37 \times 10^6$), sobre saliva del grupo Sin Experiencia (mediana $1,07 \times 10^7$), siendo muy superiores al recuento encontrado en placa del grupo Sin Experiencia (mediana $6,44 \times 10^5$), del grupo Con Experiencia (mediana $5,14 \times 10^5$). Al observar la media (Figura 12), se observa que el mayor recuento se encuentra en saliva de ambos grupos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ni en placa ($p=0.3545$), ni en saliva ($p=0.4956$).

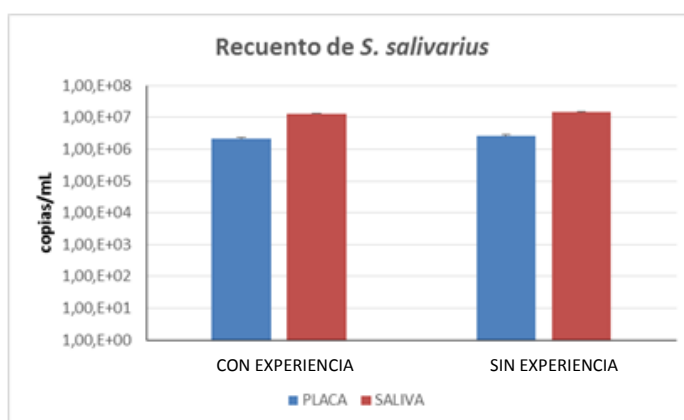


FIGURA 12: Promedio de *S. salivarius* en muestras de placa y saliva expresado en copias/mL

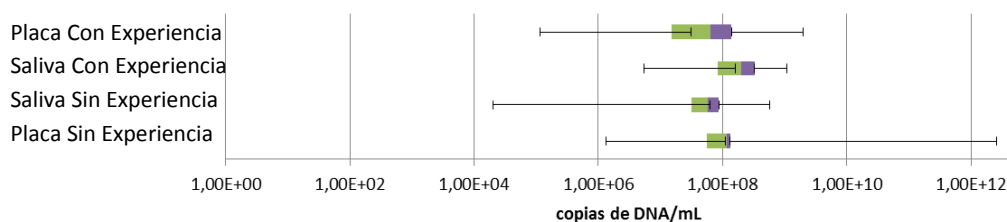
A. naeslundii

FIGURA 13: Comparación de medianas para *A. naeslundii* en muestras de placa y saliva en el grupo Con y Sin Historia de caries, expresado en copias/mL. Se puede observar el máximo y el mínimo.

En la Figura 13 se aprecian los resultados al analizar el recuento de *A. naeslundii* en los grupos Con y Sin Experiencia de caries en las muestras de placa supragingival y saliva. Al comparar los recuentos, se observa una mayor cantidad en saliva en el grupo Con Experiencia de caries (mediana $1,99 \times 10^8$), respecto a la saliva en el grupo Sin Experiencia de caries (mediana $5,80 \times 10^7$). En relación a la placa, se encontró un mayor recuento en el grupo Sin Experiencia de caries (mediana $1,15 \times 10^8$), en relación al grupo Con Experiencia (mediana $6,31 \times 10^7$). Sin embargo no se observa una diferencia significativa ni en placa ($p=0.4569$), ni en saliva ($p=0.2390$). Al analizar por la media (Figura 14), el mayor recuento se observa en placa en el grupo sin Experiencia de caries.

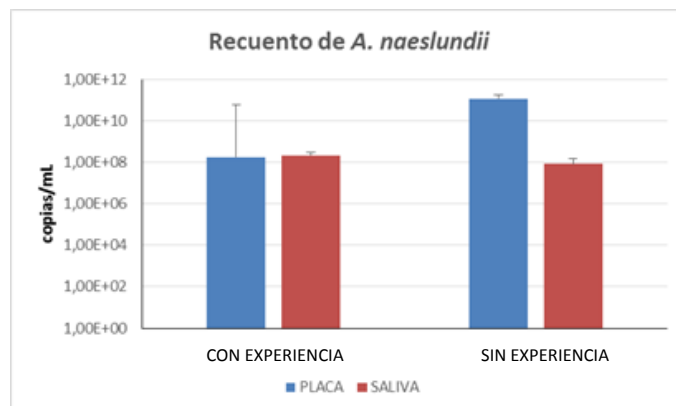


FIGURA 14: Promedio de *A. naeslundii* en muestras de placa y saliva expresado en copias/mL

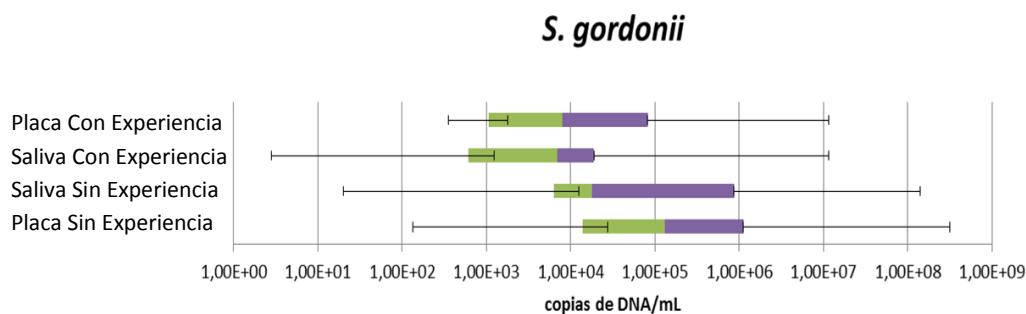


FIGURA 15: Comparación de medianas para *S. gordonii* en muestras de placa y saliva en el grupo Con y Sin Historia de caries, expresado en copias/mL. Se puede observar el máximo y el mínimo.

En la Figura 15 se aprecian los resultados al analizar el recuento de *S. gordonii* en los grupos Con y Sin Experiencia de caries en las muestras de placa supragingival y saliva. Al comparar los recuentos, basados en la mediana, se puede observar una mayor cantidad en placa del grupo Sin Experiencia de caries (mediana $1,30 \times 10^5$), seguido de saliva del mismo grupo (mediana $1,78 \times 10^4$). En el grupo Con Experiencia de caries, es mayor el recuento en placa (mediana $7,89 \times 10^3$), que en saliva (mediana $6,90 \times 10^3$). Al observar los promedios (Figura 16), se distingue que el mayor recuento nuevamente se observa en placa del grupo Sin Experiencia de caries. Sin embargo no existen diferencias significativas ni en placa ($p= 0.0785$), ni en saliva ($p= 0.3085$).

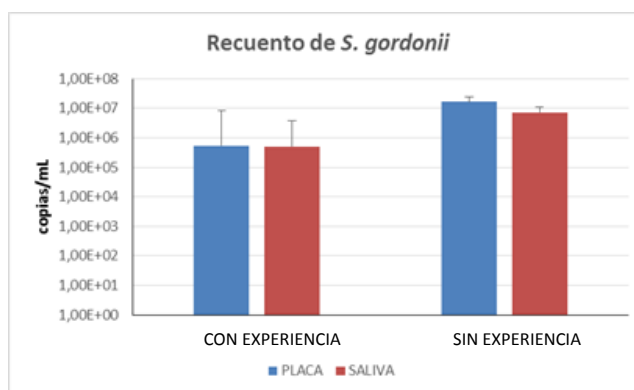


FIGURA 16: Promedio de *S. gordonii* en muestras de placa y saliva expresado en copias/mL

En la siguiente tabla se observa el detalle de la abundancia de cada bacteria en muestras de placa supragingival y saliva, expresado en copias de DNA/mL.

