


UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO

Facultad de Odontología

Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Oral

# Evaluación de la Fermentación de distintos tipos de endulzantes utilizados en la dieta por *Streptococci* orales

Tesis de pregrado para optar al título de Cirujano-Dentista.

Alumno: Nickolas Andreas Martino Aichele

Profesor tutor: Dr. Mauricio Bittner Ortega

Profesor Co-tutor: Dr.(c) Ignacio Fuentevilla Morgado

Santiago de Chile, 2015.

A mis padres, hermana, polola y amigos

Quiero agradecer a mis padres, por brindarme el apoyo incondicional y siempre estar ahí para cuando los necesitaba. Son un pilar fundamental en mi formación, tanto académica como personal, y sin ellos no habría llegado donde estoy ahora. Gracias por confiar y creer en mí.

A mi hermana, por estar siempre junto a mí brindándome su apoyo, consejos, su cariño o simplemente compartiendo momentos y sacándome sonrisas que hicieron más llevadero el estrés acumulado con los años de estudio.

Además agradezco las grandes amistades que forme en el transcurso de los años. La Andrea, el Pipe, el Jorge, quienes entregaron sus locuras, su amistad, su cariño, su apoyo y risas durante gran parte de la carrera. Gracias por todos los momentos inolvidables.

Al Pelao, quien fue mi compañero de internado y prácticamente de tesis. Gracias por los grandes momentos juntos que compartimos durante este año y los anteriores, por su cariño y apoyo.

Agradezco al laboratorio de microbiología y todas las personas que trabajan ahí, por aceptarme y hacerme sentir como uno más de ustedes. Gracias por todos los momentos inolvidables, las risas, los almuerzos y su apoyo durante las largas horas de correr geles o estar haciendo PCRs. Especialmente a la Vale, quien me ayudo, brindo su apoyo, me acompaño durante las eternas tardes y confió en mí. Además de todos los momentos agradables que me entregas día a día. Gracias por tu cariño, tu entrega, tu incondicionalidad, tus risas, tu amor y por permitirme entrar a tu vida.

Gracias al Dr. Bittner, quien nos abrió las puertas (antes de tener la clave) para poder realizar esta tesis. Además de brindarnos el apoyo necesario, las explicaciones didácticas para entender, su tiempo y entrega durante todo el proceso.

Les agradezco a todas las personas que no nombre, pero que estuvieron en mi camino y ayudaron a formarme durante este trayecto profesional.

# ÍNDICE


1. INTRODUCCIÓN ……..……1
2. ASPECTOS TEÓRICOS ……..……3
   - 2.1. Caries dental ……..……3
   - 2.2. Etiología de la caries dental ……..……4
   - 2.3. *Streptococcus* orales – Fermentación ……..……7
   - 2.4. Azúcares fermentables ……..……10
   - 2.5. Azúcares sustitutos ……..……11
   - 2.6. Polioles ……..……12
   - 2.7. Stevia ……..……13
   - 2.8. Tratamiento de la caries dental ……..……13
3. HIPÓTESIS ……..……17
4. OBJETIVOS ……..……17
5. MATERIALES Y MÉTODOS ……..……18
   - 5.1. Selección de pacientes ……..……18
   - 5.2. Obtención de muestra de saliva ……..……19
   - 5.3. Siembra de muestras de saliva ……..……19
   - 5.4. Medios de cultivo ……..……19
   - 5.5. Análisis macroscópico de colonias ……..……20
   - 5.6. Análisis microscópico de colonias ……..……21
   - 5.7. Tinción de Gram ……..……21
   - 5.8. Identificación de *Streptococcus* orales mediante PCR de colonias ……..……22
   - 5.9. Electroforesis en geles de Agarosa para comprobar la presencia de ADN ……..……23
   - 5.10. Evaluación del perfil fermentativo de *Streptococci* orales con diferentes azúcares ……..……23
   - 5.11. Análisis de datos ……..……23
6. RESULTADOS ……..……24
   - 6.1. Caracterizar genotípicamente *Streptococci* orales ……..……24

6.2. Caracterizar fenotípicamente *Streptococci* orales en base a su habilidad de fermentar distintos endulzantes ……..……27
6.3. Glucosa ……..……29
6.4. Sacarosa ……..……30
6.5. Manitol ……..……31
6.6. Sorbitol ……..……32
6.7. Xilitol ……..……33
6.8. Stevia ……..……34
6.9. Frecuencia de fermentación de *Streptococci* orales ……..……35
6.10. Determinar la prevalencia de caries en los estudiantes de Odontología ……..……36
7. DISCUSIÓN ……..……37
8. CONCLUSIONES ……..……46
9. SUGERENCIAS ……..……47
10. RESUMEN ……..……48
11. ABSTRACT ……..……49
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ……..……50
13. ANEXOS ……..……57

# ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS


**Figura 1** Composición taxonómica bacteriana ……..……8

**Figura 2** Composición de especies bacterianas de *Streptococcus* orales ……..……9

**Figura 3** Gráfico de solubilidad vs pH ……..……10

**Figura 4** Análisis macroscópico de colonias ……..……21

**Tabla 1** Partidores, secuencias, tamaño y temperatura de alineamiento ……..……22

**Figura 5** Características macroscópicas de *S. salivarius* y *S. oralis* ……..……24

**Figura 6** Características microscópicas de *S. salivarius* ……..……25

**Figura 7** Características microscópicas de *S. oralis* ……..……25

**Figura 8** Características microscópicas de *S. mutans* ……..……25

**Figura 9** Electroforesis en gel ……..……26

**Figura 10** Cepas bacterianas aisladas ……..……26

**Figura 11** Ensayos de fermentación de azúcares para *S. salivarius* ……..……28

**Figura 12** Ensayos de fermentación de azúcares para *S. oralis* ……..……28

**Figura 13** Gráfico de fermentación de glucosa y relación índice COPD ……..……29

**Figura 14** Gráfico de fermentación de sacarosa y relación índice COPD ……..……30

**Figura 15** Gráfico de fermentación de manitol y relación índice COPD ……..……31

**Figura 16** Gráfico de fermentación de sorbitol y relación índice COPD ……..……32

**Figura 17** Gráfico de fermentación de xilitol y relación índice COPD ……..……33

**Figura 18** Gráfico de fermentación de stevia y relación índice COPD ……..……34

**Figura 19** Frecuencia de fermentación de *Streptococci* orales ……..……35

**Tabla 2** Prevalencia de caries en estudiantes de Odontología ……..……36

**Figura 20** Estructura química de glucosa ……..……39

**Figura 21** Estructura química de sacarosa ……..……39

**Figura 22** Estructura química de manitol ……..……40

**Figura 23** Estructura química de sorbitol ……..……40

**Figura 24** Estructura química de xilitol ……..……41

**Figura 25** Estructura química de stevia y rebaudiósido A ……..……41

**Figura 26** Vía de fermentación de las pentosas ……..……42

# INTRODUCCIÓN

La caries dental es probablemente la enfermedad infecciosa más prevalente que afecta a los seres humanos (1), afectando a más del 80% de la población mundial. Esta es una enfermedad multifactorial que resulta de la interacción de distintas bacterias cariogénicas capaces de fermentar azúcares, provocando una desmineralización y posterior destrucción del tejido dentario. (2)

Según la OMS, esta se define como “un proceso localizado de origen multifactorial que se inicia después de la erupción dentaria, determinando el reblandecimiento del tejido duro del diente y que evoluciona hasta la formación de una cavidad”. (3) Además podemos describirla como un proceso dinámico de remineralización y desmineralización, el cual es el resultado del metabolismo de distintas bacterias sobre la superficie dentaria, el que puede llegar a producir una pérdida de minerales en el tiempo, y eventualmente terminar en una cavidad. (12)

Muchos investigadores han intentado resolver la etiología de esta enfermedad e incluso aún siguen siendo válidas muchas de las teorías propuestas hace muchos años, tal como la triada de Keyes, en donde se observa que el tiempo, microorganismos acidúricos, susceptibilidad del diente y azúcares fermentables son los que contribuyen a la formación de caries. Otros autores han ido contribuyendo y agregando nuevos factores a la formación de caries. (12)

Uno de los factores fundamentales para el inicio y progresión de la caries es la presencia bacteriana. Más aún, es comúnmente aceptado mencionar que sin bacterias no se generara una lesión cariosa. (4) Esta enfermedad es de carácter polimicrobiana (5, 6), es decir, en ella participan diversas bacterias que contribuyen a la cariogenicidad de la placa dental (biopelícula dental) (7). Es por esto que es de vital importancia entender la función que cumplen las distintas especies bacterianas específicas en la progresión de lesiones cariosas. La gran mayoría de los *Streptococcus orales* y algunas otras especies como *Lactobacillus* son acidogénicos y producen ácidos como el láctico, propionico, acético y fórmico

al metabolizar ciertos carbohidratos fermentables (glucosa, sacarosa, fructosa, etc.), todos productos involucrados en el proceso de desmineralización del diente (8, 9).

Recientemente se han intentado desarrollar vacunas o nuevas terapias antimicrobianas para el tratamiento de la caries dental. La mayoría de estos estudios han obtenido resultados desfavorables, por lo que se han enfocado más en la prevención que en el tratamiento propiamente tal. Una opción que ha tomado fuerza ha sido la creación de sustitutos del azúcar (edulcorantes), con el fin de evitar la fermentación de las bacterias y la consecuente formación de la lesión cariosa.

Los edulcorantes han sido estudiados desde 1970, siendo el xilitol el más relevante debido a que ha sido aceptado como un edulcorante natural por la Food and Drug Administration (FDA) (10). Lo que buscan estos sustitutos del azúcar es aumentar el flujo salival y promover la mineralización, pero en especial evitar la fermentación que producen las cepas bacterianas. El xilitol ha demostrado inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans*, pero no ha sido comprobado en otros *Streptococci* orales. (39)

Hoy en día, el xilitol es la mejor opción para la aplicación de productos de consumo oral y en medicina, no obstante, las bacterias pueden generar mutaciones y adaptarse a nuevas fuentes de carbono, tal como se ha visto en la resistencia antibiótica. Por esta razón, el objetivo de estudio es evaluar la capacidad de ciertos *Streptococci* orales, aisladas de alumnos de odontología de la Universidad Andrés Bello, para fermentar distintos tipos de edulcorantes más comúnmente utilizados en productos orales, alimentos y medicamentos.

# ASPECTOS TEÓRICOS

## Caries dental

La caries dental es una enfermedad o proceso complejo, dinámico y crónico, en el que se ve afectada la estructura dentaria por la segregación de ácidos producto de la fermentación bacteriana. Debido a este cambio se genera un desequilibrio entre la sustancia dentaria y el fluido de la placa circundante, obteniendo una pérdida de tejido mineralizado en la superficie dental, lo que se traduce con el tiempo a una destrucción localizada de los tejidos duros o cavitación de la pieza dental. (11)

Existen términos erróneos en cuanto a caries dental, confundiendo muchas veces con lesión cariosa o cavitación. La caries dental es la enfermedad, la cual no necesariamente provoca una destrucción a nivel de los tejidos dentarios, ya que tan solo puede existir una desmineralización en la superficie dental, pero que gracias a los sistemas tamponantes en la saliva, entre otros factores, evitan que la lesión siga su progreso y se genere la cavitación o lesión. (12)

La organización mundial de la salud (OMS) la define como “un proceso localizado de origen multifactorial que se inicia después de la erupción dentaria, determinando el reblandecimiento del tejido duro del diente y evoluciona hasta la formación de una cavidad”. (13) Además, se describe que es una enfermedad irreversible y transmisible, en donde existen mecanismos dinámicos de desmineralización y remineralización, resultado del metabolismo de distintas bacterias sobre la superficie dentaria, los que por diversos factores pueden llegar a la cavitación de los tejidos duros del diente. (14)

La caries dental es un problema a nivel mundial. Según datos entregados por la organización mundial de la salud (OMS), esta enfermedad afecta entre un 60 y 90% de los escolares a nivel mundial, y a cerca del 100% de los adultos. Además se ha observado que es la enfermedad bucodental más frecuente en varios países asiáticos y latinoamericanos. (15, 16) A nivel nacional afecta a niños

de 6 años en un 70,4% y a los de 12 años en un 62,5%. (17) Esto, en conjunto con el alto costo, la poca cobertura que existe a nivel dental y el aumento en el consumo de azúcares refinados conlleva a que estos problemas probablemente aumenten con el transcurso de los años. (16)

Para el desarrollo de la caries son necesarios distintos microorganismos endógenos, siendo los principales patógenos *S. mutans* y *S. sobrinus*, no obstante, los colonizadores primarios son igualmente importante, ya que ellos son quienes comienzan la formación de la biopelícula dental. Bacterias tales como *S. sanguinis, S. oralis, S. mitis* son las primeras en aparecer y formar la biopelícula. Luego se co-agregan otras bacterias, entre las que se destacan *S. salivarius, S. mutans, S. sobrinus y S. gordonii,* entre otros. Estos en contacto con hidratos de carbono presentes en la dieta producen la fermentación a través de ácidos orgánicos débiles, bajando la concentración de pH. Si se pierde la homeostasis entre desmineralización y remineralización, y el pH sigue descendiendo hasta llegar a un pH critico menor a 5,5, conllevará a la desmineralización localizada del diente. (18)

La desmineralización es el proceso de remover minerales en forma de iones desde la superficie del esmalte mediante un intercambio iónico. Un número substancial de iones se pueden remover del componente principal del esmalte, la hidroxiapatita, sin destruir su estructura. Cuando se remueve una gran cantidad de minerales de la hidroxiapatita se genera una perdida en su estructura, provocando una cavitación. Este proceso puede ser revertido mediante la remineralización de la hidroxiapatita, en donde la homeostasis juega un rol muy importante en el progreso de la lesión. (19)

## Etiología de la caries dental

No existe solo un componente que pueda dar comienzo al proceso de la caries dental, siendo esta más bien multifactorial, compuesta por varios factores que se interrelacionan entre sí. Todos estos se basan en la triada de Keyes y las

modificaciones que se han propuesto a esta. Los principales factores son: microorganismos, estructura dentaria, dieta, tiempo y saliva.

1. Microorganismos: Los principales microorganismos cariogénicos son *S. mutans* y *S. sobrinus*, no obstante, bacterias tales como *S. oralis, S. mitis* y *S. Sanguinis* son colonizadores primarios, los que se unen a la película adquirida que se forma sobre el diente mediante glucosiltransferasas (GFTs) y proteínas de unión a glucanos, para dar comienzo a la formación de la biopelícula dental. Estos provocan un ambiente adecuado para que otras bacterias puedan resistir y vivir, las cuales llegan posteriormente para acoplarse a la biopelícula dental, produciendo una mayor cantidad de ácidos hasta llegar a un pH crítico, lo cual conlleva a la destrucción localizada de la superficie dental. (18)

2. Estructura dentaria: La maduración del esmalte tras la erupción dental es importante para la susceptibilidad del diente, ya que al estar en contacto con fluoruros provenientes de la saliva provoca que se añadan a la estructura de la hidroxiapatita, generando un esmalte más resistente. Mayor cantidad de surcos y fisuras en la superficie dental, además de irregularidades en el arco generan una dificultad para la higiene, obteniendo un riesgo mayor en la generación de caries. Otros aspectos, como factores genéticos, tales como hipoplasias o hipomineralizaciones, generan una estructura dentaria más débil. (20)(21)

3. Dieta: Un consumo elevado de carbohidratos fermentables provoca que las bacterias orales tengan una fuente de energía constante en el medio, generando un constante desequilibrio en el pH, lo que conlleva a una pérdida de la homeostasis entre remineralización y desmineralización, provocando la desmineralización localizada sobre la hidroxiapatita e inicio de la caries dental. Los *Streptococcus orales* poseen glucosiltransferasas (GFTs), los cuales catalizan la síntesis de glucanos mediante la utilización de sacarosa. Otros como las proteínas de unión a glucanos, tienen afinidad

por las diferentes formas del glucano y contribuyen a la adhesión de la biopelícula dental. (22) Se ha observado que el consumo de alimentos con formas más adhesivas son más cariogénicos que las sólidas, y a su vez estas lo son más que las liquidas. Otros factores que influyen en el riesgo cariogénico son el consumo elevado de carbohidratos fermentables, así como el consumo de éstos entre comidas. (23) Los estudios Vipeholm de caries dental conectan la cantidad y la frecuencia de consumo de sacarosa con caries, con efectos significativos en la cariogenicidad. (24)

4. Tiempo: Cantidad de tiempo que se encuentra el diente frente a la exposición de ácidos y microorganismos. Mientras mayor sea el tiempo de exposición frente a los agentes ácidos, mayor será la probabilidad de generar lesiones cariosas.

