



UNIVERSIDAD
Finis Terrae

UNIVERSIDAD FINIS TERRAE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
ESCUELA DE ODONTOLOGÍA

**GENOTIPIFICACIÓN DE *STREPTOCOCCUS MUTANS*, Y SU
RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE CARIES EN PACIENTES
PEDIÁTRICOS ATENDIDOS EN LA UNIVERSIDAD FINIS TERRAE
EN EL AÑO 2019**

NICOLE URZÚA LABRA
DANAE VARAS ASTORGA

Tesis presentada a la Facultad de Odontología de la Universidad Finis Terrae,
para optar al título de Cirujano Dentista

Profesor Guía: Dra. Estefanía Castillo Vargas

Santiago, Chile

2019

AGRADECIMIENTOS

El camino para llegar aquí no fue fácil, fue un recorrido lleno de aprendizajes, de momentos de estrés que sólo nosotros entendemos, de caídas, días malos, días buenos, pero al final de todo, lo importante es pararse con más fuerza, si retrocedemos un paso avanzamos dos de un salto. Gracias a la Institución que fue como nuestro segundo hogar, a nuestros doctores que fueron nuestros pilotos en la educación y profesionales que el día de mañana seremos, gracias a nuestros compañeros, de este camino pudimos sacar amigas y amigos que son como hermanos.

Gracias a la Dra. Estefanía Castillo, que siempre tuvo la mejor disposición de ayudarnos en esta tarea.

Un especial agradecimiento a nuestras familias, que a pesar de todo siempre estuvieron ahí, incondicionales.

Un beso al cielo para ti Tata, abuelo dentista, sin tí nunca hubiese sabido lo lindo de la Odontología.

Un beso al cielo para ti Papá, sin ti no hubiese sido lo que soy hoy, tu recuerdo siempre está conmigo.

ÍNDICE

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	3
OBJETIVOS.....	17
METODOLOGÍA.....	18
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	21
RESULTADOS.....	22
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES.....	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
ANEXOS.....	42

RESUMEN

Introducción: De las patologías orales que afectan a los seres humanos, la caries es probablemente la más prevalente. Actualmente se han descrito varios microorganismos involucrados en la patogénesis de una lesión de caries, entre los cuales *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) es el agente más relevante asociado a esta patología. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar su presencia en saliva es una de las alternativas para su identificación rápida y segura. Acción de diferentes genotipos, con diferentes potenciales fenotípicos, dan como resultado diferentes atributos de virulencia que pueden aumentar el riesgo de desarrollar caries en un individuo.

Materiales y métodos: Se invitó a participar en este estudio a 20 niños entre 6-12 años atendidos en la universidad Finis Terrae con distintas experiencias de caries, a partir de ellas se realizó reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De este proceso se analizaron las muestras en geles de agarosa al 2%.

Resultados: Se conoció e identificó mediante reacción en cadena de la polimerasa con partidores arbitrarios, la presencia de distintos genotipos de *S. mutans* en la cavidad bucal de niños atendidos en la clínica odontológica de la Universidad Finis Terrae.

Conclusión: Pacientes pediátricos atendidos en la clínica odontológica de la Universidad Finis Terrae, presentan diferentes genotipos de *S. mutans* asociado o no a caries.

ABSTRACT

Introduction: Of the oral pathologies that affect humans, dental caries is probably the most prevalent. Currently several microorganisms have been associated to the pathogenesis of dental caries, where *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) is one of the most relevant agents. The polymerase chain reaction (PCR) technique to detect its presence in saliva is one of the alternatives for its rapid and safe identification. Action of different genotypes, with different phenotypic potentials, results in different virulence attributes that may increase the risk of developing caries in an individual.

Materials and methods: 20 children between 6-12 years old attended at the Finis Terrae university with different caries experiences were invited to participate in this study, from which polymerase chain reaction (PCR) was performed. From this process the samples were analyzed in 2% agarose gels.

Results: The presence of different *S. mutans* genotypes in the oral cavity of children treated in the dental clinic of the Finis Terrae University was known and identified by polymerase chain reaction with arbitrary starters.

Conclusion: Pediatric patients treated in the dental clinic of the Finis Terrae University, present different genotypes of *S. mutans* associated or not with caries.

INTRODUCCIÓN

De las patologías orales que afectan a los seres humanos, la caries es probablemente la más prevalente (1). La lesión de caries se describe como “un proceso dinámico de desmineralización y remineralización, producto del metabolismo bacteriano sobre la superficie dentaria, que con el tiempo puede producir una pérdida neta de minerales y posiblemente, aunque no siempre, resultará en la presencia de una cavidad” (1). Las bacterias orales pertenecen a una comunidad compleja de numerosas especies que participan en la formación de la placa bacteriana (biofilm o biopelícula) con todas sus funciones, interacciones y propiedades (1).

Actualmente se han involucrado diferentes microorganismos a la patogénesis de la caries, tales como estreptococos del grupo mutans, *Lactobacillus spp* y *Actinomyces spp*. Entre éstos, la especie *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) es el agente más importante asociado a esta patología (1).

El estudio de la participación de *S. mutans* en la colonización de tejidos dentales, implantación e interacción con otros microorganismos es de gran importancia para poder comprender la dinámica de las biopelículas dentales. Por medio de técnicas de biología molecular, se ha avanzado en la identificación de los diferentes tipos que habitan la cavidad oral, los productos que generan y que son críticos para su implantación, las interacciones con otras especies y el desarrollo de nuevos procedimientos que ayuden su identificación como uno de los agentes más importantes en la caries dental (1).

Una característica importante de *Streptococcus mutans* es la persistencia de sus genotipos en la cavidad oral de adultos, adolescentes y niños mayores de cinco años. Este fenómeno es conocido como persistencia "intraindividual" y revela la relativa estabilidad que estos alcanzan en un hospedador y la relación con la expresión de características fenotípicas que les pueden dar ventajas para la

supervivencia, como la capacidad de formar biopelículas, de adherirse y soportar las fluctuaciones del pH (2).

El conocimiento acerca del microorganismo cariogénico más importante relacionado con la caries ha aumentado, lo cual amplía nuestro entendimiento acerca de las vastas correlaciones que se dan desde su implantación en los tejidos orales, como en la progresión de la enfermedad y de la amplia gama de interacciones con todos los demás factores (1).

Hasta algunos años, los métodos microbiológicos y bioquímicos disponibles permitían la detección e identificación de *Streptococcus mutans* y *sobrinus*. Sin embargo, el proceso requiere de un laboratorio de microbiología equipado lo que implica espacio y recursos, además de personal calificado y con experiencia para definir las diferencias entre ambas especies. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *polymerase chain reaction*) para detectar su presencia en saliva es una alternativa eficiente para identificación rápida y segura de la presencia de estas especies en el paciente (1).

En el caso de *S. mutans*, la existencia de diferentes genotipos, con diferentes potenciales fenotípicos, dan como resultado atributos variables de virulencia que pueden aumentar el riesgo de desarrollar caries en un individuo (3).

Aunque ha habido importantes avances en este campo, es necesario continuar con el estudio de *Streptococcus mutans* y las diferentes cepas que constituyen esta especie además de desarrollar metodologías adecuadas para su control en etapas tempranas y poder restablecer el equilibrio perdido que genera la caries dental. Las técnicas de biología molecular han sido de gran ayuda en la identificación y caracterización del *Streptococcus mutans* (1).

Es por esto, que este trabajo pretende apoyarse de técnicas de biología molecular como el PCR para identificar *S. mutans* desde saliva de pacientes, y genotipificarlos.

MARCO TEÓRICO

1. MICROBIOTA BUCAL

De acuerdo a diversos estudios clínicos y moleculares, se ha determinado que las superficies orales son colonizadas por microorganismos desde el momento del parto (4).

Durante el desarrollo postnatal, los cambios fisiológicos como tipo de alimentación, la erupción de los dientes primarios y sustitución de la dentición primaria por dentición permanente entre otros, alteran en gran medida la ecología bucal impactando los hábitats microbianos, los cuales, a su vez, pueden dar lugar a cambios de composición de la comunidad microbiana en las diferentes fases de la vida de las personas. La estructura filogenética microbiana y la composición ecológica de las comunidades microbianas varían con el envejecimiento, por lo que la microbiota oral debe ser definida en base a la edad y nichos orales (4).

La microbiota juega un papel fundamental en la inducción, la formación y la función del sistema inmune del huésped (5). Cuando esta interacción funciona de manera óptima, se genera la inducción de respuestas protectoras a los patógenos y las vías de regulación implicados en el mantenimiento de la tolerancia a antígenos inocuos (5).

La cavidad oral humana está fuertemente colonizada por microorganismos, incluyendo virus, protozoos, hongos, bacterias y arqueas. La disbiosis de la microbiota normal de la boca, se asocia principalmente a dos enfermedades orales, prevalentes en el hombre: la caries, y la enfermedad periodontal (6).

Las comunidades bacterianas que se encuentran en la boca son muy complejas, con participación de alrededor de 1,000 especies de diversas especies de microorganismos (7). La microbiota de la mucosa bucal está constituida, salvo en

las encías y los labios, casi exclusivamente por bacterias tipo cocos grampositivos anaerobios facultativos y, en especial, por *Streptococcus viridans*. Los labios, al representar una zona de transición de piel a mucosas, están colonizados por una microbiota cutánea como *Staphylococcus epidermidis* y por especies de los géneros *Kocuria* y *Micrococcus*; además, se detectan también abundantes *Streptococcus viridans* procedentes de la saliva y el dorso de la lengua debido la acción del humedecimiento labial. En la mucosa yugal predominan también los *Streptococcus viridans*, destacando *Streptococcus mitis*; le siguen en frecuencia *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus salivarius*; también se identifican otros microorganismos presentes en la saliva. En el paladar duro existe una microbiota estreptocócica similar a la de la mucosa yugal. En el paladar blando aparecen bacterias propias de las vías respiratorias altas como especies de *Haemophilus*, *Corynebacterium* y *Neisseria*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus viridans*. La microbiota de la encía está íntimamente relacionada con la de la placa coronal lisa en la unión dentogingival y con la de localización subgingival (8).

2. LESIONES DE CARIES

La lesión de caries es un proceso de desmineralización mediado por bacterias presentes en la cavidad oral, que puede estar condicionado por diversos factores bio-socio-ambientales y que constituye actualmente la enfermedad más prevalente en el ser humano, observándose que entre el 90-95% de la población mundial sufre esta patología (9), siendo la principal causa de la pérdida de dientes (27). Se caracteriza por ser resultado de un desequilibrio bioquímico gatillado por cambios de pH locales inducidos por bacterias, los que al mediano plazo provocan una lesión (cavitación), y alteraciones del complejo dentino-pulpar. Es una enfermedad de origen multifactorial, en la que existe interacción durante un período de tiempo variable de tres factores principales: un huésped susceptible, especies bacterianas que conforman la microflora oral, y un sustrato apropiado (12).