TABLA 4: Abundancia de bacterias expresada en copias/mL.

			Con Experiencia de caries	Sin Experiencia de caries	p
<i>S. sanguinis</i>	Placa	Media±DS	$1 \times 10^6 \pm 1, X 10^6$	$1, X 10^6 \pm 2, X 10^6$	0.2390
		Mediana	4×10^5	$8, X 10^5$	
		Máximo - Mínimo	$6 \times 10^6 - 4 \times 10^2$	$6 \times 10^6 - 5 \times 10^2$	
	Saliva	Media±DS	$3 \times 10^5 \pm 1 \times 10^6$	$1 \times 10^6 \pm 3 \times 10^5$	0.4978
		Mediana	2×10^5	7×10^5	
		Máximo- Mínimo	$1, X 10^6 - 1 \times 10^4$	$5 \times 10^6 - 2 \times 10^3$	
<i>S. mutans</i>	Placa	Media±DS	$8 \times 10^6 \pm 2 \times 10^7$	$3 \times 10^5 \pm 5 \times 10^5$	0.1955
		Mediana	6×10^4	3×10^3	
		Máximo- Mínimo	$8 \times 10^7 - 1 \times 10^2$	$1 \times 10^6 - 2 \times 10^2$	
	Saliva	Media±DS	$1 \times 10^5 \pm 2 \times 10^5$	$6 \times 10^5 \pm 1 \times 10^6$	0.7117
		Mediana	1×10^4	1×10^4	
		Máximo - Mínimo	$8 \times 10^5 - 8 \times 10^1$	$3 \times 10^6 - 8 \times 10^1$	
<i>S. gordonii</i>	Placa	Media±DS	$5 \times 10^5 \pm 2 \times 10^6$	$2 \times 10^7 \pm 5 \times 10^7$	0.0785
		Mediana	2×10^4	1×10^5	
		Máximo- Mínimo	$6 \times 10^6 - 4 \times 10^2$	$2 \times 10^8 - 1 \times 10^2$	
	Saliva	Media±DS	$5 \times 10^5 \pm 2 \times 10^6$	$7 \times 10^6 \pm 2 \times 10^7$	0.3085
		Mediana	8×10^3	2×10^4	
		Máximo- Mínimo	$6 \times 10^6 - 3 \times 10^0$	$7 \times 10^7 - 2 \times 10^1$	
<i>A. naeslundii</i>	Placa	Media±DS	$2 \times 10^8 \pm 3 \times 10^8$	$1 \times 10^{11} \pm 4 \times 10^{11}$	0.4569
		Mediana	7×10^7	1×10^8	
		Máximo- Mínimo	$1 \times 10^9 - 1 \times 10^5$	$1 \times 10^{12} - 1 \times 10^6$	
	Saliva	Media±DS	$2 \times 10^8 \pm 2 \times 10^8$	$8 \times 10^7 \pm 9 \times 10^7$	0.2390
		Mediana	7×10^7	6×10^7	
		Máximo- Mínimo	$7 \times 10^8 - 5 \times 10^6$	$3 \times 10^8 - 2 \times 10^4$	
<i>S. salivarius</i>	Placa	Media±DS	$2 \times 10^6 \pm 3 \times 10^6$	$3 \times 10^6 \pm 5 \times 10^6$	0.3545
		Mediana	5×10^5	6×10^5	
		Máximo- Mínimo	$9 \times 10^6 - 7 \times 10^3$	$2 \times 10^7 - 2 \times 10^5$	
	Saliva	Media±DS	$1 \times 10^7 \pm 1 \times 10^7$	$1 \times 10^7 \pm 1 \times 10^7$	0.4956
		Mediana	6×10^6	1×10^7	
		Máximo- Mínimo	$4 \times 10^7 - 1 \times 10^4$	$4 \times 10^7 - 2 \times 10^5$	

DISCUSIÓN

Este trabajo de investigación se realizó sobre una muestra de 23 escolares de 8 años de edad de ambos sexos, en la zona norte de la región Metropolitana. Los resultados analizados muestran que el valor ceod del grupo con Experiencia de caries (ceod=3,2), es concordante con la realidad nacional, (ceod=3,8) (Soto y cols., 2007). Del grupo con Experiencia de caries, 2 de cada 3 niños correspondían a hombres, resultados que concuerdan con el estudio realizado por Rojas, en el año 2001, donde la cantidad de varones en un grupo de 432 pacientes, era prácticamente el doble que mujeres en relación a la cantidad de dientes cariados según índice ceod (Rojas, 2001). Sin embargo, este resultado puede no ser extrapolable a la población por tratarse de una muestra pequeña (n=23). En relación al indicador utilizado, fue escogido el índice COPD/ceod dadas las condiciones en las cuales fue tomado el examen dental, en donde no se contaba con el equipamiento necesario para realizar un adecuado y confiable examen en base a ICDAS.

El desarrollo de la lesión de caries es un proceso dinámico con periodos alternados de progresión, detención y regresión, donde la placa dental juega un rol fundamental (Astorga y cols., 2015). La caries dental involucra la interacción en el tiempo de una superficie dental susceptible, las bacterias cariogénicas y la disponibilidad de una fuente de carbohidratos fermentables, especialmente sacarosa (Duque de Estrada y cols., 2006).

Dependiendo de las condiciones ambientales en la cavidad oral, del individuo en general, de uno o varios sitios dentro del hospedero, el equilibrio fisiológico entre el tejido duro y la biopelícula puede ser perturbado, resultando en una pérdida neta de minerales (Fejerskov, 2004).

La gran mayoría de los estudios sobre la etiología bacteriana de la caries dental se ha realizado mediante cultivos bacterianos. Aproximadamente 250 especies de bacterias orales de humanos se han cultivado y la diversidad real se ha estimado en 700 especies (Socransky y cols., 2000; Paster y cols., 2001), pudiendo incluso alcanzar 1000 especies (Dewhirst y cols., 2010).

La microbiota residente de la cavidad oral inevitablemente formará biopelícula sobre la superficie dental, y aunque es una enfermedad polimicrobiana (Marchant y cols., 2001), donde la presencia de bacterias es fundamental para el inicio y progresión de la caries (Beigjton, 2005), es innegable que también influyen otros factores no relacionados directamente con bacterias (Corby y cols., 2005). El establecimiento de la microbiota de la cavidad oral es influenciado tanto por factores externos; como el medio ambiente durante el parto, la microbiota oral de la madre, transmisión persona a persona, el tipo de alimentación infantil y las condiciones de higiene oral, así como factores internos; como la etapa de desarrollo de la vía digestiva (Tanner y cols., 2002; Penders y cols., 2006).

El grupo Streptococci está ampliamente distribuido en la cavidad oral, es así como *S. salivarius*, *S. oralis* y *S. mitis* se han destacado por colonizar tejidos blandos como encía y lengua, y las especies *S. mutans*, *S. sobrinus*, y *S. gordonii* por colonizar tejidos duros (Lemos y cols., 2005). Las biopelículas formadas en diferentes lugares dentro de la cavidad oral difieren en su composición bacteriana pero usualmente contienen la mayoría de las especies frecuentemente aisladas en todas las superficies del esmalte (Kolenbrander y cols., 2002).

Considerando el factor microbiológico, dos especies han sido fuertemente asociadas como agentes etiológicos, *S. mutans* y *S. sobrinus*, ya que

numerosos estudios han relacionado la presencia de caries con elevados recuentos de estas especies, sin embargo los estudios se han focalizado principalmente en *S. mutans* debido a la relativa facilidad de manipulación genética comparado con *S. sobrinus*. (Lemos y cols., 2005).