5. Saliva: La saliva juega un rol fundamental en la prevención de caries, en el que neutraliza los ácidos y provee de minerales y proteínas que protegen al diente. Aproximadamente el 99.5% de la saliva es agua, el 0,5% restante está compuesto por constituyentes orgánicos e inorgánicos, incluyendo electrolitos, componentes antibacterianos, mucus y enzimas. Dentro del componente orgánico encontramos albumina, aminoácidos, glucosa, lisozimas, mucinas, etc. En el componente inorgánico encontramos bicarbonato, fosfatos, calcio, fluoruros, etc. Todos estos elementos son de gran importante para la prevención de caries. Factores como el sexo, la edad, genes, enfermedades sistémicas, etc. van a afectar la tasa de secreción y composición de la saliva. Bajas concentraciones de flúor se pueden encontrar en la saliva, sin embargo, este juega un rol fundamental en la remineralización y refuerzo de la pieza dentaria, ya que genera fluorapatita, la cual es mucho más resistente al ataque acido. La saliva tiene un sistema buffer, el cual permite generar un balance en el pH salival. Este sistema incluye proteínas, bicarbonato, fosfatos presentes en la saliva. El pH salival dependerá de las concentraciones de bicarbonato presente.

Cuando este es mayor aumenta el pH salival, haciendo la saliva más básica. Por otro lado, un bajo flujo salival provoca que el pH descienda, haciendo que la saliva se torne más ácida. Es por ello que enfermedades que provocan un descenso en el flujo salival sean más propensos a generar lesiones cariosas. Ciertas glucoproteínas en la saliva se adhieren sobre la superficie dental para generar la película adquirida. Esta película está relacionada en procesos importantes como la colonización bacteriana, la protección de la superficie dentaria frente a los ácidos, entre otros. (25)

## ***Streptococcus orales* – Fermentación**

*S. mutans, S. sobrinus, S. salivarius, S. gordonii, S. oralis y S. sanguinis* son bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas, capnofílicas, de morfología esférica, que se agrupan en diplos o cadenas. Todas estas tienen la capacidad de acidogenicidad gracias a su metabolismo fermentativo, produciendo una baja en el pH mediante la utilización de azúcares, y la eventual desmineralización de la superficie dental. Además son acidófilas, donde son capaces de resistir medios ácidos bombeando protones fuera de la célula. Algunas bacterias como *S. mutans* son acidúricas, es decir, tiene la capacidad de seguir produciendo ácidos en medios con pH bajo. (14)

Estudios muestran que la composición bacteriana en la fase inicial de la lesión cariosa es significativamente diferente a la que encontramos en etapas posteriores, así como la de la placa dental a superficies dentales. Aunque la proporción relativa de *S. mutans* incrementa de un 0.12% en la placa dental a un 0.72% en caries de esmalte, *S. mitis* y *S. sanguinis* son los *Streptococcus* dominantes en estas lesiones. (26) Las lesiones cariosas son un ecosistema diverso, en donde *S. mutans* ocupa tan solo un 1,6% de la comunidad bacteriana en las lesiones. (27)

Otros Estudios han demostrado que el género *Streptococcus* predomina en un 40% en lesiones cariosas superficiales de esmalte, no obstante, en lesiones cariosas más avanzadas, de dentina o interproximales, el género *Streptococcus* se

reduce drásticamente, bajando a un 20% aproximadamente, tal como se muestra en la figura 1.




Fig. 1. Composición taxonómica de las distintas bacterias de lesiones cariosas iniciales, avanzadas e interproximales. (27)

Por lo que los *Streptococcus* orales *son* un gran precursor de las lesiones cariosas iniciales, ayudando a otras especies bacterianas a la colonización y posterior destrucción del diente. En la figura 2, podemos apreciar que el principal microorganismo presente en lesiones superficiales en mayor proporción es *S. Sanguinis,* con una predominancia del 50%, aumentando aún más en lesiones dentinarias o interproximales llegando hasta el 70 y 80% respectivamente. Otro microorganismo predominante es *S. mitis*, el cual se presenta en mayor medida en lesiones de esmalte. En relación a *S. mutans*, se encontró una baja proporción en todas las lesiones, yendo desde un 0.73% en lesiones de esmalte, hasta un 0.48% en dentina y un 0.02% en lesiones interproximales. La baja proporción demuestra que esta especie es minoritaria, y permite cuestionarse la importancia como factor etiológico principal en la caries dental. (27)

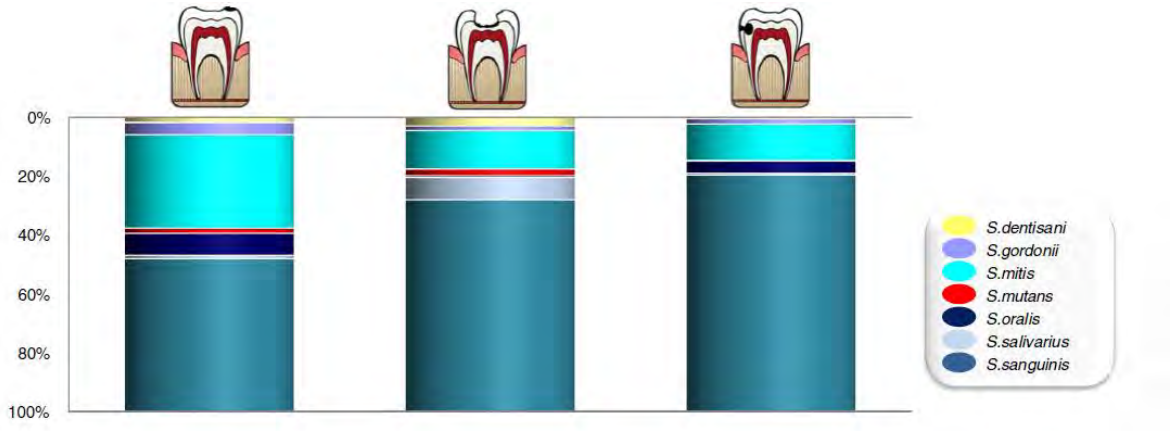



Fig. 2. Ilustración de las distintas especies bacterianas de *Streptococcus orales* en lesiones de esmalte, dentina e interproximales. (27)

Los *Streptococcus orales* son capaces de utilizar los azúcares y carbohidratos disponibles en alimentos de consumo diario como fuente de energía y fermentarlos, produciendo energía que es aprovechada por las bacterias. Estas son capaces de fermentar una gran cantidad de sustancias como la glucosa, sacarosa, maltosa, entre otras, mediante la vía de la glucólisis, obteniendo como producto final ácido láctico. Esta vía genera liberación de protones al medio, acidificándolo. Al descender el pH, los iones fosfatos e hidroxilos van a formar ácidos en presencia de los protones, lo cual conlleva a tener una solución subsaturada respecto a la hidroxiapatita. Esto provocara una disolución del cristal hacia el medio, provocando la salida de iones en la hidroxiapatita y finalmente la desmineralización de la estructura dentaria.

En la figura 3 podemos observar como el pH actúa en la disolución de la hidroxiapatita, en donde al haber un descenso en el pH se comienza a disolver debido a que las soluciones que lo rodean se vuelven insaturadas. (28)

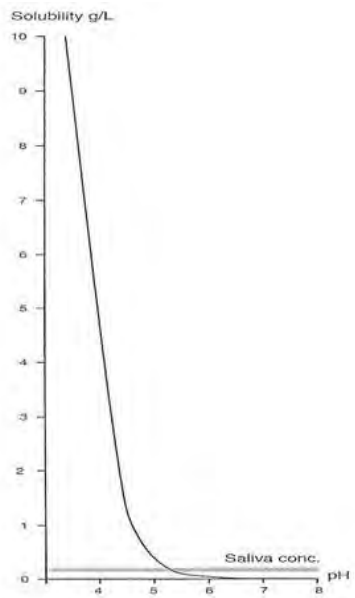



Fig. 3. Gráfico de solubilidad vs pH. La solubilidad es nula hasta el pH 5.5. A menor pH se observa que la solubilidad de la hidroxiapatita aumenta. (28)

## Azúcares fermentables

Los microorganismos y los factores de la dieta, principalmente azúcares fermentables, han sido estudiados por más de 120 años. El exceso y/o la frecuencia en el consumo de azúcares, especialmente la sacarosa, juegan un rol fundamental en la formación de caries. (29) Dentro de estos, los más utilizados son la glucosa y sacarosa.

- **Glucosa**

La glucosa es un carbohidrato, monosacárido, siendo el azúcar simple más importante para el metabolismo. Es una de las principales fuentes de energía para microorganismos. Estudios han demostrado que los *Streptococci* orales se ven beneficiados al crecer en medios enriquecidos con glucosa e incluso produciendo ácidos en mayor cantidad. Se ha observado que tanto *S. mutans,* como *S. sobrinus* generan una mayor producción de ácidos, a un pH más bajo y en menor tiempo, en medios enriquecidos con glucosa. (30)

- **Sacarosa**

La sacarosa se compone de fructosa y glucosa, y es quizás uno de los carbohidratos más eficientes para la formación de caries dental en humanos. Bacterias como *S. mutans* codifican múltiples enzimas que están involucradas en el metabolismo de este disacárido. Además sirve como fuente de energía y de carbono metabolizable para una gran variedad de microorganismos orales y es un sustrato particularmente efectivo en la generación de ácidos orgánicos mediante la vía de la glucolisis por los *Streptococci* orales. La sacarosa es un sustrato para las enzimas glucosiltransferasas (GTFs) que están presentes en los *Streptococci* orales, las que permiten generar componentes que promueven la formación de la biopelícula dental sobretodo en superficies lisas del diente. Otras enzimas son las fructosiltransferasas (FTFs) que también se encuentran presente en muchos *Streptococci* orales y que convierten la sacarosa en polímeros de fructosa (fructanos) y glucosa libre. Los fructanos sirven como energía de almacenamiento extracelular para los diversos microorganismos y además pueden ser hidrolizados para reducir y extender el pH de la biopelícula dental. (31)

## Azúcares sustitutos

Estos son aditivos alimentarios que generan mayor dulzor que el azúcar, pero con menor cantidad de calorías, siendo naturales o sintéticos. Se ha estimulado el uso de estos en pacientes diabéticos, obesos y con caries dental. Por consecuente, y debido a que los *Streptococcus orales* son capaces de producir ácidos a partir de los azúcares fermentables, es que se han buscado alternativas para evitar la desmineralización de la superficie dentaria con el uso de estos azúcares sustitutos. Algunos estudios indican que los azúcares sustitutos no son metabolizados a ácidos por los microorganismos orales, por lo que no pueden causar caries dentales. (32) Dentro de los más utilizados se encuentran el sorbitol, manitol, xilitol y stevia, entre otros.

## Polioles

Los polioles son polialcoholes, o “alcoholes de azúcar”, ya que su estructura química es similar al azúcar y al alcohol, pero no son ninguno de ellos. Son carbohidratos hidrogenados usado en remplazo al azúcar. Se ha masificado su uso debido al potencial benéfico en la salud. Estos no son cariogénicos, y benefician a pacientes diabéticos y obesos por presentar bajas calorías, entre otros. Estos representan una baja fuente de energía para los microorganismos de la cavidad bucal, por lo que se describen como seguros para los dientes. (33) Dentro de los polioles más comúnmente utilizados se encuentra sorbitol, manitol y xilitol.

- **Sorbitol**

El sorbitol es un “alcohol de azúcar” derivado de la glucosa. Estudios demuestran que estimula la producción de saliva, provocando que aumente la capacidad buffer, y neutralizando efectivamente el descenso del pH que se produce en la placa tras comer alimentos fermentables. Otros estudios indican que sorbitol no es metabolizado por la gran mayoría de microorganismos orales, pero puede ser fermentado por *S. mutans* a un ritmo lento. (34) Se ha demostrado que sorbitol no reduce el potencial cariogénico de la dieta ya que altera el pH del medio, induce la formación de placa con mayor biomasa y genera lesiones cariosas más profundas. (35)

- **Manitol**

Es un derivado de la hexosa que tiene grupos alcohol como radicales. Estos son preparados comercialmente mediante la reducción de la dextrosa. (36) Se ha visto en estudios que el manitol reduce las caries en un 70%, mientras que xilitol y sorbitol lo hacen en un 86% y 48% respectivamente. Manitol y sorbitol son capaces de ser reconocidos por estreptococos cariogénicos y provocan además, el crecimiento de *Streptococcus mutans* y conformación de la placa dental. (37)

- **Xilitol**

El xilitol es un polialcohol. Este endulzante no cariogénico es utilizado comúnmente en chicles, dentífricos y colutorios. Estudios han demostrado que el xilitol es recomendado como medida preventiva para reducir la caries dental. También se ha observado que reduce la acumulación de placa reduciendo la expresión de glucosiltransferasas B (GTFB). Por otra parte, disminuye la producción de ácidos metabólicos, el crecimiento y metabolismo de los *Streptococci*, y contribuye a la remineralización de la superficie dental formando un complejo de calcio-xilitol. (38) El uso de altas concentraciones de xilitol inhibe a *Lactococcus lactis* en el tiempo, pero no así en *S. salivarius* y *L. casei.* Además, en medios enriquecidos con altas cantidades de xilitol, se ha visto que el crecimiento de *S. salivarius* se ve aumentado. (38, 39) Otros estudios han mostrado que el xilitol limita la caries dental incluso en la presencia de ambientes ácidos y cariogénicos e incluso es más efectivo que el sorbitol. (37)

**Stevia**

El stevia es derivado de Stevia Rebaudiana, una planta sudamericana. Sus hojas contienen glucósidos específicos que otorgan el sabor dulce, pero sin aportar calorías, obteniendo un dulzor entre 150 a 300 veces más potente que la sacarosa. El componente principal es el esteviósido, constituyendo cerca del 85%, mientras que el rebaudiósido A está presente en menor proporción, pero es el que otorga mayor dulzor. (40) Estudios han demostrado que posee propiedades anticariogénicas mediante sus componentes principales. Se ha visto que suprime el crecimiento de *S. mutans* y además provoca que segregue menos ácidos al ser sembrados en medios que contienen esteviósidos en comparación con sacarosa y glucosa. (41)

## Tratamiento de la caries dental

El tratamiento de esta enfermedad consiste prioritariamente en la prevención, evitando la formación de lesiones cariosas y reforzando la estructura

dentaria, en conjunto con la eliminación de la infección bacteriana. Es decir, se deben eliminar factores patogénicos que favorecen el desarrollo de la lesión y no solo tratar los síntomas y signos de la enfermedad. (42) Se entiende por prevención a cualquier medida que reduzca la probabilidad de alguna enfermedad o afección, o bien interrumpir o disminuir la progresión de esta. No solo se trata de evitar la afección, sino también de detener su progresión hasta conseguir la curación una vez aparecida esta, o bien de retrasar el curso de esta lo máximo posible.