El análisis epidemiológico de este problema de salud se ha abordado atendiendo a múltiples variables y enfoques del proceso salud-enfermedad tales como: edad y sexo, áreas geográficas, dieta, patrones familiares, relación con otros padecimientos y condiciones de vida, con concepciones basadas en la multicausalidad, entre otras (10).

La caries es considerada una de las enfermedades orales más frecuentes de la infancia, convirtiéndose en un desafío para la salud pública. La OMS ha estimado que entre el 60 y 90% de los niños del mundo presentan lesiones de caries con cavitación evidente. La prevalencia a nivel de Latinoamérica no es menos alarmante, alcanzando valores hasta del 90% (11).

La saliva contiene componentes que participan en la prevención de la desmineralización del esmalte. Adicionalmente, tiene un papel importante en la remineralización, y es esencial en el balance ácido-base de la placa. Las macromoléculas salivales están comprometidas con la funciones de formación de la película adquirida. Así también se han aislado en la saliva, péptidos y proteínas con actividad antimicrobiana (12).

Los microorganismos involucrados en la generación de lesiones de caries sintetizan enzimas capaces de catalizar la formación de glucanos extracelulares bacterianos, moléculas que además de facilitar la adhesión de las bacterias a la superficie del esmalte, pueden ser utilizados por estas como fuente de energía, generando en este proceso metabólico moléculas ácidas que gatillan la disminución local de pH (12).

2.1 PATOGÉNESIS DE LA CARIES DENTAL

La caries es un proceso dinámico y crónico, que ocurre en la estructura dentaria en contacto con los depósitos microbianos y debido al desequilibrio entre la sustancia dental y el fluido de placa circundante. Estos eventos inducen una

pérdida de mineral de la superficie dental, cuyo signo es la destrucción localizada de tejidos duros (12).

La lesión cariosa se define como un mecanismo dinámico de desmineralización y remineralización, como resultado del metabolismo microbiano sobre la superficie dentaria, en la cual con el tiempo puede resultar una pérdida neta de mineral y es posible que posteriormente se forme una cavidad. Concluyendo entonces, que la caries es el signo de la enfermedad y no la enfermedad en si misma (12).

La caries es una enfermedad de origen multifactorial en la que existe interacción de tres factores principales: el huésped (higiene bucal, la saliva y los dientes), la microflora (disbiosis) y el sustrato (dieta cariogénica). Además de estos factores, debe considerarse el tiempo como un factor adicional: para que se genere una lesión cariosa, es necesario que las condiciones de cada factor sean favorables. Es decir, un huésped susceptible, una microflora oral desbalanceada y asociada a cariogénesis además de un sustrato apropiado, lo que deberá mantenerse durante un período determinado de tiempo (12).

Se han planteado diferentes teorías para explicar la formación de una lesión de caries. A continuación, se exponen dos de las más conocidas (12).

Teoría acidófila de Miller.

Esta teoría comprende los hechos principales siguientes:

1. En la cavidad oral existen bacterias capaces de producir ácidos, especialmente el láctico, mediante la vía glucolítica anaerobia, a partir de los azúcares.
2. El esmalte está compuesto, en su mayor parte, por sales de calcio, las cuales pueden disolverse por la acción de los ácidos orgánicos.
3. La formación de ácido en la placa dental se puede observar directamente en la boca, después de ingerir glúcidos.

4. Por la acción de estos ácidos, el pH desciende por debajo de 5,5 (pH crítico), en zonas limitadas de la superficie del esmalte y se inicia la descalcificación (12).

Teoría de la proteólisis-quelación de Schatz y Martín

Atribuye la caries dental a 2 reacciones interrelacionadas, que ocurren simultáneamente:

- Destrucción microbiana de la matriz orgánica del diente mayormente proteínica.
- Disolución de los cristales de apatita por la acción de los agentes de quelación orgánicos (ácidos, aminoácidos, aminos, péptidos y glúcidos), algunos de los cuales se originan como producto de la descomposición de la matriz, otros están presentes en los alimentos, la saliva y en la costra que puede recubrir los dientes o sarro dentario (12).

2.2 FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA DENTAL

La cavidad bucal es considerada un ecosistema poblado por microorganismos fisiológica y metabólicamente diferentes, los cuales coexisten exitosamente gracias a mecanismos adaptativos y a la existencia de nichos diversos de acuerdo a sus necesidades tales como las superficies de los dientes, el surco gingival, la lengua, las amígdalas, las superficies mucosas que revisten la boca, entre otros (13). Diferentes eventos ambientales de diferente naturaleza inducen modificaciones de la flora comensal y, en algunos casos, los microorganismos proliferan de manera tal que atentan contra el equilibrio biótico y poniendo a prueba al sistema inmune del hospedero (14.) Este tipo de eventos gatillan las primeras fases de enfermedades gingivales y periodontales, cuyo principal factor patogénico es la acumulación de placa bacteriana o biofilm (13).

Las bacterias existen en la naturaleza bajo dos estados: bacterias planctónicas, de libre flotación (1%) y bacterias sésiles, integrantes de colonias de

microorganismos llamadas biofilms o biopelículas (99%). Las biopelículas se forman cuando las bacterias en suspensión encuentran una superficie a la cual adherirse, para luego sintetizar señales químicas que permiten coordinar la formación de una estructura compuesta por polisacáridos, que cumple un rol principalmente protector (13).

En el año 2002 se generó una descripción ampliamente aceptada de biofilm, estableciendo que es "una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un sustrato o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido, y exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica (15).

La biopelícula supragingival está unida a la superficie dentaria y se encuentra formada predominantemente por *Actinomyces*. Sin embargo, la naturaleza de la biopelícula subgingival es más complicada, ya que existen dos biopelículas diferentes: una asociada a la superficie radicular y otra en íntima relación con la superficie epitelial de la pared blanda de la bolsa. Esta última contiene predominantemente espiroquetas y especies gram negativas (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*). Entre las dos biopelículas, existe una zona de baja densidad celular compuesta por bacterias débilmente unidas, que parecen estar en estado planctónico (13).

2.3 STREPTOCOCCUS MUTANS

Streptococcus mutans (*S. mutans*) es una especie bacteriana que forma parte de la microbiota comensal de la cavidad oral. En un trabajo publicado el año 1980, Hamada la describe como "un coco Gram positivo, dispuesto en cadena, no móvil, catalasa negativo, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar el pH del entorno desde 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas. Fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con la producción de ácido. *Streptococcus mutans* se ha subclasificado en varios tipos

con base en las propiedades inmunológicas, biológicas y genéticas: los serotipos de *Streptococcus mutans* son c, e, f y k. El hábitat natural de *S. mutans* es la boca humana, donde las colonias se adhieren muy cerca de la superficie del diente e igualmente se puede recuperar en lesiones cariosas. Puede aislarse frecuentemente de heces en humanos y ratas, así como también ha sido aislado desde hámsteres de experimentación (17).”

Las cepas de *S. mutans* son fenotípicamente homogéneas. Sin embargo, recientes investigaciones han revelado un gran nivel de la heterogeneidad serológica, genética y bioquímica de *S. mutans*. La heterogeneidad también se observa a nivel de enzimas producidas por las diferentes especies de *S. mutans* tales como las deshidrogenasas, glucosiltransferasas, aldolasas e invertasas. La serotipificación es un procedimiento rutinario y de mucho valor para determinar otros grupos inmunológicos y tipos de estreptococos (1).

Se ha considerado comúnmente, que la colonización de la cavidad oral de los niños por *S. mutans* ("ventana" de infección) ocurre al producirse la erupción del primer diente, es decir, alrededor de los seis meses de edad.

En un estudio realizado el año 2005, se identificaron unos 52 genotipos diferentes en niños, pero las madres eran responsables de la transmisión de 16 de ellos (1). Se observa una tendencia hacia la estabilidad de los genotipos transmitidos por las madres, en parte, porque la colonización del genotipo materno pueda interferir con la colonización de otros genotipos. Se ha observado que los niños albergan de uno a cinco genotipos diferentes de *S. mutans* en diferentes edades. La diversidad genotípica de *S. mutans* en cuatro sitios de muestreo (saliva, dorso de la lengua, mucosa alveolar y biopelícula dental) de niños parece ser homogénea en este estudio. Sin embargo, la biopelícula dental es un lugar muy importante dado el gran número de genotipos de *S. mutans* y las cepas aisladas. Se ha demostrado un alto grado de homología entre cepas de *S. mutans* recuperadas de miembros de la misma familia, lo que permite deducir la existencia

de transmisión vertical y horizontal, y una persistente colonización de *S. mutans* adquiridos previamente hasta la adultez temprana (1).

Se investigó la colonización inicial de *S. mutans* en un estudio prospectivo de 46 niños estadounidenses desde el nacimiento a 5 años de la edad, cuyas madres portaban altos niveles de *S. mutans*. De aquel estudio, la ventana de infectividad fue definida como el período a partir de 19 a 31 meses de edad, cuando el riesgo de adquisición de *S. mutans* era alto (19).

2.4 FACTORES DE RIESGO

La mayoría de los autores revisados para el desarrollo de esta tesis, coinciden en señalar que entre los factores de riesgo más importantes en la aparición de las caries en la población infantil se encuentran la mala higiene bucal, y la ingesta de azúcares en la dieta (20).

Respecto a la mala higiene bucal, numerosos estudios confirman que este factor es un riesgo significativo no sólo en la aparición de lesiones de caries, sino también en la prevalencia de ésta. Se considera que el cepillado dental sistemático puede suprimir la actividad bacteriana de la placa dental, y detener el desarrollo de las lesiones iniciales (21).

Otro factor de riesgo asociado a la generación de caries es la presencia de placa dentobacteriana, lo que se encuentra íntimamente ligado a la higiene bucal. El poder cariogénico de la placa dentobacteriana depende de varios factores, donde uno de los más importantes es su contenido microbiano. Además del nivel de infección por microorganismos de riesgo cariogénico, debemos considerar otros factores como el empaquetamiento celular, el grosor de la placa, el contenido de glucanos insolubles, la presencia del ión flúor, la concentración de ácidos y la frecuencia de episodios acidogénicos (22).

La dieta consumida también es un factor a considerar en la génesis de lesiones de caries. Las características de los alimentos consumidos tales como tipo, contenido

y concentración de azúcares, asociación de la sacarosa a otros carbohidratos fermentables como la lactosa, cereales y almidones o a frutas ácidas, la cantidad de minerales, la cantidad de sustancias neutralizadoras del pH ácido, la consistencia, el grado de adhesividad, el tamaño de las partículas, la velocidad con que es despejada, su nivel de acidez, entre otros.

Otros factores a considerar son los dependientes del individuo, tales como: preferencias alimentarias, frecuencia y momentos de consumo de alimentos dulces y ácidos, el tiempo en que estos permanecen en la boca, la eficiencia y sistematicidad de los procedimientos de higiene bucal, entre otros (23).