Diversos estudios sugieren que el nivel de *S. mutans* no es predictivo para determinar futuras lesiones de caries, así como un alto recuento del Grupo Mutans en saliva al compararlo con experiencia de caries, y que tampoco los altos niveles en placa permiten predecir una variación en experiencia de caries (Matee y cols., 1993). Sin embargo, Duque de Estrada considera que el paso más importante para que se produzca la caries, es la adhesión inicial del *S. mutans* a la superficie del diente. En nuestra población de estudio, el recuento de *S. mutans* en las muestras de placa del grupo con Experiencia de caries fue mayor que el recuento en placa del grupo sin Experiencia de caries, lo que concuerda con lo documentado en la literatura (Figueroa y cols., 2009; Giacaman y cols., 2013). En sujetos sanos, las especies del grupo Mutans Streptococci corresponden a menos del 1% de los aislados obtenidos y en niños con caries temprana de la infancia, el grupo MS comprende entre unos 30-50% de los aislados obtenidos de placa bacteriana y unos 10-30% de los aislados obtenidos de saliva. (Law y cols., 2007). En este trabajo de investigación se esperaba una diferencia significativa en el recuento de *S. mutans* entre el grupo con Experiencia de caries comparado con el grupo sin caries, situación que no ocurrió, lo que puede explicarse principalmente por el escaso número de participantes y también porque esta enfermedad puede ocurrir en ausencia de esta bacteria (Loesche y Straffon, 1979) y que aun más puede suceder que individuos con altos recuentos de *S. mutans* no necesariamente desarrollen lesiones de caries (Kleinberg, 2002), ya que la relación entre *S. mutans* y caries no es absoluta (Fejerskov, 2004). Las

especies que conforman la microbiota no tienen un rol determinado, ya que son heterogéneas, con una alta variabilidad genética y fenotípica (Astorga y cols., 2010). Algunos autores proponen que el desarrollo de las caries dental es más complejo que sólo tener la presencia de *S. mutans* (Figuroa y cols., 2009), ya que no jugaría un rol específico en su desarrollo, más bien el sobrecrecimiento de *S. mutans* podría ser explicado por una disrupción de la homeostasis en la biopelícula, ya que si ésta se pierde, una infección oportunista podría ocurrir aún cuando esta infección deriva de la microbiota que es endógena en el hospedero (Fejerskov, 2004).

Prolongados periodos de acidificación permiten la aparición de microbiota acidúrica y desmineralización del esmalte dental. De los agentes que interrumpen la estabilidad de la biopelícula de la placa supragingival, los de mayor impacto son la baja de pH y los cambios en las fuentes de carbohidratos, ya que al ser metabolizados rápidamente por bacterias acidogénicas, disminuyen fácilmente el pH permitiendo a su vez la irrupción significativa de miembros cariogénicos, compitiendo efectivamente cuando las condiciones ambientales son menos favorables para el crecimiento de otras especies. En general, microorganismos como *S. mutans* son capaces de crecer bajo este pH llevando a cabo la glicolisis, siendo esta una ventaja selectiva sobre otras especies menos acidúricas (Lemos y cols., 2005).

La saliva mantiene la integridad dentaria por medio de su acción de limpieza mecánica, la maduración posteruptiva del esmalte, la regulación del medio iónico para proveer capacidad de remineralización sin la precipitación espontánea de sus componentes y la limitación de la difusión ácida. Le aporta al esmalte de los dientes recién erupcionados iones de calcio y de fosfato que permiten gradualmente incrementar su grado de mineralización y a la vez, perfecciona su estructura, proceso denominado maduración posteruptiva,

umentando la resistencia del esmalte a la disolución ácida. Es bien sabido el hecho de que la mayor susceptibilidad a la caries dental ocurre precisamente en el periodo posterior a la erupción dentaria, principalmente en el primer año de erupcionados los dientes (Duque de Estrada y cols., 2006).

La saliva es fundamental para el balance ácido–base de la placa bacteriana. El pH del líquido de la biopelícula disminuye muy pronto luego de la ingesta de carbohidratos producto de la fermentación de bacterias acidogénicas, descendiendo por debajo de 5,5 y que gracias al sistema tampón de la saliva, permite un incremento en el pH. De ahí la importancia del flujo salival para producir este incremento del pH al aumentar el flujo salival. La salud oral está relacionada también a un nivel más alto de flujo salival, pH y capacidad tamponante de la saliva (Miura y cols., 1991). Además mantiene la biopelícula oral húmeda y tibia. El pH de la saliva está cerca de la neutralidad, permitiendo el óptimo crecimiento de la mayoría de los microorganismos. En este trabajo de investigación, *S. salivarius* se encontró en altas concentraciones en saliva, sin embargo no existió diferencia significativa al comparar ambos grupos ($p=0.3545$). Esta mayor proporción de *S.salivarius* en saliva, concuerda con los resultados obtenidos al estudiar la prevalencia de bacterias del género *Streptococcus* en saliva de niños de entre 2 y 5 años de edad, donde *S. salivarius* era el más prevalente tanto en el grupo con caries como en el grupo sin caries (Tournelle, 2013). *S. salivarius*, es el mayor constituyente de la biopelícula colonizando epitelio bucal, lengua y epitelio dorsal. Produce además enzima ureasa que contribuye a la estabilidad de la comunidad oral. Es un microorganismo pionero en la conformación del ecosistema de la cavidad bucal y que si bien juega un rol moderador, está más asociado a tener un rol beneficioso debido a su capacidad de secretar la enzima ureasa, favoreciendo la regulación del pH ambiental (Chen y cols.,

1996). En este estudio, al comparar, en base a la mediana, se puede observar que en el grupo sin Experiencia de caries, en saliva hay un recuento de $1,07 \times 10^7$ copias de DNA/mL, en placa de $6,44 \times 10^5$, valores muy superiores al recuento en saliva ($1,14 \times 10^4$) y placa ($2,64 \times 10^3$) de *S. mutans* del mismo grupo Sin Experiencia de caries, lo que está evidenciado por la literatura ya que *S. salivarius* es la primera bacteria capaz de habitar toda la cavidad oral a través de la saliva y que al ser cultivado con *S. mutans*, *S. salivarius* inhibe la formación de *S. mutans* (Ogawa y cols., 2010), sin embargo para otros autores esta relación no está definida (Kim Seow., 2009).

A. naeslundii es una bacteria baciliforme, Gram positivo, anaerobio facultativo, que pertenece a los colonizadores iniciales de la biopelícula, entregando sustrato para la adhesión de otras bacterias orales incluyendo al género *Streptococcus*, contribuyendo así al desarrollo del microambiente bacteriano. En este trabajo de investigación se encontró en altos niveles en placa en el grupo sin Experiencia de caries, validando su participación en regular y mantener la salud del ecosistema oral debido a su capacidad de adhesión a la superficie dental (Yaling y cols., 2006). Si bien es una bacteria alcalogénica, por medio de la vía Arginina – Deiminasa, algunos autores la asocian al inicio de caries dental en niños y caries radicular en adultos (Chen y cols., 2001).

