



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA MICROBIOTA ORAL
ASOCIADA A CARIES EN PACIENTES PEDIÁTRICOS, QUE
ACUDEN A LA CLÍNICA DE ODONTOPEDIATRÍA DE LA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

CIRUJANA DENTISTA

PRESENTA:

KARLA BEATRIZ CHAVARRÍA GARCÍA

TUTOR: C.D. VÍCTOR MANUEL MIRA MORALES

Victor Manuel Mira Morales

ASESOR: C.D. ALFREDO ALAN OSEGUEDA ESPINOSA

ALFREDO ALAN OSEGUEDA ESPINOSA

VoBo
VoBo



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es una pequeña muestra de agradecimiento a un par de personas que me han brindado amor desde que nací...

- ❖ A mis abuelitos, Alicia y Juan José; que, sin su apoyo incondicional, desde que tengo memoria, no podría haber realizado todo lo que hasta ahora he logrado, no tengo las palabras suficientes para agradecer todo el amor que me han brindado y todo el esfuerzo que hicieron para que ahora haya concluido una de mis etapas más importantes, terminar la licenciatura.

Gracias, por todo lo que han hecho por mí, LOS AMO...

- ❖ Gracias a mi familia, mi mamá, Isabel, mi papá, Leopoldo, mis hermanos, Dani y Po, mis tíos, Brenda, Rodrigo y Miguel, y a mi ahijada y prima hermosa Lucía Regina, por todo el amor que me brindan día a día, el apoyo incondicional cuando necesitaba pacientes y consejos para seguir, sin duda son una parte muy importante en esta etapa de mi vida.

- ❖ Mejor amiga, hermana de vida y ahora colega, Tania, gracias por todo el apoyo incondicional que me has brindado, sabes que siempre estaré junto a ti, así como tú has estado conmigo, mil gracias, te quiero.

- ❖ A mis amigos y compañeros del 04, que desde el día uno de esta aventura universitaria estuvo a mi lado, brindándome alegría y apoyo en cada paso que dábamos juntos.

- ❖ A mis profesores y ahora amigos que me ha dejado la F.O. UNAM, por todos los consejos, las enseñanzas y apoyo que me brindaron durante esta etapa, en especial a C.D. Sergio Gómez y C.D. Juan Carlos Rodríguez, muchas gracias.

- ❖ Gracias a los profesores que se encargan del Laboratorio de Microbiología de pregrado, por todo el apoyo durante el proceso de elaboración de esta tesis.

- ❖ A mi tutor C.D. Víctor Manuel Mira Morales y a mi asesor C.D. Alfredo Alan Osegueda Espinosa, mil gracias, por todo lo compartido en las aulas, por esas clases tan didácticas y llenas de conocimiento, y sobre todo mil gracias por todo el apoyo que me brindaron desde el primer día en el que comenzó a planearse este trabajo de investigación, sin ustedes esto no se hubiera podido terminar de manera exitosa, gracias por la dedicación y compromiso al estar conmigo en cada una de las etapas de la tesis, mil gracias. Los quiero y admiro mucho.

- ❖ Y a ti amada UNAM, gracias por recibirme desde la preparatoria y dejarme llegar a un lugar maravilloso, CIUDAD UNIVERSITARIA, y sobre todo a mi hermosa FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, estoy feliz y orgullosa de haber concluido esta etapa en tan HONORABLE institución...GRACIAS.

Llegar hasta aquí, costó muchas horas de desvelo, gastos inimaginables para mí y mi familia, lágrimas, momentos de desesperación y por instantes el de querer tirar la toalla, pero al final todo ha valido la pena, me siento orgullosa de mí y de lo que he logrado a lo largo de mi vida, pero estoy segura de que esta etapa solo es el primer paso de mi camino profesional....

Taliz, lo logramos...

ÍNDICE

	Página
Resumen	6
Introducción	7
Antecedentes	8
Marco teórico	10
Capítulo 1 Cariología	10
1.1 Definición de la caries dental	10
1.2 Teorías de la caries	13
Capítulo 2 Etiología microbiana de la caries dental	15
2.1 Características generales de bacterias y hongos	15
2.1.1 bacterias	15
2.1.2 hongos	17
2.2 Biopelícula dental asociada a la iniciación y progresión de la caries dental en niños y adultos (ventanas de infectividad)	19
2.3 Bioquímica de la caries (metabolismo de carbohidratos)	22
2.3.1 perfiles microbiológicos de saliva relacionados con caries dental	24
2.4 Características principales de las bacterias involucradas en el desarrollo del proceso carioso	25
2.5 Perfiles microbiológicos involucrados en las etapas de progresión de la caries dental	26
Capítulo 3 Técnicas fenotípicas de análisis y diagnóstico microbiológico	27
3.1 Tinciones (microscopía)	27
3.2 Cultivos	28
3.3 Pruebas bioquímicas	30
3.4 Pruebas de susceptibilidad a la caries dental	31
Capítulo 4 inmunología de la enfermedad cariosa	33
4.1 Inmunidad innata oral	33
4.1.1 Inmunoglobulina A (IgAs-1 e IgAs-2)	33
4.1.2 Neutrófilos Polimorfonucleares (PMN)	34
4.1.3 Metaloproteinasas (MPP)	35
4.2 Inmunidad adaptativa oral	36

4.3	Avances en las terapias de inmunización activa y pasiva contra microorganismos cariogénicos	37
4.4	Terapias de reemplazo microbiológico contra la caries dental	38
4.5	Péptidos antimicrobianos	38
	Planteamiento del problema	40
	Pregunta de investigación	40
	Justificación	40
	Hipótesis	41
	Objetivo general	41
	Objetivos específicos	41
	Materiales y métodos	42
	Análisis Estadístico	50
	Resultados	51
	Discusión	67
	Conclusión	68
	Anexos	69
	Bibliografía	71

RESUMEN

Los objetivos de este trabajo de investigación fueron, determinar mediante métodos fenotípicos la composición de la microbiota oral de pacientes pediátricos con dentición decidua o mixta, y con presencia de actividad cariogénica.

Se realizó la toma de muestras de los dientes con caries, (primeros y segundos molares temporales y/o primer molar permanente), de 12 pacientes pediátricos de ambos sexos, que acudieron a la Clínica de Odontopediatría de la Facultad de Odontología, UNAM.

Se realizó la siembra de los microorganismos, obtenidos de las muestras, en distintos medios de cultivo, (Agar Gelosa Sangre, Mitis Salivarius, Manitol Salado, Dextrosa Sabouraud, Macconkey y EMB); posterior a la incubación durante 24 h a 36 ± 1 °C, se realizó el análisis microscópico de las colonias por medio de tinciones de Gram (bacterias) y azul de lactofenol (hongos). Así mismo se realizaron pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa; todo esto para determinar desde la morfología y agrupación de los microorganismos, así como su metabolismo y con esto lograr identificar fenotípicamente su género y/o especie.

Como resultados obtuvimos que *Streptococcus mutans* es el que prevalece en mayor cantidad en ambas denticiones, así como *Streptococcus milleri* y *S. pyogenes*. Se encontró que el *Lactobacillus* tiene gran influencia en caries de distintos grados, solo en dentición temporal. El género *Staphylococcus* se encuentra presente en mayor prevalencia en dentición mixta.

Las interacciones de hongos (*Candida sp.*) y bacterias son generalizadas para ambas denticiones y ambos sexos, por la presencia de placa dentobacteriana y el aumento como consecuencia de actividad cariogénica.

INTRODUCCIÓN

El ser humano cuenta con una microbiota propio que adquiere desde su nacimiento, esto se debe por la exposición a distintos microorganismos, a través del contacto en primera instancia, con la madre, y después con otros individuos y el medio ambiente en general (1). La cantidad y agrupación de microorganismos en el cuerpo humano, sobre todo en cavidad oral, puede ser variado, principalmente por características como el sitio de colonización, tipo de ecosistema microbiano o por procesos exógenos (1).

El estado de salud es la situación de inmunidad y resistencia ante una determinada enfermedad, este significado se asocia en los dientes, a su condición de fortaleza o resistencia ante las enfermedades bucales como la caries dental (2). Como se ha venido estudiando, la caries dental es una enfermedad infecciosa, transmisible, producida por la concurrencia de bacterias específicas, que se caracteriza por un desequilibrio bioquímico (3).

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), es 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 (4). Existen teorías en las que se habla sobre la conformación de la caries dental, la más utilizada es la de Keyes, quien definió la caries como “una enfermedad multifactorial”, desarrollando posteriormente la triada ecológica que llevaría su nombre. Según esta teoría, existen tres factores implicados en el proceso de la caries dental: el huésped, la dieta y la placa dental. Posteriormente, Newbrum en 1987 añade un cuarto elemento a esta triada: el tiempo (5).

La biopelícula dental, es una estructura compuesta por células microbianas envueltas en una matriz, constituida por polisacáridos. La presencia de las biopelículas orales genera gran importancia para mantener la homeostasis en la cavidad bucal, manteniendo estable la microbiota oral, aun cuando el medio sea variable, es decir, dando como resultado un balance dinámico, sostenido por una serie de interacciones, tanto sinérgicas como antagónicas, entre los diferentes grupos microbianos. Estas interacciones incrementan el catabolismo de nutrientes endógenos (proteínas y glicoproteínas) y proveen protección a través del mantenimiento de un medio local favorable.

Las bacterias presentes en la biopelícula dental llevan a cabo una serie de procesos bioquímicos, la principal fuente de energía para realizarlos, son los azúcares, como, por ejemplo, en la ruta metabólica donde más se utiliza esta fuente de energía, es la glucólisis. en ella se genera la síntesis de compuestos, como los ácidos orgánicos, al sintetizarse una gran cantidad de ácidos, se produce contacto con las superficies minerales del diente los cuales reaccionan con la hidroxiapatita produciendo disolución de este compuesto, y dando lugar a la caries dental (1).

ANTECEDENTES

La colonización y formación de las biopelículas son una serie de procesos muy organizados; la primera fase llamada de adhesión es cuando las bacterias llegan a la superficie y se adhieren a ella de manera irreversible, por medio de la unión de las adhesinas bacterianas con receptores, generalmente proteicos presentes en la superficie. La segunda etapa, es llamada proceso de colonización y crecimiento, en esta fase las bacterias inician la producción de la matriz de sustancia polimérica extracelular, lo que permite la formación de las micro colonias, el crecimiento de la población microbiana. La tercera etapa, comprende la maduración de la biopelícula, y el establecimiento de la morfología particular de las microcolonias.

Toda formación de biopelícula ésta influenciada por tres factores; en primer lugar, las características fisicoquímicas del sustrato o la superficie, en segundo lugar, encontramos, las características del medio acuoso que estará en contacto con la biopelícula; y, en tercer lugar, las características de las mismas bacterias (6).

Como se ha descrito en la literatura, la representación y conformación de la biopelícula dental fue descrita por vez primera, a partir de los estudios de Socransky et al., quienes determinaron que las asociaciones específicas entre las bacterias presentes serían denominadas, como complejos bacterianos. Los complejos bacterianos, son la esquematización de la secuencia de cómo se coloniza la superficie dental, hasta formar la placa dentobacteriana (6). Se dividieron en 5 complejos, los cuales son:

Complejo amarillo: formado por especies del género *Streptococcus*; por ejemplo, *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. gordonii* y *S. intermedius*.

Complejo verde: encontramos especies como *Capnocytophaga gingivalis*, *C. ochracea*, *C. sputigena*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Complejo morado: formado por las especies de *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus*.

Complejo azul: en él encontramos a *Actinomyces sp.*

Complejo naranja: se encuentran los colonizadores secundarios o puente como: *Fusobacterium sp.* y subespecies como *Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens e intermedia*; *Campylobacter rectus*, *gracilis* y *showae*, *Eubacterium nodatum* y *Streptococcus constellatus*.

Complejo rojo: O también llamado de los periodontopatógenos, en él se encuentran: *Tannerella forsythia*, *Porphyromona gingivalis*, y *Treponema denticola*.

En la colonización oral, se han establecido periodos o “ventanas de infectividad”, en las cuales se van adquiriendo poco a poco microorganismos. Se ha reportado que individuos con caries, las especies de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus fermentum*, *L. gasseri*, *L. salivarius*; *Actinomyces naeslundii*, *A. odontolyticus*, *A. viscosus* y *A. gerencseriae* son las más frecuentes (3).

Para que se pueda formar el proceso carioso, es necesario que los microorganismos cumplan con características como tener capacidad de ser acidogénicos, acidúricos y acidofílicos (3). Se sugiere que *S. mutans*, es el principal y más virulento microorganismo, responsable de la caries dental. Este microorganismo sólo se detecta tras la erupción de los dientes temporales, principalmente en las fosas, fisuras y fosetas de los molares, pues se adhiere a la placa dentobacteriana que se comienza a formar en las estructuras dentarias. La ventana de infectividad de esta especie varía entre los 19 y 31 meses de edad (4). Así mismo, el género *Lactobacillus* sp, se ha asociado a caries de fosas y fisuras, como invasor secundario, gracias a las uniones físicas. En sujetos pediátricos edéntulos se pueden encontrar este microorganismo junto con *S. mutans* (7).

El componente bacteriano de las comunidades orales se ha caracterizado ampliamente, por la mayor presencia de estas especies de microorganismos, sin embargo, el papel de la microbiota fúngica dentro de cavidad bucal es en gran parte desconocida (8). Las interacciones entre hongos y bacterias pueden influir en la salud oral, pues sabemos que, en boca, *Candida sp.* se aísla de las superficies mucosas y de la placa dental supra e infragingival en más de la mitad de los pacientes. La caries está íntimamente relacionada con la presencia de la biopelícula dental o “placa dental” de la que *Candida* suele formar parte. Existe evidencia de la relación sinérgica entre *Candida albicans* y *Streptococcus oralis* (8).

Los microorganismos pueden estar dentro de cavidad oral de forma comensal, sin embargo, también pueden ser transmitidas a ella y generar un mayor número de colonizadores. Las transmisiones pueden ser, verticales, desde la saliva de la madre hacia el hijo, al momento de probar los alimentos y besos en la boca. La transmisión horizontal, consiste en la transmisión de los microorganismos, entre los miembros de un grupo, ya sea compañeros de la guardería, familiares, o incluso personas que cuidan por mayor periodo de tiempo a los infantes (4).