A su vez, se debe tener en cuenta la experiencia anterior de caries, el grado de severidad de las lesiones, la edad de presentación, las alteraciones cualitativas y cuantitativas de la saliva, la inexistencia de terapias de flúor sistémico o tópico, factores socioeconómicos, entre otros (23).

La experiencia de caries depende del balance entre el consumo de azúcares, la higiene oral y el uso del fluoruro. Hay tres conceptos científicos que son fundamentales en las nuevas mediciones para detectar, tratar y monitorear la caries: (1) la caries es un proceso dinámico, (2) la caries dental es un proceso continuo conformado por etapas que van desde reversible (pre-clínica) hasta irreversible (lesiones clínicamente detectables), y (3) el proceso de la caries es un balance de factores patológicos y protectores que pueden modularse para el manejo de la caries (21).

2.5 EPIDEMIOLOGÍA DE LA CARIES DENTAL EN PREESCOLARES CHILENOS

La caries dental constituye la afección bucal de mayor incidencia y prevalencia en el mundo. Estomatólogos de todos los tiempos han dedicado su quehacer a crear nuevas técnicas terapéuticas que permitan eliminar o al menos disminuir su morbilidad (25).

La caries temprana de la infancia (CTI) es una forma única de caries que se desarrolla en la dentición temporal. Es una enfermedad debilitante, que progresa rápidamente y que se caracteriza por angustia infantil, dolor e infección. Sus consecuencias a largo plazo podrían incluir una disminución en el crecimiento, malnutrición, problemas para dormir, además de una interrupción de la vida familiar. Aunque la CTI es clasificada como un proceso patológico relacionado especialmente a *S. mutans*, es importante considerar la influencia de otros factores y cómo estos pueden modificar la manera en la cual los tejidos dentarios reaccionan a los productos ácidos generados como producto del metabolismo bacteriano (26).

A pesar de que existen tecnologías preventivas capaces de dominarlas, controlarlas y/o erradicarlas, la odontología en Latinoamérica continúa usando métodos curativos, costosos, complejos y en algunos casos ineficientes, y se sigue ofreciendo a 90% de la población la exodoncia como única solución (27).

En relación a los aspectos epidemiológicos, la CTI constituye un serio problema de salud pública, siendo más prevalente en países en vías de desarrollo como el nuestro y comunidades desprotegidas de países desarrollados como son poblaciones de inmigrantes, minorías étnicas o zonas rurales en donde la prevalencia alcanza hasta un 90% (28).

Según el MINSAL, en Chile existen muy pocos estudios referentes al tema y de acuerdo a los datos disponibles la prevalencia varía desde un 7,8% a un 62,3%. Estas diferencias se deben principalmente a los diferentes criterios diagnósticos utilizados, y a que las poblaciones estudiadas presentan características sociales y demográficas diversas, imposibilitando la comparación de los resultados. A su vez, el último reporte ministerial no publicado reveló una prevalencia de caries de un 27% a los 2 años, y de un 48% a los 4 años (28).

Al igual que en otras investigaciones, no se encontró asociación estadísticamente significativa entre CTI y los factores encuesta de dieta cariogénica, aseo bucal,

frecuencia de cepillado y cepillado antes de dormir. Esto se debe a los sesgos de información propios de cualquier encuesta o entrevista, y que tiene que ver con la deseabilidad social, es decir, responden lo que creen que es correcto o lo que el profesional desea escuchar, ocultando la información verdadera (28).

3. MÉTODOS MOLECULARES DE ESTUDIO DE PATOLOGÍAS ORALES PREVALENTES

3.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

En la actualidad, estudios del área médica y odontológica cada vez se apoyan más de técnicas de biología molecular para el estudio de patologías. Entre las más usadas está la reacción en cadena de la polimerasa (o PCR, por el nombre en inglés *polymerase chain reaction*). Esta es una reacción enzimática *in vitro*, que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa, que tiene la capacidad de sintetizar ADN usando una hebra complementaria como molde. En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR (29).

El elemento principal en la PCR es el ADN, cuya naturaleza química ofrece ventajas para su manipulación (29).

La enzima comercial más usada es la “Taq ADN polimerasa”, la cual proviene de una bacteria termófila llamada *Thermus aquaticus*. Gracias a sus capacidades de sobrevivir en condiciones de temperatura muy altas, sus enzimas, entre ellas la ADN polimerasa, son capaces de soportar altas oscilaciones de temperaturas (29). Los “*primers*” o partidores son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar, y son complementarios a ésta. Generalmente su tamaño oscila entre 15-25 pares de bases y la cantidad de G-C no debe ser más del 55% de la secuencia. Si no se respetan estas reglas,

existe la posibilidad de la formación de dímeros de partidores, es decir, de productos inespecíficos. Esto repercute en el rendimiento de la reacción, así como en la especificidad del producto esperado. Son dos secuencias diferentes de primers las que se utilizan en la PCR, una denominada «*forward*» o sentido y otra «*reverse*» o antisentido; ambas deben estar diseñadas para que hibriden con el templado y las cadenas de ADN puedan ser extendidas por la Taq polimerasa en dirección 5'-3' (como sucede endógenamente) (29). Adicionalmente, la reacción requiere la adición de deoxi nucleótidos o dNTP's, que corresponden a una mezcla de los 4 nucleótidos que constituyen la hebra de DNA, usados por la DNA Taq polimerasa para generar la cadena complementaria a la molde (29). La reacción se realiza en una solución tampón o "*buffer*", generalmente compuesta de Tris-HCl (pH = 8) (29).

La reacción debe complementarse con magnesio, un ión bivalente que actúa como cofactor enzimático de la DNA Taq polimerasa que influye en la procesividad de la reacción (29).

Cada ciclo de la PCR se lleva a cabo en tres etapas principales: desnaturalización, hibridación y extensión. Brevemente, la **desnaturalización** se asocia a un incremento de temperatura a 95°C durante 20-30 segundos de acuerdo a la secuencia del templado, con el objetivo de separar la doble hebra de ADN. Luego, la fase de **hibridación** en la cual la temperatura funcional oscila entre 50 y 60°C, óptima para permitir la hibridación de los partidores. Por último, la fase de **extensión** cuya temperatura óptima es de 72°C, en la cual la ADN Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a alta velocidad. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, de 5' a 3'. La figura 1 resume los pasos previamente expuestos (29).

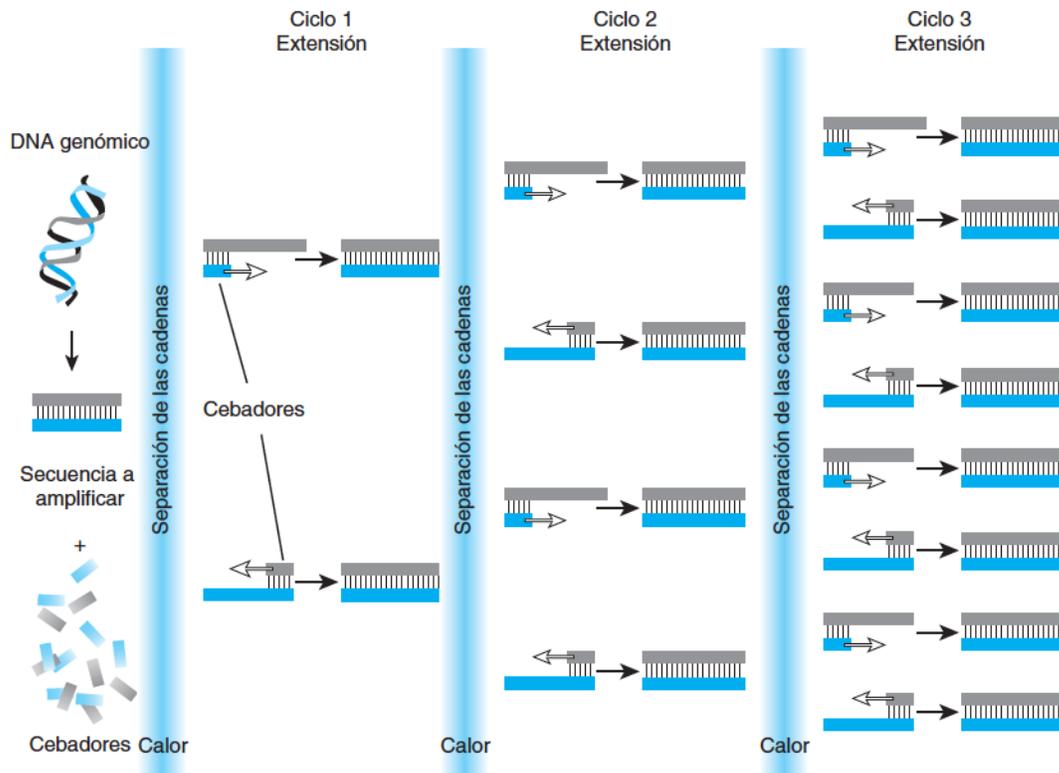


Figura 1. Pasos de un ciclo de la PCR (Figura de *Thompson y Thompson; Genética en Medicina 7ª edición*).

3.2 GENOTIPIFICACIÓN

La notable variabilidad de *S. mutans* ha sido demostrada por varios estudios, utilizando técnicas moleculares de secuenciación, electroforesis en gel de campo pulsado y PCR con primers arbitrarios (3). A través de este método, ha sido posible identificar alrededor de 52 genotipos diferentes de *S. mutans*, reportados en saliva y biopelículas dentales (3).

En Chile, son pocos los trabajos que se han enfocado en el estudio específico de los genotipos de *S. mutans* presentes en la población. Más aún, siendo los niños uno de los grupos más afectados por caries de acuerdo a los informes odontológicos publicados por el Ministerio de Salud, son los menos considerados en estudios de investigación microbiológica. Es por esto, que en este trabajo de

tesis buscamos evaluar un grupo de la población de niños atendidos en la Facultad de Odontología de la Universidad Finis Terrae, con el fin de determinar la variabilidad genotípica de las cepas de *S. mutans* presentes en estos pacientes.

OBJETIVO GENERAL

Conocer los distintos genotipos de *Streptococcus mutans* presentes en pacientes pediátricos atendidos en la clínica del niño en la Facultad de Odontología de la Universidad Finis Terrae

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar la diversidad genotípica de *S. mutans* en muestras de saliva de pacientes pediátricos de 6 a 12 años, atendidos en la clínica del niño de la Facultad de Odontología de la Universidad Finis Terrae.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. TIPO DE ESTUDIO

Este estudio es descriptivo, transversal.

2. POBLACIÓN Y MUESTRA

Se invitará a participar en este estudio a pacientes pediátricos que se presenten en la clínica de la Universidad Finis Terrae, a modo preventivo y/o rehabilitador. Se considerarán niños sanos entre 6-12 años de edad pertenecientes al nivel básico (n=20).

3. CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION

Criterios de inclusión:

Todo paciente pediátrico que se presente a la clínica del niño y acepte participar del estudio.

Criterios de exclusión:

Pacientes que presenten enfermedades crónicas

Pacientes que hayan recibido tratamiento con antibióticos durante los tres meses previos al examen o que usen aparatos ortodónticos.

A aquellas familias que accedan a participar, se les solicitará que lean y firmen un consentimiento informado, otorgando autorización para la toma de muestra y posteriores estudios a realizarse con ella. A su vez, se solicitará verbalmente el consentimiento al paciente, siendo necesarios ambos documentos para la extracción, almacenamiento y uso de la muestra.

4. VARIABLES

Genotipos de *S. mutans*:

Definición conceptual: Información genética que diferencia un organismo de otro dentro de una misma especie.

Naturaleza de la variable: Cualitativa

Nivel de medición: Nominal

Instrumento u obtención de datos: PCR

Indicador o codificación: Diferentes tipos de *S. mutans*.

5. TECNICAS DE RECOLECCION DE DATOS

Primero, se sintetizan sets de partidores específicos para la genotipificación de cepas prevalentes de *S. mutans* de acuerdo a lo publicado por Pereira et al en el año 2008 (31).

Tabla 1: partidores utilizados en este estudio

Nombre partidor	Secuencia	Referencia
OPA-2	5' – TGC CGA GCT G – 3'	Li y cols 2001

OPA-3	5' – AGTCAGCCAC – 3'	Truong et al, 2000
-------	----------------------	--------------------

Luego, se obtendrán muestras de saliva de cada paciente que acepte participar en este estudio, siguiendo protocolo validado (32). Se solicitará enjuagar la boca con agua una vez, para luego obtener la muestra de saliva que será almacenada en un tubo estéril de 15 mL. Las muestras serán manipuladas inmediatamente después de la obtención de ella, para luego almacenar el remanente a -20°C mientras se realiza el estudio. Una vez terminado, todas las muestras tanto de saliva como DNA serán desechadas siguiendo las normas de seguridad establecidas (32).

Para este estudio, se utilizó el kit de PCR “Extract-N-Amp™ Tissue PCR Kit” (Sigma-Aldrich). De acuerdo a la información entregada por el fabricante, este kit facilita el manejo de muestra biológica ya sea de tejido o fluido, ya que contiene todos los reactivos necesarios para extraer y amplificar ADN genómico. Una de las ventajas comparativas de este kit respecto a otros disponibles en el mercado, es el paso inicial de extracción de DNA desde la muestra, que incrementa el rendimiento de la reacción de PCR posterior.

PROCEDIMIENTO

(Información resumida de instrucciones del fabricante)

Todos los pasos se llevan a cabo a temperatura ambiente, a menos que se indique otra temperatura.

A. Extracción de ADN desde tejidos o fluidos

1. Pipetee 100 µL de solución de extracción, en un Tubo de microcentrífuga de 1,5 mL.
2. **Para la saliva:** Pipetee 10 µL de saliva en la solución previa. Mezclar bien mediante vórtex o pipeta.
3. Incubar la muestra a temperatura ambiente por 10 minutos.
4. Incubar la muestra a 95°C durante 3 minutos.

5. Agregar 100 μL de Solución de Neutralización B a la muestra y homogenizar por vórtex.
6. El extracto generado puede mantenerse a 4°C, o ser utilizado de inmediato para reacción de PCR.

B. Amplificación por PCR

El mix de reacción de PCR del kit comercial “Extract-N-Amp” está optimizado para que la reacción pueda ser realizada a temperatura ambiente, sin tener actividad polimerasa prematura.

1. Preparar el siguiente mix en tubos de PCR:

Tabla 2: reacción de PCR realizada, de acuerdo a sugerencia del proveedor

Reagent	Volume
Water, PCR grade	x μL
Extract-N-Amp PCR reaction mix	10 μL
Forward primer	y μL
Reverse primer	y μL
Tissue extract	4 μL^*
Total volume	20 μL

* Nota: La mezcla de reacción de PCR Extract-N-Amp está formulada para compensar los componentes presentes en las soluciones previamente usadas.

Para este estudio se utilizaron 8 μ L de la muestra preparada desde saliva.

2. Mezclar suavemente.

3. Se aplicó el siguiente programa de PCR:

Tabla 3: Programa de PCR utilizado en este estudio

Ciclo	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo
Desnaturación inicial	94	5'
45 ciclos	94	30''
	36	30''
	72	1'
Extensión final	72	5'
Término	4	∞

4. El producto de PCR generado será visualizado en geles de agarosa 2%, utilizando SYBR green y un transiluminador.

6. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS

El análisis a realizar será cualitativo, ya que se determinará el genotipo de acuerdo al patrón de bandas obtenido en el gel de agarosa. Los datos generados serán tabulados de manera ordenada en cuadros de síntesis, usando el programa Microsoft Excel.

7. ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN

Aquellas familias que accedan a participar, se les solicitará que lean y firmen un consentimiento informado, otorgando autorización para la toma de muestra y posteriores estudios a realizarse con ella. A su vez, se solicitará verbalmente el consentimiento al paciente pediátrico, siendo necesarios ambos documentos para la extracción, almacenamiento y uso de la muestra.

8. RESULTADOS

Caracterización de la muestra según edad y sexo:

En la tabla 1 se puede observar la edad y sexo de los 20 pacientes pediátricos que conforman la muestra, donde se indica con número 1 a los pacientes femeninos y 2 a los pacientes masculinos. Es posible observar más pacientes del género masculino que femenino, ya que un 65% de la muestra total son hombres y un 35% son mujeres.

En los grupos etarios de 6, 7 y 8 años hay más pacientes hombres que mujeres, siendo un total de 53,8% y en el grupo etario 9, 10 y 11 años igualmente hay más hombres que mujeres con un total de 85,7%. De todos los grupos etarios el que más integrantes tuvo fue el de 6 años y el que menos integrantes tuvo fue el de 11 años (1 integrante).

Número	SEXO	EDAD	P1	P2	P3	P4	P5	P6
1	1	7	7	6	4	4	3 2, 4, 5, 7, 8, 9	1, 2, 4, 5
2	2	10	6	6	4	4	3 2, 4, 5, 7, 8, 9	1, 2, 4, 5
3	1	6	6	6	4	4 2, 3, 4-	3, 8	1, 2, 3, 6, 7
4	2	9	6	6	3	3	3 3,4,6,7	3, 4, 5, 6, 7
5	2	10	6	6	4	3	2 4,5,9-	1, 4, 5, 6, 7
6	2	10	6	6	4	2 1, 3	1, 2, 4, 5, 6, 7, 9	4, 5
7	1	8	6	6	4	4 2, 3, 4-	1, 4, 5, 7, 8, 9	1,5,6-
8	1	6	6	6	4	4 1, 2, 3, 4	2, 4, 6, 8, 9	3, 4, 5-
9	1	7	6	6	4	3 1, 3	4, 5, 8, 9	1, 3, 4, 5, 6
10	2	6	6	6	4	3 1, 3	1, 3, 4, 5, 6, 9, 10	1, 2, 5-
11	1	9	6	6	4	3 3, 4	1, 2, 4, 5, 6, 8, 9	1, 2, 3, 5, 6
12	2	11	6	6	4	3 2, 3, 4-	2, 8	1, 2, 5, 6
13	2	6	6	6	3	4 1,2,3-	1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9	1, 2, 4, 5, 6
14	2	8	6	6	4	4	3 1, 4, 5-	2, 4
15	2	6	6	6	4	4 2, 3	1, 4, 5, 6, 7, 9	1, 5, 6-
16	2	6	6	6	4	3 3, 4		9 1,2,3-
17	1	7	6	6	4	4	3 3, 4, 5, 7, 8, 9	1, 4
18	2	9	6	6	4	3 1, 3	2, 4, 5, 7, 8, 9	1,4,5-
19	2	7	6	6	4	4	3 1, 4, 5, 7, 8, 9	1,4,5-
20	2	7	6	6	4	3	2, 3, 2004 2, 4	1, 2, 3, 5
20		X = 7,45		6 X= 3,9		X= 3,55		

Tabla 4: Resumen del grupo de pacientes pediátricos que conforman el estudio, y las respuestas a las preguntas de la encuesta realizada al ingreso.



Figura 2. El gráfico circular de la figura representa el porcentaje de pacientes por sexo que conforman la muestra, con un 65% de hombres y 35% mujeres.

EDAD

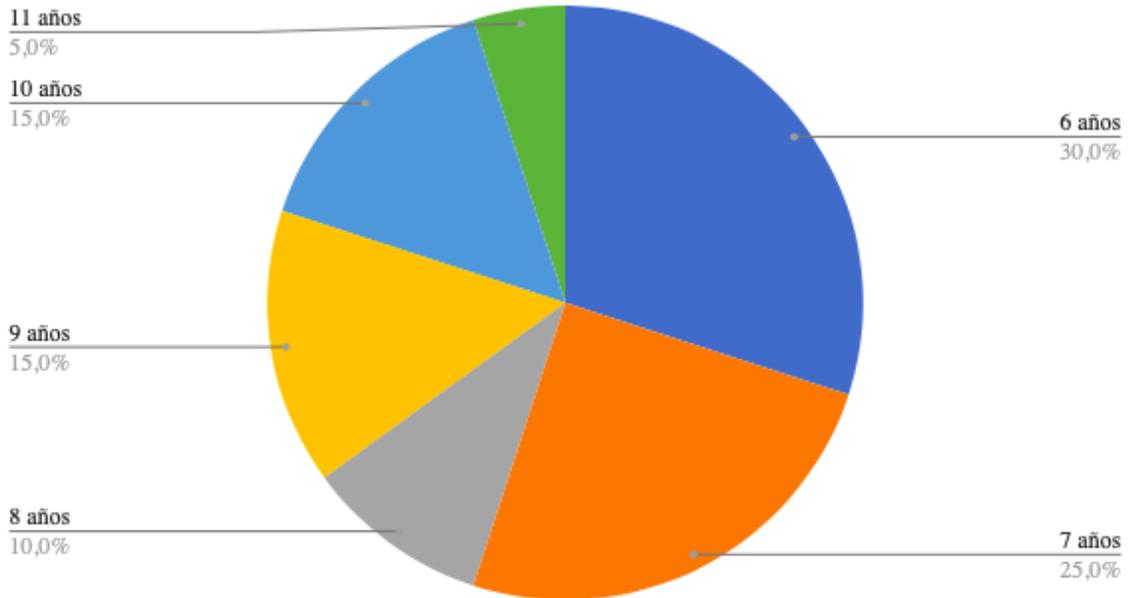


Figura 3. El gráfico representa la clasificación de pacientes pediátricos por edad. Se observa que la mayor cantidad de niños tiene 6 años de edad (30%), un 25% tiene 7 años de edad, el 10% tiene 8 años, el 15% tiene 9 años, otro 15% tiene 10 años de edad y por último sólo un 5% tiene 11 años de edad.