S. sanguinis se encontró en mayores proporciones en el grupo Sin Experiencia de caries tanto en placa como saliva, lo que está en concordancia con la literatura, ya que se ha asociado a superficies libres de caries (Marchant y cols., 2001; Belda-Ferre y cols., 2012). Algunos autores atribuyen un rol antagónico de *S. sanguinis* contra *S. mutans*, argumentando que *S. mutans* en bajas proporciones y con altos niveles de *S. sanguinis*, está asociado a salud oral (Caufield y cols., 2000; Seow y cols., 2009), lo que sería concordante con esta investigación, ya que en base a la mediana, se destaca

que el recuento en saliva del grupo sin Experiencia de Caries ($6,51 \times 10^5$), es muy superior al recuento de saliva en *S. mutans* del mismo grupo ($1,14 \times 10^4$). Lo mismo ocurre respecto al recuento de placa en el grupo Sin Experiencia de caries ($7,96 \times 10^5$), al comparar *S. mutans* en placa del grupo Sin Experiencia ($2,64 \times 10^3$).

La caries es un proceso dinámico (Astorga y cols., 2015), donde la interacción cooperativa que ocurre entre mutans streptococci y los streptococci juegan un importante rol en el desarrollo de caries y la biopelícula dental (Ogawa y cols., 2010), así como el pH de una comunidad microbiana tiene un profundo efecto sobre su composición (Kolenbrander y cols., 2002).

En una investigación donde se expuso por 10 días a 9 especies orales a glucosa, alcanzando un pH final de 5,5, 5,0 y 4,5, el recuento de *S. mutans* se incrementó a pesar de la caída del pH, mientras que el recuento de *A. naeslundii* y *S. gordonii* no fue detectable en valores de pH bajo 5 (Kolenbrander y cols., 2002), lo que podría explicar el bajo recuento que tuvo *S. gordonii* en el grupo con Experiencia de caries (placa $7,89 \times 10^3$, saliva $6,90 \times 10^3$), y que difiere bastante de lo ocurrido en el grupo sin Experiencia de caries (placa $1,30 \times 10^5$, saliva $1,78 \times 10^4$), aun cuando esta diferencia no es significativa (p placa 0.3085, p saliva= 0.0785), sí podría explicar en parte la contribución de *S. gordonii* a la homeostasis de la biopelícula en el grupo Sin Experiencia de caries, por su capacidad de adhesión.

Se propone en la literatura que la complejidad de la microbiota es mayor en los niños sin caries, sin embargo en ambos grupos estudiados se encontraron las 5 bacterias pero en distintas proporciones, lo que da cuenta de la complejidad y diversidad de la microbiota en ambos grupos (Li y cols., 2007). Aunque esta diferencia resultó no ser significativa además de que las lesiones

de caries están asociadas a otros factores externos que no fueron estudiados en esta investigación.

Al comparar a los niños con y sin Experiencia de caries, el resultado para ninguna de las bacterias estudiadas resultó ser significativo, esto puede explicarse debido al reducido tamaño de la muestra estudiada. Un mayor tamaño muestral se sugiere para obtener resultados más concluyentes y comparables.

CONCLUSIONES

- *S. mutans*, está presente tanto en el grupo con experiencia de caries, como en el grupo sin experiencia de caries, sin embargo existe una tendencia a un mayor recuento en el grupo con experiencia de caries sin presentar diferencia estadísticamente significativa.
- Las bacterias denominadas alcalogénicas no son exclusivas del grupo sin experiencia de caries, ya que se encuentran presentes también en el grupo con experiencia de caries.
- A pesar de que no se encontró una diferencia significativa al comparar los grupos con y sin experiencia de caries, existe una tendencia a un mayor recuento de *S. sanguinis*, *S. gordonii*, *S. salivarius* y *A. naeslundii* en el grupo sin experiencia de caries.
- La presencia de una misma especie en ambos grupos, sugiere que puede actuar tanto favorablemente como negativamente en el hospedero.

BIBLIOGRAFIA

- Aas J, Griffen A, Dardis S (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 46: 1407–1417.
- Astorga B, Barraza C, Cassals J (2015). Avances en el estudio de la diversidad bacteriana asociada a caries dental mediante estudio genómico. *Int. J. Odontomat.* 9(3)349-356.
- Becker M, Paster B, Leys E (2002). Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 40: 1001–1009.
- Beighton D (2005). The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol.* 33(4):248-55.
- Belda-Ferre P, Alcaraz L, Cabrera-Rubio R y cols., (2012). The oral metagenome in health and disease. *International Society for Microbial Ecology* 6, 46–56.
- Bowden G (1984). Possibilities for modifying the caries attack by altering the oral micromicrobiota. *J Can Dent Assoc* 50: 169–172.
- Burne R, Marquis R (2000). Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol Lett* 193: 1–6
- Burne R, Zeng L, Ahn S (2012). Progress dissecting the oral Microbiome in Caries and Health. *Adv. Dent. Er.* 24(29): 77-80
- Carlsson J, Grahnen H, Jonsson G. (1970). Establishment of *Streptococcus sanguinis* in the mouths of infants. *Arch. Oral. Biol.* 15 1145-48

- Caufield P, Dasanayake A, Li Y (2000). Natural History of *Streptococcus sanguinis* in the Oral Cavity of Infants: Evidence for a Discrete Windows of Infectivity. *Infection and Immunity*. 68: 4018-4023
- Ceballos M, Acevedo C y cols. (2007). Diagnóstico en Salud Bucal de niños de 2 y 4 años que asisten a la educación preescolar en la Región Metropolitana. Chile. Minsal.
- Corby P, Lyons-Weiler J, Bretz W, Hart, C (2005). Microbial Risk Indicators of early Childhood Caries. *Journal of Clinical Microbiology*. 43:5753-59.
- Duque de Estrada J, Pérez J, Hidalgo I (2006). Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Rev Cub Estomatología*. 43(1).
- Dewhirst F, Hen T, Izard J, Paster B, Tanner (2010). The human oral microbioma. *J. Bacteriol.*, 192 (19): 5002-17.
- Fejerskov O (2004). Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res*, vol.38, p.182-191.
- Figueroa M, Alonso G, Acevedo A (2009). Microorganismos presentes en las diferentes etapas de la progresión de la lesión de caries dental. *Acta Odontológica Venezolana* 47 (1).p. 1-13.
- Fujiwara T, Sasada E, Mima N. (1991). Caries prevalence and salivary mutans streptococci in 0-2 years old children of Japan. *Community Dent Oral Epidemiol* 19: 151-154.
- Gordan V, Garvan C, Ottenga M, Schulte R, Harris P, McEdward D. y cols. (2010). Could Alkali Production Be Considered an Approach for Caries Control? *Caries Res*. 44: 547–554.

- Griffin S, Griffin P, Swann J. L., Zlobin N (2005). New coronal caries in older adults: implications and prevention. *Journal of Dental Research* 84, no. 8, p. 715-720.
- Kuramitsu H, He R (2007). Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbial Mol Biol Rev*; 71: 653-70.
- Kim Seow W, Lam J, Ltsag A (2009). Oral *Streptococcus* species in pre-term and full term children- a longitudinal study. *Int. Jou. Paed. Dent.* 19: 406-41.
- Kolenbrander P, Andersen R, Blehert D, Eglund P, Foster J, Palmer RJ J (2002). Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*; 66: 486-505.
- Kolenbrander P, Palmer R, Rickard H (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodotol* 2000 42: 47-79
- Kleinberg I (2002). A mixed bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specific-plaque hypothesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 13(2):108-25
- Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F (2005). Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J. Bacteriol* 187: 7193-7203.
- Kreth J, Merritt J, Zhu L (2006). Cell density and ComE-dependent expression of a group pf mutacin and mutacin like genes in *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 265: 11-17.
- Kreth J, Zhang Y, Herzberg M (2008). Streptococcal Antagonism in Oral Biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* Interference with *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology* 190 (13). p. 4632-4640.