Las principales medidas en la prevención de la progresión de caries son (43):

1. Eliminación de la placa bacteriana: Reforzar las técnicas de cepillado para poder remover la placa dental de manera eficiente, provocando una desorganización de la placa microbiana.
2. Aplicación de sellantes de fisura: El cepillo no llega a surcos profundos debido a que el grosor de las cerdas es mayor que el del surco, provocando un acumulo de microorganismos y formación de placa dental, permitiendo la progresión de la enfermedad. Los sellantes buscan cubrir las fisuras y surcos profundos, las cuales son las zonas más susceptibles y retentivas. Estos dejan una superficie más lisa, impidiendo la colonización bacteriana y facilitando la remoción mecánica de estos mediante técnicas de higiene.
3. Cambios en la dieta: Dietas que son cariogénicas o ricas en azúcares fermentables favorecen la aparición de la enfermedad. Los microorganismos presentes en boca fermentan y producen ácidos que terminan en la destrucción de la pieza dentaria. Existen ciertos factores de la dieta que favorece que sean más cariogénicas que otras, dentro de los cuales encontramos.
    a. Frecuencia: Si consumimos mayor cantidad de alimentos azucarados, mayor será el riesgo cariogénico. Por el contrario, un menor consumo de alimentos azucarados genera un menor riesgo.

b. Contenido de azúcar: Alimentos que poseen azúcar más fermentables o en mayor cantidad son más cariogénicos que los alimentos que poseen una menor cantidad.
c. Momentos de ingesta: El consumo de azúcares durante las comidas genera un menor riesgo respecto al consumo de alimentos azucarados entre comidas. Cuando existen más de 4 momentos de ingesta de azúcar al día se considera un riesgo cariogénico.
d. Consistencia de los alimentos: Los alimentos que son más adhesivos se adhieren más fácil a la superficie dental, permaneciendo más tiempo y provocando un mayor riesgo; mientras que alimentos más líquidos y menos adhesivos generan un menor riesgo.
e. Factores protectores: Ciertos alimentos tienen factores que protegen al diente del ataque de los microorganismos. La leche y derivados tienen alto contenido de calcio, grasas, caseína y fosfatos, los que aumentan el pH por el aumento en la secreción salival. La manzana tiene gran cantidad de polifenoles, los que estimulan la secreción salival. (44)

4. Aplicación de Fluoruros: El flúor puede ser aplicado de manera tópica o sistémica. El uso de barnices de flúor de manera tópica se considera apropiado para las superficies dentales que se encuentran en riesgo en individuos susceptibles a la formación de caries, y además en niños con riesgo moderado y alto de prevalencia de caries. Estos fueron desarrollados para prolongar el tiempo de contacto entre el flúor y el esmalte dental, ya que se adhieren a la superficie por tiempos prolongados en una capa delgada, previniendo la inmediata perdida de flúor después de su aplicación, actuando como un reservorio de flúor para el medio. El flúor remplaza los iones hidroxilos presentes en la hidroxiapatita y la transforma en fluorapatita, un compuesto más estable y menos soluble frente a los ataques ácidos de la fermentación bacteriana. Es importante destacar que la fluorapatita se disuelve a un pH bajo 4,5, mientras que la hidroxiapatita lo hace en un pH 5,5, favoreciendo así la resistencia de la pieza dentaria. Este

> también afecta a la placa bacteriana, inhibiendo parcialmente la producción de ácidos sobre los microorganismos de la placa, presentando acción toxica frente a las bacterias e impidiendo la adherencia de bacterias a la película adquirida cambiando la carga superficial del diente. El flúor también actúa por medios sistémicos (fluoración del agua, la sal, leche, etc.), sin embargo resulta menos eficiente que por medio tópico y puede provocar fluorosis dentales. El medio sistémico no facilita que llegue el flúor de manera eficiente a la estructura dentaria, mientras que el sistema tópico permite un intercambio directo en la estructura dentaria. (45)

Otro tipo de tratamientos cuando la lesión ya se encuentra presente y esta no puede ser tratada mediante la prevención, son las restauraciones dentales. Estas forman parte de una terapia local que facilita el control de la placa dental, no siendo el principio ni el final del proceso, ya que no evitan la posterior formación de caries en caso de tener una higiene deficiente. Estos tratamientos son procedimientos no reversibles, haciendo que los dientes sean más propensos a la fractura, ya que debilita la estructura dentaria; y a lesiones cariosas adicionales por la filtración marginal que se puede provocar entre la unión de la restauración y el diente. No obstante, esta terapia es necesaria para eliminar las lesiones cariosas generadas por los microorganismos cuando esta progresa sin control. Esta terapia se realiza si la terapia preventiva no tuvo éxito, donde no fue posible revertir el riesgo cariogénico. (43)

Estudios han demostrado que por sí sola la obturación del diente afectado no elimina la infección causante e incluso provoca un deterioro mayor en la estructura dentaria, debilitando el diente y generando una mayor propensión al desarrollo de lesiones secundarias en los márgenes de las restauraciones. Esto se da principalmente por el hecho de que los microorganismos, la deficiencia en la higiene, el bajo flujo salival, un alto consumo de azúcares fermentables, etc., aún siguen estando presentes, provocando un riesgo cariogénico y permitiendo la desmineralización de las estructuras dentarias. (46)

Debido a que la caries dental no tiene un solo factor etiológico, siendo más bien un proceso multifactorial y dinámico, es que se han realizado muchos estudios para poder combatir esta enfermedad. Los azúcares fermentables y sustitutos son utilizados en muchos medicamentos y alimentos, por lo que las bacterias podrían eventualmente utilizarlos para la fermentación de estos y posterior producción de ácidos, provocando la desmineralización localizada de la estructura dentaria.

## HIPÓTESIS

Por lo anteriormente expuesto es que se formula la siguiente hipótesis:

**"*Streptococci* orales son capaces de fermentar la gran mayoría de azúcares utilizados como endulzantes en la dieta".**

## OBJETIVOS

Evaluar la fermentación de endulzantes por Streptococci orales en estudiantes de Odontología de la Universidad Andrés Bello sede Santiago entre 18 y 30 años.

### Objetivos específicos

- Caracterizar genotípicamente y fenotípicamente *Streptococci* orales.
- Determinar la capacidad y frecuencia de fermentar distintos tipos de endulzantes

### Objetivos secundarios

- Determinar la prevalencia de caries en los estudiantes de Odontología
- Relacionar el índice COPD con la capacidad de fermentación de las bacterias.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. Selección de pacientes

El presente estudio es experimental no controlado. Se tomaron muestras de saliva a 81 estudiantes de odontología de la Universidad Andrés Bello, sede Santiago, entre 18 - 30 años.

Se seleccionó la Universidad Andrés Bello de forma intencionada por la factibilidad de acceso y facilidad en la toma de muestras de los estudiantes.

Se solicitó la autorización del director del laboratorio de microbiología y biotecnología oral de la Universidad Andrés Bello para hacer uso de las instalaciones y recursos durante el desarrollo de esta investigación. (ANEXO N°1)

Se contactó al secretario académico y director de clínicas de la Universidad, donde se les explico mediante una carta dirigida, los objetivos del estudio y el procedimiento, informando explícitamente que los datos serán confidenciales y la importancia de la participación de los estudiantes en el estudio. (ANEXO N°2A-B)

Una vez aceptada la solicitud por parte de las autoridades de la Universidad, se coordinó con la enfermera a cargo los horarios de toma de muestra de saliva de los alumnos y la utilización de materiales para ello.

El muestreo es probabilístico, donde la muestra se obtendrá a partir de la saliva estimulada.

A) Criterios de inclusión:
   - Rango etario entre 18 – 30 años.
   - Estudiantes de Odontología de la Universidad Andrés Bello.

B) Criterios de exclusión:
   - Pacientes con enfermedades que impidan la toma de muestra (S. Sjogren, xerostomía, etc.)

## 2. Obtención de muestras de saliva

La toma de muestras se realizó por dos observadores, seleccionando a estudiantes de primero a sexto año. Cada estudiante recibe un consentimiento informado, en donde se explica en que consiste el procedimiento (recolección de saliva y examen clínico bucal) y el estudio. (ANEXO N°3) Luego de esto, los estudiantes debían depositar la saliva estimulada en un tubo Falcon estéril. La saliva era estimulada mediante la masticación de láminas de parafina. Parafilm®, durante 3 minutos.

Tras la obtención de la muestra se realizaba un cuestionario y un examen clínico, en donde se contabilizaba el índice COPD de cada estudiante. (ANEXO N°4)

Posteriormente las muestras eran trasladadas hasta el laboratorio de Microbiología y Biotecnología Oral de la Universidad Andrés Bello para ser procesadas.

## 3. Siembra de muestras de saliva

Las muestras de saliva recolectadas se siembran en placas Petri con medio Mitis Salivarius Bacitracina Telurito de Potasio (MSBT), selectivo para *Streptococci* orales y se incubaron en capnofilia a 37°C por 48 horas.

## 4. Medios de Cultivo

### A. Agar Mitis Salivarius Bacitracina Telurito de Potasio (MSBT)

Se disuelven 7,5 gr. de medio Mitis Salivarius y 1,5 gr. de Agar granulado en 100 mL de agua destilada. Se agita suavemente hasta su completa disolución, y se autoclava por 20 min. Cuando está a una temperatura adecuada (40-50°C) se agregan para 100 mL: 100 µL de Bacitracina (200 unidades/mL) y 100 µL de Telurito de Potasio al 1%. Se vierte el medio en placas Petri para ser usadas posteriormente.

**B. Tripticasa de Soya (TSB)**

Se disuelven 3 gr. de Tripticasa de Soya en 100 mL de agua destilada. Se autoclava por 20 min.

**C. Caldo Rojo Fenol**

Para cada caldo de los distintos azúcares (Glucosa, Sacarosa, Manitol, Sorbitol, Xilitol y Stevia), se disuelven: 0,5 gr. Peptona de Caseína, 0,25 gr. Cloruro de Sodio, 0,009 gr. Rojo de Fenol (pH final 7.4 $\pm$ 0.2) y 0.25 gr. de cada azúcar en 50 mL de agua destilada. Se agita suavemente hasta su completa disolución, y se autoclava a 117°C por 20 min.

**D. Caldo Peptonado**

Se disuelven 0,5 gr. de Peptona de Caseína y 0,25 gr. de Cloruro de Sodio en 50 mL de agua destilada. Se agita suavemente hasta su completa disolución, y se autoclava a 117°C por 20 min.

**E. Medios de conservación: Caldo TSB con glicerol**

Se incorporan 600µL de glicerol estéril 50% (v/v) como preservante en un tubo eppendorf que contiene 600 µL de medio TSB. Se efectúa una suspensión espesa de la bacteria y se congela a -80°C.

**5. Análisis Macroscópico de Colonias**

Identificación de colonias con morfología macroscópica según criterios compatibles con *Streptococcus salivarius, Streptococcus oralis, Streptococcus sanguinis, Streptococcus gordonii, Streptococcus sobrinus, Streptococcus mutans* como se observa en la figura 4, y aisladas para un crecimiento puro.

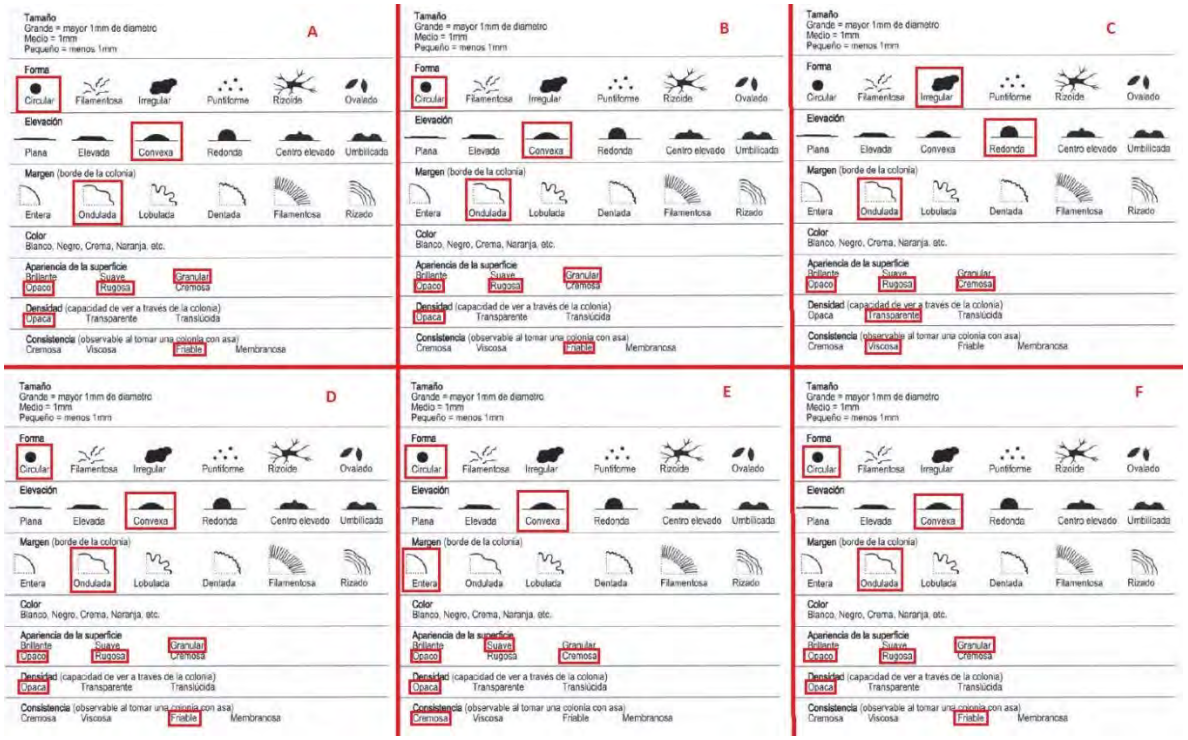



Fig. 4. Análisis macroscópico de colonias. A; *S. mutans,* B; *S. gordonii,* C*; S. salivarius,* D; *S. sanguinis,* E; *S. sobrinus* y F; *S. oralis*

## 6. Análisis Microscópico de Colonias

En un portaobjeto se depositó una gota de agua para cada colonia analizada y aislada, con el asa previamente estéril y fría. Se tomó una colonia desde la placa, luego se mezcló la muestra con la gota de agua y se homogenizó por la superficie del portaobjeto. Finalmente se fijó por calor.

## 7. Tinción de Gram:

Se agrega al frotis Cristal Violeta por 3 min., se deja escurrir el excedente y se lava con agua destilada, luego se agrega Lugol por 2 min. Se decolora rápidamente con alcohol – acetona y agua destilada (se repite este paso 3 veces), y al instante se agrega Safranina al 1% por 1 min. Se lava con agua destilada y se seca cuidadosamente. Se observó en el microscopio óptico con aumento total de 1000X, se registraron los resultados con fotografías.

## 8. Identificación de *Streptococci orales* mediante PCR de colonias.

En un tubo de eppendorf con 100 µL de agua destilada estéril se mezcló una colonia de una de las muestras y se utilizó el termociclador con el programa de desnaturalización de DNA por 12 min a 95°C.

En otro tubo eppendorf se agregan 10 µL de Master Mix 2X, 0,4 µL del partidor 1, 0,4 µL del partidor 2, como se describe en la tabla 1, y 9,2 µL de DNA recién desnaturalizado. Se lleva al agitador para homogenizar la preparación y luego al termociclador con el programa para PCR de cada cepa bacteriana, descritos a continuación:

- Para *S. salivarius* y *S. oralis*: Desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos constituidos por una desnaturalización a 95°C por 30 segundos, una hibridación a 66°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 45 segundos, terminando con una extensión final a 72°C por 7 minutos.
- Para *S. gordonii, S. sobrinus, S. mutans* y *S. sanguinis*: Desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos constituidos por una desnaturalización a 95°C por 30 segundos, una hibridación a 70°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 30 segundos, terminando con una extensión final a 72°C por 7 minutos.

| Objetivo | Partidor | Secuencia del partidor | T. (°C) | Tamaño (bP) |
|---|---|---|---|---|
| *S. mutans* (gftD) | MKD-F<br>MKD-R | 5´GGCACCACAACATTGGGAAGCTCAGTT3´<br>5´GGAATGGCCGCTAAGTCAACAGGAT3´ | 70 | 433 |
| *S. sobrinus* (gftT) | MKT-F<br>MKT-R | 5´GATGATTTGGCTCAGGATCAATCCTC3´<br>5´ACTGAGCCAGTAGTAGACTTGGCAACT3´ | 70 | 328 |
| *S. salivarius* (gftK) | MKK-F<br>MKK-R | 5´GTGTTGCCACATCTTCACTCGCTTCGG3´<br>5´CGTTGATGTGCTTGAAAGGGCACCATT3´ | 66 | 544 |
| *S. sanguinis* (gftP) | MKP-F<br>MKP-R | 5´GGATAGTGGCTCAGGGCAGCCAGTT3´<br>5´GAACAGTTGCTGGACTTGCTTGTC3´ | 70 | 313 |
| *S. oralis* (gftR) | MKR-F<br>MKR-R | 5´TCCCGGTCAGCAAACTCCAGCC3´<br>5´GCAACCTTTGGATTTGCAAC3´ | 66 | 374 |
| *S. gordonii* (gftG) | MKG-F<br>MKG-R | 5´CTATGCGGATGATGCTAATCAAGTG3´<br>5´GGAGTCGCTATAATCTTGTCAGAAA3´ | 70 | 440 |

Tabla 1. Partidores, secuencias, tamaño y temperatura de alineamiento utilizados en este estudio (47).

## 9. Electroforesis en Geles de Agarosa para comprobar la presencia de ADN

Los geles se prepararon usando Agarosa a concentración 1,5% (p/v) en tampón TAE (Tris-Acetato 40 mM pH 8 y EDTA 1mM) en cámara fotovoltaica. En la primera ranura se depositan 3 µL AccuRuler 100® bP DNA RTU Ladder, en las siguientes se depositan 5 µL de las muestras de DNA. La electroforesis se realizó a 100V constantes. Las bandas de DNA se visualizan en el transiluminador UV a 254nm y se registran los resultados en una fotografía.