Para analizar la microbiota oral, tenemos diversos métodos que nos ayudan a determinar el género y especie de los microorganismos que conforman dicha microbiota. Los métodos fenotípicos, incluyen: cultivo de microorganismos en medios líquidos, sólidos o semisólidos; tinciones y observación al microscopio, así como pruebas bioquímicas para determinadas especies (9).

MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO 1 CARIOLOGÍA

1.1 Definición de caries dental

La caries dental se define como una enfermedad infecciosa de origen multifactorial, causada por una gran cantidad de microorganismos, que va a afectar a los tejidos duros del diente, dando lugar a cavitaciones y pérdidas dentarias. Su velocidad de progresión depende de varios factores asociados, tales como hábitos dietéticos, costumbres familiares o factores genéticos, entre otros. Es originada mediante un proceso dinámico conocido como desmineralización-remineralización, por lo que actuando en fases precoces es posible evitar su progresión (7).

La caries dental se considera un proceso dinámico crónico, infeccioso, transmisible y multifactorial que se caracteriza por la destrucción de los tejidos duros del diente, y progresa lentamente con el tiempo, con la subsecuente pérdida de minerales de la superficie dental. Esto se refleja clínicamente como una opacidad del esmalte, que puede evolucionar a grandes cavidades, que comprometen la dentina, el cemento y la pulpa dental, hasta la destrucción total del diente (11).

La caries, según la OMS (Organización Mundial de la Salud), es 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 (4). Considerada como una de las principales enfermedades bucales de mayor prevalencia, pues el 90 % de la población ha sido afectada, siendo los individuos entre cero y quince años, los de más alto riesgo de contraerla (2).

Se puede clasificar en cuanto a su:

- Profundidad
 - Esmalte; afecta al primer tejido duro del diente sin o con ruptura de la superficie externa.
 - Dentina y Esmalte, presencia de tejido carioso en esmalte como en dentina superficial.
 - Esmalte, Dentina y Pulpa; la afectación de la caries abarca los dos primeros tejidos, y al momento de retirarlo existe comunicación pulpar (2).
- Localización
 - Caries de fosas y fisuras, localizadas en las caras oclusales de premolares y molares, caras palatinas de dientes anteriores superiores y molares superiores y en las caras vestibulares de molares inferiores.

- Caries en superficies lisas, localizadas en las caras proximales por debajo de la relación de contacto con el diente vecino y en el 1/3 cervical de las caras vestibulares y linguales o palatinas.
- Caries en zonas radicales, se inicia por debajo de la unión amelo-cementaria (2).

La caries dental es la enfermedad crónica, más común entre los niños y adolescentes, y la que afecta de manera más frecuente a la salud bucal y general del infante (12). Existen diversas clasificaciones de acuerdo con la edad en la que se presenta.

- **Caries del niño pequeño;** es la aparición en cualquier superficie dentaria durante los primeros 3 años de vida (13).
- **Caries de la infancia temprana;** afecta a los dientes anterosuperiores, en primera instancia, después se ven afectados los dientes posteriores, primeros molares tanto del maxilar como de la mandíbula (14).
- **Caries del lactante;** o bien nombrada como caries de la primera infancia, según la AAPD (Academia Americana de Odontología Pediátrica). La caries de la primera infancia, que afectan a los dientes temporales según su cronología de erupción, ataca fundamentalmente a los cuatro incisivos superiores, primeros molares superiores e inferiores y caninos inferiores, involucran a varios dientes en forma rápida y ocasionan significativo desarrollo de caries en dentición temporal y posteriormente en dentición permanente; se dice que los niños con caries de la primera infancia presentan el doble de dientes cariados, obturados y perdidos a los 4 y 6 años de edad, en relación con los que no las poseen (15).

La caries dental en niños se puede desarrollar desde los 71 meses de edad, puesto que hay presencia de órganos dentarios en boca, y un cambio significativo en la dieta (16).

Entre los factores de riesgo más importantes en la aparición de la caries dental en la población infantil, se encuentran la mala higiene bucal y la ingesta de azúcares en la dieta (16). Desde el nacimiento, el amamantamiento es la principal fuente de alimento, pero cuando se utiliza, sustituto de leche en un biberón, la alimentación del niño, es potencialmente cariogénica, dado el contenido azucarado de estas sustancias, la próxima erupción de los dientes temporales, y la ausencia de medidas higiénicas por parte de la madre hacia el niño; conforme avanza el tiempo, los dientes del menor, los cuales presentan lesiones cariosas, que poco a poco serán más severas, provocando a largo plazo un dolor intenso en la dentadura del menor, así como disminución en el desarrollo del infante por la dificultad al consumir alimentos (16).

Los alimentos son potencialmente cariogénicos a las estructuras del diente, sobre todo por los siguientes aspectos referentes a las características del alimento; por ejemplo.

- Tipo, contenido y concentración de azúcares, asociación de la sacarosa a otros carbohidratos fermentables, como la lactosa, cereales y almidones, o a frutas ácidas, la cantidad de minerales, la cantidad de sustancias neutralizadoras del pH ácido, la consistencia, el grado de adhesividad, y otros concernientes a los individuos tales como: preferencias alimentarias, frecuencia y momentos de consumo de alimentos dulces y ácidos, el tiempo en que éstos permanecen en la boca, la eficiencia y el correcto uso de los aditamentos para la higiene bucal (17).

Cabe mencionar que, en la comunidad infantil, todos estos factores se ven condicionados por los padres, puesto que ellos son los que tienen una línea directa con los hábitos del menor (18).

Dentro de la microbiota relacionado a la caries en pacientes pediátricos, encontramos a *Streptococcus mutans*, como uno de los más sobresalientes, *Actinomyces gerencseriae*, *Bifidobacterium sp.*, *Veillonella sp.*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguinis*, y *Lactobacillus fermentum*. *A. gerencseriae*, es considerada como una de las especies que se encuentra durante el inicio del proceso carioso, y *Bifidobacterium sp*, en el proceso de caries profunda.

Como se mencionó, la caries de la infancia temprana tiene una gran importancia, pues afecta ambas denticiones, en la literatura se encontró que detrás del estudio de la microbiota durante este proceso carioso, existen cerca de 139 especies, donde los grupos con más frecuencia son: *Granulicatella elegans*, *Veillonella sp.*, *Veillonella atypica*, *Neisseria flavescens* y *Campylobacter showae*.

En dientes con alto índice de lesiones cariosas, *Streptococcus mutans* y *Corynebacterium clona AK153*, se presentan en dientes deciduos, mientras que en dientes permanentes con caries de pacientes jóvenes se hallaron, especies del género, *Propionibacterium*, *Leptotrichia clona GT018*, *Campylobacter gracilis*, *Selenomonas clona EY04* (1).

1.2 Teorías de la caries dental

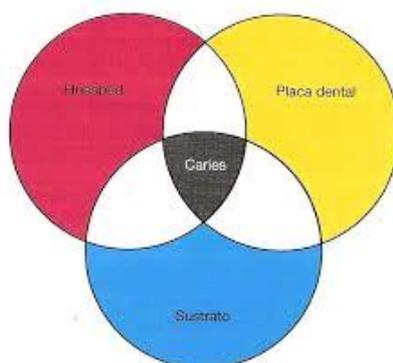
En 1960 Paul Keyes definió la caries como “una enfermedad multifactorial”, desarrollando posteriormente la triada ecológica que llevaría su nombre. Según esta teoría, existen tres factores implicados en el proceso de la caries dental: el huésped, la dieta y la placa dental. Posteriormente, Newbrum en 1987 añade un cuarto elemento a esta triada: el tiempo (5).

En 1997, autores como Fejerskov, consideraba los factores responsables de la caries en un grupo mucho más amplio. Para él, además de los factores anteriormente nombrados, a los que consideraba “factores primarios”, existían otro tipo de factores que iban a participar de manera secundaria, ya que su relación con la placa bacteriana propiciaba la aparición de una lesión; a éstos los llamaba “factores moduladores” (5).

Placa dental: Es un depósito de comunidades bacterianas inmersas en una matriz extracelular de polisacáridos adheridos sobre la superficie del diente; siendo una de las principales bacterias implicadas en la génesis de la caries el *Streptococcus mutans*.

La dieta o el sustrato: Implicada de forma directa en la aparición de caries. Se debe a un consumo excesivo y frecuente de carbohidratos, entre ellos fructosa, sacarosa y glucosa, que fermentan en la cavidad oral dando lugar a la desmineralización progresiva del diente.

El huésped: Donde debemos tener en cuenta el diente (influye la posición de éstos en el arco dental, la anatomía de este y la calidad del esmalte o la edad del diente; siendo este más susceptible tras su erupción y disminuyendo el riesgo con la edad). Y la saliva, que también tendrá un papel importante, ya que va a proteger al diente gracias a sus propiedades antibacterianas y componentes.



Esquema etiológico de Keyes modificado

Gottlieb y Frisbie, apoyan la llamada teoría de la proteólisis, que se basa en la detección de proteínas en el esmalte humano (19).

La teoría de proteólisis-quelación, que postula el ataque por bacterias orales de componentes orgánicos del esmalte; los productos de degradación consiguientes poseen una capacidad quelante y, por tanto, disuelven los minerales del diente (19).

La teoría químico-parasitaria o acidogénica propuesta por Miller en 1890, fue la teoría con mayor popularidad durante mucho tiempo y sigue vigente como la más aceptada desde hace más de 100 años, donde explica que la caries es causada por una disolución de ácido de la placa dental en la fase mineral del diente, el ácido es producido por un metabolismo de los carbohidratos y por bacterias orales (19).

A pesar de que hay teorías sorprendentemente exactas sobre etiología de caries, vigentes por cerca de cien años, persiste la imagen que ésta es causada solamente por malos hábitos dietéticos o tiene un origen predeterminado genéticamente; aunque de hecho la caries dentaria está correctamente clasificada como una enfermedad infecciosa de curso crónico.

CAPÍTULO 2 ETIOLOGÍA MICROBIANA DE LA CARIES DENTAL

2.1 Características Generales de Bacterias y Hongos

2.1.1 Bacterias

Cápsula: Es una envoltura externa, ubicada por fuera de la pared celular, de tipo mucosa, que forma un gel que se adhiere a la célula, se puede localizar tanto en las bacterias Gram negativas como Gram positivas (16).

Evita que se lleve a cabo la fagocitosis de las células, principal mecanismo de defensa. Las bacterias que producen cápsula forman en los medios sólidos colonias acuosas, mucoides (M) o lisas (S), en cambio, las cepas rugosas (R) no producen cápsula.

Membrana Plasmática: También llamada membrana interna, es una estructura delgada interna, que rodea el citoplasma celular, está compuesto principalmente por fosfolípidos y proteínas, en las células procariontes y en los eucariontes, se encuentran también hidratos de carbono y esteroides, como el colesterol.

En las células procariontes y eucariontes, se observa como una estructura de doble capa formada por dos líneas oscuras, que es una bicapa lipídica, cada molécula de fosfolípido contiene una cabeza polar, en ella encontramos fosfato, y glicerol, es hidrófila e hidrosoluble, y la parte que pertenece a las colas, tienen la característica de ser, no polares, hidrofóbicas, están organizadas de tal forma que la parte que pertenece a la cabeza, se localiza hacia el exterior de la de las capas y la parte de la cola hacia el interior. La función principal de la membrana plasmática es que tiene permeabilidad selectiva es decir actúa como barrera de distintas sustancias, que entran y salen de la célula (16).

Pared celular: Es una estructura semirrígida y compleja que determina la forma celular; su función principal es evitar la ruptura de la célula bacteriana, esto solo puede suceder cuando la presión hidrostática intracelular es mayor que la extracelular. Compuesta por un "red macromolecular", llamada peptidoglucano o mureína, es un polímero constituido por unidades repetidas del monómero formado por dos derivados de carbohidratos, N-acetil Glucosamina (NAG) y N-acetil Murámico (NAM). Estas moléculas forman una hilera que constituye el "esqueleto" de Hidratos de Carbono (12). Existen dos tipos de pared celular, tanto para las bacterias Gram positivas y Gram negativas.

- Pared Celular de Bacterias Gram positivas
 - La estructura de la pared celular en las bacterias Gram positivas, contiene varias capas de peptidoglucanos dando así mayor rigidez y espesor a la pared; contiene una capa granulosa, conformada por ácido lipoteicoico, ácidos teicoicos, que están compuestos por un alcohol, (glicerol o ribitol) y fosfato.
- Pared Celular de Bacterias Gram negativas
 - La pared celular de estas bacterias está compuesta por una o muy pocas capas de peptidoglucanos, éstos están unidos a lipoproteínas, de la membrana externa, encontrados en el periplasma, (sustancia gelatinosa localizada entre la membrana externa y la plasmática).

La membrana externa contiene lipopolisacáridos (LPS) lipoproteínas, y fosfolípidos; la función principal es que dificulta la fagocitosis y lisis de las células; constituye una barrera que impide el paso de detergentes, metales pesados, sales biliares, ciertos colorantes, antibióticos, y enzimas digestivas. La permeabilidad de la membrana externa se debe en parte a la presencia de las proteínas, llamadas porinas que sirven como canales para el transporte de algunas moléculas, entre ellas nucleótidos, disacáridos, péptidos, aminoácidos, vitamina B y hierro.

Flagelos: Son apéndices filamentosos largos, delgados y helicoidales, que dan la facilidad de movimiento a las bacterias.

Existen bacterias carentes de flagelos, a éstas se les da el nombre de átricas.

Los flagelos pueden encontrarse en toda la extensión de la célula, recibiendo el nombre de peritricos, cuando se localizan en uno de los polos o extremos, se les nombra como polares, si son polares pueden ser monótricos un solo flagelo, lofótricos, un mechón de flagelos en un polo y anfótricos localizados en ambos polos de la célula.

La composición de los flagelos es de 3 partes, el filamento, el gancho y el cuerpo basal. El filamento es externo con respecto a la célula y se une al gancho en la superficie celular. El gancho está fijado al cuerpo basal, que a su vez está anclado en la membrana plasmática. El cuerpo basal está compuesto de un cilindro y dos o más juegos de anillos contiguos a la membrana plasmática, el peptidoglucano y, en el caso de las bacterias Gram negativas, a la membrana externa.

Pili: Son apéndices pilosos más largos que las fimbrias, su cantidad es de una o dos por célula, están implicados en la movilidad y transferencia de ADN; a

este proceso se le conoce como *conjugación*, por tal motivo éstas estructuras también reciben el nombre de pili de conjugación (sexuales).