- Linossier A, Valenzuela C (2004) *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in oral cavity: possible relationship to down's syndrome. Malard J editor. Focus on Down syndrome Research, Ed. New York: nova Science; p. 213-215.
- Law V, Seow W, Townsend G. (2007). Factors influencing oral colonization of mutans Streptococci in young children. Aust Dent J 2: 93-100.
- Lemos J, Abranches J, Burne R (2005). Responses of cariogenic streptococci to Environmental stresses. Curr Issues MolBiol 7(1):95-107
- Linossier A, Valenzuela C (2011). Colonización de la cavidad oral por *Streptococcus* grupo mutans, según edad, evaluado en saliva por un método semi-cuantitativo. Rev. Chil. Infect 28(3): 230-237.
- Low W, Tan S, Schwartz S (1999). The effect of dental rehabilitation on the body weight of children with early childhood caries. Pediatr Dent. 21: 325-326.
- Marsh P (2006). Dental plaque as a biofilm and microbial community implications for health and disease. BMC Oral Health; 6(Suppl. 1): S14.
- Marsh P (2010). Microbiology of dental plaque biofilms and their role in oral health and caries. Dent Clin north Am: 54(3) 441-54.
- Matee M, Mikx F, de Soet J, Maselle S, de Graaff J, van Palestein Helderma W (1993). Mutans streptococci in caries –active and caries-free infants in Tanzania. Oral Microbiol Immunol 8: 322-324.
- Miura H, Isogai E, Hirose K, Wakazaka H (1991). Application of a sucrose indicator strip to evaluate salivary sucrose clearance. J Dent 19:189-191

- Nascimento M, Gordan V, Garvan C, Browngardt C, Burne R. (2009). Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24: 89–95.
- Nobbs A, Zhang Y (2007). *Streptococcus gordonii* Hsa environmentally constrains competitive binding by *Streptococcus sanguinis* to saliva-coated hydroxyapatite. *J. Bacteriol.* 189: 3106-3114.
- Ogawa A, Furukawa S, Fujita S, Mitobe J (2010). Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by *Streptococcus salivarius* FruA. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (5). 1572-80.
- Ojeda- Garcés JC, Oviedo- García E, Salas L (2013). *Streptococcus mutans* y caries dental. *Rev. CES odont.* 26(1) 44-56.
- Parisotto T, Steiner-Oliveira C. Duque C (2010). Relationship among microbiological composition and presence of dental plaque, sugar exposure, social factors and different stages of early childhood caries. *Arch Oral Biol.* 55. 365-373
- Reyes E, Martín J, Yévenes I, Neira M, Palma P (2012). Actividad y efectos de ureasa y arginina deiminasa en saliva y biopelícula oral humana. *Rev Fac Odontol Univ Antioq* 23(2): 343-352.
- Rojas R, Camus M (2001). Estudio Epidemiológico de las Caries Según Índice c.e.o.d y C.O.P.D. en Preescolares y Escolares de la Comuna de Río Hurtado, IV Región. *Revista Dental de Chile* 92(1): 17-22.
- Rosan B, Lamont R (2000). Dental plaque formation. *Microbes infect.* 2 (13): 1599-607.
- Sissons C, Hancock E, Perinpanayagam H, Cutress T (1988). The bacteria responsible for ureolysis in artificial dental plaque. *Arch Oral Biol* 33: 727–733.
- Soto L, Tapia R. (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. Chile. Minsal.

- Soto L, Tapia R. (2007). Diagnóstico Nacional de Salud Bucal de los niños de 6 años. Chile. Minsal.
- Tournelle P. 2013. Prevalencia y diversidad de bacterias pertenecientes al género *Streptococcus* en saliva de niños pre-escolares chilenos entre 2 y 5 años de edad con y sin caries. Trabajo de investigación requisito para optar al título de cirujano dentista. Universidad de Chile.
- Van Houte J, Lopman J, Kent R (1994). The predominant cultivable microbiota of sound and carious human root surfaces. J Dent Res 73: 1727–1734.
- Van Wuyckhuyse B, Perinpanayagam H, Bevacqua D y cols., (1995). Association of free arginine and lysine concentrations in human parotid saliva with caries experience. J Dent Res 74: 686–690.
- Yaling L, Tao H, Jingyi Z, Xuedong Z (2006). Characterization of the *Actinomyces naeslundii* ureolysis and its role in bacterial aciduricity and capacity to modulate pH homeostasis. Microbiol Res. 161(4):304–10.

Anexo 1. Detalle de las muestras analizadas con su respectivo recuento para cada bacteria expresado en copias de DNA/mL.

MUESTRA	ESTADO	DECARIES	<i>Salivarius placa</i>	<i>Salivarius saliva</i>	<i>A. neslundii placa</i>	<i>A. neslundii saliva</i>	<i>S. sanguinis placa</i>	<i>S. sanguinis saliva</i>	<i>S. gordonii placa</i>	<i>S. gordonii saliva</i>	<i>S. mutans placa</i>	<i>S. mutans saliva</i>
A10	SH	285E+05	4,47E+06	4,96E+07	6,47E+07	1,26E+06	6,51E+05	1,59E+08	7,08E+07	1,88E+03	8,32E+01	
B	SH	3,17E+05	5,02E+06	1,24E+08	6,21E+07	7,96E+05	8,80E+05	1,86E+07	4,79E+04	1,06E+03	3,63E+02	
B3	SH	6,44E+05	1,07E+07	9,46E+07	3,28E+08	4,47E+06	5,80E+05	2,38E+05	1,87E+05	2,31E+04	5,36E+03	
C1	SH	6,44E+05	1,07E+07	1,31E+12	5,03E+07	6,77E+05	1,87E+05	1,95E+05	1,55E+06	1,92E+05	3,22E+06	
C7	SH	2,13E+05	1,97E+05	1,89E+07	4,39E+07	4,71E+02	5,32E+04	2,00E+06	6,91E+06	1,46E+06	1,14E+04	
110	SH	5,96E+06	8,97E+06	1,33E+06	1,88E+06	8,23E+02	2,02E+03	1,12E+04	1,31E+04	2,64E+03	7,07E+03	
116	SH	1,48E+06	3,62E+07	1,15E+08	5,80E+07	8,86E+05	7,24E+05	1,23E+04	1,78E+04	1,24E+06	3,00E+06	
118	SH	3,12E+05	1,56E+07	1,16E+08	1,96E+07	4,29E+04	5,84E+05	2,51E+04	5,38E+01	4,55E+02	2,18E+04	
172	SH	1,02E+06	9,91E+06	1,40E+08	1,77E+08	6,86E+05	2,19E+06	1,56E+04	1,26E+04	9,45E+02	6,26E+04	
173	SH	1,55E+07	2,20E+07	6,34E+07	2,01E+04	6,29E+06	5,04E+06	1,35E+02	9,01E+01	1,88E+02	5,55E+02	
177	SH	1,17E+06	3,37E+07	1,60E+08	1,11E+08	1,37E+06	7,54E+05	1,30E+05	2,00E+01	3,84E+04	1,45E+04	
A8	CH	6,96E+05	1,96E+06	1,27E+07	4,19E+07	6,73E+05	3,32E+05	5,47E+04	8,16E+03	1,44E+04	6,82E+05	
B5	CH	3,33E+05	3,98E+07	2,33E+07	3,91E+07	8,62E+04	1,85E+05	3,44E+05	5,16E+04	3,90E+06	9,86E+02	
B8	CH	3,08E+05	9,28E+06	1,18E+08	1,46E+08	2,54E+06	1,09E+04	1,67E+05	2,02E+04	2,75E+03	8,56E+04	
B19	CH	7,48E+06	2,33E+07	9,33E+07	7,36E+07	1,98E+05	2,04E+05	5,85E+06	5,80E+06	6,92E+04	8,86E+03	
97	CH	4,52E+06	2,67E+06	1,06E+09	3,49E+08	1,83E+06	8,23E+05	9,88E+02	4,79E+04	1,24E+02	9,12E+02	
109	CH	9,07E+06	1,61E+07	3,28E+07	6,38E+08	6,08E+05	8,86E+04	3,55E+02	1,18E+02	5,51E+02	8,44E+01	
112	CH	3,52E+04	8,87E+04	1,09E+07	5,38E+06	4,87E+04	2,83E+05	1,32E+03	2,79E+00	5,29E+04	2,03E+04	
113	CH	9,38E+04	3,15E+06	3,04E+08	6,97E+08	1,72E+05	3,78E+05	1,00E+05	5,85E+03	8,93E+03	3,66E+04	
120	CH	1,26E+04	1,26E+04	1,15E+05	5,68E+06	1,46E+05	1,71E+05	4,75E+02	1,40E+02	9,52E+05	4,72E+03	
121	CH	1,71E+06	2,90E+07	1,47E+08	1,14E+08	4,84E+06	1,10E+06	4,60E+03	1,47E+04	1,70E+07	8,08E+02	
122	CH	8,63E+05	3,46E+06	3,06E+08	2,62E+08	2,18E+04	1,14E+05	2,79E+04	2,04E+03	1,83E+05	7,64E+05	
125	CH	6,62E+03	3,08E+07	4,54E+07	2,52E+08	7,05E+05	4,15E+05	1,12E+04	7,96E+03	7,53E+07	4,96E+04	