## 10. Evaluación del perfil fermentativo de *Streptococci* orales con diferentes azúcares.

En una placa multipocillos se realizan divisiones para los distintos azúcares y las distintas muestras a evaluar. Se utilizan 200 µL de Caldo Rojo Fenol de cada azúcar por cada pocillo (glucosa, sacarosa, manitol, sorbitol, xilitol y stevia), y se agregan 20 µL de una suspensión bacteriana (1000µL de Caldo Peptonado y bacterias sembradas en Agar MSBT), realizándose en duplicados. A modo de control de crecimiento bacteriano se agrega Caldo Rojo fenol de cada azúcar sin presencia de bacterias y a modo de control de fermentación se agrega *Streptococcus mutans* como suspensión bacteriana. Estos se incuban a 37°C por 24, 48 y 72 horas. Luego se observa el crecimiento bacteriano y la producción de ácido en las cepas analizadas. La presencia de un color amarillo indica una reacción positiva para la fermentación, mientras que el color rojo indica una reacción negativa.

## 11. Análisis de datos

Para analizar los datos se calculó frecuencia y proporción, de cada una de las variables evaluadas. Además de eso se llevaron a cabo los análisis estadísticos de relación entre COPD, capacidad fermentativa y las distintas bacterias identificadas, mediante la utilización del test de chi-cuadrado de Pearson.

El análisis estadístico se realizó a través de SPSS versión 20.

# RESULTADOS

## 1. Caracterizar genotípicamente *Streptococci* orales.

### - Aislamiento de *Streptococci* orales:

Se realiza una toma de muestra a los alumnos de primero a sexto año, de edad entre 18 – 30 años, de la Universidad Andrés Bello, los que fueron un total de 81 alumnos. A estos se les tomo una muestra de saliva para la realización de un estudio experimental, donde se buscaba el aislamiento de distintos *Streptococci* orales, dentro de los cuales están: *S. mutans, S. sobrinus, S. sanguinis, S. gordonii, S. oralis* y *S. salivarius.* Obteniendo un total de 81 muestras.

Se realizó la siembra de las muestras de saliva y la selección de colonias compatibles con características macroscópicas (figura 5) y microscópicas, (figura 6, 7 y 8) de los distintos *Streptococci* orales, y luego, mediante PCR de colonia se determina la presencia de los *Streptococci* orales antes mencionados por electroforesis (figura 9). Por lo que de un universo de 81 muestras y 154 cepas, se lograron aislar 36 cepas de *S. salivarius,* correspondiente al 23% del total, 10 cepas de *S. oralis*, correspondiente al 7% del total, 8 cepas de *S. mutans,* correspondiente al 5% del total, 0 cepas de *S. sanguinis, S. gordonii* y *S. sobrinus* y 100 cepas de S. spp correspondientes al 65% (figura 10)

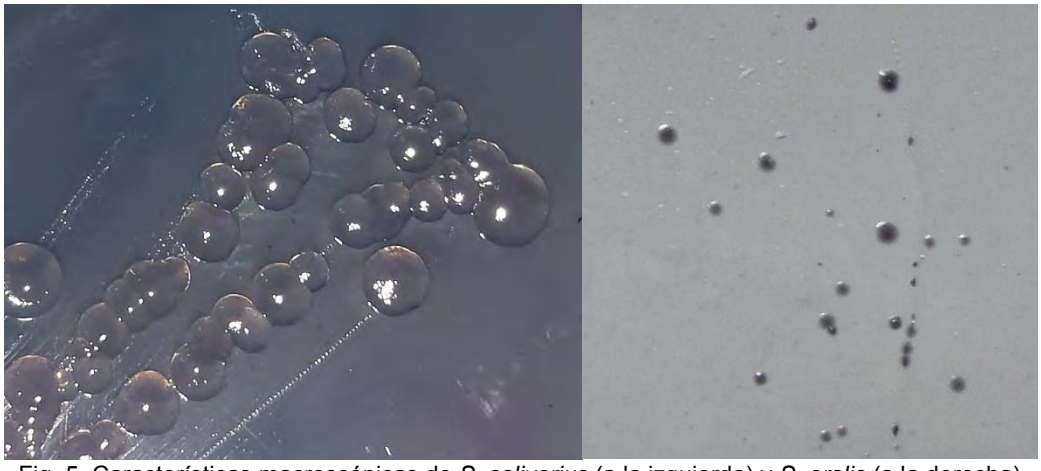


Fig. 5. Características macroscópicas de *S. salivarius* (a la izquierda) y *S. oralis* (a la derecha).

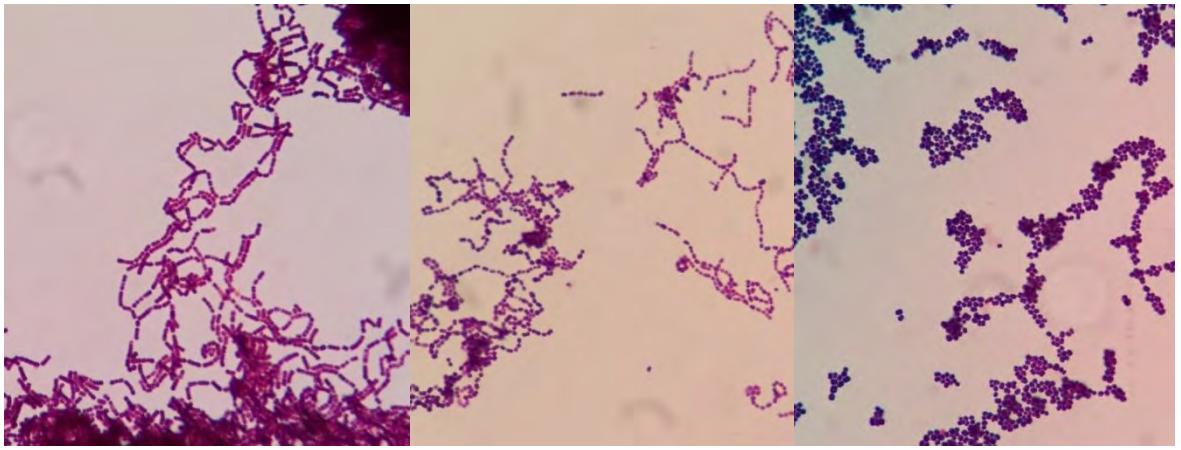


Fig. 6. Distintas características microscópicas de *S. salivarius*

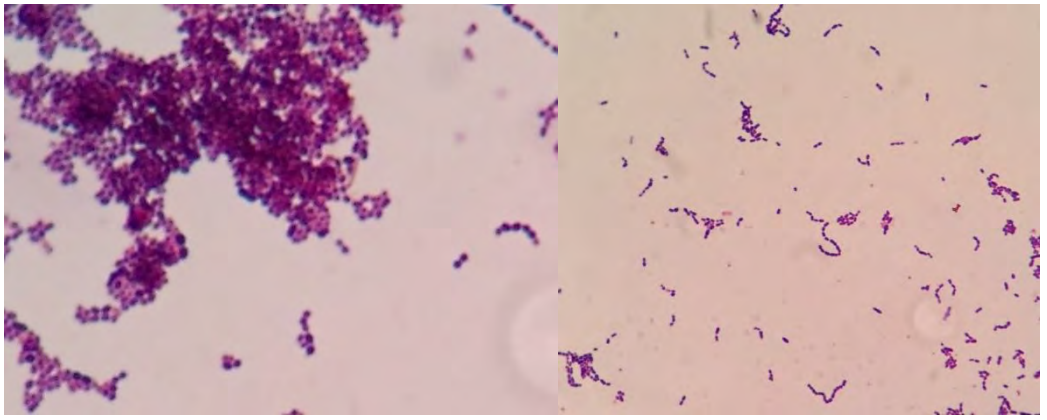


Fig. 7. Distintas características microscópicas de *S. oralis*

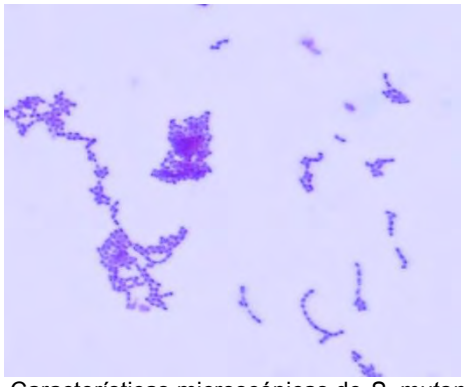


Fig. 8. Características microscópicas de *S. mutans*

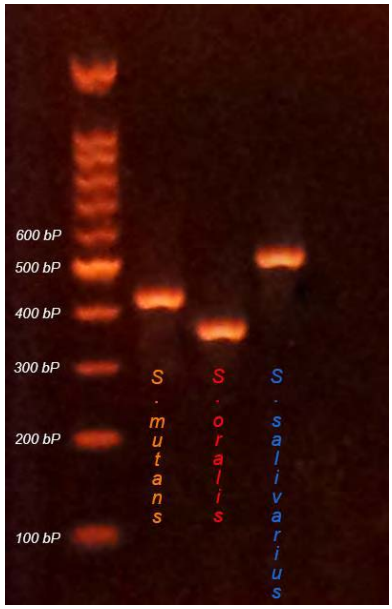



Fig. 9. Electroforesis en gel. Cepas de *S. mutans* (433 bP), *S. oralis (*374 bP) y *S. salivarius* (544 bP)

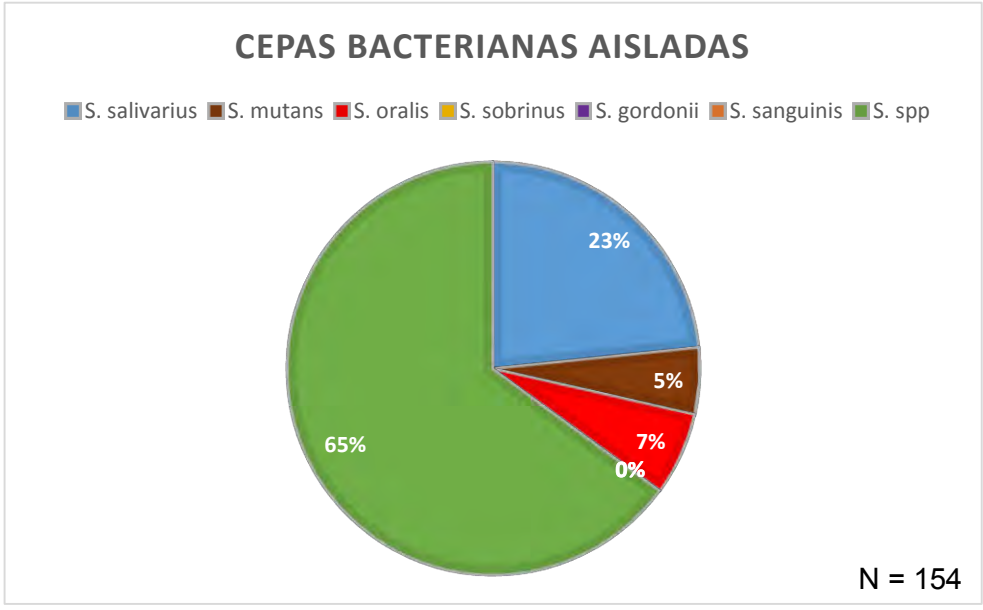



Fig. 10. Gráfico de cepas bacterianas aisladas, de un total de 154 muestras.

2. **Caracterizar fenotípicamente *Streptococci* orales en base a su habilidad de fermentar distintos endulzantes (sacarosa, glucosa, stevia) y polioles (sorbitol, manitol y xilitol).**

Para evaluar la habilidad fermentativa de los distintos *Streptococci* orales, se realizó en placas multipocillos la suspensión bacteriana en presencia de los distintos azúcares, observando la producción de ácidos por la presencia de los *Streptococci* orales. El color amarillo indica una reacción positiva para la fermentación (pH más acido) y el color rojo una reacción negativa para la fermentación (pH más básico). En la figura 11 podemos observar placas multipocillos con cepas de *S. salivarius* en diferentes intervalos de tiempo, 24, 48 y 72 hrs. y su fermentación frente a distintos endulzantes, donde se aprecia que *S. salivarius* fermenta glucosa en primera instancia, seguido por sacarosa a las 48 horas. Tras 72 horas es capaz de fermentar casi todos los endulzantes. Por otra parte, en la figura 12 se observa una placa multipocillos con cepas de *S. oralis* en diferentes intervalos de tiempo, 24, 48 y 72 hrs. y su fermentación frente a los distintos endulzantes, mostrando que *S. oralis* no presenta un grado mayoritario de fermentación a ningún endulzante durante las primeras 24 horas. A las 48 horas, algunas cepas comienzan a fermentar glucosa, no así los otros endulzantes. A las 72 horas ya se observa que glucosa y sacarosa son fermentadas por la bacteria, no así los otros endulzantes.

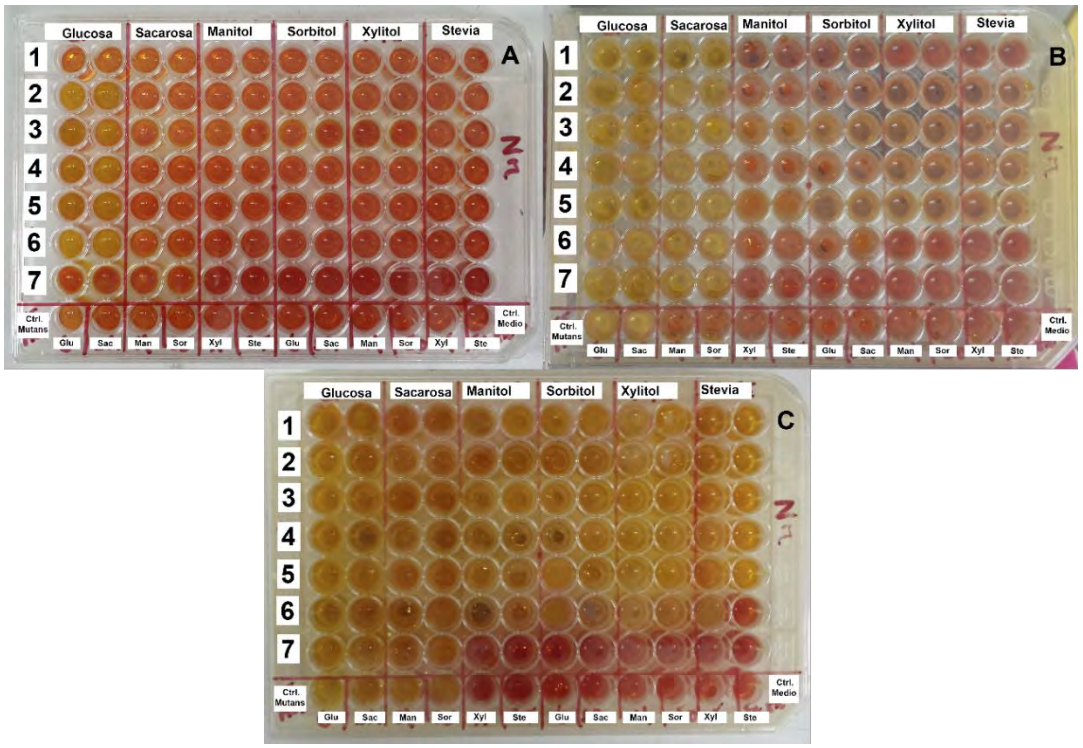



Fig. 11. Ensayos de fermentación de azúcares con cepas de *S. salivarius* en distintos intervalos de tiempo. A; 24 horas, B; 48 horas, C; 72 horas.