La encuesta consta de 6 preguntas cerradas en donde los tutores responden según el comportamiento de los pacientes pediátricos.

La pregunta número 1 fue un parámetro para evaluar uno de los criterios de exclusión de este experimento, aquí se evaluó si el niño estuvo en algún tratamiento prolongado de alergia, asma, epilepsia, hiperactividad u otra enfermedad. El 100% de la respuesta a esta pregunta fue que los niños no habían estado en tratamiento prolongado para estas u otras enfermedades, por lo tanto, se procede con la encuesta completa debido a que los niños encuestados cumplen con los criterios de inclusión determinados para este estudio.

PREGUNTA 1

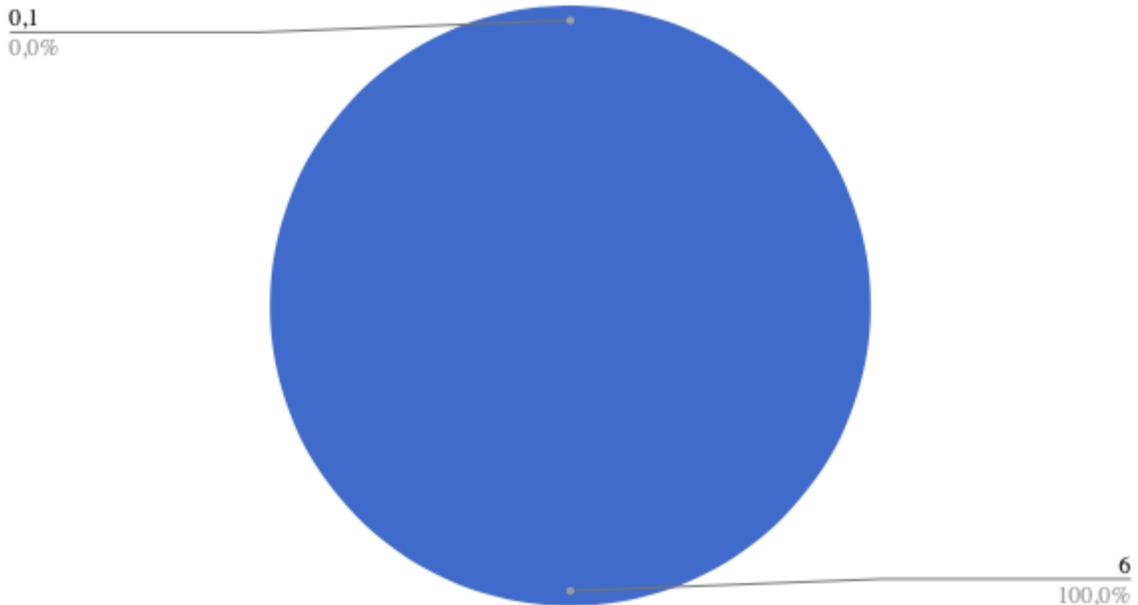


Figura 4. En el gráfico se puede observar que el 100% de los encuestados respondieron la alternativa 6 en la pregunta 1, referida a si han tenido algún tratamiento prolongado frente enfermedades como alergia, asma, epilepsia, hiperactividad, u otra enfermedad.

La pregunta número 2 tiene relación con el uso de pasta dentífrica cuando el niño se cepilla. Las alternativas son: NUNCA (1) CASI NUNCA (2), CASI SIEMPRE (3), SIEMPRE (4). El 95% respondió SIEMPRE (4) y el 5% respondió CASI SIEMPRE (3).

PREGUNTA 2

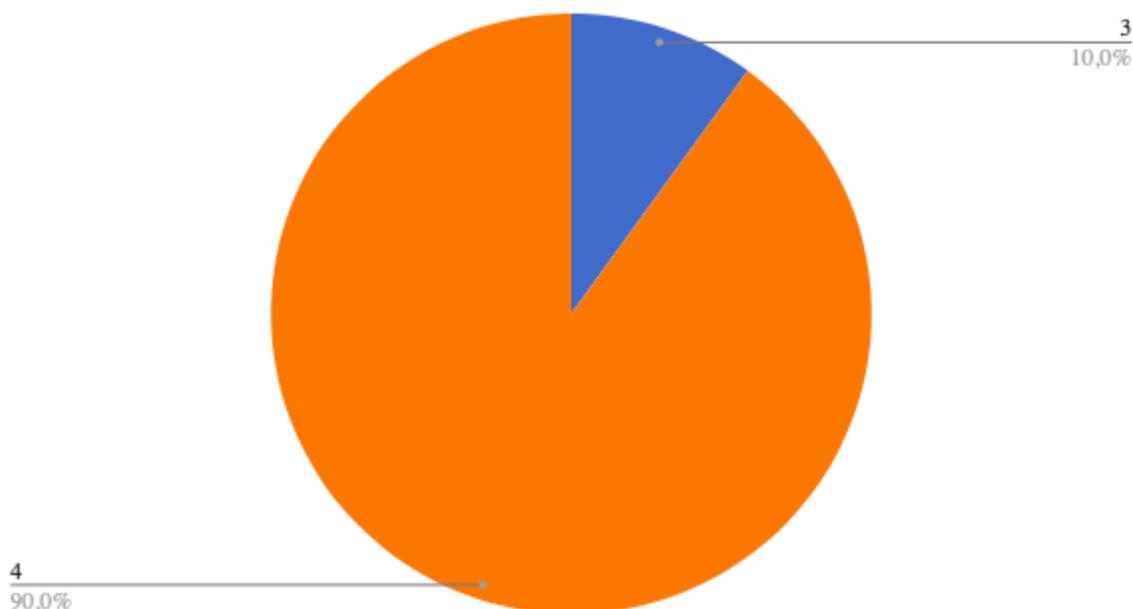


Figura 5. El gráfico representa las respuestas entregadas a la pregunta 2 de la encuesta realizada, respecto al uso de pasta dentífrica al momento del cepillado. Se observa que el 10% de los encuestados responde “casi siempre”, mientras que un 90% de los pacientes responden que “siempre” usan pasta de diente.

La pregunta número 3 tiene que ver con la conducta de cepillado del niño después de comer y antes de dormir, las alternativas a estas preguntas son: NUNCA (1), CASI NUNCA (2), CASI SIEMPRE (3), SIEMPRE (4). El 5% de los niños respondió CASI NUNCA (1 individuo) 45% respondió casi siempre y el 50% del total de individuos respondió que SIEMPRE (4) se cepilla los dientes después de comer antes de acostarse.

Del grupo de niños que SIEMPRE se cepillan los dientes antes de dormir el 50% son mujeres y el 50% son hombres. Del grupo de niños que CASI SIEMPRE se cepillan los dientes antes de dormir el 22,2% son mujeres y el 77,7% son hombres. Solo 1 individuo (hombre) respondió que CASI NUNCA se cepilla los dientes antes de dormir.

PREGUNTA 3

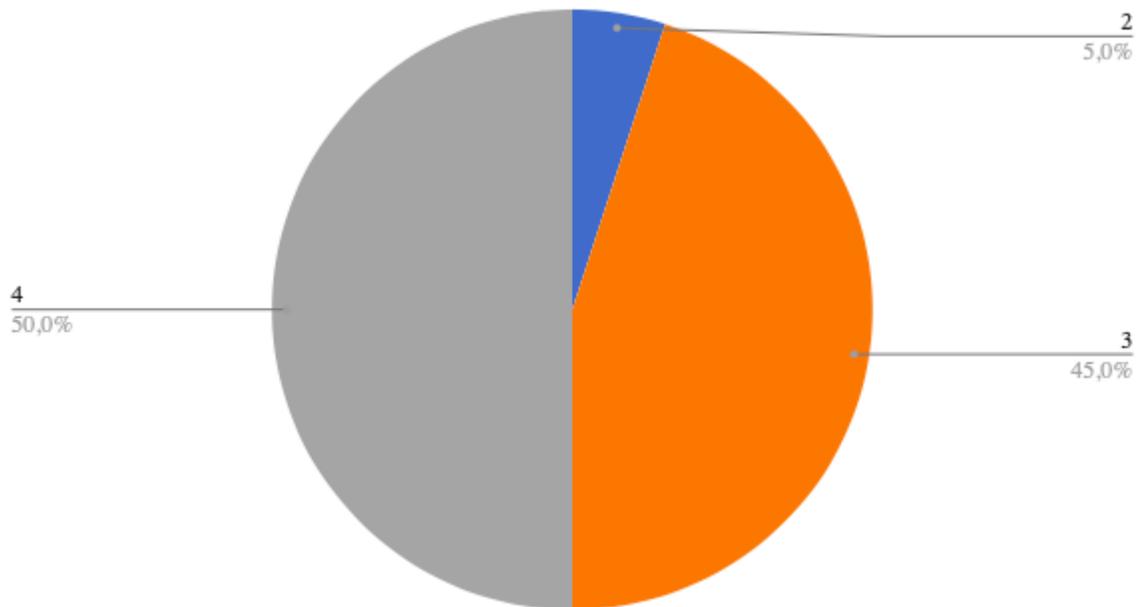


Figura 6. El gráfico representa las respuestas entregadas por los pacientes a la pregunta 3 de la encuesta realizada al ingreso, respecto a la frecuencia de cepillado. Se observa que el 50% de los encuestados respondieron que siempre se cepillan los dientes antes de dormir.

La pregunta 4 tiene que ver con la edad en que el paciente comenzó a consumir alimentos como bebidas gaseosas, chocolate, galletas dulces, golosinas, chicles, golosinas saladas y helados. El resultado fue que en un 95% de los casos encuestados comenzó el consumo de este tipo de alimentos a los 2 años o más. En el caso específico de las bebidas gaseosas, un 95% respondió que empezaron a consumir después de los 2 años, mientras que sólo 1 persona respondió que el paciente consumía este producto entre los 1 y los 2 años. 6 tutores respondieron que el niño nunca había consumido alguno de estos alimentos azucaradas, lo que corresponde a un 30% de los niños encuestados que no han consumido nunca alguno de estos alimentos.

La pregunta 5 se refiere a la clase de alimentos que come el niño/niña generalmente entre comidas regulares, en esta opción el tutor podía marcar más

de una alternativa. La lista de la encuesta contiene un total de 13 alimentos, en los que se incluyen masas saladas, caramelos, yogurt con azúcar o sin azúcar, cereales con azúcar, masas dulces, azúcar, chocolates, postres con azúcar, frutas frescas con azúcar, frutas frescas sin azúcar, frutos secos, entre otros. De las respuestas entregadas, destaca el 40% de consumo de masas saladas entre comidas y un 45% de consumo de caramelos. De los pacientes encuestados un 85% prefiere el consumo de yogurt con azúcar versus un 15% que consume yogurt sin azúcar entre comidas. De la población encuestada, un 70% responde que si al consumo de cereales con azúcar como alternativa de alimento entre comida, mientras que un 35% indica el consumo de masas dulces. Una de las alternativas evaluadas era el consumo de chocolate, a la cual un 60% de los niños indican que lo consumen entre comidas. Se destaca que sólo un 5% de los pacientes encuestados, que corresponde a 1 individuo, informa el consumo entre comidas de fruta fresca sin azúcar añadida, como una alternativa de colación.