Llevan a cabo dos movimientos, el *movimiento por sacudida*, consiste en que un pili se extiende por el agregado de subunidades de pilina y toma contacto con una superficie u otra célula y luego se retrae, cuando las subunidades de pilina se dispersa; el *movimiento por desplazamiento* proporciona un medio para que los microbios se desplacen en ámbitos con bajo contenido de agua, como las biopelículas, y el suelo.

2.1.2 Hongos

Los hongos, pertenecen al reino dentro del dominio Eukarya, son microorganismos y organismos comensales que tienen la capacidad de degradar materia y establecer comunicación simbiótica con otros organismos vivos (20).

Los organismos que pertenecen al linaje de los hongos incluyen setas, royas, trufas, mohos y levaduras. Son organismos eucariontes, quimio heterótrofos, pues requieren de compuestos orgánicos para obtener energía y carbono (21).

Concepto morfológico de especie: Se basa únicamente en las características morfológicas con especial énfasis en las estructuras de reproducción sexual y asexual. Entre los caracteres morfológicos utilizados para la clasificación en categorías mayores, por ejemplo, filo, se usan básicamente algunas características de los esporos sexuales como son, la forma y el proceso de producción. La presencia y tipo de septo e, igualmente, la presencia de grapa (clamp) de conexión son otras de las características usadas para este fin. Para los niveles taxonómicos más bajos, como es la especie, se emplean la pigmentación, la forma y la topología de estructuras tales como conidias, células conidiógenas, conidióforos y cuerpos fructíferos.

Concepto biológico de especie: Sólo se puede aplicar a hongos con reproducción sexual, aunque en hongos asexuales existe la posibilidad teórica del intercambio genético a través de la recombinación mitótica o somática. Los hongos se describen como estructuras vegetativas, pues llevan a cabo reacciones bioquímicas, como son el catabolismo y el anabolismo de moléculas.

Dentro del género los hongos encontramos, los hongos filamentosos o carnosos, que se van a caracterizar por presentar:

- Tallo (cuerpo): Formado por largos filamentos de células; a estos filamentos se le dio el nombre de hifas; a largo de las hifas se encuentran separaciones como paredes, de forma transversal llamadas tabiques.
- Hifas cenocíticas: Este tipo de hifa también crece en el tallo, solo que a diferencia de las antes mencionadas, carecen de tabiques.
- Micelio: Es una masa filamentosa que aparece cuando las hifas crecen y maduran.

Levaduras: Son hongos unicelulares filamentosos de forma esférica u oval; algunas levaduras pueden producir “brotes”, que son superficies externas a la estructura de la levadura, estos “brotes” se pueden o no dividir; cuando no hay división de estas estructuras externas, se forma una cadena corta de células llamada, pseudohifa. El crecimiento de las levaduras es de manera anaerobio facultativo, llegan a presentar una reproducción asexual por medio de los fragmentos de hifas, dando como producto final la formación de esporas.

- Esporas asexuales: formadas a partir de las hifas de un organismo por medio de mitosis y división celular, produciendo, conidiosporas (conidios).
- Conidiósporas (conidios): Es una célula, que puede ser unicelular o multicelular, que no está encerrada en un saco, se producen en una cadena en el extremo de un conidióforo (1).
- Arthroconidios: Son conidios formados por la fragmentación de una hifa tabicada.
- Blastoconidios: Se forman a partir de brotes de célula parental, como el caso de *Candida albicans* (1).
- Clamidoconidio: Espora de pared gruesa que se forma por redondeo y alargamiento de un segmento de hifa.
- Esporangiospora: Se forma dentro de un esporangio, en el extremo de una hifa aérea conocida como esporangióforo (1).
- Esporas sexuales: Se genera por la reproducción sexual que consta de plasmogamia, cariogamia, meiosis.

2.2 Biopelícula dental asociada a la iniciación y progresión de la caries dental en niños y adultos (ventanas de infectividad).

Para que haya cualquier proceso infeccioso en boca, es necesario que primero se genere una biopelícula, la cual es una estructura compuesta por células microbianas envueltas en una matriz, constituida por polisacáridos. La presencia de las biopelículas orales genera gran importancia para mantener la homeostasis (1).

La segunda etapa es llamada proceso de colonización y crecimiento, en esta fase las bacterias inician la producción de la matriz de sustancia polimérica extracelular lo que permite la formación de las microcolonias, el crecimiento de la “población microbiana” La tercera etapa comprende a la maduración de la biopelícula, y el establecimiento de la morfología particular de las microcolonias

Toda formación de biopelícula ésta influenciada por tres factores; en primer lugar, las características fisicoquímicas del sustrato o la superficie, en segundo lugar, encontramos las características del medio acuoso que estará en contacto con la biopelícula; y en tercer lugar las características de las mismas bacterias (22).

Como se ha descrito en la literatura, la representación y conformación de la biopelícula dental fue descrita por vez primera, a partir de los estudios de Socransky y Cols, quien determinó que las asociaciones específicas entre las bacterias presentes serían denominadas, como complejos bacterianos (1).

Los complejos bacterianos son la esquematización de la secuencia de cómo se colonizará la superficie dental hasta formar la placa dentobacteriana, se dividieron en 5 complejos, los cuales son:

Complejo amarillo: Compuesto por las especies del género *Streptococcus*; por ejemplo, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus intermedius*.

Complejo verde: Encontramos a las especies presentes como *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Capnocytophaga sputigena*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Complejo morado: Formado por las especies de *Veillonella parvula* y *Actinomyces odontolyticus*.

Complejo azul: En él encontramos a *Actinomyces sp.*

Complejo naranja: Aquí encontramos a los colonizadores llamados puente o secundarios, como, *Fusobacterium sp.* y subespecies, *Parvimonas micra*, *Prevotella nigrescens*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*,

Campylobacter gracilis, *Campylobacter showae*, *Eubacterium nodatum* y *Streptococcus constellatus*.

Complejo rojo: O también llamado periodonto patógenos como, *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, y *Treponema denticola*.

Dentro de estos complejos encontramos a la etiología microbiana capaz de formar procesos cariosos.

Para que haya colonización oral se han distribuido “ventanas de infectividad”, en las cuales se van adquiriendo poco a poco microorganismos. La microbiota que se puede encontrar, en pacientes con caries, las especies de *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus fermentum*, *gasseri*, *L. salivarius* y *Actinomyces naeslundii*, *A. dontolyticus*, *A. viscosus* y *A. gerencseriae* son las más frecuentes (3).

En pacientes recién nacidos y de infantes y hasta 46 meses, se encontró que el *Streptococcus sanguinis* no prevalece en dentaduras con dientes deciduos. Los niveles de *S. sanguinis* disminuyen conforme pasan los meses y aumentan los de *Streptococcus mutans*.

El hallazgo de *Actinomyces sp*, varía entre las especies, en menores de 6 meses prevalece *A. odontolyticus*, y cuando hay presencia de dientes deciduos, la especie que sobresale es *A. naeslundii*, junto con *A. viscosus* y *A. gerencseriae*.

De los microorganismos antes mencionados, éstos deben de cumplir con características que ayudan a formar el proceso carioso, como, por ejemplo; la capacidad de ser acidúricos, acidogénicos y resistencia a niveles de pH bajos (3).

Streptococcus mutans, se sugiere que es el principal y más virulento de los microorganismos en el proceso de formación de caries este microorganismo sólo se detecta tras la erupción de los dientes temporales, principalmente en las fosas fisuras y fosetas de los molares, pues se adhiere a la placa dentobacteriana que se comienza a formar en las estructuras dentarias. Se podría hablar de que la ventana de infectividad de esta especie varía entre los 19 y 31 meses de edad (4).

Lactobacillus sp; gracias a las uniones físicas se ha asociado a caries de fosas y fisuras, o como invasor secundario en cavidades abiertas. Se menciona en la literatura que en pacientes pediátricos edéntulos se pueden encontrar este microorganismo junto con *Streptococcus mutans* (7).

También es probable encontrar entre la microbiota oral de los pacientes pediátricos, algunos hongos, colonizan de manera natural a este sitio, y tienen un papel importante en el establecimiento de ciertas enfermedades (23).

En la cavidad bucal se han encontrado diferentes tipos de hongos los cuales forman parte de la microbiota residente, pues estas personas, no presentan enfermedad; aproximadamente son, 75 tipos, siendo el género *Candida sp*, *Clasdosporium sp* los más abundantes (23).

Las interacciones entre hongos y bacterias pueden influir en la salud bucal pues sabemos que, en boca, *Candida sp* se aísla de las superficies mucosas y de la placa dental supra e infra gingival en más de la mitad de los pacientes. La caries dental está íntimamente relacionada con la presencia de la biopelícula dental o “placa dental” de la que *Candida sp* suele formar parte. Como por ejemplo la relación sinérgica entre *Candida albicans* y estreptococos orales.

Además de tener en boca, estos microorganismos, y todas las características antes mencionadas, para que se genere el proceso carioso, las transmisiones de las bacterias, juegan un papel importante, pues se genera mayor número de colonizadores.

Las transmisiones pueden ser, verticales, desde la saliva de la madre hacia el hijo, al momento de probar los alimentos y besos en la boca, la transmisión horizontal, consiste en la transmisión de los microorganismos, entre los miembros de un grupo, ya sea compañeros de la guardería, familiares, o incluso personas que cuidan por mayor periodo de tiempo a los infantes (4).

2.3 Bioquímica de la caries (metabolismo de carbohidratos)

La caries es un proceso dinámico donde los dientes sufren ciclos alternativos de desmineralización, se da cuando el pH intrabucal está por debajo de un valor crítico; se considera punto crítico de comienzo de disolución de la fase mineral del esmalte, cuando el pH intrabucal cae en un valor de 5.5.

Se menciona que existe una fuerte relación entre el potencial ácido de la placa y la caries. Si se mide el pH de la placa y los cambios producidos por aporte de glucosa se obtiene una curva denominada Stephan, en ella se observa que el pH intrabucal en condiciones de reposo tiende a estar cerca de neutralidad alrededor de 7 y al exponerse a carbohidratos cae rápidamente a un valor ácido, después de 30 a 60 minutos, el pH regresa a la neutralidad.

Las bacterias presentes en la biopelícula dental llevan a cabo una serie de procesos bioquímicos, siendo los azúcares, la principal fuente de energía para realizarlos, como por ejemplo la ruta metabólica más utilizada es el glucolisis. En la cual se genera la síntesis de compuestos como ácidos orgánicos, cuando se sintetiza una gran cantidad de ácidos, entran en contacto con las superficies minerales del diente y reaccionan con la hidroxiapatita, produciendo disolución de este compuesto (1).

Transporte de azúcares

Las bacterias orales presentan dos sistemas en los cuales se transportan azúcares:

El sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato, (PEPT-PTS). Tiene dos dominios, uno específico de azúcar y otro de fosforilados, transportando un grupo fosfato a partir del fosfopiruvato proveniente del glucolisis.

El sistema de transporte de unión a proteína, (BPTS), este sistema requiere, energía que proviene del Adenosín trifosfato (ATP), los azúcares son fosforilados al interior de la bacteria (1).

Glucolisis

Consta de 5 reacciones, comenzando con la fosforilación de la glucosa, llamada fase de inversión, para después dar lugar a la fase de generación de energía donde se sintetizan las moléculas de ATP.

Fase de inversión

Cuando la glucosa es importada y se fosforila queda de manera irreversible como glucosa 6-fosfato.

La glucosa 6-fosfato es isomerizada de la forma aldohexosa a cetohehexosa-fructosa 6- fosfato, para dejar 1 carbono para ser fosforilado. Esta reacción es catalizada por la enzima glucosa-fosfato-isomerasa.

La fructosa-6-fosfato sufre una segunda fosforilación en el grupo hidroxilo unido al carbono 1, para quedar como fructosa-1-6-bifosfato, en una reacción irreversible, llevada a cabo por la enzima fosfofructocinasa, el fosfato proviene del ATP, el cual queda como Adenosín difosfato (ADP) al final de la reacción.

El segundo fosfato, desestabiliza la molécula al traer dos grupos con carga negativa en cercana proximidad, y esto ayudará a que la enzima aldolasa actúe de manera reversible a la fructosa-1-6-bifosfato, en generando dos moléculas de tres carbonos cada una, unidas a un grupo fosfato, el gliceraldehído-3-fosfato (G3P), que es un intermediario de la glucólisis, y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), que no es intermediario, por lo que se isomerizara para formar otro G3P para que se pueda continuar a través de la ruta, es catalizada ésta reacción por la enzima trifosfatoisomerasa (1).

Fase de generación de energía

El grupo aldehído del GP3 es oxidado a su grupo carboxilo en una reacción reversible catalizada por la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, con la reducción constante de NAD⁺ a NADH; esta enzima toma fosfato inorgánico Pi (H₃PO₄), para que se lleve a cabo la transferencia del hialuro (H-) del grupo aldehído NAD- por lo que la reacción no requiere del gasto de ATP, para dar como producto glicerato-1,3-bifosfato (o 1,3-bifosfoglicerato).

El siguiente paso es la desfosforilación del 1,3-bifosfoglicerato por medio de una reacción reversible llevada a cabo por la enzima fosfogliceratocinasa la cual transfiere el grupo fosfato unido al carboxilo, a una molécula de ADP, generando ATP y glicerato-3-fosfato.

Este nuevo intermediario (glicerato-3-fosfato) es isomerizado a 2-fosfoglicerato en una reacción reversible catalizada por la enzima fosfogliceratomutasa. El objetivo de esta reacción es tener una molécula que pueda ser blanco de una reacción de deshidratación, por lo que la siguiente reacción es eliminar una molécula de agua liberada por medio de una reacción reversible, catalizada por la enzima enolasa.

La formación de fosfoenolpiruvato facilita la síntesis de ATP durante el último paso de glucólisis es desfosforilada en una reacción irreversible catalizada por la enzima piruvatocinasa, la cual transfiere el grupo fosfato del fosfoenolpiruvato a una molécula de ADP, para dar piruvato y ATP (1).

2.3.1 Perfiles microbiológicos de saliva, relacionados con caries dental

La saliva es un fluido biológico viscoso con un pH cercano a la neutralidad que se produce en las glándulas salivales. Contiene además de agua, elementos orgánicos e inorgánicos, como proteínas, péptidos, lípidos, y minerales, gracias a esto se le otorga la capacidad de mantener la homeostasis del ecosistema oral, pues cumple las funciones de agente lubricante y amortiguador.