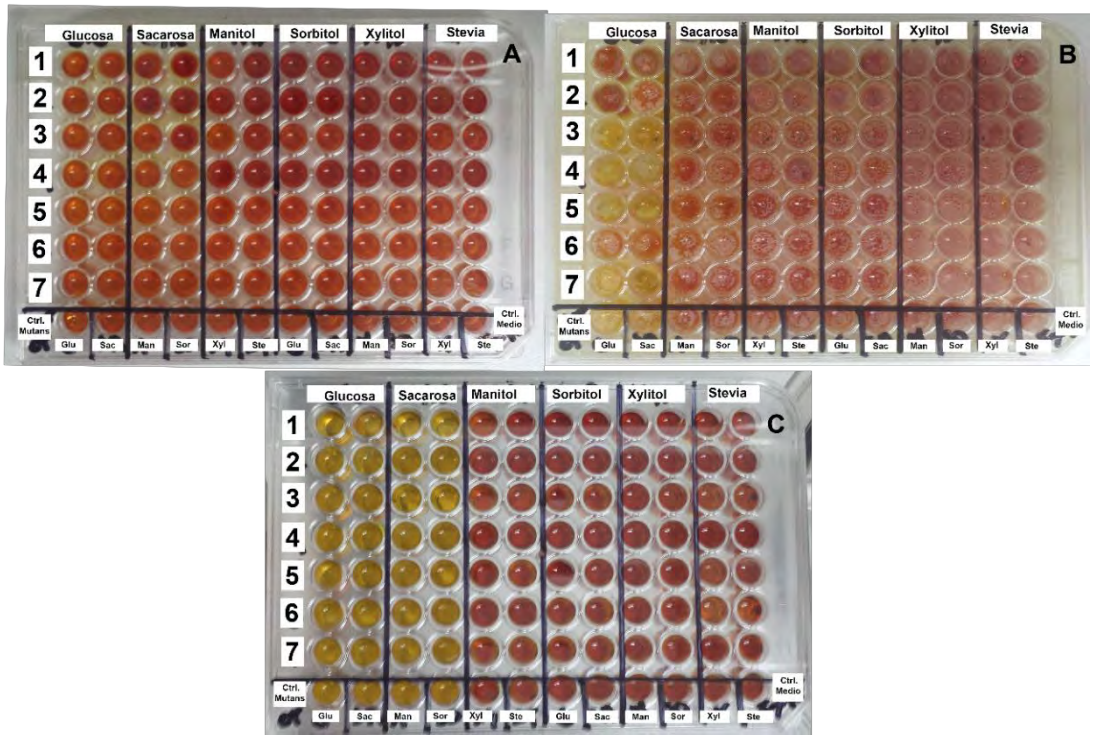



Fig. 12. Ensayos de fermentación de azúcares con cepas de *S. oralis* en distintos intervalos de tiempo. A; 24 horas, B; 48 horas, C; 72 horas.

## Glucosa

Todas las cepas bacterianas fueron capaz de fermentar glucosa en un 100% (figura 13a). Además, se observa que todas las cepas bacterianas analizadas son capaces de fermentar glucosa independiente del intervalo del índice COPD, lo que sugiere que aún en estadíos tempranos de la enfermedad ya existen bacterias patógenas capaces de fermentar (figura 13b).

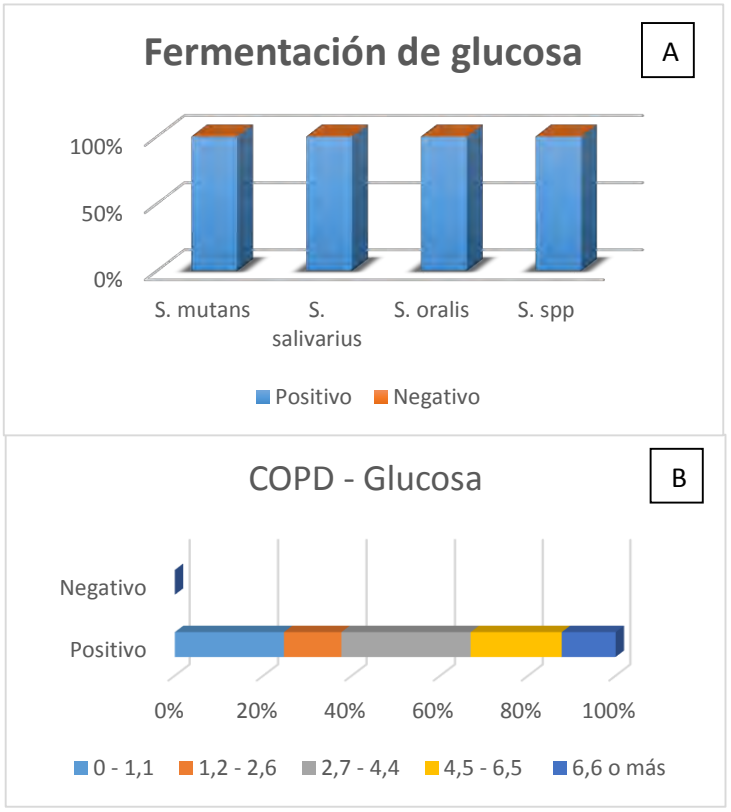



Fig. 13. A. Fermentación de glucosa por distintas cepas bacterianas. B. Relación de índice COPD y fermentación de glucosa

## Sacarosa

Todas las cepas bacterianas fueron capaces de fermentar sacarosa en un 100% (figura 14a). Además, se observa que todas las cepas bacterianas analizadas son capaces de fermentar sacarosa independiente del intervalo del índice COPD, lo que sugiere que aún en estadíos tempranos de la enfermedad ya existen bacterias patógenas capaces de fermentar este azúcar (figura 14b).

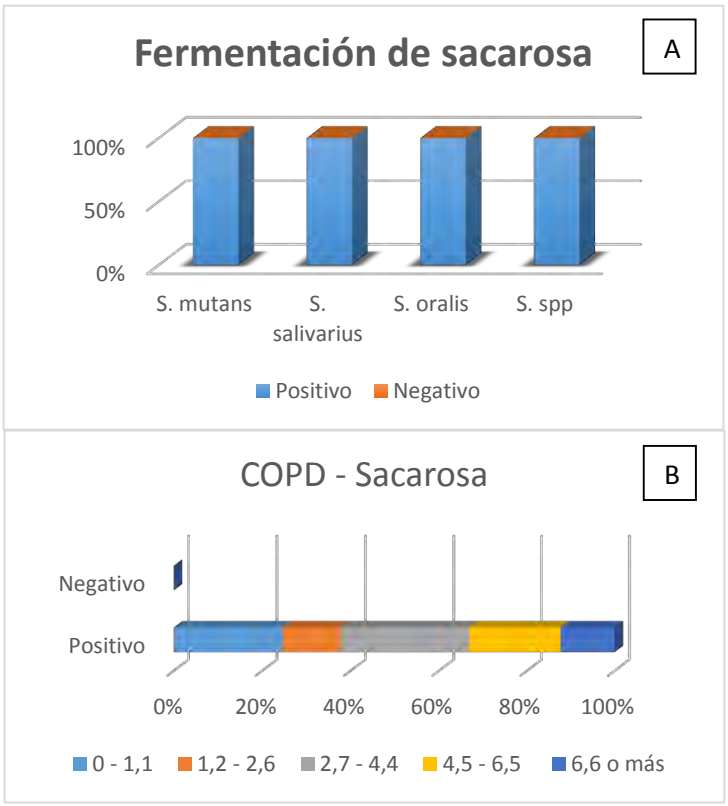



Fig. 14. A. Fermentación de sacarosa por distintas cepas bacterianas. B. Relación de índice COPD y fermentación de sacarosa.

## Manitol

Un 100% de cepas de *S. mutans* son capaces de fermentar manitol, mientras que tan solo el 83% de cepas de *S. salivarius* lo fermenta. La proporción baja cuando observamos *S. oralis,* en donde tan solo el 10% produjo fermentación. Por último, un 23% de cepas de *S. spp* fermentaron (figura 15a).

Se observa además que en rangos menores del índice COPD, la proporción de bacterias capaces de fermentar manitol es menor respecto a los valores intermedios y de mayor riesgo, estableciéndose como límite inferior, el rango 2,7 – 4,4. Pese a esto, no existe una relación entre el índice COPD y la capacidad fermentativa de las cepas bacterianas en cuanto a manitol (figura 15b).

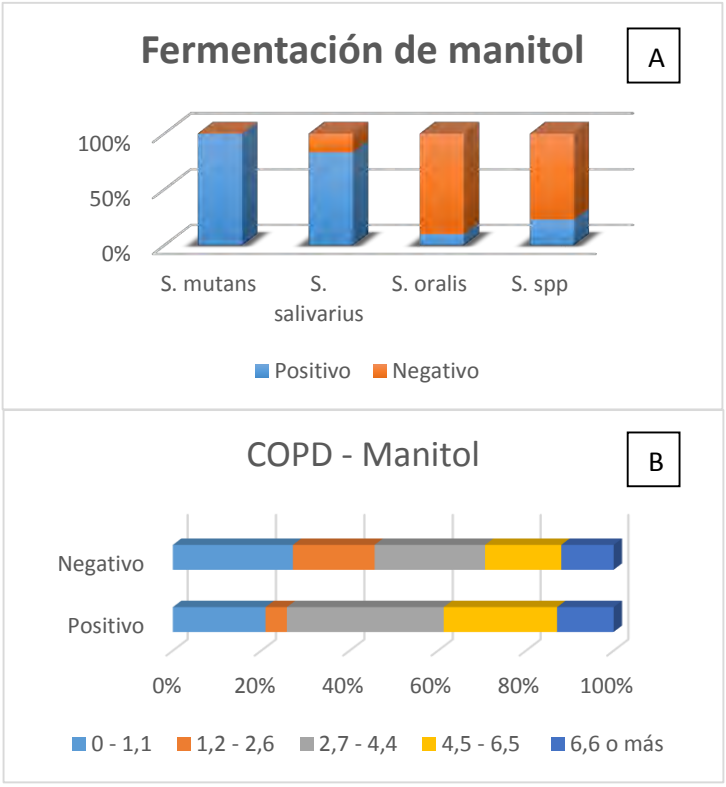



Fig. 15. A. Fermentación de manitol por distintas cepas bacterianas. B. Relación de índice COPD y fermentación de manitol.

## Sorbitol

Un 100% de cepas de *S. mutans* son capaces de fermentar sorbitol, mientras que tan solo el 83% de cepas de *S. salivarius* lo fermenta. La proporción baja cuando observamos *S. oralis,* en donde tan solo el 10% produjo fermentación. Por último, un 23% de cepas de *Streptococcus. spp* fermentaron este poliol (figura 16a).

Se observa además que en rangos menores del índice COPD, la proporción de bacterias capaces de fermentar sorbitol es menor respecto a los valores intermedios y de mayor riesgo, estableciéndose como límite inferior, el rango 2,7 – 4,4. Pese a esto, no existe una relación en cuanto al índice COPD y la capacidad fermentativa de las distintas bacterias (figura 16b).

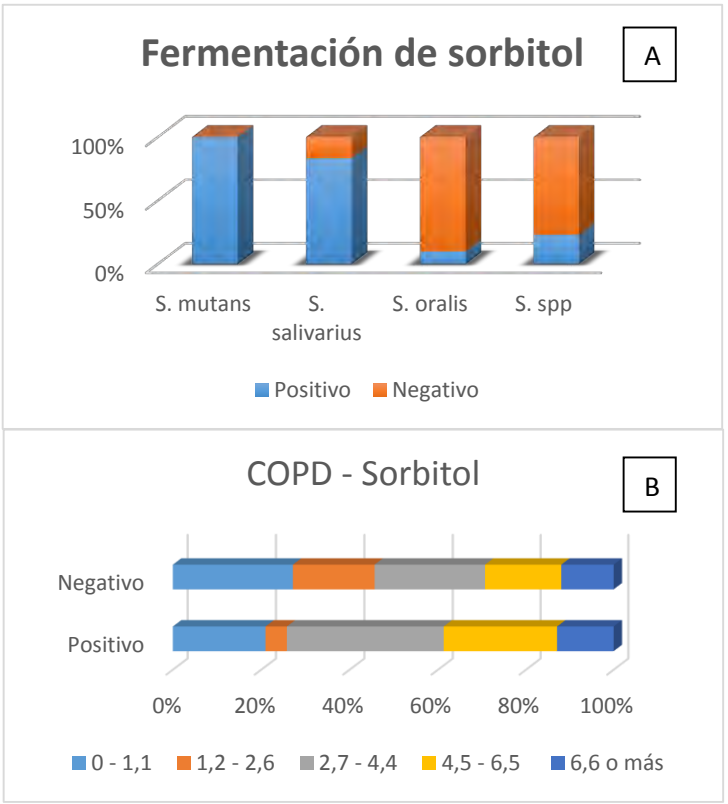



Fig. 16. A. Fermentación de sorbitol por distintas cepas bacterianas. B. Relación de índice COPD y fermentación de sorbitol

## Xilitol

Tan solo *S. salivarius* fue capaz de fermentar xilitol, en donde se observa que un 69% de cepas fueron capaces de fermentarlo. Por el contrario, ninguna cepa de *S. mutans, S. oralis* y *S. spp* fue capaz de fermentar xilitol (figura 17a).

Por otra parte, la proporción de bacterias capaces de fermentar xilitol es menor en todos los intervalos del índice COPD, cuyos valores disminuyen aún más entre los intervalos 0 – 2,6, por lo que existe una relación entre el índice COPD y la capacidad fermentativa frente a xilitol (figura 17b).

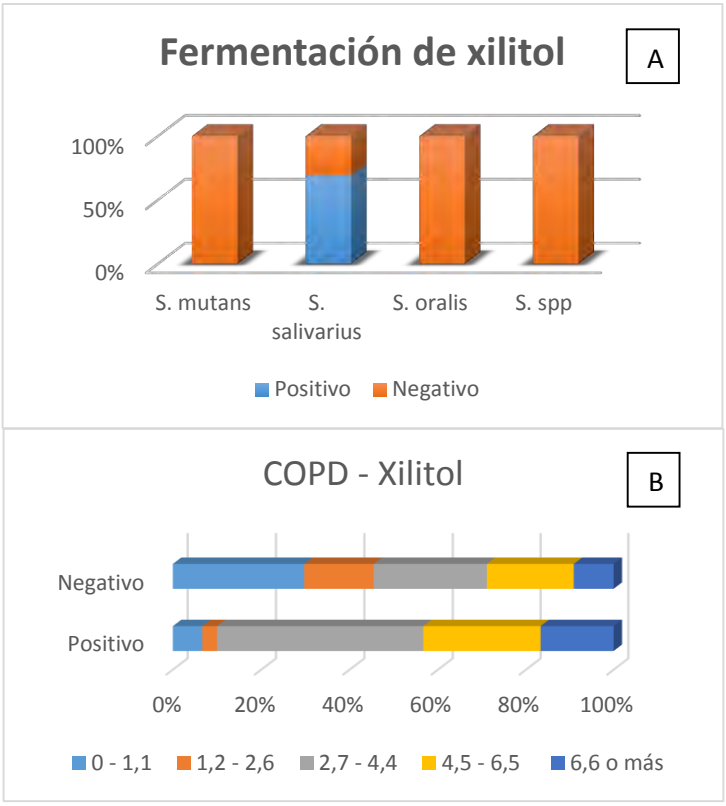



Fig. 17. A. Fermentación de xilitol por distintas cepas bacterianas. B. Relación de índice COPD y fermentación de xilitol.

## Stevia

*S. salivarius* fue el único microorganismo capaz de fermentar stevia, en donde se observa que el 66% fue capaz de fermentarlo. Por el contrario, las cepas de *S. mutans, S. oralis* y *Streptococcus spp* no fueron capaces de fermentar stevia (figura 18a).

Se observa además que la proporción de bacterias capaces de fermentar stevia es menor en todos los intervalos del índice COPD, siendo nula en el intervalo 1,2 – 2.6, y disminuyendo aún más en el intervalo 0 – 1,1, existiendo una relación entre el índice COPD y la capacidad fermentativa de las cepas bacterianas frente a stevia (figura 18b).

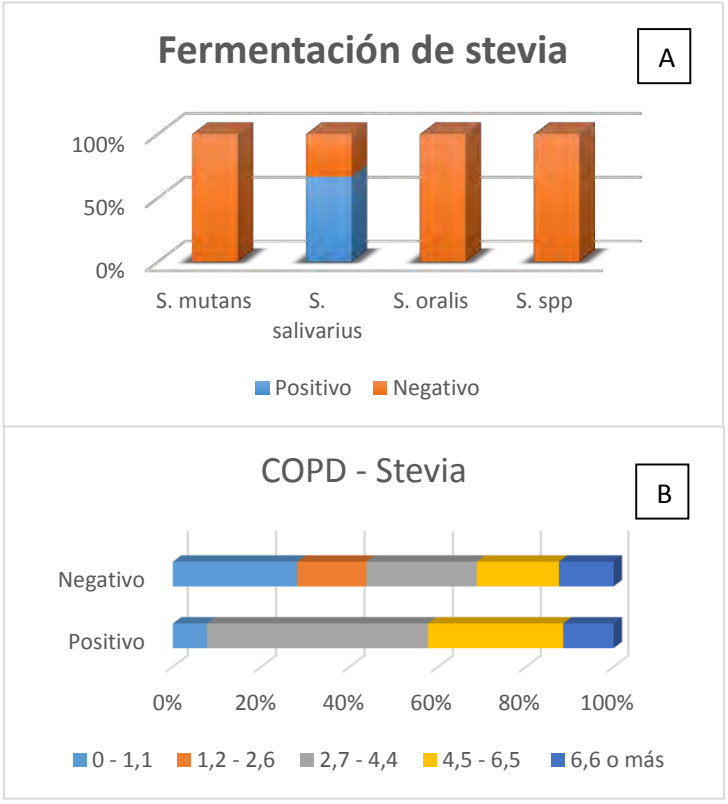



Fig. 18. A. Fermentación de stevia por distintas cepas bacterianas. B. Relación de índice COPD y fermentación de stevia.