La pregunta 6 del cuestionario aplicado a los pacientes corresponde al consumo de bebestibles. Las respuestas a esta pregunta informan que el 80% de los pacientes encuestados consume agua corriente de la llave entre comidas, mientras que el 50% informa consumir agua mineral también. Respecto al consumo de jugos, un 30% informa consumir jugo sin azúcar, mientras que el 60% consume líquidos azucarados entre los que se consideran té, bebidas gaseosas y jugos preparados o en polvo. Respecto al consumo de lácteos, se informa que el 80% los consume azucarados versus un 15% que informa consumir lácteos sin azúcar.

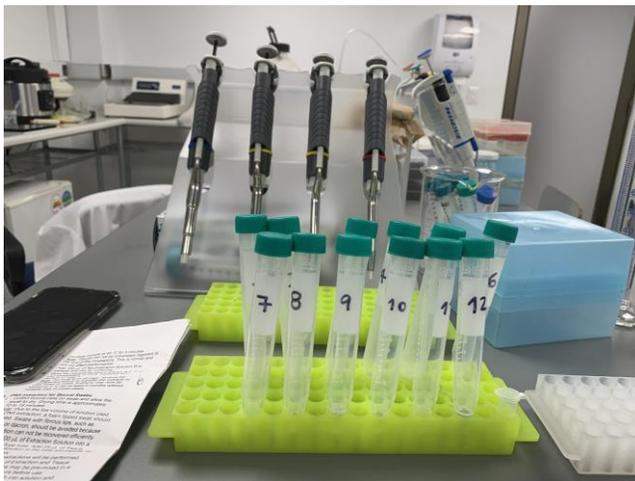
Protocolo de kit comercial “Extract-N-Amp”



Imagen 1: Obtención y almacenamiento temporal de las muestras de saliva.

Lo primero que se realizó fue la obtención de las muestras de saliva de los pacientes pediátricos. Para la extracción cada uno de los pacientes se enjuagó con agua por 30 segundos, todo esto previo a su consentimiento. Mientras tanto, la madre, padre o tutor del niños respondía las preguntas de la encuesta de la manera lo más objetiva posible. Posterior al enjuague, el niño procede a depositar la mayor cantidad de saliva que puede en un tubo de

ensayo. Cada tubo fue enumerado de forma ordenada y conservado a -20°C , cuando ya se obtuvieron las 20 muestras se procede a la extracción de ADN de los tejidos.



Cuando ya se tienen los tubos de ensayo listos y ordenado entonces se procede a la extracción de ADN siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante, de acuerdo al cual se utilizan $100\ \mu\text{L}$ de saliva por cada muestra, las que se manejan en tubos eppendorf de 1,5 ml.

Imagen 2: Mantención temporal de las muestras de saliva.

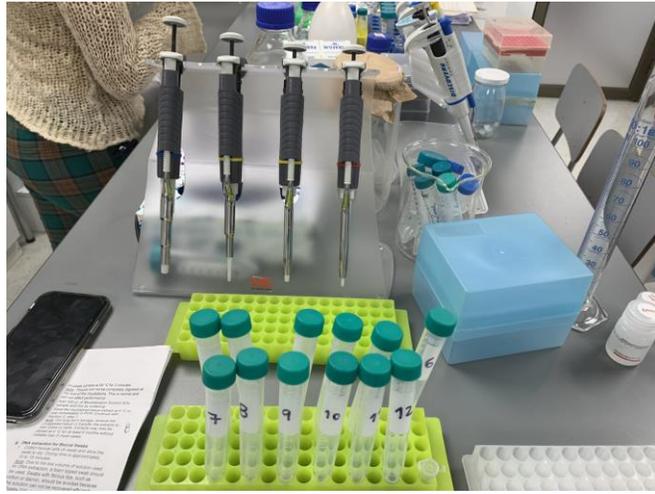




Imagen 3: Proceso experimental.

Utilizando una micropipeta, se extrajeron 100ul de saliva desde el tubo de muestra, y se agregó sobre la solución del kit comercial. Se mezcla bien por vórtex o pipeta.

Después de este paso, se incuba la muestra a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego, se incuba a 95°C durante 3 minutos, para posteriormente agregar 100uL de solución de Neutralización B a la muestra y homogenizar con vórtex. El extracto que se genera en este paso se puede conservar a 4°C, o ser utilizado de inmediato para la reacción de PCR.



Posterior a todos los procesos descritos anteriormente se realizó la amplificación por PCR. El kit comercial “Extract-N-Amp” utilizado está optimizado para que la reacción pueda ser realizada a temperatura ambiente, sin tener actividad polimerasa prematura. Se preparó el mix de acuerdo a la tabla 2 (sección metodología) en tubos de PCR (agua destilada, mix comercial “Extract-N-AMP PCR reaction mix”, partidores, y extracción de DNA preparada desde saliva) según los volúmenes que indica el fabricante.

Para este estudio se utilizaron 8 uL de muestra preparada desde saliva. Se mezcló

suavemente, y se utilizó el PCR detallado en la tabla 3. El producto generado fue visualizado en agarosa 2%, utilizando y un transiluminador (imagen 5).

Imagen 4: Ejemplo de obtención de muestra de saliva con micropipeta.

programa de El producto un gel de SYBR green

Patrón de banda obtenido en gel de agarosa

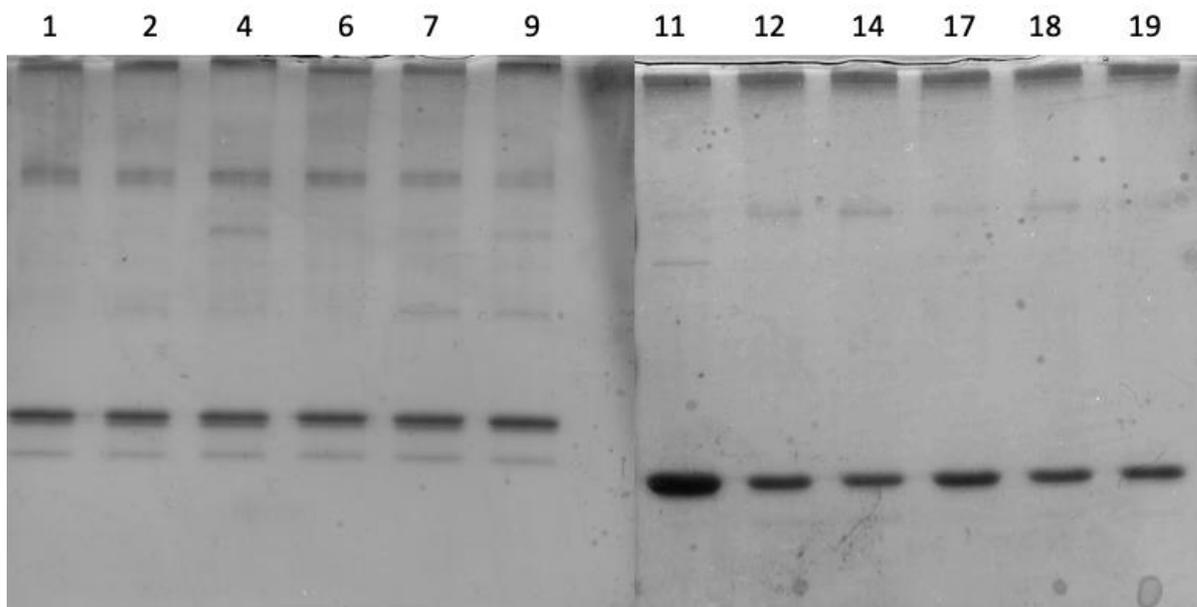


Imagen 5: patrón de bandas obtenido en gel de agarosa 2%

Como podemos ver en las imágenes algunas de las muestras no presentan producto de PCR amplificado: la número 3, 5, 8, 13, 15, 16 y 20.

En los pacientes que amplificaron podemos ver que el paciente 1, 2 y 6 de acuerdo a lo publicado en investigaciones (33) parecen corresponder a genotipo B. Paciente 4, 7, 9, 11 y 17 parece corresponder a genotipo N de acuerdo a lo publicado en investigaciones (33).

Pacientes 12, 14, 18 y 19 son difíciles de determinar, ya que pareciera corresponder a genotipo A, pero la imagen se visualiza tenue probablemente por baja cantidad de ADN utilizado para la realización del ensayo.

Todos los resultados se encuentran resumidos en la siguiente tabla:

MUESTRA	SEXO	EDAD	GENOTIPO
1	1	7	GENOTIPO B
2	2	10	GENOTIPO B
3	1	6	NO AMPLIFICÓ
4	2	9	GENOTIPO N
5	2	10	NO AMPLIFICÓ
6	2	10	GENOTIPO B
7	1	8	GENOTIPO N
8	1	6	NO AMPLIFICÓ
9	1	7	GENOTIPO N
10	2	6	INDETERMINADA
11	1	9	GENOTIPO N
12	2	11	GENOTIPO A
13	2	6	NO AMPLIFICÓ
14	2	8	GENOTIPO A
15	2	6	NO AMPLIFICÓ
16	2	6	NO AMPLIFICÓ
17	1	7	GENOTIPO N
18	2	9	GENOTIPO A
19	2	7	GENOTIPO A
20	2	7	NO AMPLIFICÓ
20		$\bar{X} = 7,45$	

Tabla 5: Resumen de resultados de muestra con su genotipo. Sexo 1:= Femenino, Sexo 2= Masculino.

9. DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo principal conocer los distintos genotipos de *S. mutans* presentes en pacientes pediátricos atendidos en la clínica del niño en la Facultad de Odontología de la Universidad Finis Terrae.

Se obtuvieron muestras de saliva de 20 niños entre ellos hombres y mujeres, para luego proceder a la extracción de ADN siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante usando el kit comercial “Extract-N-Amp”, luego se obtuvo la visualización en geles de agarosa 2%.

El experimento logró llevarse a cabo. Sin embargo, no todas las muestras presentaron producto amplificado, lo que no quiere decir que el paciente no presente la bacteria en estudio. Entre las hipótesis que consideramos podrían explicar este resultado, están:

- i. Aspectos experimentales al momento de realizar la extracción de DNA.
- ii. Poca concentración de DNA en la muestra extraída.
- iii. La presencia de algún elemento que afecte o interfiera con la eficiencia de amplificación del PCR.