Anexo 2: Certificado Comité de Bioseguridad.



Comité Institucional de Bioseguridad

Administración Conjunta Campus Norte

FDO N°9

Santiago, 13 de Agosto de 2013.

CERTIFICADO

El Comité Institucional de Bioseguridad (CIB) ha analizado el Proyecto de Investigación presentado al Concurso Fonis 2013, titulado "**Cuantificación y caracterización de la producción de álcali por cepas bacterianas de la biopelícula dentaria y saliva en pacientes con o sin lesiones activas de caries**". El investigador responsable de este proyecto es el Dr. Gustavo Moncada.

Los procedimientos experimentales, que involucran tanto el manejo de material biológico y de microorganismos patógenos, así como el uso de agentes químicos de riesgo, se realizarán en el Laboratorio de Química perteneciente al Departamento de Ciencias Básicas y Comunitarias y en el Laboratorio de Microbiología perteneciente al Departamento de Patología y Medicina Oral de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile.

El CIB certifica que los laboratorios y la Facultad mencionada anteriormente, cuentan con las facilidades para el manejo y desecho del material químico y biológico 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. Moncada para ser presentado al Concurso FONIS 2013.

Dr. Mario Chiong
Presidente

Dra. Andrea Paula-Lima
Secretaria

Anexo 3: Consentimiento informado.



Consentimiento Informado Para Participación en Proyecto de Investigación

Título del Protocolo: Caracterización de la producción de álcali por cepas bacterianas de placa microbiana y saliva en pacientes con distinta Experiencia de caries dental.

Investigador Principal: Dr. Gustavo Moncada.

Sede de Estudio: Facultad de Odontología, Universidad de Chile–Olivos 943–Santiago.

Nombre del Paciente (niño):.....

Mi nombre es Gustavo Adolfo Moncada Cortés, académico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile. Estoy realizando una investigación que busca detectar una nueva forma de mantener a la población libre de lesiones de caries en sus dientes, al conocer la actividad de ciertos compuestos químicos y su producción en la saliva y placa bacteriana, considerando sus efectos sobre los dientes.

Le proporcionaré información e invitaré a su hijo (a) o pupilo (a) a ser parte de este estudio. No tiene que decidir hoy si lo harán 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 a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez aclarada todas sus consultas y después que haya comprendido los objetivos de la Investigación y si usted desea que su hijo (a) o pupilo (a) participe, se le solicitará que firme este formulario.

Los aspectos de este formulario tratan los siguientes temas: Justificación de la Investigación, Objetivo de la Investigación, Tipo de Intervención y procedimiento, Beneficios y Riesgos Asociados a la Investigación, criterios de inclusión-exclusión y Aclaraciones.

Informo a Ud. que a su hijo (a) o pupilo (a) serán reforzadas las técnicas de higiene oral y se aclaran dudas en caso de presentar consultas. Además se le proporcionará un cepillo dental y un tubo de pasta de dientes.

Justificación de la Investigación.

La caries dental es la enfermedad buco dental más prevalente en Latinoamérica, siendo la enfermedad crónica más frecuente en la población, afectando a más del 96% de los adultos.

En Chile la realidad no es distinta, la caries dental aumenta sostenidamente con la edad, según la edad del grupo estudiado, corresponde a un 17% a los 2 años, un 48.02% a los 4 años, un 70.36% a los 6 años, un 62.5% a los 12 años, aumentando drásticamente a un 98% en la población entre 35 a 44 años, llegando a un 100% de la población con Experiencia de caries entre los 65 a 74 años.

Su origen es infeccioso y se asocia con la presencia de altas poblaciones de bacterias adheridas sobre los dientes. Las lesiones de caries se establecen tanto en dientes sanos como en dientes que han sido restaurados (tapadura).

El análisis de la actual investigación, nos permite estudiar una nueva forma preventiva en el conocimiento de la enfermedad caries dental, donde algunos compuestos propios de la boca, actuarían como un importante factor que reducen el apareamiento de lesiones de caries dental. Estos compuestos de amonio podrían inhibir potencialmente el desarrollo de la caries dental porque neutralizaría los ácidos que deterioran los dientes y modificaría la proporción de los gérmenes que producen las caries, favoreciendo las condiciones para el mantenimiento de la salud oral.

Esta investigación pretende contribuir en el inicio de un camino que se vislumbra prometedor para la comprensión de la caries dental, particularmente en niños, con la finalidad futura de buscar nuevas formas para prevenir la caries dental. Su fecha de inicio es Marzo de 2013.

Objetivo de la Investigación.

El presente estudio tiene por objeto recolectar muestras de saliva y placa bacteriana ubicadas sobre los dientes de su hijo (a) o pupilo (a) para medir la cantidad de ciertos compuestos que podrían entenderse como protectores de la generación de caries que tiene la boca de hijo (a) o pupilo (a).

Beneficio de participar en esta Investigación.

Usted aportará información no disponible sobre las ventajas y desventajas de conocer la presencia y cantidad de compuestos propios de la boca que funcionarían como protectores contra las caries.

Adicionalmente se reforzará la técnica de higiene oral de su hijo (a) o pupilo (a) y se le entregará un informe escrito con el actual estado de su salud oral.

Tipo de Intervención y Procedimiento.

Si usted decide que su hijo (a) o pupilo (a) participe se le realizará un examen bucal con evaluación de la saliva y placa bacteriana y se le instruirá sobre la mejor técnica de higiene oral.