### 3. Frecuencia de fermentación de *Streptococci* orales

Las 154 cepas de *Streptococci* orales analizados en este estudio fueron capaces de fermentar en un 100% glucosa y sacarosa. Por otra parte, tan solo 62 cepas, correspondientes a un 40,25% de ellos fue capaz de fermentar sorbitol y manitol. Por último, tan solo 25 cepas, correspondientes a un 16,23% fermento xilitol y 24 cepas, correspondientes a un 15,58% fue capaz de fermentar stevia (figura 19).

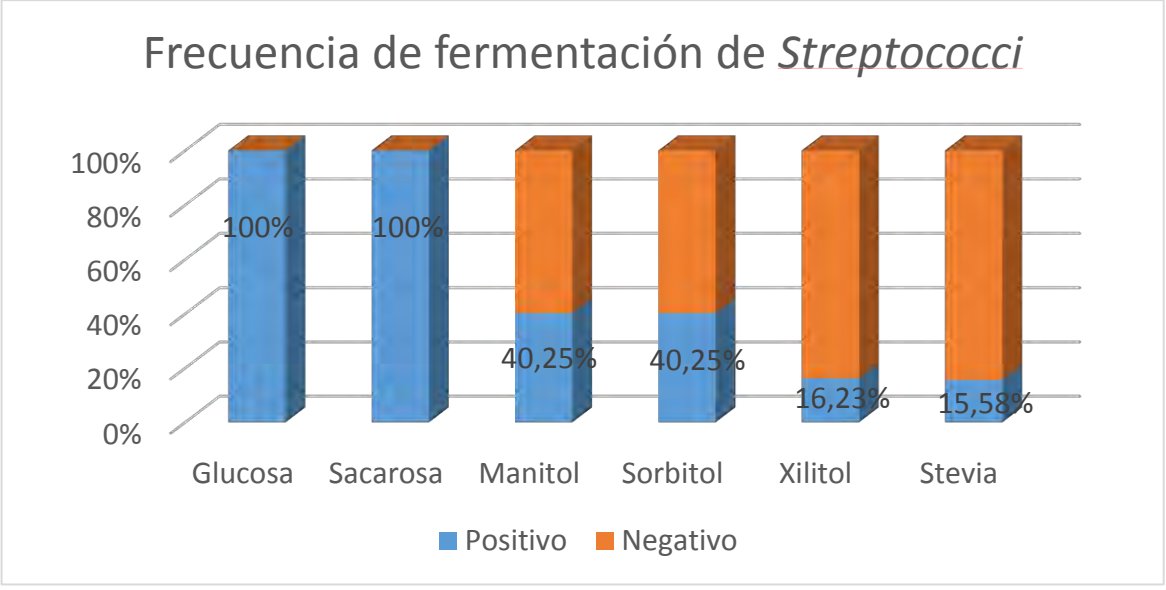



Fig. 19. Frecuencia de fermentación de los distintos endulzantes por parte de los *Streptococci* orales analizados en este estudio.

## 4. Determinar la prevalencia de caries en los estudiantes de Odontología

La población objetivo son estudiantes que cursan de primero a sexto año de la carrera de Odontología de la Universidad Andrés Bello sede República durante el año 2015.

De un total de 81 alumnos(as) entre 19 y 28 años de edad, 35 fueron hombres, equivalente a un 43,21% y 46 fueron mujeres, correspondiente a un 56,79%.

Usando el índice COPD (Anexo 3), solo 66 alumnos(as) presentaron historia de caries, correspondiente al 81.48%, definiendo la prevalencia de caries en los estudiantes de Odontología de la Universidad Andrés Bello año 2015 (tabla 2).

Los alumnos(as) tuvieron un índice COPD moderado según los estándares de la OMS. El índice COPD promedio de la población fue de 3.7

| Edad | Masculino (Con caries/Sin caries) | Femenino (Con caries/Sin caries) | Total (Con caries/Sin caries) |
|---|---|---|---|
| 19 | **1** (1/0) | **2** (2/0) | **3** (3/0) |
| 20 | **1** (1/0) | **5** (3/2) | **6** (4/2) |
| 21 | **6** (4/2) | **14** (12/2) | **20** (16/4) |
| 22 | **5** (4/1) | **10** (9/1) | **15** (13/2) |
| 23 | **3** (1/2) | **4** (4/0) | **7** (5/2) |
| 24 | **7** (4/3) | **5** (5/0) | **12** (9/3) |
| 25 | **4** (3/1) | **3** (3/0) | **7** (6/1) |
| 26 | **1** (1/0) | **0** (0/0) | **1** (1/0) |
| 27 | **4** (3/1) | **2** (2/0) | **6** (5/1) |
| 28 | **3** (3/0) | **1** (1/0) | **4** (4/0) |
| **Total** | **35** (25/10) | **46** (41/5) | **81** (66/15) |

Tabla 2. Prevalencia de caries en estudiantes de Odontología Universidad Andrés Bello 2015

# DISCUSIÓN

La caries dental es un problema que afecta a un gran porcentaje de la población a nivel mundial, provocando que se realicen diversos estudios para poder encontrar una solución a la enfermedad. Pese a que esta es una enfermedad multifactorial, es importante que exista la presencia de bacterias cariogénicas para poder fermentar los distintos tipos de azúcares y ser capaces, en conjunto a otros factores, de reducir el pH salival acidificando el medio. Las bacterias más estudiadas que se consideran como patógenos principales de la enfermedad son *S. mutans* y *S. sobrinus.* Estas, en conjunto con otras bacterias bucales son capaces de utilizar los azúcares como fuente de carbono, que tras ser metabolizados en las vías fermentativas tiene como resultado la síntesis de ácido láctico y otros compuestos. El medio bucal se ve acidificado mediante esta vía, provocando que el pH salival disminuya a niveles críticos (menor a pH 5,5), y favoreciendo la desmineralización localizada de la estructura dentaria por pérdida de la homeostasis entre remineralización y desmineralización.

Diversos tipos de tratamiento han sido estudiados para el tratamiento de la caries dental, siendo uno de los métodos preventivos más conocidos el reemplazo de diversos azúcares fermentables por sustitutos de azúcar no fermentables. Estos compuestos son pobremente metabolizados por las bacterias, generando un menor riesgo cariogénico y disminuyendo así la incidencia de la enfermedad.

Actualmente muchos alimentos y medicamentos se encuentran endulzados con algún tipo de azúcar, siendo sacarosa la más empleada. El consumo de ellos afecta en directa proporción al riesgo cariogénico, el cual aumenta a mayor frecuencia. Además podemos encontrar el uso de sorbitol, xilitol y stevia asociado a ciertos productos, los cuales han sido descritos como no cariogénicos.

Por consecuente, se buscó evaluar la fermentación de los azúcares más utilizados por parte de diversos *Streptococci* orales, tales como *S. salivarius, S. sobrinus, S. mutans, S. oralis, S. sanguinis* y *S. gordonii.*

En este estudio se evaluó la fermentación de azúcares como sacarosa y glucosa, diversos polioles como manitol, sorbitol y xilitol, y utilizando stevia como endulzante natural.

El presente estudio se llevó a cabo en la Universidad Andrés Bello, a diversos alumnos de la carrera de Odontología, solicitando el consentimiento informado al director de escuela y clínicas, para luego proceder a tomar la muestra de saliva, obteniendo un total de 81 muestras. Se tomó esta cantidad debido al tiempo que demora todo el procesamiento de las muestras, además de la disponibilidad de clínicas y horario de los alumnos para la obtención de muestras y examen clínico, siendo un universo prudente en el tiempo a realizar el estudio.

De este universo total se logró aislar 153 cepas diversas, dentro de las cuales el 23% corresponde a *S. salivarius* (36 cepas), 5% a *S. mutans* (8 cepas), 7% a *S. oralis* (10 cepas) y 65% del total corresponde a cepas no identificadas de *Streptococci* (100 cepas). Es importante destacar que *S. gordonii* y *S. sobrinus* existen en menor proporción, siendo casi inexistente en pacientes libres de caries, por ello es que no se aislaron cepas de estas bacterias en las muestras. Por otra parte, *S. sanguinis* si se encuentra en ciertas proporciones en pacientes libres de caries, pero no pudo ser aislado en este estudio. (47, 48) Algunos factores que pudieron haber afectado el aislamiento de cepas bacterianas son un mal procesamiento de las muestras, elección de colonias inadecuadas, gran cantidad de concentración de antibiótico en las placas, entre otros. Todas las cepas bacterianas fueron confirmadas mediante análisis macro y microscópico, y PCR de colonias por electroforesis.

Para analizar el perfil fermentativo de las diversas cepas de *Streptococci* con los distintos azúcares, se realizó una suspensión bacteriana de cada cepa en los azúcares utilizados en el estudio.

Al evaluar los datos obtenidos, se observa que todas las cepas bacterianas son capaces de fermentar glucosa y sacarosa en un 100%, concluyendo que las bacterias tienen la capacidad de fermentar y producir ácidos, pudiendo provocar un aumento en el riesgo cariogénico. Si observamos la estructura química de la

glucosa, podemos encontrar que este monosacárido presenta 6 carbonos base, es decir una hexosa (figura 20) (49). En base a esta estructura es que se evalúa la fermentación de los demás azúcares.

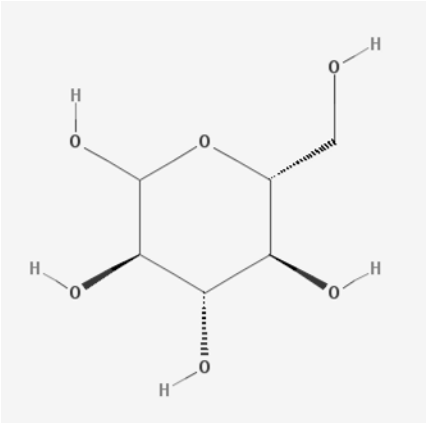


Fig. 20. Estructura química de glucosa

Por otro lado, la sacarosa es un disacárido compuesto por una molécula de glucosa y otra de fructosa, unidas por un enlace glicosídico, por lo que tiene una estructura muy similar a la glucosa (figura 21) (50).

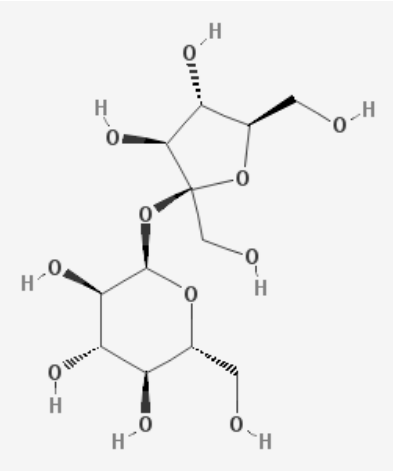


Fig. 21. Estructura química de sacarosa

Por otro lado, manitol y sorbitol es fermentado por un 100% de las cepas de *S. mutans*, mientras que tan solo el 83% de las cepas de *S. salivarius* y el 10% de *S. oralis* lo hacen. Por último, un 23% de las cepas de *S. spp* dieron positivo en fermentación a ambos endulzantes. De esto se desprende que todas las cepas de *S. mutans* y la gran mayoría de *S. salivarius* son capaces de fermentar en presencia de manitol y sorbitol, generando producción de ácidos y aumentando el riesgo cariogénico. Por otro lado, *S. oralis* y el resto de *Streptococcus spp.* dieron porcentajes bajos de fermentación, demostrando que no son tan eficientes frente a la fermentación de manitol. Manitol posee una estructura químicamente similar a la glucosa, siendo una hexosa, que solo cambia la disposición de los hidrógenos y sus grupos carboxilos (figura 22) (51).

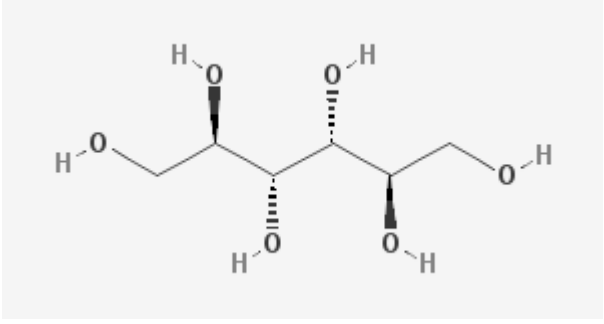


Fig. 22. Estructura química de sorbitol

Sorbitol también posee una estructura similar a la glucosa, en donde cambia su grupo carbonilo por un grupo hidroxilo, conservando su estructura principal de seis carbonos (figura 23) (52).

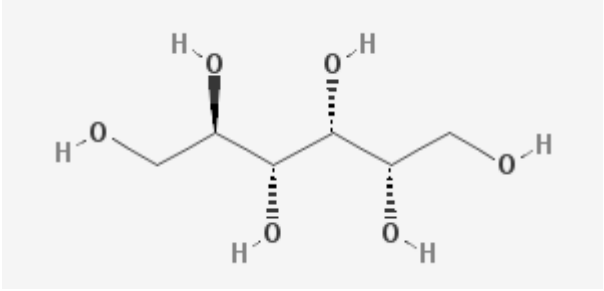


Fig. 23. Estructura química de sorbitol

Al evaluar xilitol y stevia, encontramos que tanto *S. mutans, S. oralis* y las cepas no identificadas de *Streptococcus spp.* no son capaces de fermentar a ambos endulzantes, obteniendo un 0% de fermentación por parte de ellas. Por otro lado, *S. salivarius* fermenta en un 69% xilitol y un 66% stevia. Por lo tanto, xilitol y stevia fermentaron en menor cantidad en comparación a los otros endulzantes, donde solamente *S. salivarius* fue capaz de fermentar, demostrando que estos endulzantes son menos eficientes para otras bacterias en la producción de ácidos y por tanto, obteniendo un menor riesgo cariogénico, pero aun así pueden provocar algún daño por un descenso en el pH por parte de *S. salivarius.* La estructura química del xilitol presenta 5 carbonos principales, siendo una pentosa (figura 24) (52).

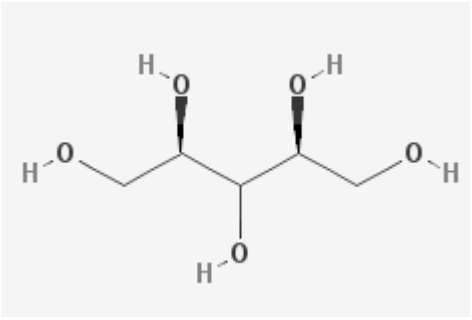


Fig. 24. Estructura química del xilitol.

Por último, stevia es un glúcido diterpeno y presenta una estructura más compleja, con 38 carbonos en su interior (figura 25) (53, 54).

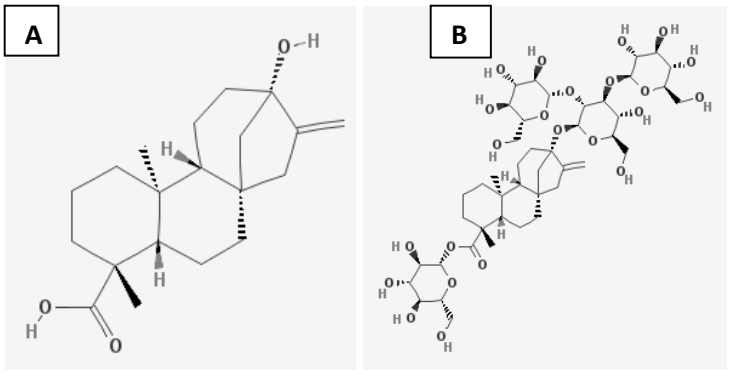



Fig. 25. A. Estructura química de esteviol. B. Estructura química de Rebaudiósido A

Se esperaba que xilitol y stevia no fuesen fermentados por ninguna bacteria, debido a su estructura química diferente respecto a la glucosa y su capacidad antibacteriana. Algunos estudios indican que xilitol posee un efecto antimicrobiano sobre algunas bacterias, inhibiendo su crecimiento, como es en el caso de *S. mutans*, pero no así sobre *S. salivarius,* donde este es capaz de crecer en medios con altas concentraciones de xilitol (5% - 10%) e incluso en menores concentraciones se veía un aumento en su crecimiento. (38) Por otro lado, cabe destacar que existe la vía de fermentación de las pentosas, en las que se forma acido láctico como producto final (figura 26) (55). Al ser xilitol una pentosa, y tener a *S. salivarius "*resistente" a xilitol, es posible que este pueda fermentarlo para producir ácidos que generen un descenso en el pH, provocando un viraje de color en las pruebas de fermentación aplicados en este estudio, no así frente a las otras bacterias que si resultan ser inhibidas por xilitol, haciendo que no se produzca fermentación.