Para evaluar cada uno de estos puntos se requiere más tiempo y herramientas de las consideradas para la ejecución de esta tesis, ya que implicaría solicitar nuevamente la presencia del paciente para realizar una nueva toma de muestra y extracción.

Se logró identificar genotipos de *S. mutans* en la saliva de niños tales como genotipo B, N y A, sin embargo no se puede concluir si hay correlación de ciertos genotipos de *S. mutans* y la experiencia de caries del paciente tal como se mostró en una investigación (34).

Además podemos decir que se logró la identificación de un genotipo en cada muestra y no múltiples genotipos en cada muestra por lo que podemos decir que

no existiría asociación de que un paciente deba presentar todos los genotipos si es que está en actividad de caries.

Los resultados demuestran la variedad genotípica de cepas de *S. mutans* entre individuos. Algunas de estas diferencias pueden o no explicar la presencia clínica o ausencia de caries lesiones y su gravedad clínica.

Se requieren más ensayos para la identificación de genotipos de *S. mutans* y la posterior asociación a la actividad de caries que presente el paciente. Sin embargo, este tipo de ensayos son factibles de realizar de manera rápida, simple y económica con el objetivo de profundizar nuestro conocimiento microbiológico oral.

10. CONCLUSIÓN

De acuerdo a los datos generados en este trabajo de tesis, podemos concluir que:

Es posible obtener DNA bacteriano desde muestras de saliva de pacientes pediátricos atendidos en la Facultad de Odontología de la Universidad Finis Terrae, utilizando un kit comercial.

Se determinó la existencia de genotipos diferentes de la especie bacteriana *Streptococcus mutans* en la cavidad bucal de niños entre 6 a 12 años de edad con distinta experiencia de caries, utilizando la herramienta de reacción en cadena de la polimerasa o PCR.

No fue posible asociar un genotipo específico de la especie bacteriana *S. mutans*, con una mayor experiencia de caries en los niños analizados, ni con hábitos de higiene o alimentación específicos.

11. CRONOGRAMA

Meses: septiembre, octubre, noviembre												
Actividad	Planificación mensual(semanas)											
	s 1	s 2	s 3	s 4	s 5	s 6	s 7	s 8	s 9	s1 0	s1 1	s1 2
Compra de materiales	*	*										
Obtención de muestras			*	*	*							
Extracción de DNA genómico						*	*	*				
Secuenciación de muestras de pacientes							*	*				
Análisis de datos generados										*	*	*
Generación del informe y publicación										*	*	*

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ojeda-Garcés Juan Carlos, Oviedo-García Eliana, Salas Luis Andrés. Streptococcus mutans y caries dental. CES odontol. 2013; 26(1): 44-56
2. Martínez MC RA. Estudio de las cepas de Estreptococos del grupo mutans presentes en binomios madre-hijo. Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia -. 2009; 21(2):177–85.
3. Bedoya, C., Rincón, R., Parada, M. Genomic and phenotypic diversity of Streptococcus mutans. Journal of Oral Biosciences. 2019; (61), 22–31.
4. Xu X, He J, Xue J, Wang Y, Li K, Zhang K, et al. Oral cavity contains distinct niches with dynamic microbial communities. Environ Microbiol. 2015;17(3):699-710
5. Belkaid Y, Hand T. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. Cell. 2014;27;157(1):121-41
6. Wade, W. G. The oral microbiome in health and disease. Pharmacol. Res. 2013; 69(1):137-43.
7. Dewhirst, F. E.; Chen, T.; Izard, J.; Paster, B. J.; Tanner, A. C.; Yu, W. H.; Lakshmanan, A. & Wade, W. G. The human oral microbiome. J. Bacteriol., 192(19):5002- 17, 2010; 192(19):5002- 17.
8. Cruz Quintana Sandra Margarita, Díaz Sjostrom Pedro, Arias Socarrás Dunier, Mazón Baldeón Gloria Marlene. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. Rev Cubana Estomatol. 2017; 54(1): 84-99.
9. García Martínez Alfredo, Martínez Brito Isabel, Ojeda Cabrera Angela, Rivero Llop Martha Lidia. Publicaciones de autores cubanos sobre caries dental, periodo 2012-2015. Un enfoque bibliométrico. Rev.Med.Electrón. 2016; 38(5): 666-676.
10. Rodríguez Méndez G. Salud bucal. En: Medicina General Integral. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2014; 173-80.

11. Cereceda M María Angélica, Faleiros C Simone, Ormeño Q Andrea, Pinto G Mayerling, Tapia V Rebeca, Díaz S Carlos. Prevalencia de caries en alumnos de educación básica y su asociación con el estado nutricional. *Rev. chil. pediatr.* 2010; 81(1): 28-36.
12. Núñez Daniel Pedro, García Bacallao Lourdes. Bioquímica de la caries dental. *Rev haban cienc méd.* 2010; (9): 156-166.
13. Sarduy Bermúdez Lázaro, González Díaz María Elena. La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. *Medicentro Electrónica.* 2016; 20(3): 167-175.
14. Díaz Caballero A.J., Vivas Reyes R., Puerta L., Ahumado Monterrosa M., Arévalo Tovar L., Cabrales Salgado R. et al. Biopelículas como expresión del mecanismo de quorum sensing: Una revisión. *Avances en Periodoncia.* 2011; 23(3): 195-201.
15. Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (9): 881-90.
16. Loera Muro A, Ramírez Castillo FY, Avelar González FJ, Guerrero Barrera AL. Biopelículas multi-especie: asociarse para sobrevivir. *Invest Cienc.* 2012; 54: 48-56.
17. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological reviews.* 1980; 44(2): 331-384.
18. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries research.* 2011; 45(1):69–86.
19. Alves AC, Nogueira RD, Stipp RN, Pampolini F, Moraes AB a, Gonçalves RB, et al. Prospective study of potential sources of *Streptococcus mutans* transmission in nursery school children. *Journal of medical microbiology.* 2009; 58(Pt 4):476–81.
20. Hidalgo Gato- Fuentes I, Johany Duque de Estrada Riverón J, Pérez Quiñones JA. La caries dental. Algunos de los factores relacionados con su formación en niños. *Rev Cubana Estomatol.* 2008;45(1)

21. Nasco Hidal Nayda, Gispert Abreu Estela de los A, Roche Martinez Alina, Alfaro Mon Maritza, Pupo Tigüero Raúl J. Factores de riesgo en lesiones incipientes de caries dental en niños. *Rev Cubana Estomatol.* 2013 ; 50(2)
22. Kanasi E, Johansson I, Lu SC, Kressin NR, Nunn ME, Kent R. Microbial Risk Markers for Childhood Caries in Pediatricians' Offices. *J Dent Res.* 2010 April; 89(4):378-83.
23. Arora A, Scott J, Bhole S, Loc Do, Schwarz E and Blinkhorn A. Early childhood feeding practices and dental caries in preschool children: a multi-centre birth cohort study. *BMC Public Health.* 2011; 11-28.
24. González Martínez Farith Damián, Vidal Madera Anaya Meisser, Tirado Amador Lesbia Rosa. Relación entre obesidad y caries dental en niños. *Rev Cubana Estomatol* 2014; 51(1): 93-106.
25. Rojas Herrera Isis. Prevalencia de caries dental y factores de riesgo asociados. *Rev Cub Med Mil.* 2012; 41(4): 379-384.
26. Echeverría L Sonia, Herrera G Oscar, Henríquez D'A Eugenia, Sepúlveda R Rosa, Maldonado L Paula. Prevalencia de caries temprana de la infancia en niños con enfermedades respiratorias crónicas. *Rev. chil. pediatr.* 2012; 83(6): 563-569.
27. Segúen Hernández Jacqueline, Arpízar Quintana Raquel, Chávez González Zulema, López Morata Beatriz, Coureaux Rojas Laritza. Epidemiología de la caries en adolescentes de un consultorio odontológico venezolano. *MEDISAN.* 2010 Feb; 14(1).
28. Zaror Sánchez Carlos, Pineda Toledo Patricia, Orellana Cáceres Juan José. Prevalencia de Caries Temprana de la Infancia y sus Factores Asociados en Niños Chilenos de 2 y 4 Años. *Int. J. Odontostomat.* 2011; 5(2): 171-177.
29. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad.* 2013; 2(2):70-78.

30. Watson JD, Crick FH. A structure for desoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953; 421: 397-378.
31. Cínthia Pereira Machado Tabchoury, Maria Clara K. Sousa, Rodrigo Alex Arthur, Renata Oliveira Mattos-Graner, Altair Antoninha Del Bel Cury, Jaime Aparecido Cury. Evaluation of genotypic diversity of *Streptococcus mutans* using distinct arbitrary primers. *J Appl Oral Sci*. 2008; 16(6): 403-407.
32. Lim, Y., Totsika, M., Morrison, M., & Punyadeera, C. The saliva microbiome profiles are minimally affected by collection method or DNA extraction protocols. *Scientific Reports*. 2017; (1): 8523.
33. Mary L. Arévalo-Ruano,¹ Flor Y. Canacuan-Melo,¹ Julián Echeverry-Chica,¹ Clara L. Salazar-González,¹ Cecilia M. Martínez-Delgado,¹ María C. Martínez-Pabón,² Margarita M. Correa,³ Astrid V. Cienfuegos-Gallet. Identificación molecular y genotipificación de *Streptococcus mutans* de muestras de saliva de niños de Medellín, Colombia. *Revista CES Odontología*. 2014 ; 27(2): 1-14.
34. Damle SG, Loomba A, Dhindsa A, Loomba A, Beniwal V. Correlation between dental caries experience and *mutans streptococci* counts by microbial and molecular (polymerase chain reaction) assay using saliva as microbial risk indicator. *Dent Res J (Isfahan)*. 2016;13(6):552-559.

13. ANEXO

13.1 Anexo 1. Consentimiento informado



FACULTAD
DE **ODONTOLOGÍA**
UNIVERSIDAD FINIS TERRAE

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Nombre del Estudio: Genotipificación de *Streptococcus mutans* en pacientes pediátricos atendidos en la Universidad Finis Terrae en el año 2019

Investigador Estefanía Castillo Vargas, Ph.D
Responsable: Nicole Urzúa, alumna tesista
Danae Varas, alumna tesista

Unidad Académica: Facultad de Odontología

El propósito de esta información es ayudarle a tomar la decisión de permitir la participación de su hijo/hija, familiar o representado -o no- en una investigación, y, si es el caso, para autorizar el uso de muestras humanas o información personal (por ejemplo, información de la ficha clínica).

Lea cuidadosamente este documento, puede hacer todas las preguntas que necesite al investigador y tomarse el tiempo necesario para decidir.

1. Objetivos de la investigación

La caries dental es una de las enfermedades orales prevalentes en la población, donde la población pediátrica es especialmente susceptible debido a hábitos alimenticios y/o rutinas higiene oral. Usted ha sido invitado/invitada a participar en este estudio, ya que buscamos identificar patrones genéticos de la especie bacteriana *Streptococcus mutans*, y relacionarlos al estado de salud oral de pacientes pediátricos entre 6 y 12 años.