Existen diferentes tipos de glándulas secretoras de saliva; por ejemplo, el 93% proviene de las glándulas principales o mayores que son:

La parótida, en un 20%, la secreción de esta glándula es de tipo serosa, producen saliva acuosa rica en amilasa.

En un 65%, encontramos a las glándulas submandibulares, la secreción de esta glándula es de tipo mixta, que producen saliva de tipo viscosa.

Por otro lado, las glándulas sublinguales aportan del 7 al 8% de secreción, la cual es mucosa, generando un producto salival viscoso, rico en mucinas.

También encontramos las glándulas menores distribuidas a través de la mucosa oral (mucosa labial, bucal, lingual y palatina), ellas aportan el 5% de la secreción total de saliva, son de tipo mixto, excepto las glándulas palatinas (1).

Como se comentó anteriormente, la saliva presenta en su contenido diversos componentes, por ejemplo.

Amilasa salival

Esta enzima es la más abundante de la saliva, tiene un peso que va de los 56 a los 61 kDa, y representa alrededor de los 40 a 60% del contenido proteínico total de este biofluido, así como puede inhibir o promover el crecimiento bacteriano.

Su principal función es la digestión inicial de carbohidratos complejos como el almidón, pues gracias a que tiene actividad glucosidasa le permite digerir enlaces a 1-4 entre los residuos de glucosa que forman a este polisacárido.

Al modificar al almidón, a formas más simples, como dextrinas límites y oligosacáridos, maltosas e isomaltosacáridos, permite que tanto el hospedero como a los microorganismos pueden metabolizarlos para obtener energía.

Puede ser un componente en la película adquirida, las bacterias se pueden adherir a la superficie del esmalte mediante la interacción con dicho dominio, (unión mediada por amilasa), pero también puede limitar el crecimiento de microorganismos al formar complejos con otras proteínas salivales y mediar el fenómeno de coagregación que conllevan a la reducción de la carga bacteriana por deglución (1).

2.4 Características principales de las bacterias involucradas en el desarrollo del proceso carioso:

MICROORGANISMO	GÉNERO	ESPECIES	CARACTERÍSTICAS							
			MICROSCÓPICAS			BIOQUÍMICAS			MACROSCÓPICAS	
			TINCIÓN	FORMA	AGRUPACIÓN	TOLERANCIA AL O ₂	OXIDASA	CATALASA	MEDIOS DE CULTIVO	CARACTERÍSTICAS DE COLONIA
BACTERIAS	<i>Streptococcus</i>	<i>viridans mutans sobrinus sanguinis</i>	GRAM +	cocos	en cadenas cortas o largas	anaerobias facultativas	negativo	negativo	Agar-sangre de camero	colonias circulares, de un tamaño aproximado de 4 a 4 mm de diámetro; Hemólisis: α o parcial , donde se forma un halo de color verdoso alrededor de la colonia. β o total , donde se forma un halo de color amarillo/transparente alrededor de la colonia. γ o nula , donde se expresa la ausencia de hemólisis.
	<i>Staphylococcus</i>	<i>aureus epidermidis</i>	GRAM +	cocos	en medios sólidos: "racimo de uvas"; en medios líquidos: cadenas cortas.	aerobias y anaerobias facultativas	positivo	positivo	TBS, Agar-sangre de camero, Agar Chapman o Agar-manitol cloruro de sodio al 75%	circulares de 2 a 8 mm de diámetro, convexas; desde translúcidas a opacas, blanquecino griseas (S. epidermidis) o amarillas/naranjas (S. aureus).
	<i>Lactobacillus</i>	I. <i>delbrueckii, salivarius (homofermentativos)</i> II. <i>Casei y plantarum (heterofermentativos)</i> III. <i>Fermentum oris (heterofermentativos)</i>	GRAM +	bacilos	bastoncillos	anaerobias facultativas	positivo	negativo	Agar Rogosa-Mitchell-Wise man	Pequeñas de 2-5 mm de diámetro, convexas, suaves, con márgenes rectos, opacas y sin pigmentos.
	<i>Neisseria</i>	<i>sp.</i>	GRAM -	cocos	pares "granos de café"	aerobias facultativas	positivo	positivo	Agar Thayer Martin; Agar-sangre de camero, Agar chocolate con vancomicina 3mg/ml	circulares, opacas, y de color gris
HONGOS	<i>Candida</i>	<i>albicans</i>	Azul de lactofenol	hifas y pseudo hifas	no aplica	anaerobias facultativas	no aplica	negativo	Agar Sabouraud	Blanquecinas blanco amarillentas, planas, cremosas, opacas o lisas; también pueden ser rugosas.

Principales características de los diferentes microorganismos, presentes en los procesos cariosos (1).

2.5 Perfiles microbiológicos involucrados en las etapas de progresión de la caries dental

Cuando analizamos la progresión de una lesión cariosa podemos identificar diferentes estadios o etapas de avance. Al determinar la presencia de ciertas especies bacterianas en cada etapa de avance de la lesión, se ha podido evidenciar que algunas especies bacterianas predominan sólo en las etapas iniciales, y otras predominan exclusivamente en las etapas avanzadas (24).

Cada lesión de caries representa un ecosistema único, donde las especies microbianas presentes conforman una biopelícula, y en el que ocurren interrelaciones de sinergismo y antagonismo que determinan la presencia y el crecimiento de microorganismos oportunistas más virulentos y la inhibición de microorganismos residentes poco virulentos.

Para el inicio y progresión de la lesión de caries dental es esencial que las especies bacterianas involucradas tengan la habilidad de producir ácido (acidogénicas) y tolerar un medio de pH bajo (acidúricas). Además, debe considerarse también la virulencia particular de especies capaces de producir polímeros de sacarosa, y otras especies que aprovechan esta matriz de polímeros para su adherencia y colonización (24).

A medida que la lesión progresa, se da una transición de bacterias anaerobias facultativas Grampositivas, que predominan en las etapas iniciales de la lesión, a bacterias anaerobias estrictas Grampositivas y Gramnegativas que predominan en lesiones de caries avanzadas.

CAPÍTULO 3 TÉCNICAS FENOTÍPICAS DE ANÁLISIS Y DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Para el estudio de las bacterias y hongos es necesario realizar diferentes métodos fenotípicos, los cuales nos ayudarán a diferenciar las características de cada microorganismo.

3.1 Tinción (microscópica)

En este estudio se utilizan colorantes que tienen afinidad por ciertos materiales celulares, se revela la morfología y tamaño celular, así como la agrupación.

Gram: Es un tipo de tinción diferencial empleado para la visualización de bacterias. Se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana, como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose Bacteria Gram positiva a las bacterias que se visualizan de color moradas y Bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosa, rojo o grosella. (25)

Azul de lactofenol (azul de algodón): Se emplea para observar hongos. Es una tinción simple (un solo colorante) y como tal está basada en la afinidad del colorante por componentes de las células, en este caso por las estructuras fúngicas. Tiene tres características que lo hacen especial, para observar dichas estructuras en los hongos del tipo moho obtenidos en los cultivos por aislamiento.

a. El fenol destruye la microbiota acompañante (algunas veces en los cultivos, juntos a los hongos pueden crecer colonias de bacterias)

b. El ácido láctico conserva las estructuras fúngicas al crear, por decirlo de algún modo, una película que las protege, provocado por un cambio de gradiente osmótico entre el interior y el exterior de dicha estructura.

c. El azul de lactofenol tiene la capacidad de adherirse a las hifas y conidios de los hongos microscópicos (25).

Agrupación: Será la manera en cómo se observan los microorganismos bajo el microscopio.

Bacterias

Se pueden encontrar de forma aislada o en conjunto, se pueden visualizar como:

- **Cocos esféricos:** cuando se localizan en pares reciben el nombre diplococos, en el caso de formar una especie de cadena se les dio el nombre estreptococos, los divididos en dos planos formando un grupo de cuatro se les denomina tétradas los que permanecen unidos asemejando un cubo, reciben el nombre de sarcinas, y por último están los que asemejan a un racimo de uvas, llamados estafilococos.

- **Bacilos alargados:** La agrupación normalmente es de bacilos aislados cuando están en pares se les denomina diplobacilos, en cadenas, son los estreptobacilos, existe una combinación de bacilos ovalados, asemejando a los cocos y recibe el nombre de cocobacilos, si presentan una o más curvas son llamados vibriones.

Hongos

Se utiliza para detectar el tipo de forma reproductiva, observando al microscopio: forma, tamaño, agrupamiento, color, etc. También se describirán las características de las hifas: presencia o ausencia de tabiques, grosor, hifas en raqueta, hifas en espiral (25).

Levaduras

Las colonias de levaduras suelen ser de color blanco crema, más o menos lisa (*Candida albicans*) o de aspecto seco y plegadas (*Candida krusei*) con algunas excepciones que forma un micelio (*Geotrichum sp* y *Trichosporon sp*), las colonias mucoides sugieren la formación de cápsula (*Cryptococcus neoformans*). Las colonias de color rojo anaranjado de aspecto cremoso o rugoso son características de las especies del género *Rhodotorula sp* (25).

3.2 Cultivo

En este método se analiza la manera en que crecen las bacterias, en un tiempo mínimo de 18 a 24 horas; existen diversos medios de cultivo: sólidos, líquidos y semisólidos.

Líquidos: En él se encuentran disueltas las sustancias nutritivas, para el crecimiento de las colonias.

Sólidos: Están formados por una base de agar, que es un polímero de origen vegetal que se mantiene en fase líquida en temperaturas altas, y al enfriarse se forma un gel (26).

Agar sangre: Es un medio de cultivo sólido, que permite el crecimiento de la mayoría de las bacterias, en él se encuentran los nutrientes necesarios. Se utilizan en la siembra primaria de las muestras clínicas. Se compone básicamente de una base de agar enriquecido y 5% de sangre. La base de agar puede variar de acuerdo con las necesidades, pero principalmente estará compuesto por peptonas, aminoácidos, vitaminas, extracto de carne, y cloruro de sodio (9).

Sabouraud: Es un medio de cultivo para el aislamiento, identificación y conservación de hongos, contiene peptona, tripteína y glucosa, que ayudan como nutrientes para el desarrollo del microorganismo. Por el alto contenido de

glucosa y presencia de cloranfenicol, así como pH ácido, inhibe el desarrollo de bacterias (27).

Agar Mitis Salivarius (AMS): Contienen peptonas como las fuentes de carbón, nitrógeno, vitaminas y minerales. La dextrosa y la sacarosa son fuentes de hidrato de carbono. El cristal violeta y el potasio tellurite (de la Solución Tellurite en un 1 %) inhibe la mayoría de los bacilos gram negativos y bacterias gram positiva excepto *Streptococcus sp.* El azul de tripano da el color a las colonias. Agar es el agente que se solidifica (28).

Trypticasein Soy Agar (TSA): El Agar Trypticasein de Soya, es un medio general para el cultivo de microorganismos no exigentes o moderadamente exigentes, no indicado para el aislamiento primario en muestras clínicas. Uno de los usos habituales es el mantenimiento de subcultivos de cepas, como por ejemplo *Enterobacteriaceas sp* y *Staphylococcus sp.* Las fuentes de nitrógeno aportan las peptonas y caseína, estando el cloruro sódico presente para mantener el equilibrio osmótico (27).

Siembra

Es el método de introducir una porción de muestra en un medio sólido con el fin de iniciar un cultivo. Existen diferentes técnicas, por ejemplo: (29).

- Siembra por inmersión: se coloca la muestra (inóculo) en una placa o caja de Petri y sobre el mismo se vierte el medio de cultivo previamente fundido (microorganismos aerobios).
- Siembra en doble capa: una vez solidificado el medio se vierte una cantidad extra de medio, necesaria para cubrir la capa anterior (10 ml aproximadamente) se utiliza principalmente para microorganismos anaerobios facultativos y microaerofilicos).
- Siembra en superficie: se vierte en la caja de Petri el medio de cultivo fundido, se solidifica y se coloca sobre el inóculo, con una espátula se extiende el inóculo, hasta su absorción total por el medio de cultivo, se utiliza para microorganismos aerobios estrictos.
- Siembra por estría: se vierte sobre la caja de Petri el medio de cultivo fundido y se deja solidificar, para este tipo de siembra, existen dos tipos de técnicas:

Técnica A: Se toma el asa con muestra y se hacen estrías paralelas en la cuarta parte de la superficie de la placa, se esteriliza el asa directamente en la flama, se deja enfriar; se gira la placa 90° y se estría de nuevo tocando 3 o 4 veces el área sembrada inicialmente, y cubriendo otro cuarto de la placa, sin esterilizar el asa se estría el resto de la caja.

Técnica B: Con el asa cargada se hacen 3 o 4 estrías, se esteriliza el asa y de nuevo se realizan 3 o 4 estrías perpendiculares a las anteriores, se esteriliza el asa y se repite el procedimiento hasta agotar la superficie (29).

3.3 Pruebas bioquímicas

Determinan la actividad metabólica de una cepa pura. Son empleadas principalmente la identificación y clasificación de bacterias y hongos.

Catalasa

En esta prueba se realiza la separación del peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) en agua y oxígeno, con la consiguiente aparición de burbujas. Dando como manifiesto la enzima catalasa presente en las bacterias.

Se utiliza un medio de cultivo donde haya crecimiento de microorganismos, optando por el área con mayor cantidad de colonias; se le añade unas gotas de agua oxigenada y se puede observar dos resultados:

- Catalasa positiva: Se produce la aparición de burbujas que corresponde a la liberación de oxígeno, lo que indica que la bacteria tiene el enzima catalasa.
- Catalasa negativa: No se producen burbujas por tanto la bacteria no posee dicha enzima.

Oxidasa

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo-oxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana.

El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromo-oxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo, pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa.

Para realizar la prueba se necesitan tiras de papel impregnadas con el reactivo para-amino-N-dimetil-anilina, que se oxida por la citocromo-oxidasa. El procedimiento consiste en impregnar la zona coloreada de la tira reactiva con una masa de bacterias. Se observa si en el transcurso de un minuto la zona impregnada vira a un color azul-violeta.

3.4 Pruebas de susceptibilidad a la caries dental.

Las pruebas para medir la susceptibilidad a la caries dental o también llamadas pruebas de diagnóstico etiológico permiten evaluar el riesgo de desarrollar la enfermedad, en un momento dado para un individuo, pero no implica necesariamente el desarrollo de lesiones. Dentro de las pruebas microbiológicas utilizadas para determinar la actividad acidogénica, se encuentran el Test de Snyder-Alban y CTR bacteria. Por otra parte, los índices de caries dental ceo-d y CPO-d permiten determinar la historia de caries dental del paciente y a través de ésta, se pudiera predecir la actividad de caries dental.