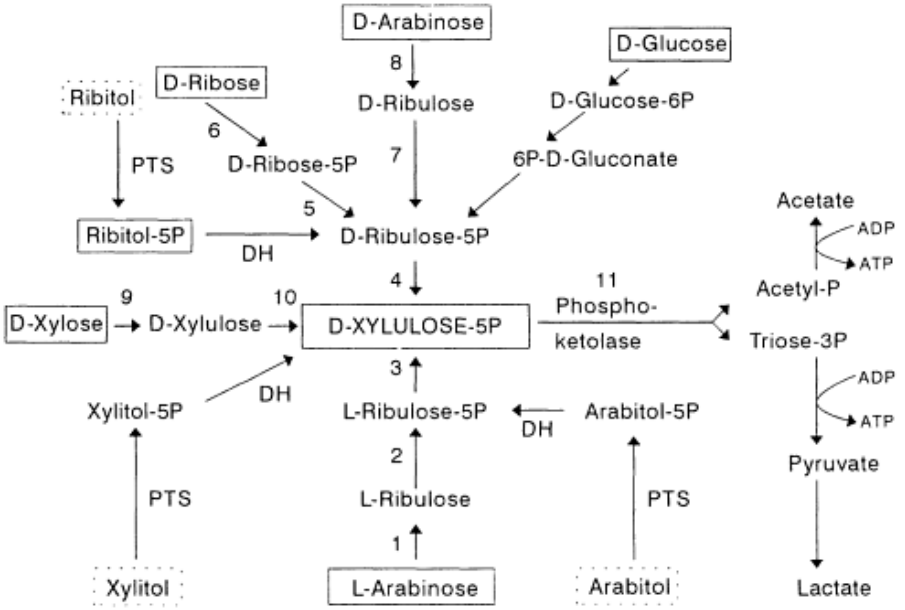



Fig. 26. Vía de fermentación de las pentosas (55)

Por otra parte, stevia tiene dos componentes claves en su composición, esteviósidos y rebaudiósido A. Ambos componentes tienen subgrupos de glucosa en su estructura, los esteviósidos tienen dos moléculas de glucosa unidas en el

sitio hidroxilo, mientras que el rebaudiósido A tiene 3 moléculas de glucosa, en donde la glucosa central se une a la estructura central de esteviol (56, 57). Se ha visto en estudios que stevia puede tener degradación de sus componentes a ciertas temperaturas. Al calentar soluciones con esteviósidos a 100°C aparecen 2 productos de degradación, steviolbiósido y glucosa, atribuible a la ruptura del enlace éster del carbono 19 en el esteviósido. Resultados similares se obtienen con rebaudiósido A, produciendo glucosa y rebaudiósido B. El enlace éster del carbono 19 vendría siendo sensible al calor y provocando una ruptura estructural (58). El medio debía ser autoclavado bajo presión y altas temperaturas para lograr la esterilización de este. En base a esto, es que puede ser posible que *S. salivarius* haya sido capaz de producir fermentación de stevia por medio de glucosas libres en el medio. No obstante, esta teoría queda inconclusa debido a que las otras bacterias analizadas en este estudio no fueron capaces de fermentar stevia. Ya que *S. salivarius* es capaz de crecer en medios de xilitol frente a otras bacterias, es posible que también presente algún tipo de resistencia especial frente a stevia. Esta resistencia sería la responsable de su capacidad fermentativa, que en este estudio alcanzó un valor de 66%.

Cabe destacar también que el medio utilizado para realizar el perfil de fermentación utiliza peptona de caseína y cloruro de sodio. La peptona de caseína es una proteína, la cual tiene carácter anfótero, es decir que puede captar o ceder protones. Esta propiedad permite que actué como amortiguador del pH, actuando como base si no está protonado y como ácido si lo está (59). El cloruro de sodio es una sal, siendo un compuesto químico que contiene un ácido y una base ($Na^+$ y $Cl^-$). Esto eventualmente podría actuar como buffer, retardando el descenso o ascenso del pH para provocar el viraje en el perfil de fermentación. Esto podría explicar el por qué las distintas cepas presentaron una fermentación retardada en las distintas horas analizadas, fermentando así los azúcares más simples en primera instancia y luego los más complejos. O bien, las bacterias simplemente fermentan a un ritmo más lento.

Otro punto importante es el rojo fenol utilizado en los medios del perfil de fermentación. Este presenta un pH de 7.66 aproximado, virando a amarillo bajo pH 6.4 y a rojo sobre pH 8.2 (60). En base a esto, podemos deducir que las bacterias que presentan fermentación positiva frente a los distintos azúcares utilizados pueden provocar un descenso en el pH, lo que puede conllevar a un mayor riesgo cariogénico, no obstante, no necesariamente van a provocar la desmineralización localizada del diente y destrucción de este, ya que esta ocurre bajo pH crítico de 5,5.

Cabe destacar que diferentes concentraciones en la suspensión bacteriana provoca una variación en la fermentación. En concentraciones de estándar de turbidez McFarland 0,5 no había fermentación positiva, incluso frente a glucosa para las distintas cepas. Para lograr la fermentación de glucosa se necesitaban concentraciones próximas a un estándar de turbidez McFarland 2. Además, bacterias con consistencia viscosa fermentaban en mayor medida respecto a bacterias con consistencia friable, debido principalmente a que las bacterias quedaban suspendidas en el medio en mayores concentraciones.

Respecto a la relación entre el índice COPD y fermentación de las distintos azúcares se desprende que para glucosa y sacarosa no existe una relación, ya que todas las bacterias son capaces de fermentar ambos azúcares, por lo que siempre existe un potencial cariogénico. Tampoco observamos una relación en manitol y sorbitol, donde a intervalos más bajos del índice COPD la proporción bacteriana capaz de fermentar los endulzantes es menor en relación a intervalos mayores, pese a esto, no se puede establecer una relación entre la fermentación y el índice COPD. Xilitol y stevia si presenta una relación, aunque menor en comparación a sorbitol y manitol. En intervalos más bajos del índice COPD la proporción bacteriana capaz de fermentar los endulzantes es menor, aumentando un poco más en intervalos mayores. De esto se podría desprender que las bacterias son menos propensas a fermentar azúcares a intervalos más bajos del índice COPD, provocando menos riesgo cariogénico al no fermentar en mayor proporción los azúcares.

A modo de resumen tenemos que la glucosa y la sacarosa son fermentadas en un 100% por todas las cepas bacterianas. Manitol y sorbitol por otra parte son fermentadas en un 100% solamente por *S. mutans*, mientras que *S. salivarius, S. oralis* y *Streptococcus spp.* lo hacen en un 83%, 10% y 23% respectivamente. Esto por la similitud en la estructura que presentan con glucosa. Por último, xilitol y stevia sólo fueron fermentados por *S. salivarius* en un 69% y 66% respectivamente. Otras cepas analizadas no fermentaron estos endulzantes. Cabe recordar que *S. salivarius* es capaz de crecer en ambientes con xilitol. Esta molécula, que contiene entre su estructura una pentosa, podría eventualmente ser fermentada por esta bacteria mediante la vía de las pentosas. Stevia por otra parte presenta esteviósidos y rebaudiósido A, las que pueden haber sido hidrolizadas y así obtener glucosa como producto de degradación para la posterior fermentación por parte de *S. salivarius*.

De todo este se interfiere que stevia y xilitol, pese a tener un porcentaje elevado de fermentación por parte de *S. salivarius,* son las mejores opciones de reemplazo a azúcares fermentables en dietas o productos, en comparación a los otros endulzantes utilizados en este estudio, evitando así un potencial riesgo cariogénico. Estos además son productos antimicrobianos, inhibiendo a ciertas bacterias presentes en la microflora oral.

# CONCLUSIONES

De acuerdo a las muestras de saliva obtenidas en el presente estudio realizado en estudiantes de Odontología de la Universidad Andrés Bello, sede Santiago en el año 2015, se concluye lo siguiente:

- *Streptococcus salivarius* fue el microorganismo más aislado en la población.

- Las bacterias aisladas en el estudio fueron capaces de fermentar en 100% glucosa y sacarosa, presentes en diversos alimentos y medicamentos.

- Solo *Streptococcus mutans* es capaz de fermentar sorbitol y manitol en un 100%, seguido por *Streptococcus salivarius* con un 84% y *Streptococcus oralis* en un 10%, los cuales son utilizados en chicles o colutorios, constituyendo un potencial riesgo cariogénico.

- Solo *Streptococcus salivarius* es capaz de fermentar xilitol y stevia, constituyendo un potencial riesgo cariogénico.

- Existe una relación entre el índice COPD y la fermentación en cuanto a xilitol y stevia, en donde a intervalos bajos hay menor fermentación que a intervalos moderados o altos.

- La prevalencia de caries en estudiantes de odontología de la Universidad Andrés Bello entre 19 y 28 años durante el 2015 es de 81.48% con un índice COPD promedio de 3,71.

# SUGERENCIAS

- Modificar la población analizada e integrar individuos con caries establecidas.

- Aumentar el número de muestras analizadas e identificar distintas especies de *Streptococci.*

- Medir y analizar cambios de pH, utilizando suspensión de distintos azúcares.

# RESUMEN

La caries dental es un problema de salud a nivel mundial que afecta a más del 80% de las personas. Esta enfermedad multifactorial es el resultado de la interacción de distintas bacterias capaces de fermentar hidratos de carbono, provocando una desmineralización del tejido calcificado del diente y posterior destrucción por liberación de ácidos al medio.

Los estreptococos orales son cocos Gram positivos, anaerobios facultativos, capaces de colonizar superficies dentales para la posterior formación de la placa cariogénica y desmineralización del diente. Pese a que el potencial cariogénico de los colonizadores primarios (*Streptococci* de los grupos Mitis y Salivarius) es bajo, sus interacciones son importantes para el establecimiento y mantención de la microflora oral y la placa cariogénica.

En este trabajo se evaluó la capacidad de fermentación de Estreptococos orales, tales como *S. salivarius, S. oralis, S. gordonii, S. sanguinis*, *S. mutans, S. sobrinus* frente a diferentes endulzantes utilizados comúnmente en los alimentos. Se recolectaron muestras de saliva a estudiantes de Odontología de la Universidad Andrés Bello y se realizó la siembra y aislamiento de colonias en Agar MSBT. Se hizo un análisis microscópico con tinción Gram y posteriormente la identificación mediante PCR. Finalmente se realizaron perfiles fermentativos con los endulzantes más utilizados en el mercado: glucosa, stevia, xilitol, sacarosa, sorbitol y manitol.

Dentro de los resultados se destaca que todos los estreptococos analizados en este estudio fueron capaces de fermentar glucosa y sacarosa. Interesantemente, la mayoría de ellos fermentaron sorbitol y manitol, endulzantes descritos como no cariogénicos. Por otro lado, solo *S. salivarius* fue capaz de fermentar xilitol y stevia. Por lo tanto, el consumo de endulzantes comúnmente utilizados presentarían un riesgo potencial para la generación de caries dental.

# ABSTRACT

Tooth decay is a health problem worldwide affecting more than 80% of people. This multifactorial disease results from the interaction of different bacteria capable of fermenting carbohydrates, causing demineralization of tooth calcified tissue and subsequent destruction by the release of acid to the environment.

Oral *Streptococci* are Gram positive coccus, facultative anaerobes, capable of colonizing dental surfaces for the subsequent formation of cariogenic plaque and tooth demineralization. Although the cariogenic potential of primary colonizers (*Streptococci* of the Mitis and Salivarius groups) is low, their interactions are important for the establishment and maintenance of oral microflora and cariogenic plaque.

In this work the fermentation capacity of oral streptococci, such as *S. salivarius, S. oralis, S. gordonii, S. sanguinis, S. sobrinus, S. mutans,* against different sweeteners commonly used in foods was evaluated. Saliva samples were collected from dental students at the University Andres Bello and sowing and isolation of colonies on agar MSBT was performed. Microscopic analysis with Gram staining and then identification by PCR was done. Finally fermentation profiles were performed with the most sweeteners used in the market: glucose, stevia, xylitol, sucrose, sorbitol and mannitol.

Within results it remarks that all the *Streptococci* analyzed in this study were able to ferment glucose and sucrose. Interestingly, a large group of them fermented sorbitol and mannitol, described as non-cariogenic sweeteners. Furthermore, only *S. salivarius* was able to ferment xylitol and stevia. Therefore, consumption of sweeteners commonly used present a potential risk for the generation of dental caries.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) Caufield, P., Li, Y. and Dasanayake, A. (2005). Dental caries: an infectious and transmissible disease. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*, 26(5), p. 10 - 16.

(2) Young, D., Buchanan, P., Lubman, R. and Badway, N. (2015). New Directions in Interorganizational Collaboration in Dentistry: The CAMBRA Coalition Model. *Journal of Dental Education*, 71(5), p. 595 - 600.

(3) Scheie, A. and Petersen, F. (2004). THE BIOFILM CONCEPT: CONSEQUENCES FOR FUTURE PROPHYLAXIS OF ORAL DISEASES?. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15(1), p. 4-12.

(4) Corby, P., Lyons-Weiler, J., Bretz, W., Hart, T., Aas, J., Boumenna, T., Goss, J., Corby, A., Junior, H., Weyant, R. and Paster, B. (2005). Microbial Risk Indicators of Early Childhood Caries. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), p. 5753-5759.

(5) Beighton, D. (2005). The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Commun Dent Oral Epidemiol*, 33(4), p. 248-255.

(6) Marchant, S., Brailsford, S., Twomey, A., Roberts, G. and Beighton, D. (2001). The Predominant Microflora of Nursing Caries Lesions. *Caries Research*, 35(6), p. 397-406.

(7) Huang, R., Li, M. and Gregory, R. (2011). Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*, 2(5), p. 435-444.

(8) Georgios, A., Vassiliki, T. and Sotirios, K. (2015). Acidogenicity and acidurance of dental plaque and saliva sediment from adults in relation to caries activity and chlorhexidine exposure. *Journal of Oral Microbiology*, 7(0).

(9) Caufield, P. (2005). Dental caries: an infectious and transmissible disease where have we been and where are we going?. *The New York state dental journal*, 71(2), p. 23 - 27.

(10) Accessdata.fda.gov, (2015). *CFR - Code of Federal Regulations Title 21*. [En línea] Disponible en: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=172.395 [Citado18 Mayo 2015].

(11) Fejerskov, O. (2004). Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. *Caries Res*, 38(3), p. 182-191.

(12) Fejerskov, O. (1997). Concepts of dental caries and their consequences for understanding the disease. *Commun Dent Oral Epidemiol*, 25(1), p. 5-12.

(13) Palomer R, L. (2006). Caries dental en el niño: Una enfermedad contagiosa. *Rev. chil. pediatr.*, 77(1).

(14) Nuñez, D. and Bacallao, L. (2010). Biochemistry of dental caries. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, [En línea] 9(2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2010000200004.

(15) Who.int, (2015). *WHO | Oral health*. [En línea] Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/ [Citado 10 Junio 2015].

(16) Who.int, (2015). *OMS | La OMS publica un nuevo informe sobre el problema mundial de las enfermedades bucodentales*. [En línea] Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr15/es/ [Citado 10 Junio 2015].

(17) Fuentes N, J., Corsini M, G., Bornhardt, T., Ponce V, A. and Ruiz F, Á. (2014). Prevalencia de Caries y Nivel de Higiene Oral en Niños de 6 años Atendidos Bajo la Norma GES y el Modelo JUNAEB. *Int. J. Odontostomat.*, 8(3), p.385-391.