Se coleccionará 5 ml de saliva completa que se depositará en un tubo estéril que se mantendrá a baja temperatura (4°C). El fluido de placa será recogido de las superficies dentales con material apropiado estéril y coleccionado en tubos rotulados en una solución de acidez controlada, que se mantendrá a baja temperatura (4°C). El almacenamiento y procesamiento se hará en las dependencias de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Riesgo de participar en la Investigación.

Su hijo (a) o pupilo (a) no correrá ningún riesgo durante y posterior al procedimiento de la investigación debido a que en esta oportunidad no será sometido (a) a ningún procedimiento, sólo se efectuará la toma de muestra no invasiva y se evaluará la condición de los dientes. En caso que alguno de ellos presente problema, será informado por escrito para que sea atendido en la clínica correspondiente para su tratamiento en las condiciones que los protocolos recomienden.

Criterios de Inclusión y Exclusión.

Inclusión: niños 6-7años, de ambos sexos con y sin lesiones de caries dentarias.

Exclusión: enfermedades que afecten la tasa de secreción salival, ingesta antibióticos, uso de enjuagatorios bucales, si su hijo (a) o pupilo (a) presenta alguna o varias condiciones mencionadas, queda impedido de participar en el estudio.

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 del estudio cuando lo desee.
- No tendrá que efectuar gasto alguno como consecuencia del estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- Una vez concluido el presente estudio, los voluntarios participantes recibirán un informe escrito en sobre cerrado entregado en el colegio respectivo.
- Usted podrá solicitar información actualizada sobre el estudio, al investigador responsable o solicitar la exposición a la comunidad educativa los resultados.
- La información obtenida de la Investigación, respecto de la identificación de pacientes, será codificada para garantizar la confidencialidad de los datos por parte de los investigadores.
- Si considera que no existen dudas ni preguntas acerca de su participación, puede si lo desea, firmar el Formulario de Consentimiento Informado anexa al documento.
- En caso de cualquier duda Ud. puede acudir a Av. La Paz 571, Facultad de Odontología de Universidad de Chile, Área de Operatoria Dental los días Lunes de 8 a 13 horas o Miércoles de 14 a 19 horas o comunicarse con Gustavo Moncada o Javier Martin al número 02-978-1742.
- El presente Consentimiento ha sido visado por la Comisión de Ética de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, Preside el comité, Prof. Dr. Juan Cortés Araya, Cirujano dentista, Profesor Titular, Vicedecano de la Facultad de Odontología, Universidad de Chile, e-mail: vicedeca@odontologia.uchile.cl.



Formulario de Consentimiento Informado

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

1. He leído y comprendido la información anteriormente entregada y que mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria.
2. He sido informado (a) y comprendo la necesidad y fines del estudio que se le realizará a mi hijo (a) o pupilo (a).
3. Tengo conocimiento del procedimiento que se le realizará a mi hijo (a) o pupilo (a).
4. Conozco los beneficios de participar en la Investigación
5. El procedimiento no tiene riesgo alguno para la salud de mi hijo (a) o pupilo (a).
6. Además de esta información que he recibido, seré informado/a en cada momento y al requerimiento de la evolución del proceso, de manera verbal y/o escrita si fuera necesaria y al criterio del investigador.
7. Autorizo a usar el caso de mi hijo (a) o pupilo (a) para investigación y para ser usado como material audiovisual en clases, protegiendo mi identidad.

Yo ,rut_ , Doy mi consentimiento al investigador y al resto de colaboradores, para realizar el procedimiento diagnóstico pertinente a mi hijo (a) o pupilo (a).....nacido el.....(día/mes/año) y autorizo la utilización de las muestras de saliva y biopelícula oral de mi hijo(a) o pupilo(a), donadas voluntariamente, para ser estudiadas y analizadas en el marco de este proyecto de investigación para la medición de la actividad de ureasa y arginina deiminasa en saliva y placa dental realizada por el Odontólogo Dr. Gustavo Moncada Cortés. Además fui informada (o) que para este estudio sólo se utilizarán de mis datos aportados: la cantidad de dientes cariados, sanos, obturados (tapados) y perdidos de mi hijo (a) o pupilo (a), el resto de los datos personales serán absolutamente resguardados. Acepto PUESTO QUE SE QUE ES POR MI PROPIO INTERÉS Y EL DE MI HIJO (A) O PUPILO.

Nombre del Padre-Madre, Tutor o Representante Legal:

Firma: _____ Fecha de Toma del CI: _____

Nombre del Investigador que toma el CI:

Firma: _____ Fecha de Toma del CI: _____

Nombre del Investigador Principal

Firma: ----- Fecha: -----

--



Anexo 4. Ficha Clínica

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

FICHA DE SALUD ORAL

NOMBRE DE COLEGIO:.....

COMUNA:.....**REGIÓN:**.....

AÑO (4) MES (5)

DIA (6)

Nº FICHA (7)

Nº EXAMINADOR (8)

--	--	--	--

--	--

--	--

--	--	--	--

--	--

INFORMACIÓN GENERAL:

NOMBRE(9)

Cumple con ayuno y abstenerse de higiene oral durante últimas 10 horas:.....

EDAD EN AÑOS(10)

--	--

GÉNERO(11)

M= 1 F= 2

--

LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA (12)

ESTADO SOCIOECONÓMICO (13)

URBANA=1 RURAL=2

1= ALTO

2=MEDIO

3= BAJO

--

--

TIPO DE DENTICIÓN Y NECESIDADES DE TRATAMIENTO (14)



1 = TEMPORAL

2 = MIXTA PRIMERA FASE. (INCIS., 1° M. PERMAN.)

3 = MIXTA SEGUNDA FASE. (PREMOLARES) 4 = PERMANENTE (COMPLETA PERMANENTE)

MAXILAR SUPERIOR

		55	54	53	52	51		61	62	63	64	65				
D	(15)													(24)		
T	(25)													(34)		
		17	16	15	14	13	12	11		21	22	23	24	25	26	27
(35)																(48)
(49)																(62)

MAXILAR INFERIOR

		47	46	45	44	43	42	41		31	32	33	34	35	36	37
(63)																(76)
(77)																(90)
		85	84	83	82	81		71	72	73	74	75				
D	(91)													(100)		
T	(101)													(110)		

DIENTE TEMPORAL (T) PERMANENTE (P)

<u>DIAGNÓSTICO</u>			<u>TRATAMIENTO</u>			
	T	P				
A	0	=	SANO	0	=	NO NECESITA
B	1	=	CARIADO	1	=	SELLANTE O DETENCIÓN DE CARIES
C	2	=	OBTURADO Y CARIADO	2	=	OBTURAR UNA SUPERFICIE
D	3	=	OBTURADO	3	=	OBTURAR DOS O MÁS SUPERFICIES
E	4	=	PERDIDO POR CARIES	4	=	CORONA O PILAR DE PUENTE
F	5	=	INDICACIÓN EXTRACCIÓN POR CARIES	5	=	INTERMEDIARIO
G	6	=	PERDIDO POR OTRA RAZÓN	6	=	TRATAMIENTO PULPAR
H	7	=	CORONA O PILAR DE PUENTE	7	=	EXTRACCIÓN
I	8	=	NO ERUPCIONADO	8	=	OTRAS NECESIDADES
J	9	=	EXCLUIDO	9	=	ESPECIFICAR.....

COPD : _____ ceod: _____

<i>C</i>	<i>O</i>	<i>P</i>

<i>c</i>	<i>e</i>	<i>o</i>

Índice de Green y Vermellón: _____

INSTRUCTIVO DE FICHA DE SALUD BUCAL

Colegio: Coloque el nombre del establecimiento

Comuna: Indique la comuna a que pertenece

Fecha: El año, mes y día registrarlos sólo el día del examen.