Prueba de Snyder y Alban

La prueba de Alban (simplificación del test colorimétrico ideado por Snyder) se basa en la capacidad de la saliva de producir ácido cuando una muestra de saliva estimulada es inoculada en el medio de Snyder. Dicho medio, de pH 4.7, contiene, entre otros componentes, glucosa, agar y verde bromocresol como indicador de pH (30).

Los microorganismos contenidos en la saliva metabolizan la glucosa produciendo ácido, lo cual origina una baja en el pH que modifica el color verde original del medio virando al amarillo. Para realizar la prueba de Alban necesitamos tubos de ensayo con tapón de rosca, con 5 cc de medio de Snyder. La sistemática a seguir será la siguiente

1. Previo a la realización de la prueba, el tubo se retira del frío (deben mantenerse a 4°) para que este a temperatura ambiente en el momento en que se vayan a utilizar.
2. El paciente salivará dentro del tubo ayudado de un embudo de cristal estéril la suficiente cantidad de saliva como para cubrir el medio. Se tapa bien el tubo con tapón de rosca.
3. Incubamos a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas.

Se realiza con base a un viraje de color del verde original al amarillo y a la profundidad del cambio de color. La lectura se realiza a las 24, 48 y 72 horas, anotándose los resultados.

Aunque una prueba positiva indica riesgo de caries (elevada ingesta de hidratos de carbono, caries abiertas, acumulo de placa) esto no siempre es así; por el contrario, una prueba negativa nos indica un desafío ambiental menor.

Esta prueba es muy útil para:

1. Valorar los progresos conseguidos en programas de control de placa dentobacteriana y dieta.

2. Como ayuda para facilitar la motivación del paciente, ya que éste puede "ver" sus progresos.

Prueba CRT Bacteria

Este sistema consta de un tubo que a su vez contiene una lengüeta de plástico recubierta por ambos lados por medios selectivos y conectada a un tapón de rosca el cual cierra un tubo transparente, quedando el dispositivo seguro para su almacenamiento e incubación, conservándose estéril y húmedo (31).

Las superficies de la lengüeta están cubiertas por medios de cultivo a base de agar Rogosa, para recuentos de *Lactobacillus acidophilus* (color verde) y en la otra cara con agar Mitis Salivarius Bacitracina para recuentos de *Streptococcus mutans* (color azul oscuro). El kit también incorpora cápsulas de parafina, tabletas de NaHCO₃ y etiquetas de identificación.

Esta prueba tiene utilidad para evaluar programas control de placa dentobacterina y dieta. Los recuentos altos de *Streptococcus* del grupo *mutans* indican un riesgo microbiológico alto de caries. Está contraindicado realizarlos durante tratamientos con antibióticos (esperar al menos 14 días), y si se utilizan colutorios antimicrobianos se debe esperar 12 horas.

Índice CPO-D

Desarrollado por Klein, Palmer y Knutson, y representa el índice fundamental para estudios de prevalencia en odontología. Son avalados como método por la Organización Mundial de la Salud (OMS), cuantifica los estados clínicos de la enfermedad en una escala numérica. El índice CPO. Significa lo siguiente, la sigla C describe el número de dientes afectados por caries dental a nivel de lesión cavitada. P expresa el número de dientes perdidos (extraídos) como consecuencia de caries dental, y O el número de dientes restaurados u obturados como consecuencia de la caries dental. El índice CPO es el resultado de la suma de estos valores. (32)

Índice Ceo-d

Es una adaptación del índice CPO-d para la dentición temporal. Fue propuesto por Gruebel y representa el promedio de cada individuo del número de dientes temporales donde la sigla c significa cariados, la e extracción indicada por caries y la o de obturaciones (32).

CAPÍTULO 4 INMUNOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD CARIOSA

4.1 Inmunidad innata oral

La respuesta inmune natural o innata, está determinada genéticamente, es inmediata, espontánea, actúa contra cualquier agente pernicioso, no se incrementa con exposiciones repetidas al mismo agresor e influye en la dirección que seguirá la respuesta específica o facultativa. Participan en ella, como barreras, elementos anatómicos, bioquímicos, fisiológicos y biológicos (33) (34).

El sistema innato actúa contra cualquier agente nocivo, pero su calificativo de inespecífico se ha modificado debido a que, también es capaz de reconocer específicamente un número limitado (aproximadamente 103) de estructuras moleculares que comparten los microorganismos; para ello, utiliza una cantidad igualmente limitada de receptores, codificados por las células germinales y que están presentes en la superficie, vesículas y citoplasma de varios tipos celulares entre los que se incluyen: macrófagos, neutrófilos, células cebadas, epiteliales, endoteliales, dendríticas, asesinas naturales (natural killer -NK). Los principales receptores (PRR) que estas células expresan para detectar e interactuar con estructuras o patrones moleculares de microorganismos (PAMPs) (34).

Dentro de cavidad oral encontramos algunos componentes de la saliva (mucinas, tiocianato, carbonato y diferentes enzimas: lisozima, lactoferrina, fosfolipasa, peroxidasa), el pH gástrico, el moco, las células M y las placas de Peyer, así como las defensinas o criptidinas y las enzimas, pepsina y fosfolipasa A.

4.1.1 Inmunoglobulina A (IgAs1 e IgAs2)

La inmunoglobulina A está constituida por dos moléculas de inmunoglobulina tipo A; es una proteína soluble que forma parte de los mecanismos de defensa o inmunidad adquirida.

Existen dos subclases, la s-IgA1 y s-IgA2 (por sus siglas en inglés). La s-IgA2 es secretada en mayor cantidad en contraparte con otros fluidos. Son producidas por el suero y pasan a la cavidad oral a través del fluido crevicular gingival.

Estos anticuerpos pueden formar parte de la película adquirida, controlan la unión de microorganismos a sitios adherentes, tanto en las mucosas como en las superficies dentales (1).

Tiene la capacidad de neutralizar factores de virulencia bacterianos limita la adherencia microbiana, realiza aglutinación bacteriana, previene la penetración de antígenos en la mucosa oral y opsonización de bacterias para que puedan ser digeridas por fagocitos orales.

Las proteasas IgA1 son enzimas proteolíticas que escinden enlaces peptídicos específicos en la secuencia de la región bisagra de la inmunoglobulina A1 (IgA1) humana. Varias especies de bacterias patógenas secretan proteasas IgA1 en los sitios de infección de la mucosa para destruir la estructura y la función de la IgA1 humana, eliminando así un aspecto importante de la defensa del huésped. Las proteasas IgA1 se conocen como proteínas auto transportadoras ya que su estructura genética codifica la información para dirigir su propia secreción fuera de la célula bacteriana (35).

4.1.2. Neutrófilos Polimorfonucleares (PMN)

Pertencen a la línea mieloide y constituyen la primera línea de defensa contra microorganismos. Sus principales funciones son la fagocitosis, y la lisis de microorganismos precozmente frente a la infección, mediante la producción de ROS y la degranulación de enzimas presentes en los lisosomas y fagolisosomas, así como la producción de Trampas Extracelulares de Neutrófilos (NETs, por sus siglas en inglés) (1).

En la cavidad bucal se han hecho diferentes recuentos de leucocitos presentes en la cavidad bucal se relevó que el tipo de célula predominante son los leucocitos polimorfonucleares neutrófilos en una proporción del 98-99 % (9,10)). Los estudios demuestran que el surco gingival es la vía a través de la cual estas células migran a la boca, y lo hacen por atracción de los péptidos quimiotácticos liberados por las bacterias; también cuando las bacterias dañan las células epiteliales, éstas liberan moléculas denominadas citoquinas que también atraen a los leucocitos hacia el espacio crevicular.

Los leucocitos polimorfonucleares son células fagocíticas que protegen al huésped de las infecciones bacterianas, y juegan un importante rol en la iniciación y progresión de la respuesta inflamatoria. Con base en la observación de que:

- 1- Las células inflamatorias están presentes con regularidad en el líquido del surco.
- 2- La composición química es diferente del líquido hístico.
- 3- El paso del líquido está cerca del área de inflamación, se considera un exudado inflamatorio más que una secreción fisiológica. Numerosos estudios han demostrado la presencia de PMN en el fluido crevicular, constituyendo la primera barrera de defensa contra los agentes infecciosos. El fluido crevicular presente en el surco gingival juega un rol muy importante en la defensa de los tejidos periodontales, siendo de valor para evaluar los cambios clínicos

correlacionando la cantidad de flujo de fluido crevicular con la inflamación gingival presente.

Podemos concluir diciendo que la ausencia o presencia de fluido crevicular, representa el medio clínico más disponible para establecer la diferencia entre encía normal e inflamada de manera subclínica (36).

4.1.3. Metaloproteinasas (MPP)

En el desarrollo de los gérmenes dentarios intervienen diversos tipos celulares que producen una amplia variedad de macromoléculas, entre ellas diversas proteínas. Dentro de estas proteínas destacamos las denominadas metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs), son una familia de proteasas que participan en la remodelación de la matriz extracelular de manera dependiente de zinc y calcio (37).

La degradación de proteínas extracelulares es esencial para que cualquier célula individual pueda interactuar con su ambiente circundante y para que los organismos multicelulares funcionen y se desarrollen. Las MMP también degradan moléculas de la superficie celular y otras proteínas pericelulares, reguladoras del comportamiento celular en diversas vías (37).

Estas enzimas son sintetizadas por diferentes células del tejido conectivo, como fibroblastos, osteoblastos, odontoblastos y también células de defensa como los leucocitos (polimorfonucleares y macrófagos). Las MMPs son detectables con alta frecuencia en las células, tejidos y líquidos intersticiales implicados en una amplia variedad de funciones biológicas, en estado de salud y en condiciones patológicas. A nivel oral, la expresión de estas proteínas puede cuantificarse en diferentes fluidos como la saliva, el fluido gingival crevicular (FGC) o muestras de enjuagues bucales y algunos tejidos como la encía, mucosa y dentina. Se sugiere que las proteínas MMPs 1-2-3 y 9 contribuyen en la morfogénesis temprana dental (38).

Cambios en los niveles de algunas MMPs se han relacionado con el progreso de la lesión cariosa, brindando una nueva perspectiva de patología. En ella, las MMPs del huésped, de origen odontoblástico (pulpar), actuarían en la capa profunda de la lesión cariosa coadyuvando al proceso proteolítico de la matriz orgánica de la dentina, (ligera y alterada por las colagenasas bacterianas) e interactuando y perpetuando su actividad proteolítica gracias a diversos factores de crecimiento, presentes en la matriz orgánica de la dentina que estimulan su transcripción y activación, alternándose y sucediendo simultáneamente a los momentos altamente desmineralizantes, consecuencia de la producción bacteriana de toxinas y ácidos carboxílicos (38).

Los odontoblastos producen Metaloproteinasas MMPs -2,-8,-9,-14,- 20, la más abundante en la dentina es la MMP -8. Por otra parte, los cambios de pH que tienen lugar en la lesión de caries son activadores muy potentes para MMPs.

En el desarrollo de la caries dental se relaciona a la MMPs-2 y 20, que pueden fragmentar la amelogenina, mayor proteína estructural que compone la matriz del esmalte. MMPs-2 no es detectada en túbulos dentinarios sanos, pero sí en toda la extensión cariosa que afecta estas estructuras. Se intuye que los odontoblastos son los responsables de secretar MMPs-2 en respuesta a una lesión cariosa.

Las MMP son consideradas como posibles biomarcadores, los cambios cuantitativos de estas enzimas pueden reflejar el estado de salud oral de un sujeto y emplearse no solo en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades orales sino también como indicadores del proceso de adhesión de diferentes biomateriales dentales (39).

4.2 Inmunidad adaptativa oral

El sistema inmune adaptivo (SIA) está presente en los vertebrados, es específico para distintas moléculas y se caracteriza por mejorar la capacidad defensiva frente exposiciones sucesivas. Los principales elementos del SIA son los linfocitos B y T que se activan frente a los antígenos (sustancias que inducen respuestas inmunes específicas).

El SIA posee dos tipos de respuestas inmunes: Inmunidad Humoral e Inmunidad Celular Tanto la respuesta inmune adquirida humoral como celular poseen características fundamentales (34).

- ✓ Especificidad: reconoce diferentes tipos de antígeno
- ✓ Diversidad: responde a una amplia variedad de antígenos
- ✓ Memoria: amplifica las respuestas a repetidas exposiciones al mismo antígeno
- ✓ Especialización: genera respuestas óptimas para la defensa contra diferentes microorganismos
- ✓ No reactivo a lo propio: previene la injuria al huésped durante la respuesta a antígenos extraños.

Esta respuesta posee memoria, es decir, es “recordada” por el sistema inmune, siendo más eficaz y precoz frente a reexposiciones al mismo microorganismo.

Además, esta respuesta es específica a cada microorganismo o molécula no infecciosa, siendo capaz de distinguir de manera muy fina las características de éstas. Esta capacidad de reconocimiento específico de cada antígeno, por parte de los linfocitos, se debe a la expresión de receptores a los diferentes antígenos foráneos existentes y se denomina repertorio de linfocitos, el cual es extremadamente amplio (40).

4.3 Avances en las terapias de inmunización activa y pasiva contra microorganismos cariogénicos.

La inmunización de un individuo se puede dar de dos maneras, una puede ser por medio de la aplicación de vacunas, esto determinará que las personas a las que se les aplique no desarrollen enfermedades, así como también existe el caso en el cual se tiene la enfermedad, pero se genera una inmunización de por vida (41).

Estos dos ejemplos de inmunización pertenecen a la inmunización activa, ésta se lleva a cabo cuando el sistema inmunológico de una persona se activa para generar anticuerpos y activar otras células inmunológicas para ciertos patógenos; por si en un futuro exista un contacto con estos patógenos las células inmunológicas a largo plazo específicas lo puedan combatir (41).

Por otro lado, encontramos la inmunización pasiva, que surge cuando una persona recibe anticuerpos de otra, al ser introducidas al organismo, los anticuerpos “prestados” por llamarlos así, ayudan a la prevención o a combatir enfermedades infecciosas, a diferencia de la inmunización activa, esta inmunidad pasiva es a corto plazo, y generalmente, dura semanas o meses, pero brinda inmediatamente protección.