(18) Seneviratne, C., Zhang, C. and Samaranayake, L. (2011). Dental plaque biofilm in oral health and disease. *The Chinese journal of dental research: The official journal of the scientific section of the Chinese stomatological association (CSA)*, [En línea] 14 (2), p. 87 - 93. Disponible en: http://www.researchgate.net/profile/CJ_Jaya_Seneviratne/publication/22181

8611_Dental_plaque_biofilm_in_oral_health_and_disease/links/02e7e53bf967d4143a000000.pdf

(19) Soi, S., Vinayak, V., Singhal, A. and Roy, S. (2013). Fluorides and Their Role in Demineralization and Remineralization. *Journal of Dental Sciences & Oral Rehabilitation*, [En línea] Julio – Septiembre (3), p. 19 - 21. Disponible en: http://www.jdsor.com/2013-ISSUE-3/A5.pdf.

(20) Hicks, J., Garcia-Godoy, F. and Flaitz, C. (2005). Biological factors in dental caries enamel structure and the caries process in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 2). *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 28(2), p. 119-124.

(21) Vitoria Miñana, I. Promoción de la salud bucodental. En Recomendaciones PrevInfad / PAPPS [En línea]. Actualizado marzo de 2011. [Citado 15 Junio 2015]. Disponible en http://www.aepap.org/previnfad/Dental.htm

(22) Banas, J. and Vickerman, M. (2003). GLUCAN-BINDING PROTEINS OF THE ORAL STREPTOCOCCI. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 14(2), p. 89-99.

(23) Decker, R. and Loveren, C. (2003). Sugars and dental caries. *The American journal of clinical nutrition*, [En línea] 78(4), pp.881-892. Disponible en: http://ajcn.nutrition.org/content/78/4/881S.long#cited-by [Citado 15 Junio 2015].

(24) Krasse, B. (2001). The Vipeholm Dental Caries Study: Recollections and Reflections 50 Years Later. *Journal of Dental Research*, 80(9), p. 1785-1788.

(25) Macpherson, P. (2013). The role of saliva in oral health and disease. *Dental Nursing*, 9(10), p. 568-573.

(26) Simón-Soro, Á., Belda-Ferre, P., Cabrera-Rubio, R., Alcaraz, L. and Mira, A. (2013). A Tissue-Dependent Hypothesis of Dental Caries. *Caries Res*, 47(6), p. 591-600.

(27) Simón-Soro, A., Guillen-Navarro, M. and Mira, A. (2014). Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *Journal of Oral Microbiology*, 6(0).

(28) Patoral.umayor.cl, (2013). *Bioquímica de las caries | Patología Oral, General, Bioestadística, Metodología de la Investigación*. [En línea] Disponible en: http://patoral.umayor.cl/patoral/?p=1654 [Citado 15 Junio 2015].

(29) Bradshaw, D. and Lynch, R. (2013). Diet and the microbial aetiology of dental caries: new paradigms. *Int Dent J*, 63, p. 64-72.

(30) Nascimento, M., Lemos, J., Abranches, J., Goncalves, R. and Burne, R. (2004). Adaptive Acid Tolerance Response of Streptococcus sobrinus. *Journal of Bacteriology*, 186(19), p. 6383-6390.

(31) Zeng, L. and Burne, R. (2012). Comprehensive Mutational Analysis of Sucrose-Metabolizing Pathways in Streptococcus mutans Reveals Novel Roles for the Sucrose Phosphotransferase System Permease. *Journal of Bacteriology*, 195(4), p. 833-843.

(32) Tandel, K. (2011). Sugar substitutes: Health controversy over perceived benefits. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 2(4), p. 236.

(33) Livesey, G. (2003). Health potential of polyols as sugar replacers, with emphasis on low glycaemic properties. *Nutrition Research Reviews*, 16(02), p. 163 - 191.

(34) Tuncer, D., Önen, A. and Yazici, A. (2014). Effect of chewing gums with xilitol, sorbitol and xilitol-sorbitol on the remineralization and hardness of initial enamel lesions in situ. *Dental Research journal*, 11(5), p. 537 - 543.

(35) Durso, S., Vieira, L., Cruz, J., Azevedo, C., Rodrigues, P. and Simionato, M. (2014). Sucrose Substitutes Affect the Cariogenic Potential of Streptococcus mutans Biofilms. *Caries Res*, 48(3), p. 214-222.

(36) Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, (2015). *D-mannitol | C6H14O6 - PubChem*. [En línea] Disponible en:

http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-mannitol#section=Top [Citado 18 Jun. 2015].

(37) Mäkinen, K. (2010). Sugar Alcohols, Caries Incidence, and Remineralization of Caries Lesions: A Literature Review. *International Journal of Dentistry*, 2010, p. 1-23.

(38) Walters, L. (2015). [En línea] Disponible en: https://www.coastal.edu/media/administration/honorsprogram/pdf/Laura%20Walters.pdf [Citado 21 Junio 2015].

(39) Radmerikhi, S., Azul, E., Fajardo, K. and Formantes, B. (2013). Antimicrobial effect of different xilitol concentrations on Streptococcus mutans and Lactobacillus acidophilus count. *Journal of Restorative Dentistry*, 1(3), p. 95.

(40) Jiménez, T., Cabrera, G., Álvarez, E. and Gómez, F. (2010). Evaluation of the content of stevioside and rebaudioside A in a population of Stevia rebaudiana Bertoni (kaâ heê) commercially cultivated. A preliminary study. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 8(1), p. 47-53.

(41) Mohammadi-Sichani,, M. (2012). Effect of different extracts of Stevia rebaudiana leaves on Streptococcus mutans growth. *J. Med. Plants Res.*, 6(32).

(42) Anderson, C., Longbottom, C., Pitts, N. and Robertson, M. (2005). Integrated Care Approach to Targeting Caries Prevention to Pre-School Children. *Caries Research*, 39, p. 295-296.

(43) MINISTERIO DE SALUD. Guía Clínica ATENCION PRIMARIA DEL PREESCOLAR DE 2 A 5 AÑOS. Santiago: Minsal, 2009".

(44) Grenby, T., Andrews, A., Mistry, M. and Williams, R. (2001). Dental caries-protective agents in milk and milk products: investigations in vitro. *Journal of Dentistry*, 29(2), p. 83-92.

(45) Marinho, V., Higgins, J., Logan, S. and Sheiham, A. (1996). Fluoride varnishes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

(46) Duque de Estrada Riveron, J., Perez Quiñonez, J. and Hidalgo, I. (2006). Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Revista Cubana de Estomatologia*, 43(1).

(47) Hoshino, T., Kawaguchi, M., Shimizu, N., Hoshino, N., Ooshima, T. and Fujiwara, T. (2004). PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using GTF genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 48(3), p. 195-199.

(48) Ge, Y., Caufield, P., Fisch, G. and Li, Y. (2008). Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis Colonization Correlated with Caries Experience in Children. *Caries Res*, 42(6), p. 444 - 448.

(49) Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, (2015). *D-Glucose | C6H12O6 - PubChem*. [En línea] Disponible en: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-glucose#section=Top [Citado 12 Agosto 2015].

(50) Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, (2015). *D-mannitol | C6H14O6 - PubChem*. [En línea] Disponible en: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6251#section=Top [Citado 12 Agosto 2015].

(51) Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, (2015). *D-Sorbitol | C6H14O6 - PubChem*. [En línea] Disponible en: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5780 [Citado 12 Agosto 2015].

(52) Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, (2015). *xylitol | C5H12O5 - PubChem*. [En línea] Disponible en: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6912#section=Top [Citado 12 Agosto 2015].

(53) Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, (2015). *Stevioside A3 | C44H70O23 - PubChem*. [En línea] Disponible en: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6918840#section=Top [Citado 12 Agosto 2015].

(54) Pubchem.ncbi.nlm.nih.gov, (2015). *Steviol | C20H30O3 - PubChem*. [En línea] Disponible en: http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/452967#section=Top [Citado 12 Agosto 2015].

(55) Wood, B. and Holzapfel, W. (1995). *The genera of lactic acid bacteria*. London: Blackie Academic & Professional, p. 1 - 6.

(56) Yadav, S. and Guleria, P. (2012). Steviol Glycosides from Stevia: Biosynthesis Pathway Review and their Application in Foods and Medicine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(11), p. 988-998.

(57) Mosettig, E., Beglinger, U., Dolder, F., Lichti, H., Quitt, P. and Waters, J. (1963). The Absolute Configuration of Steviol and Isosteviol. *J. Am. Chem. Soc.*, 85(15), p. 2305-2309.

(58) Chang, S. and Cook, J. (1983). Stability studies of stevioside and rebaudioside A in carbonated beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 31(2), p. 409-412.

(59) Arias, V., Rodriguez, C., Ramirez, P., et al. (2012). Bacteria isolation from acid drainage waters at the suroundings of Recuperada and Julcani mining units, Huancavelica. *Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Ingeniería Geológica, Minera, Metalurgica y Geográfica*, 15 (30).

(60) Phenol Red, Sigma-Aldrich, (2015). [En línea] Disponible en: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Product_Information_Sheet/p3532pis.pdf [Citado 12 Agosto 2015].

# ANEXOS

UNIVERSIDAD ANDRES BELLO

Santiago, Abril de 2015.

Universidad Andrés Bello
Facultad de Odontología

Sr. Encargado
Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Oral.
Presente.

Estimado Dr. Mauricio Bittner:

Soy Nickolas Andreas Martino Aichele, alumno regular de la carrera de Odontología de la Universidad Andrés Bello, y me dirijo a usted mediante la presente con el fin de solicitar autorización para realizar procedimientos de carácter investigativo dentro del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Oral de la Universidad, con el fin de llevar a cabo un trabajo de investigación para optar al título de Cirujano Dentista.

El trabajo de investigación se titula **"Evaluación de la Fermentación de distintos tipos de endulzantes utilizados en la dieta por *Streptococci* orales"**, para lo cual necesitaré de las instalaciones y materiales de su laboratorio.

Haré uso de los instrumentos necesarios para realizar procedimientos de recolección y almacenamiento de muestras de saliva, preparación de agares, siembra de muestras y posterior análisis de las mismas.

Sin otro particular, me despido esperando una respuesta positiva.

Saluda Atentamente a Usted.

Nickolas Martino Aichele
Licenciado en Odontología

Firma de Autorización
Dr. Mauricio Bittner

Anexo N°1 Solicitud de autorización a encargado del laboratorio de Microbiología y Biotecnología Oral

UNIVERSIDAD
ANDRES BELLO
Universidad Andrés Bello
Facultad de Odontología

Santiago, Abril de 2015.

Doctor
Patricio Rodriguez Bastías.
Director Académico de la Facultad Odontológica UNAB sede Santiago.
Presente

Junto con saludarlo, me dirijo a Ud. para solicitar su autorización en el proyecto de tesis para optar al título de cirujano dentista, este trabajo como también lo señala su objetivo, se denomina **"Evaluación de la Fermentación de distintos tipos de endulzantes utilizados en la dieta por *Streptococci* orales"**, cuya actividad se desarrollará con estudiantes de la carrera Odontología de la Universidad Andrés Bello en un rango etario entre los 18 y 30 años de edad, considerando solo la sede de Santiago.

Para llevar a cabo el objetivo planteado, se realizará una evaluación clínica, seguidamente de una toma de muestras de saliva a los estudiantes, inicialmente se conocerá el consentimiento informado de esta actividad de parte de cada participante, firmando su autorización.

Es esencial para el logro de los objetivos planteados, requerir el uso de las instalaciones clínicas y ocupar el instrumental necesario (bandeja de examen estéril) para aplicar cada muestra.

Consecuente con lo expuesto anteriormente, se solicita a Usted autorizar los requerimientos antes señalados, lo cual permitirá cumplir con los tiempos y el proceso planificado para el desarrollo de la tesis.

Sin otro particular, se despide atentamente de Ud.

**PATRICIO RODRIGUEZ BASTÍAS**
Cirujano Dentista
Director Académico de la Facultad de Odontológica UNAB

NICKOLAS MARTINO AICHELE
Licenciado en Odontología
Interno de 6to. año

Anexo N°2a. Solicitud de autorización al director académico de la facultad odontológica

UNIVERSIDAD
ANDRES BELLO
Universidad Andrés Bello
Facultad de Odontología

Santiago, Abril de 2015.

Doctor
Luis Lecaros
Director de Clínica Odontológica UNAB sede Santiago.
Presente

Junto con saludarlo, me dirijo a Ud. para solicitar su autorización en el proyecto de tesis para optar al título de cirujano dentista, este trabajo como también lo señala su objetivo, se denomina **"Evaluación de la Fermentación de distintos tipos de endulzantes utilizados en la dieta por *Streptococci* orales"**, cuya actividad se desarrollará con estudiantes de la carrera Odontología de la Universidad Andrés Bello en un rango etario entre los 18 y 30 años de edad, considerando solo la sede de Santiago.

Para llevar a cabo el objetivo planteado, se realizará una evaluación clínica, seguidamente de una toma de muestras de saliva a los estudiantes, inicialmente se conocerá el consentimiento informado de esta actividad de parte de cada participante, firmando su autorización.

Es esencial para el logro de los objetivos planteados, requerir el uso de las instalaciones clínicas y ocupar el instrumental necesario (bandeja de examen estéril) para aplicar cada muestra.

Consecuente con lo expuesto anteriormente, se solicita a Usted autorizar los requerimientos antes señalados, lo cual permitirá cumplir con los tiempos y el proceso planificado para el desarrollo de la tesis.

Sin otro particular, se despide atentamente de Ud.

Dr. LUIS LECAROS M.
DIRECTOR
CLINICA ODONTOLOGICA

**LUIS LECAROS**
Cirujano Dentista
Director de Clínica Odontológica UNAB

NICKOLAS MARTINO AICHELE
Licenciado en Odontología
Interno de 6to. año

Anexo N°2b. Solicitud de autorización al director de clínica de la facultad odontológica

Universidad Andrés Bello
Facultad de Odontología

# Consentimiento Informado

A través del presente lo invitamos a participar a Ud. de un trabajo de investigación titulado: **"Evaluación de la Fermentación de distintos tipos de endulzantes utilizados en la dieta por *Streptococci* orales"**, con el objetivo de correlacionar *Streptococci* orales, bacterias precursoras de la caries dental.

Por este motivo se colectará saliva en tubos de ensayo estériles. Cada participante masticara una pastilla, denominada Parafilm por 3 minutos. Esta es incolora, sin sabor y sin ningún riesgo para la salud de los estudiantes. Su aplicación responde al propósito de aumentar el flujo de saliva para obtener la muestra. Además de la realización de un cuestionario que incluye un examen clínico.

La duración total de esta intervención no superará los 5 minutos por cada alumno y será realizado por Nickolas Martino Aichele, alumno de sexto año de la Facultad de Odontología de la Universidad Andrés Bello, con motivo de la realización de su proyecto de título.

Esta actividad no significara ningún riesgo, así como tampoco ningún costo. Por el contrario, ayudara a la creación de nuevas medidas de prevención de esta enfermedad.

Se informa además que los datos serán confidenciales y de uso exclusivo para este estudio.

---

Yo _____ declaro haber sido informado del proyecto de investigación **"Evaluación de la Fermentación de distintos tipos de endulzantes utilizados en la dieta por *Streptococci* orales"** que está realizando el estudiante de 6to año de la carrera de Odontología sede Santiago de la Universidad Andrés Bello:

_____
FIRMA

---

Anexo N°3. Consentimiento informado de los participantes en el estudio

## CUESTIONARIO

N°

Fecha toma de muestra: _____/_____/_____.

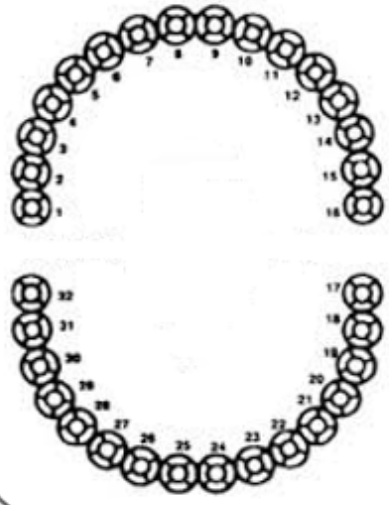
### DATOS PERSONALES

Nombre:
Edad:
Género: Femenino ☐ Masculino ☐ Año de Carrera:

### ANAMNESIS

Enfermedades sistémicas:
Uso de ATB el último mes: SI ☐ NO ☐
¿Cuál?: _____

### ODONTOGRAMA



### ¿CON QUE ENDULZA LIQUIDOS COMO TE, CAFE O LECHE?

Azúcar ☐
Endulzante ☐
- ¿Cuál?: _____

No lo endulza ☐
Otro ☐

### COPD

N° piezas cariadas: ____
N° piezas obturadas: ___
N° piezas perdidas: ____
**COPD:** _____

### FLUJO SALIVAL

En 3 minutos: ____ml.

### PH SALIVAL

Anexo N°4. Cuestionario de los participantes en el estudio