El objetivo de este estudio es conocer los distintos genotipos de esta bacteria presente en la cavidad oral de pacientes pediátricos entre 6 y 12 años, atendidos en la clínica del niño en la Facultad de Odontología de la Universidad Finis Terrae

2 PROCEDIMIENTOS DE la investigación: Metodología

En este trabajo de investigación, se le solicitará una muestra de 2 mL de saliva, a recolectar en tubos plásticos estériles. Este procedimiento no añadirá tiempo adicional a su consulta, y no se le solicitará volver para la recolección de una nueva muestra. Es un procedimiento no invasivo, simple y rápido en el que se solicitará que el paciente se enjuague la boca con agua por 20 segundos, para luego depositar su muestra de saliva en un recipiente.

Adicionalmente se le solicitarán algunos datos generales del paciente como edad, sexo y minuta de alimentación diaria, con el fin de complementar la información experimental que se genere producto de este estudio.

Las muestras de saliva obtenidas serán utilizadas únicamente en este estudio. Si quedara un remanente, éste será descartado siguiendo los protocolos adecuados de acuerdo con el origen biológico, bajo la responsabilidad de la docente encargada, Dra. Estefanía Castillo.

3 Beneficios

Es importante aclarar que el paciente no se beneficiará directamente por participar en este estudio. Sin embargo, el conocimiento que se genere de este estudio podrá ser beneficioso en el futuro para el paciente u otras personas afectadas por caries dental.

“Usted (o su hijo/hija, familiar o representado) no se beneficiará por participar en esta investigación de salud. Sin embargo, la información que se obtendrá gracias a su participación será de utilidad para conocer más acerca de.... (explicar el objetivo del estudio)”.

4 Riesgos

Esta investigación no presenta riesgos para el paciente.

Costos

Todo procedimiento asociado a este estudio y a la participación del paciente están financiados por los investigadores y la institución.

6 Confidencialidad de la información

La información obtenida se mantendrá en forma confidencial, ya que las muestras serán identificadas con un código que les permitirá a las alumnas tesistas asociarlas a la información general entregada por el paciente, pero sin relacionarlo con el nombre ni ningún otro identificador personal del paciente.

Es importante mencionar que es posible que los resultados obtenidos en este estudio sean presentados en congresos o revistas. Sin embargo, el nombre del paciente no será dado a conocer.

7 Voluntariedad

Su participación en esta investigación es completamente voluntaria.

Usted tiene el derecho a no aceptar participar o a retirar su consentimiento y retirar a su hijo/hija, o representado de esta investigación en el momento que lo estime conveniente. Al hacerlo, su hijo/hija, o representado no pierde ningún derecho que le asiste como paciente de esta institución, y no se verá afectada la calidad de la atención médica que merece.

Si usted retira su consentimiento, las muestras de saliva serán eliminadas y la información obtenida no será utilizada.

8 Preguntas

Si tiene preguntas acerca de esta investigación odontológica, puede contactar o llamar al Investigador Responsable del estudio, Dra. Estefanía Castillo Vargas, al teléfono +56997586286.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético Científico de la Universidad Finis Terrae. Si tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en una investigación médica, usted puede escribir al correo electrónico: cec@uft.cl del Comité ético Científico, para que la presidenta, Pilar Busquets Losada, lo derive a la persona más adecuada.

9 Declaración de consentimiento

- Se me ha explicado el propósito de esta investigación, los procedimientos, los riesgos, los beneficios y los derechos que asisten a mi hijo/hija, o representado, y que puedo retirar a mi hijo/hija, o representado de ella en el momento que lo desee.
- Firmo este documento voluntariamente, sin ser forzado/forzada a hacerlo.
- No estoy renunciando a ningún derecho que asista a mi hijo/hija, o representado.
- Se me comunicará de toda nueva información relacionada con el estudio del fármaco / equipo / otro que surja durante la investigación y que pueda tener importancia directa para mi representado (a mi hijo/hija, o representado).
- Se me ha informado que tengo el derecho a reevaluar la participación de mi hijo/hija, o representado en esta investigación según mi parecer y en cualquier momento que lo desee. En el caso de retiro, no sufriré sanción o pérdida de derechos a la atención sanitaria.
- Yo autorizo al investigador responsable y sus colaboradores a acceder y usar los datos contenidos en mi ficha clínica para los propósitos de esta investigación. Y el uso de material humano de mi propiedad si el estudio lo amerita.
- Al momento de la firma, se me entrega una copia firmada de este documento.

Firmas

Participante

Nombre, firma y fecha.

Representante

Nombre, firma y fecha de padre, madre o representante/ tutor legal

Investigador

Estefanía Castillo Vargas, Ph.D

Director de la Institución o su delegado nombre, firma y fecha.

Asentimiento (solo si hay menores de edad)

Nombre del Estudio: Genotipificación de *Streptococcus mutans* en pacientes pediátricos atendidos en la Universidad Finis Terrae en el año 2019

Investigador Estefanía Castillo Vargas, Ph.D
Responsable: Nicole Urzúa, alumna tesista
Danae Varas, alumna tesista

Unidad Académica: Facultad de Odontología

¿Por qué estás aquí?

Porque vamos a realizar un estudio para determinar la presencia de variedades de una bacteria presente en la boca. Estas bacterias, en ciertas condiciones ambientales, pueden asociarse al desarrollo de caries.

¿Por qué están haciendo el estudio?

Te pedimos tu participación, porque queremos saber más sobre esta bacteria en la boca de niños chilenos.

¿Qué te sucederá?

Si aceptas estar en nuestro estudio, te pediremos que te enjuagues la boca con agua, y que luego nos des una muestra de tu saliva en un tubo especial.

¿Dolerán los procedimientos del estudio?

Este estudio no te va a provocar ningún dolor ni molestia.

Debes informar a tus padres y al médico si te sientes mal en cualquier momento.

¿Cuáles son los beneficios de participar en el estudio?

Si participas en el estudio no vas a tener un beneficio directo. Sin embargo, nos vas a ayudar a generar conocimiento que será útil en un futuro.

¿Tendré que pagar algo por participar en el estudio?

Ni tú, ni tus padres deberán pagar nada por tu participación. Todos los gastos de procedimiento experimental que correspondan al estudio serán pagados por el patrocinador del estudio y no por tu familia.

¿Quién conocerá o verá la información que obtenga sobre mí?

Toda la información obtenida sobre ti durante el estudio será confidencial. Nadie lo sabrá excepto el docente a cargo, y las alumnas tesistas. Se te asignará un código específico para almacenar tu muestra de saliva, el que será usado con toda la información correspondiente a ti.

¿Debo participar en el estudio?

No es obligatorio que participes en este estudio, es absolutamente voluntario. Puedes tomarte el tiempo que consideres necesario para decidir si participas o no. Puedes cambiar de opinión en cualquier momento durante el estudio y retirarte. Es tu decisión. Nadie puede enojarse contigo si decides que no quieres continuar en el estudio. Les hemos preguntado a tus padres si aceptan que participes en el estudio. Aun así, si tus padres acepten que participes en el estudio, tu puedes decir que no.

¿Qué pasa si tengo alguna pregunta?

Puedes hacer preguntas las veces que quieras en cualquier momento del estudio.

Mi aprobación

Si firmas este papel quiere decir que lo leíste, o alguien te lo leyó, que se respondieron a todas tus preguntas y tu quedaste conforme con dicha respuesta, que quieres participar, sin que nadie te este presionando, conociendo todo los antecedentes del estudio que se enumeran en este documento y en el formulario de consentimiento informado, el cual también te fue leído y explicado, y que deberán firmar tus padres si tú decides participar en este estudio.

Si no quieres estar en el estudio, no lo firmes. Recuerda que tú decides estar en el estudio y nadie se puede enojar contigo si no firmas el papel o si cambias de idea y después de empezar el estudio, si te quieres retirar.

Si tiene preguntas o preocupaciones sobre este estudio, o experimentas cualquier problema puedes comunicarse con: Dra. Estefanía Castillo Vargas, al teléfono +56997586286, o a la dirección de correo electrónico ecastillo@uft.cl.

13.2 Anexo 2. Encuesta validada.



FACULTAD
DE **ODONTOLOGÍA**
UNIVERSIDAD FINIS TERRAE

Encuesta

Extracto de “Validación de un cuestionario para evaluar riesgo de caries en preescolares en Santiago, Chile” (Int. J. Odontostomat., 12(1):135-155, 2018.)

Sexo del paciente: _____

Edad del paciente: _____

Sexo del cuidador: _____

Edad del cuidador: _____

Parentesco con paciente: _____

1. ¿Ha estado el niño/niña en tratamiento prolongado para alguna de las siguientes enfermedades?
 - a. Alergia
 - b. Asma
 - c. Epilepsia
 - d. Hiperactividad
 - e. Otra enfermedad: _____
 - f. Ninguno

2. ¿Cuándo el niño/niña se cepilla los dientes, usa pasta de dientes?

Nunca	Casi nunca	Casi siempre	Siempre
--------------	-------------------	---------------------	----------------

3. El niño/niña, ¿se cepilla regularmente los dientes después de comer, beber o consumir un remedio antes de dormir?

Nunca	Casi nunca	Casi siempre	Siempre
--------------	-------------------	---------------------	----------------

4. ¿A qué edad comenzó a consumir el niño/niña los siguientes alimentos o bebidas? Marque con una X donde corresponda:

Alimento	Menos de 1 año	Entre 1 y 2 años	Más de 2 años	Nunca ha consumido	No sé/No recuerdo
Bebidas gaseosas					
Chocolate					
Galletas dulces					
Golosinas					

Chicles					
Golosinas saladas					
Helados					

5. ¿Qué clases de alimentos come el niño/niña generalmente entre comidas regulares? Por favor, revise la lista y marque todas las opciones que apliquen.

Masas saladas

Masas dulces

Caramelos

Azúcar

**Yoghurt sin
azúcar**

Chocolates

**Yoghurt con
azúcar**

**Postres con
azúcar**

**Cereales con
azúcar**

**Frutas frescas sin
azúcar**

Frutas frescas
con azúcar _____

Otros _____

Frutos secos

6. ¿Qué líquidos toma generalmente el niño/niña entre comidas? Por favor, lea la lista y marque todas las bebidas que apliquen.

Agua de la llave	
Agua mineral (sin azúcar)	
Jugo natural de fruta sin azúcar	
Líquidos azucarados (té, bebidas, jugos preparados o en polvo con azúcar)	
Lácteos azucarados (leche, leche cultivada, yogurt líquido con azúcar)	
Líquidos sin azúcar (té, bebidas, jugos preparados o en polvo con endulzante)	

Lácteos sin azúcar (leche, leche cultivada, yogurt líquido con endulzante)	
Otros	