En las últimas décadas se ha dirigido fundamentalmente a desarrollar estrategias para incrementar los niveles de IgA secretoria frente a *S. mutans*. En el intento de inmunizar frente *S. mutans*, tres proteínas han focalizado la atención de la mayoría de las investigaciones: las adhesinas fibrilares de la superficie conocidas como AgI/II, las glucosiltransferasas y las proteínas de unión a los glucanos. Se ha podido comprobar que las rutas de inmunización mucosa producen respuestas de IgA secretoria más intensas que las rutas de administración del antígeno parenteral; por consiguiente, muchos ensayos han utilizado la aplicación oral o nasal de los antígenos (42).

Un aspecto importante en la inmunización frente a la caries es que se desarrolle memoria inmunológica, de forma que sucesivas exposiciones al antígeno bacteriano desencadenan respuestas de IgA secretoria potentes.

Estudios realizados en primates demuestran que la aplicación tópica de anticuerpos monoclonales frente a AgI/II de *S. mutans* evitan la adherencia de la bacteria y el desarrollo de caries dental; frente a estas estrategias de inmunización pasiva la inmunización activa ofrece la ventaja de poder incrementar los niveles de IgA secretoria y desarrollar memoria inmunológica.

Diversos ensayos clínicos desarrollados en humanos nos han mostrado que es factible incrementar los niveles de IgA secretoria tras inmunización con glucosiltransferasa de *Streptococcus sobrinus* adyuvada con toxoide colérico, se hace patente una disminución de los títulos geométricos de producción de anticuerpos tras varios meses de inmunización (42).

4.4 Terapias de reemplazo microbiológico contra la caries dental.

Se han desarrollado alternativas que podrán ayudar a disminuir la aparición de la caries dental en la población. Uno de los puntos principales de investigación en el campo de las vacunas frente a la caries es que se han utilizado los factores de virulencia de *S. mutans* que facilitan la adherencia de la bacteria, se ha utilizado la inmunización nasal y oral frente a los antígenos I/II y glucosiltransferasas de la bacteria (43).

Las vacunas DNA frente a tales antígenos también se han ensayado. Una vacuna DNA es un plásmido bacteriano modificado genéticamente para expresar las proteínas para las que queremos inmunizar (42).

La idea de vacunar frente a la caries dental es antigua y se ha venido trabajando en ella desde que se conoce su patogenia, ligada a la colonización del diente por bacterias acidogénicas y se relaciona en su etiología *S. mutans* y *S. sobrinus*. Desde el nacimiento, conforme se va desarrollando la colonización de los dientes por estas bacterias se van incrementando la cantidad de IgA secretoria que interfiere con la unión de la bacteria a sus ligandos dependientes e independientes de sacarosa; es decir, bloquea la adherencia de la bacteria al diente (42).

4.5 Péptidos antimicrobianos.

Los péptidos antimicrobianos son moléculas que actúan desde el inicio de la respuesta inmune del organismo, se encuentran en la inmunidad innata. Se

caracterizan porque están compuestos de aproximadamente de 15 a 45 aminoácidos, cargados positivamente, y con afinidad hidrofílica (44).

Son secretados por las células epiteliales y leucocitos, como por ejemplo los macrófagos y neutrófilos.

La función principal de los péptidos antimicrobianos es la lisis directa de microorganismos, en la actualidad, se menciona en la literatura que además contienen funciones quimiotácticas, que permiten modular el sistema inmune y de esta forma construir “un puente”, entre la inmunidad innata y adaptativa (45).

Podemos encontrar a los péptidos antimicrobianos agrupados de acuerdo con su tamaño, estructura y organización de aminoácidos, los cuales la arginina y lisina son los más abundantes. En los seres humanos, encontramos diferentes péptidos, como, el LL-37, α -defensinas y β -defensinas, localizados en células sanguíneas, hemoglobina, células epiteliales, el péptido hepcidina se localiza en el hígado, y el péptido histatina 5 en la saliva.

Diversos péptidos antimicrobianos pueden ser empleados como agentes terapéuticos en el tratamiento de las enfermedades infecciosas y/o complementar la terapia con los antibióticos convencionales, pues tienen sinergismo con estos. Pueden actuar en contra de bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como con virus, para detener o eliminar su crecimiento (45).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La presencia de una microbiota oral disbiótica en individuos pediátricos, propicia el inicio y desarrollo de enfermedades orales, como la caries dental.

Sin embargo, existen otros predisponentes, como las transmisiones verticales y horizontales a las que el paciente pediátrico se ve expuesto durante la interacción con otras personas. (Madre, padre, niñeras, educadoras, y compañeros de escuela)

Por lo que el análisis de la composición de dicha microbiota ayudará a entender el proceso de evolución de la enfermedad cariogénica en individuos pediátricos con dentición temporal y mixta.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existirá diferencia en la composición de la microbiota oral de niños con presencia de caries de distintos grados, en dentición temporal y mixta?

JUSTIFICACIÓN

La caries dental es una enfermedad infectocontagiosa y multifactorial la cual se puede desarrollar desde las primeras etapas de la vida. Uno de los múltiples factores que juegan un rol importante en el inicio y desarrollo de esta enfermedad, son los microorganismos presentes en cavidad oral o microbiota, debido a su capacidad de generar ácidos orgánicos.

La composición de la microbiota oral es compleja y varía de un individuo a otro, ya que existe una gran variedad de géneros y especies tanto de bacterias como de hongos, los cuales están presentes en distintas proporciones y su equilibrio asegura el estado de salud oral de los individuos.

La microbiota oral, inicia su conformación desde las primeras horas de nacido y a lo largo de la vida sufre cambios. Por lo que conocer la composición de la microbiota en individuos pediátricos con procesos cariosos activos o de distintos grados, así como de las variaciones que existan nos ayudará a entender mejor la patogénesis de dicha enfermedad, y será de suma importancia para correlacionar clínicamente, y poder ofrecer un mejor diagnóstico, tratamiento y seguimiento a los pacientes pediátricos.

HIPÓTESIS

Si existe mayor heterogeneidad de la microbiota oral (microbiota disbiótica) habrá mayor presencia de caries, por tanto, debe existir mayor diferencia en la microbiota oral de niños con presencia de caries de distintos grados y denticiones.

OBJETIVO GENERAL

Determinar mediante métodos fenotípicos la composición de la microbiota oral, de individuos pediátricos con dentición temporal; con presencia de actividad cariogénica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar en el laboratorio microorganismos provenientes de las lesiones cariosas de individuos pediátricos.
- Determinar los géneros bacterianos que se encuentran presentes en cavidad oral de niños con caries dental.
- Determinar los géneros bacterianos presentes de acuerdo con la edad, sexo y tipo de dentición de niños con presencia de caries.
- Determinar si existe la presencia de diferentes especies de *Streptococcus*, a *Streptococcus mutans* en pacientes con caries.
- Identificar los géneros de hongos presentes en la cavidad oral de niños con caries.
- Analizar las diferentes especies de los microorganismos encontrados en la microbiota oral, por medio de métodos fenotípicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo de investigación tuvo como propósito, la identificación de la microbiota oral localizada en los procesos cariosos de pacientes pediátricos que acudieron a la Clínica de Odontopediatría de la Facultad de Odontología de la UNAM.

Se hizo uso de los siguientes elementos:

- Anamnesis a los padres o tutores; en él se recolectan los antecedentes patológicos, heredofamiliares y no patológicos del menor, con la finalidad de encontrar, si existe un agente externo que influya en la salud del menor.
- Odontograma infantil: Se obtuvo la relación del número de dientes que se encontraban presentes en la boca del menor, cuantos están o no con presencia de caries, el grado de caries de cada uno, para corroborar si hay relación con la presencia de los microorganismos y grado de caries que exista.
- Toma de fotografías clínicas de los órganos dentarios cariados. Esta evidencia nos ayuda a mostrar cómo son las diferentes etapas del proceso carioso de manera clínica, ya que muchas veces el tejido dental no se observa con destrucción, pero si existe presencia de caries.
- Toma de muestras del tejidoariado, para su siembra en medios de cultivo y posterior análisis bioquímico.
- El cultivo de los microorganismos se realizó bajo los siguientes criterios tanto en condiciones aerobias como anaerobias.

	Medios de cultivo	Condiciones de incubación
<i>Streptococcus sp.</i>	Agar sangre de carnero	36°C más menos 1°C 24hrs.
<i>S. mutans</i>	MSA (mitis-salivarius-agar) 5 A 10 % de sacarosa	
<i>Lactobacillus sp.</i>	Agar rogosa-mitchel- wiserman	
<i>Staphylococcus sp.</i>	Agar Chapman con manitol salado	
<i>Candida sp.</i>	Agar sabouraud	

Una vez obtenidos los cultivos, se realizó el frotis de las colonias utilizando tinción de Gram para bacterias y azul de lactofenol para hongos; además de las pruebas de la oxidasa y la catalasa, para correlacionar la macroscopía con la microscopía, logrando la identificación fenotípica de los géneros y especies microbianos aislados de cavidad oral.

Elaboración de historia clínica, consentimiento informado y tomas de fotografías durante la obtención de la muestra.

Se elaboró una historia clínica, con la finalidad de recabar los datos más importantes sobre la salud y hábitos del menor, así como el consentimiento informado, en donde se menciona el tipo de muestra que se obtendrá del mismo, así como la explicación sobre el uso de las fotografías obtenidas durante la toma de la muestra.

Obtención de tejido carioso en dientes con caries y sin caries.

Se obtuvieron muestras de 12 pacientes con caries, principalmente de los segundos y primeros molares temporales, y del primer molar permanente.

La toma de las muestras se realizó utilizando un juego de básico estéril por paciente (1x4), y de un medio de transporte llamado AMIES. Es un medio destinado a la recolección, transporte y preservación de muestras clínicas, en general, es un gel no nutritivo de agar blando que contiene un agente reductor para evitar la oxidación, y el carbón vegetal para neutralizar.



Imágenes a y b, tomadas de pacientes de la clínica de odontopediatría de la Fac. de Odontología UNAM

En este caso se utilizó el medio de AMIES que es una modificación del medio de Stuart. Básicamente, cambia el glicerofosfato por un fosfato inorgánico y el azul de metileno por carbón vegetal neutro farmacéutico.

Además se añaden los iones Calcio y Magnesio, que ayudan a conservar la permeabilidad de la célula bacteriana. Algunos microorganismos pueden resistir en el medio durante tres o más días, sin embargo, es conveniente que la muestra llegue al laboratorio antes de las 24 horas.

Primero se realizó la exploración bucal, para identificar qué órgano dentario presentaba caries dental, se utilizó un medio de transporte, y se frotó el área afectada con caries, o sin caries; posteriormente se tomó fotografía del órgano dentario a analizar.

Se colocó dentro del tubo con el agar, se cerró. Se optó como intermediario, para transportar las muestras de la clínica de odontopediatría al laboratorio de microbiología.



(Imagen c) tomada en la clínica de Odontopediatría de la Fac. de Odontología UNAM

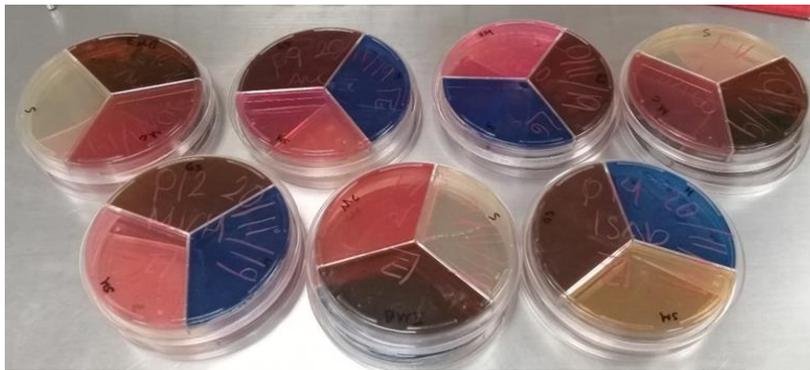


(d) Medio de transporte AMIES

Siembra de muestras en medios de cultivo.

Una vez obtenida la muestra de los pacientes pediátricos, se realizó el cultivo, en medios de agar, utilizando los siguientes instrumentos, y en el siguiente orden.

Asa, mechero, guantes, cubreboca, marcador de cera para rotular las cajas de Petri, cajas de Petri, se encontraban tres divisiones en cada una conteniendo Agar Gelosa Sangre (AGS), Agar Manitol Salado (AM), Agar Mitis Salivarius, (ASM) y en otra caja de Petri, Agar Dextrosa Sabouraud (AS), Agar Macconkey (AMc) y Agar EMB.



Medios de cultivo, (imagen e) obtenida en el Lab. De Microbiología de la Fac. De Odontología UNAM.

Para sembrar los cultivos de las colonias, se realizó lo siguiente.

1. Encender el mechero y colocarlo con la flama en color azul, para tener un ambiente estéril al momento de realizar la siembra.
2. Se tomó cada uno de los hisopos con la muestra que se obtuvo de los pacientes pediátricos, realizando la siembra por medio de la técnica estría simple.
3. Se toma el asa sosteniéndola como pluma, se coloca en la intersección de las flamas, y se deja hasta que opte por un color rojo intenso, (esto nos indica que está estéril). Posteriormente se enfría en una de las esquinas del medio de cultivo y se toma una porción de colonia, ya antes sembrada con el hisopo, nuevamente se realiza una estría simple, por todas las diferentes divisiones de agar.
4. Se rotula cada una de las cajas de Petri, con los siguientes datos, iniciales del paciente, si es un diente sin o con caries dental, y número del órgano dentario, la fecha de la toma de la muestra, y número de paciente.
5. Se colocan las cajas de Petri en una canasta metálica dentro de la incubadora, durante 24 horas, a una temperatura de 36 más menos un grado centígrado.

Análisis de las colonias

Tinción de Gram–bacterias / Examen en Fresco-hongos

El siguiente método que se utilizó para identificar las bacterias y hongos presentes en las colonias, fue tinción de Gram y tinción de azul de algodón o lactofenol.

Para la tinción de Gram se utilizó, portaobjetos, rejilla, mechero, asa, cristal

violeta, alcohol acetona, Lugol, safranina, agua bidestilada.