Número de Ficha: Cada niño debe tener su número de identificación y es necesario que cada número de ficha se use una sola vez.

Examinador: Cada examinador tiene asignado un número y un volumen de fichas en forma correlativa.

NOMBRE EXAMINADOR	NÚMERO ASIGNADO	No de FICHA
Lorena Duperat	1	
Jéssica Maureira	2	

Nombre del alumno: El nombre del alumno debe registrarse con letra imprenta empezando por el apellido.

Edad: Colocar la edad en años cumplidos.

Localización geográfica: Especificar si es urbana o rural

REGISTRO DE ÍNDICES: COP-D y ceo-d

Registro de los dientes presentes: Encerrar en un círculo la nomenclatura correspondiente. Ej. Encerrar (55) o (15).

Diagnóstico y Tratamiento: Anotación en los recuadros.

ESTADO: En los recuadros, 15-24; 35-48; 63-76 y 85-75, anotar el diagnóstico de acuerdo a los códigos de la columna izquierda.

TRATAMIENTO: En los recuadros 25-34; 49-62; 77- 90 y 101-110, anotar el tratamiento indicado de acuerdo a los códigos de la columna derecha

INDICE DE GREEN Y VERMELLON: colocar en la casilla, el número correspondiente al índice de green y vermellón. Piezas superiores es medido por la cara vestibular y piezas inferiores por la cara lingual.

Anexo 5: Informe de Caries

UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

“INFORME DE DIAGNÓSTICO Y NECESIDAD DE TRATAMIENTO DE LOS ALUMNOS DEL COLEGIO....., PARTICIPANTES DEL ESTUDIO “MEDICIÓN DE ÁLCALI MEDIANTE LA ACTIVIDAD DE UREASA Y ARGININA DEIMINIASA EN SALIVA Y PLACA DENTAL EN NIÑOS DE 8 AÑOS, CON DISTINTA EXPERIENCIA DE CARIES DENTAL”

Nombre del alumno:.....

Diagnóstico

Gingivitis (inflamación de la encía):	Sí	No	
Caries:	Sí	No	Nº:

Tratamiento

Profilaxis (limpieza):	Sí	No	
Exodoncias (Extracciones):	Sí	No	Nº:
Obturaciones (tapaduras):	Sí	No	Nº:
Sellantes:	Sí	No	Nº:

Observaciones:.....

...

.....

Gracias por su tiempo y colaboración en este estudio. Se despiden atentamente.



Anexo 6: Acta de Aprobación de Protocolo de Investigación.

11/10/2012

ACTA DE APROBACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

ACTA N°: 2012/13

1. Acta de aprobación de protocolo de estudio N° 2012/21

1. Miembros permanentes del Comité Ético-Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile participantes en la aprobación del Proyecto:

Dr. Eduardo Rodríguez
Miembro permanente del CEC

Dr. Alejandro Escobar
Miembro permanente del CEC

Dra. Ximena Lee
Miembro permanente del CEC

Dra. Claudia Lefimil
Miembro permanente del CEC

Dra. Karin Lagos
Miembro permanente del CEC

3. Fecha de Aprobación: 03/10/2012

4. Título completo del proyecto: "Caracterización de la Producción de Alcali por cepas bacterianas de placa microbiana y saliva en pacientes con distinta Experiencia de caries dental" FONIS SA12I2283 versión año 2012.

5. Investigador responsable: Prof. Dr. Gustavo Adolfo Moncada Cortés, académico del Departamento de Odontología Restauradora. Facultad de Odontología, Universidad de Chile

6. Institución: Facultad de Odontología, Universidad de Chile y Fonis.

7. Documentación Revisada:

- Protocolo versión en español del Proyecto: "Caracterización de la Producción de Alcali por cepas bacterianas de placa microbiana y saliva en pacientes con distinta Experiencia de caries dental" FONIS SA12I2283 versión año 2012.
- Documento de Consentimiento informado, versión 11/10/2012.
- Currículo del investigador responsable y del Coinvestigador.

8. Carácter del estudio y de la muestra:

Estudio descriptivo analítico de la Producción de Alcali por cepas bacterianas de placa microbiana y saliva en pacientes con distinta Experiencia de caries dental. En una muestra de 385 niños entre 6 y 7 años de estratos sociales bajos y medio bajos de buena salud general del área norte del Gran Santiago.

9. Fundamentación de la aprobación ética

La caries dental constituye un gran problema en la salud bucal de nuestra población chilena, y se han realizado constantes exploraciones de nuevas estrategias tanto en prevención, tratamiento, así como de la evaluación del riesgo cariogénico en diferentes condiciones. La sucesión de ciclos de desmineralización-remineralización de las superficies de los dientes han sido estudiados, y se ha relacionado la exposición prolongada del ambiente bucal a ácidos como una de las causas de la caries dental, ello se asocia a la actividad metabólica de la microbiota cariogénica, en saliva y/o placa. Sin embargo pero muy poco se ha dicho sobre la producción de sustancias alcalinas que participan en este equilibrio. Esta investigación contempla establecer protocolos para la medición de la actividad alcalinogénica en saliva, reproducible a largo plazo, en vista a proveer de un ensayo de laboratorio que permita una predicción del riesgo de caries en la población infantil de 6 y 7 años.

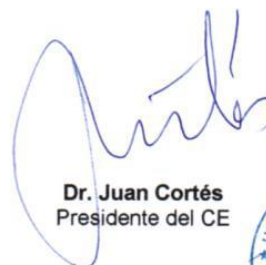
Esto constituye un aporte desde el punto de vista diagnóstico y una herramienta de seguimiento en procesos de intervención contra la caries dental. Con ello se pretende establecer la base que permita a la Cariología seguir los estudios, hacia una mayor comprensión de la microbiología, bioquímica, y el impacto en la salud y enfermedad de la producción de álcalis en saliva y biopelícula oral humana.

El investigador principal ha tomado las precauciones respecto al trabajo con una población de niños, respecto al uso de muestras de saliva y no se declaran riesgos mayores para el grupo en estudio. La información que se entregara a los padres de los niños posibles participantes es considerada adecuada por este comité. También ha resguardado la confidencialidad de los datos y ha incorporado en el documento de consentimiento informado las modificaciones sugeridas por este Comité, a saber:

- Incluyó los datos de las instituciones patrocinantes: Fonis y Universidad de Chile.
- Indicó cómo se llevará a cabo la toma de muestras de placa y saliva.
- Incluyo criterios de inclusión y exclusión, y la fecha de edición del C.I.
- Indicó los datos de Presidente del CEC
- Explicitó la forma cómo el paciente puede obtener la información relativa a los resultados de su examen y que todos los datos serán codificados.
- Mejoró el lenguaje e incluyó que en caso de ser necesario, se indicará que consulte con su dentista tratante.

Esta investigación cumple con la declaración de Helsinsky y las pautas CIOMS, ajustándose a los estándares científicos y éticos de la disciplina.

En consecuencia, el Comité Ético Científico de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile, **aprueba** el estudio "Caracterización de la Producción de Alcali por cepas bacterianas de placa microbiana y saliva en pacientes con distinta Experiencia de caries dental" FONIS SA12I2283 versión año 2012 y el Documento de Consentimiento informado, versión 11/10/2012.


Dr. Juan Cortés
Presidente del CE



c/c.: Investigador Principal y Secretaría C.E.C.