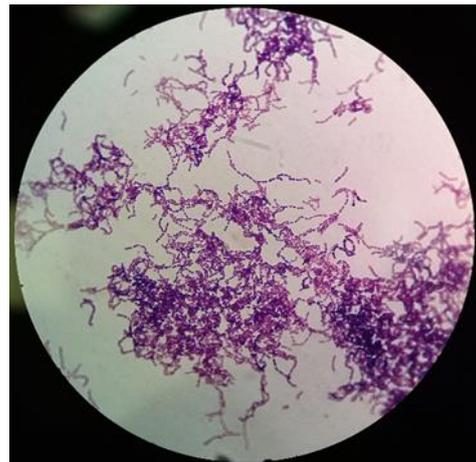
Los pasos para la realización de la tinción de Gram son los siguientes:

Una vez prendido el mechero, siempre en flama azul; se coloca una gota de agua bidestilada en el portaobjetos y posteriormente;

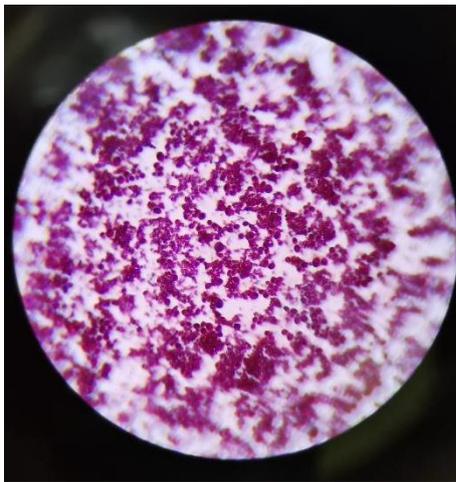
1. Se toma el asa, esterilizándola al rojo vivo, se enfría en una esquina de la caja de Petri, y se obtiene una pequeña parte de las diferentes colonias que hayan crecido. Se disuelve hasta que quede homogénea la mezcla.
2. Se fija la muestra pasando el portaobjetos unos segundos sobre la flama del mechero. De esta forma se realizó a cada una de las muestras de los 12 pacientes estudiados.
3. Posteriormente se colocan los portaobjetos en la rejilla, lo siguiente es agregar el colorante cristal violeta, dejar actuar 1 minuto y enjuagar. Inclinando la rejilla para quitar el excedente.
4. Para decolorar la muestra, se agregan unas gotas de alcohol acetona, hasta que la muestra pierda el tono azulado que dejó el cristal violeta.
5. Se vierten unas gotas de Lugol sobre las muestras, durante 1 minuto, para después enjuagar, siempre inclinando la rejilla para que se elimine el excedente del lugol.
6. Por último, se vierte safranina, dejando actuar 1 minuto y se termina enjuagando con agua bidestilada. Se dejan secar las muestras para después observar al microscopio.



(imagen f) Tinción Gram negativa, vista al microscopio obj.100x; tomada en el Lab de Microbiología de la Fac. de Odontología UNAM



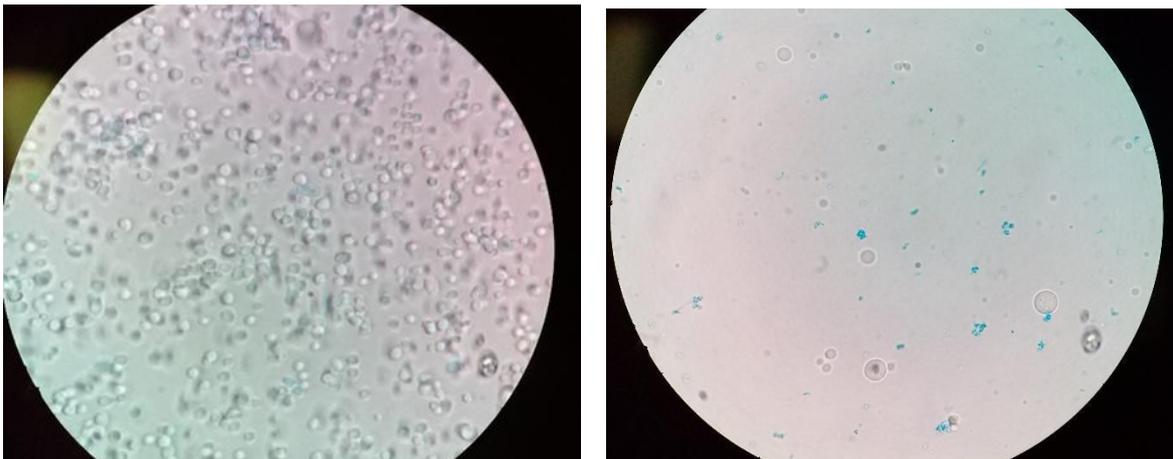
(imagen g) Tinción Gram positiva vista al microscopio obj.100x; tomada en el Lab de Microbiología de la Fac. de Odontología UNAM



(imagen I) Tinción Gram positiva, vista al microscopio obj. 100x; tomada en el Lab de Microbiología de la Fac. de Odontología UNAM

Y para la tinción de azul de algodón o de lactofenol, se utilizó, agua bidestilada, portaobjetos, rejilla, mechero, asa, azul de lactofenol, y cubreobjetos.

1. Una vez encendido el mechero, para esterilizar el área de trabajo, se toma el colorante azul de lactofenol y se coloca una gota en el centro del portaobjeto,
2. Tomando el asa se deja calentar al rojo vivo, la enfriamos en un extremo del agar, para obtener una pequeña porción de colonia, posteriormente con movimientos circulares se homogeniza el colorante y la muestra.
3. Por último, se coloca el cubreobjetos para poder observar al microscopio.



Tinción azul de lactofenol, vista al microscopio, obj. 100x, (imágenes f y g) tomadas en el Lab de Microbiología de la Fac. de Odontología UNAM

Aplicación de pruebas bioquímicas, catalasa y oxidasa.

Se llevaron a cabo las pruebas de catalasa y oxidasa, con la finalidad de determinar que especies bacterianas había en las colonias que se desarrollaron.

Para la prueba de catalasa, se utilizó mechero, asa, peróxido de hidrógeno, porta objetos, y rejillas.

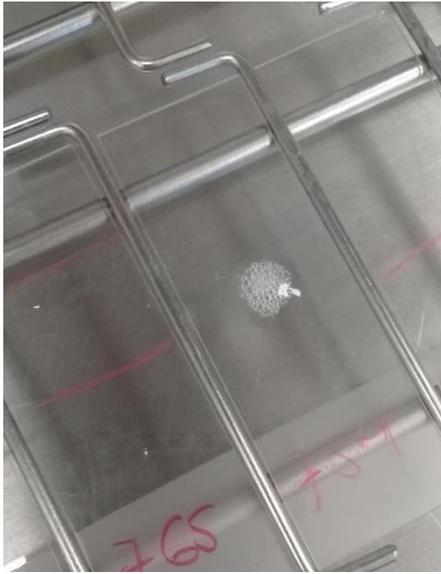
Como en todos los procedimientos anteriores, se debe prender el mechero y ajustar la flama en el color azul.

1. Se coloca una gota de peróxido de hidrógeno en el centro del portaobjetos, en cada una de las divisiones dependiendo del número de colonias que haya crecido en el medio.
2. Con el asa, debidamente estéril y fría se toma una porción pequeña de las diferentes colonias, y se diluye en el peróxido de hidrógeno. Esperando que se genere la reacción. (imagen h-i)

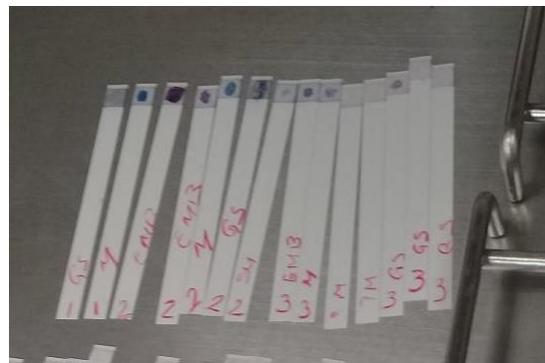
En la prueba de oxidasa, utilizamos palillos con punta, y unas tiras reactivas llamadas Bactident[®] Oxidase, se utiliza para la identificación de microorganismos en función de su actividad citocromo C oxidasa.

En las mismas condiciones de esterilización del ambiente, mechero con flama azul, se procede a los siguientes pasos.

1. Se rotula cada una de las tiras, dependiendo de la colonia, el medio, el nombre del paciente del que se toma una porción de la muestra.
2. Con ayuda del palillo se toma una pequeña porción de colonia, y se frota por todo el recuadro que contiene la tira reactiva.
3. Se deja actuar durante unos segundos, y se obtiene el resultado, según el colorímetro del fabricante. (imagen j-k)



(Imagen h-i) Pruebas de catalasa, realizadas en el Lab de Microbiología de la Fac. de Odontología UNAM



(Imagen j-k) Pruebas de oxidasa, realizadas en el Lab de Microbiología de la Fac. de Odontología UNAM

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis descriptivo utilizando medidas de tendencia central y de dispersión. Además, las variables categóricas fueron descritas a través de frecuencias y porcentajes. Se realizó un análisis bivariado utilizando pruebas de Xi cuadrada y exacta de Fisher para encontrar una asociación entre las variables, género, especies, edad, sexo y tipo de dentición en los pacientes con caries dental. Todo el análisis se realizó con un nivel de significancia de $p < 0.05$ y todo el análisis se realizó con el programa Stata v.15.

RESULTADOS

Posterior a las 24 h de incubación a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, se realizaron los análisis macroscópico y microscópico, de las colonias que habían crecido.

El análisis microscópico incluye: las tinciones de Gram y Azul de Lactofenol, pruebas bioquímicas de catalasa y oxidasa y observación al microscopio, para determinar la morfología y agrupación. Y estos fueron los resultados, separados por medio de cultivo.

Se registraron todas las características observadas, de cada tipo de medio de cultivo y se presentan agrupadas en las siguientes tablas, como a continuación se indica:

Medio de Cultivo	Abreviatura	No. de Tabla
Agar Gelosa Sangre	GS	1
Agar Manito Salado	MS	2
Agar McConkey	Mc	3
Agar EMB	EMB	4
Agar Mitis Salivarius	SM	5
Agar Dextrosa Sabouraud	S	6

(Tabla 1)

					GELOSA SANGRE												
					MICROSCOPIA			MORFOLOGÍA DE COLONIA				PRUEBAS BIOQUÍMICAS					
PACIENTE	sexo	grado de caries	edad	dentición	morfología	agrupación	Gram	forma	color	superficie	textura	oxidasa	catalasa	O2	hemolisis	Generos	especies
1	M	C4	5.5	temporal	cocos	pares	+	redonda	blanco	elevada	lisa	+	+	aerobio	gamma	Streptococcus	S. milleri
2	M	C1	6	mixta	cocos	pares	+	redonda	blanco	elevada	rugosa	+	+	aerobio	gamma	Streptococcus	S. milleri
							-			plana	lisa	-	-			Neisserias	sp
3	F	C4	8	mixta	cocos	cadena	+	redonda	blanco	elevada	lisa	-	+	aerobio	gamma	Streptococcus	S. milleri
							-					-	-			Neisserias	sp
4	F	C3	8.2	mixta	cocos	pares	+	redonda	grisacea	elevada	lisa	+	+	aerobio	gamma	Streptococcus	S. milleri
							-					-				Neisserias	sp
5	F	C3	7	mixta	cocos	parejas	-	redonda	blanco	elevada	lisa	-	+	aerobio	gamma	Neisserias	sp
6	M	C1	5	temporal	cocos	pares cadena	+	redonda	blanco	elevada	lisa	-	+	aerobio	gamma	Streptococcus	S. milleri
7	M	C3	7	mixta	cocos	pares	+	redonda	blanco	elevada	lisa	-	+	aerobio	gamma	Streptococcus	S. milleri
8	F	C4	5	temporal	cocos	pares, cadena	+	redonda	blanco	elevada	lisa	-	+	aerobio	gamma	Streptococcus	s. milleri
9	M	C2	2	temporal	cocos	pares	+	redonda	blanco	elevada	lisa	++	-	aerobio	beta	streptococcus	S. pyogenes
							-									Neisserias	sp
10	F	C3	6	mixta	cocos	cadena	+	redonda	blanco	elevada	lisa	-	+	aerobio	beta	Streptococcus	S. pyogenes
						pares									beta		
11	F	C3	5	temporal	cocos	racimo	+	redonda	blanco	elevada	lisa	-	+	aerobio	beta	Staphylococcus	s. epidermidis
12	F	C2	8	mixta	cocos	pares	+	redonda	blanco	plana	lisa	-	+	aerobio	beta	Streptococcus	S. pyogenes
						cadena	-									Neisserias	sp

Tabla 1: Características microscópicas, macroscópicas y pruebas bioquímicas que se observaron en el medio de cultivo con Agar Gelosa Sangre.

(Tabla 2)

					Manitol Salado													
PACIENTE	sexo	grado de caries	edad	dentición	MICROSCOPIA			MORFOLOGÍA DE COLONIA				PRUEBAS BIOQUÍMICAS			Generos	especies		
					morfología	agrupación	Gram	forma	color	superficie	textura	oxidasa	catalasa	O2				
1	M	C4	5.5	temporal	cocos	pares	-	redonda	azul	elevada	lisa	+	-	aerobio	Neisseria	S. epidermidis		
						racimo	+								Staphylococcus	S. epidermidis		
2	M	C1	6	mixta	cocos	cadena	+	redonda	azul	elevada	lisa	-	-	aerobio	Streptococcus	S. milleri		
							-					+	+		Neisseria	sp		
3	F	C4	8	mixta	cocos	cadena	+	redonda	azul	elevada	lisa	+	-	aerobio	Streptococcus	S. milleri		
							-					-	Neisseria		sp			
4	F	C3	8.2	mixta	cocos	cadena	+	redonda	azul	elevada	lisa	+	-	aerobio	Streptococcus	S. milleri		
							-					Neisseria	sp					
5	F	C3	7	mixta	cocos	pares	-	redonda	azul	elevada	lisa	+	-	aerobio	Neisseria	N. sp		
6	M	C1	5	temporal	cocos	pares	-	redonda	azul	elevada	lisa	+	-	aerobio	Neisseria	N. sp		
							+					Streptococcus	S. milleri					
7	M	C3	7	mixta	cocos	cadena	+	redonda	azul	elevada	lisa	+	-	aerobio	Streptococcus	S. milleri.		
					bacilos										pares	Lactobacillus	spp.	
8	F	C4	5	temporal	cocos	pares	-	redonda	azul	elevada	lisa	+	-	aerobio	Streptococcus	S. milleri		
							+					-	Neisseria		sp			
9	M	C2	2	temporal	cocos	pares	-	redonda	azul	elevada	lisa	+	-	aerobio	Neisseria	N. sp		
							-					-	-		-			
10	F	C3	6	mixta	cocos	cadena	+	redonda	azul	elevada	lisa	-	-	aerobio	Streptococcus	S. milleri		
11	F	C3	5	temporal	cocos	pares	+	redonda	azul	elevada	lisa	+	-	aerobio	Streptococcus	S. milleri		
12	F	C2	8	mixta	cocos	cadena	+	redonda	azul	elevada	lisa	-	-	aerobio	Streptococcus	S. milleri		

Tabla 2: características macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas, que se observaron en el medio de cultivo con Manitol Salado

(Tabla 3)

					Macconkey											
					MICROSCOPIA			MORFOLOGÍA DE COLONIA				PRUEBAS BIOQUÍMICAS				
PACIENTE	sexo	grado de caries	edad	dentición	morfología	agrupación	Gram	forma	color	superficie	textura	oxidasa	catalasa	O2	Generos	especies
9	M	C2	2	temporal	cocos	cadena	+	redonda	rojo	elevada	lisa	-	-	aerobio	Streptococcus	S. milleri

Tabla 3: Características macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas, que se observaron en el medio de cultivo con Macconkey

(Tabla 4)

					EMB											
					MICROSCOPIA			MORFOLOGÍA DE COLONIA				PRUEBAS BIOQUÍMICAS				
PACIENTE	sexo	grado de caries	edad	dentición	morfología	agrupación	Gram	forma	color	superficie	textura	oxidasa	catalasa	O2	Generos	especies
1	M	C4	5.5	temporal	cocos	pares	+	redonda	café	elevada	lisa	++	+++	aerobio	Streptococcus	S. milleri
3	F	C4	8	mixta	cocos	pares	+	redonda	café	elevada	lisa	+	-	aerobio	Streptococcus	S. milleri
						cadena		redonda	café	elevada	lisa					
4	F	C3	8.2	mixta	cocos	pares	-	redonda	café	elevada	lisa	+	-	aerobio	Neisseria	N.sp
5	F	C3	7	mixta	cocos	pares	-	redonda	café	elevada	rugosa	+	+	aerobio	Neisseria	sp.
						cadena						-				
6	M	C1	5	temporal	cocos	cadena	-	redonda	café	elevada	lisa	+	-	aerobio	Neisseria	N.sp
7	M	C3	7	mixta	cocos	pares	+	redonda	café	plana/ elevada	lisa	+	+	aerobio	Streptococcus	S. milleri
8	F	C4	5	temporal	cocos	pares	-	redonda	café	elevada	rugosa	+	-	aerobio	Neisseria	N.sp
9	M	C2	2	temporal	cocos	pares	+	redonda	café	elevada	lisa	+	+	aerobio	Streptococcus	S. milleri
10	F	C3	6	mixta	cocos	pares	-	redonda	café	elevada	lisa	-	-	aerobio	Neisseria	N.sp
							+								Streptococcus	s. milleri
11	F	C3	5	temporal	cocos	pares	+	redonda	café	elevada	lisa	+	+	aerobio	Streptococcus	S. milleri
12	F	C2	8	mixta	cocos	pares	+	redonda	café	elevada	lisa	+	-	aerobio	Streptococcus	S. milleri

Tabla 4 Características macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas, que se observaron en el medio de cultivo con EMB

(Tabla 5)

				Mitis Salivarius											
				MICROSCOPIA			MORFOLOGÍA DE COLONIA				PRUEBAS BIOQUÍMICAS				
PACIENTE	sexo	grado de caries	edad	morfología	agrupación	Gram	forma	color	superficie	textura	oxidasa	catalasa	O ₂	Generos	especies
10	F	C3	6	cocos	cadena/pares	+	ovalada	translúcida	elevada	lisa	-	+	aerobio	Streptococcus	S. milleri

Tabla 5: Características macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas, que se observaron en el medio de cultivo con Mitis salivarius

(Tabla 6)

					Sabouraud												
					MICROSCOPIA			MORFOLOGÍA DE COLONIA				PRUEBAS BIOQUÍMICAS					
PACIENTE	sexo	grado de caries	edad	denticion	morfología	agrupación	Azul de lactofenol	forma	color	superficie	textura	oxidasa	catalasa	O ₂	Generos	especies	#colonias
1	M	C4	5.5	temporal	levadura	aislado	positivo	redonda	blanco	elevada	lisa	-	-	aerobio	Candida	C. albicans	4
4	F	C3	8.2	mixta	levadura	pares	positivo	redonda	blanco	elevada	lisa	-	-	aerobio	Candida	C. albicans	2
5	F	C3	7	mixta	levadura	cadena	positivo	redonda	rosa	elevada	lisa	-	-	aerobio	Candida	C. albicans	4
6	M	C1	5	temporal	levadura	aislado	positivo	redonda	blanco	elevada	lisa	-	-	aerobio	Candida	C. albicans	5
7	M	C3	7	mixta	levadura	pares	positivo	redonda	blanco	elevada	lisa	-	-	aerobio	Candida	C. albicans	7

Tabla 6: Características macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas, que se observaron en el medio de cultivo con Sabouraud

Con base en los datos obtenidos, se utilizó un sistema de estadística, llamado **Fisher's exact**. El cual nos sirvió para obtener el porcentaje de crecimiento bacteriano en cada uno de los pacientes, dependiendo de los objetivos a cumplir.

El estudio incluyó a 12 individuos de los cuales 7 mujeres (59.42%) y 5 hombres (40.58%). **Figura 1.**

En cuanto a **edad**, hubo un rango de 2-10 años, por lo que se crearon dos grupos, uno de 2-5 años (46.48%) y el otro de 6 años o más (56.52%). **Figura 2.**

La distribución de la muestra en cuanto a la **dentición** fue el 56.52% para la dentición mixta y el 43.48% para la dentición temporal. **Figura 3.**

En relación con las características microscópicas, encontramos que, la **morfología** de los microorganismos cultivados fue: cocos 91.30%, levaduras 7.25% y bacilos 1.45%. **Figura 4.**

La **agrupación** observada de dichos microorganismos fue de la siguiente manera: microorganismos aislados 2.90%, bastones 1.45%, cadenas 28.98%, pares 63.77%, y racimo 2.90%. **Figura 5.**

Y en cuanto a **tinción**, obtuvimos que el 62.32% fueron Gram positivas y Gram negativas 37.68%. **Figura 6.**

Las **características macroscópicas** que se registraron fueron:

- Forma: ovalada 1.49% y redonda 98.51%. **Figura7.**
- Color: blanco 50%, café 36.96%, gris 6.52%, rojo, rosa y translúcido 2.17%. **Figura 8.**
- Superficie: plana 7.25% y elevada 92.75%. **Figura9.**
- Textura: lisa 94.20% y rugosa 5.80%. **Figura 10.**

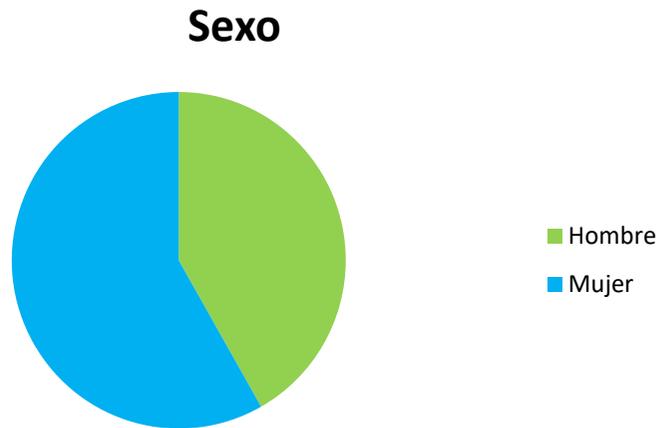


FIGURA 1. Distribución de la muestra en cuanto al sexo.
 7 mujeres (59.42%) y 5 hombres (40.58%)
n= 12

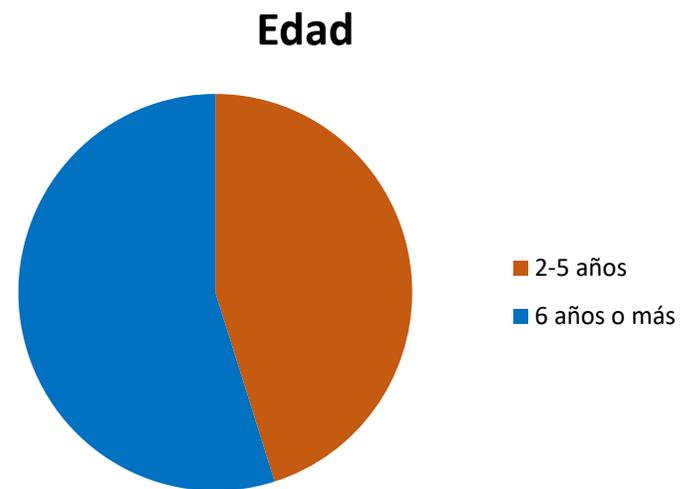


FIGURA 2. Distribución de la muestra en cuanto a edad, hubo un rango de 2-10 años, por lo que se crearon dos grupos, uno de 2-5 años (46.48%) y de 6 años o más (56.52%)
n= 12

Dentición

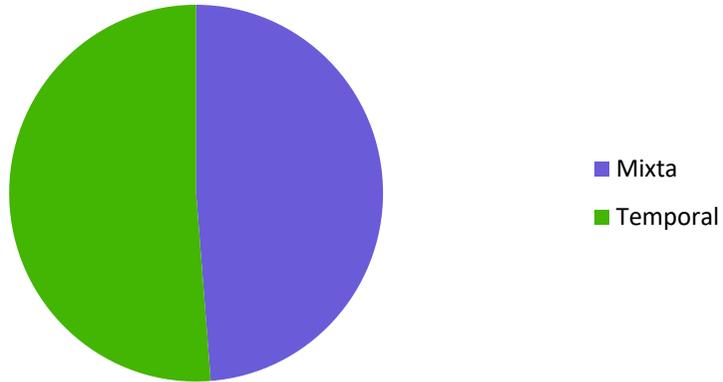


FIGURA 3. Distribución de la muestra en cuanto a la dentición, se dividió en dentición mixta (56.52%) y dentición temporal (43.48%).

n=12

Morfología

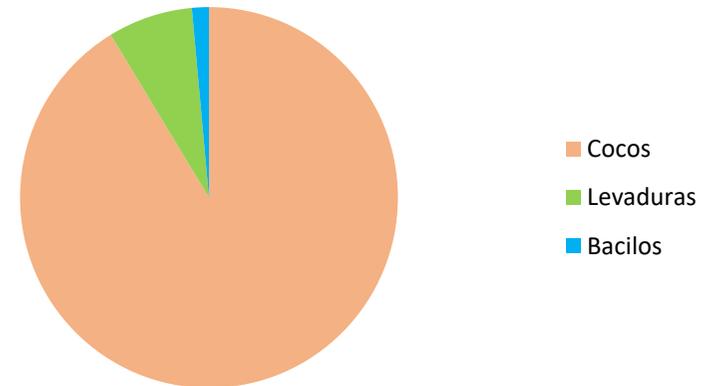


FIGURA 4. Distribución de la muestra en cuanto a la morfología de los microorganismos cultivados fue; cocos (91.30%), levaduras (7.25%) y bacilos (1.45%)

n=12

Agrupación

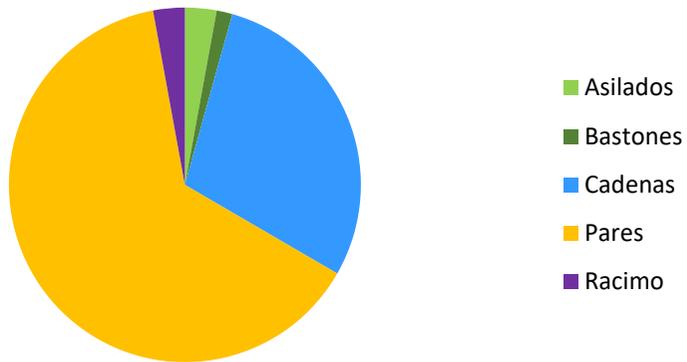


FIGURA 5. Distribución de la muestra en cuanto a la agrupación de las colonias fue, asilados (2.90%), bastones (1.45%), cadenas (28.98%), pares (63.77%), y racimo (2.90%).

n=12

Tinción de Gram

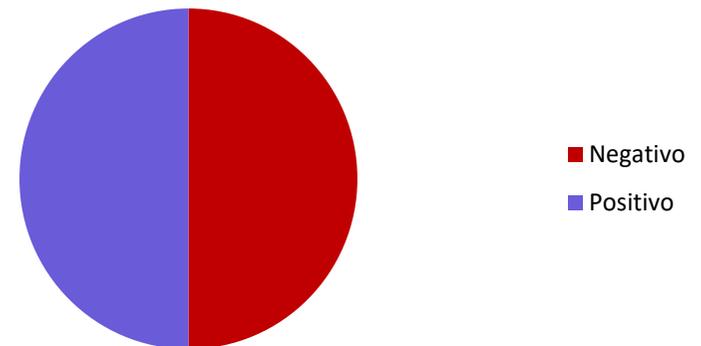


FIGURA 6. Distribución de la muestra en cuanto al tipo de tinción, Gram positivas (62.32%) y Gram negativas (37.68%).

n=12

Forma

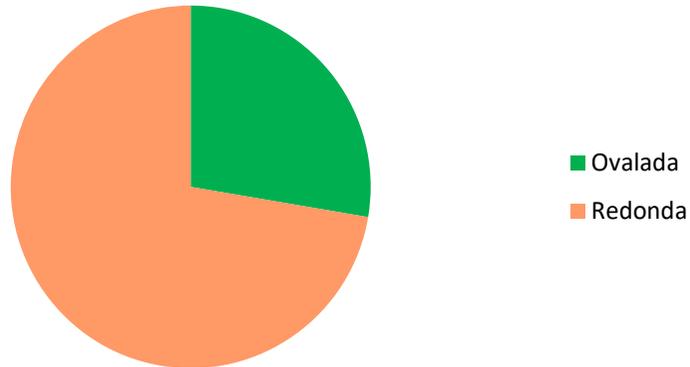


FIGURA 7. Distribución de la muestra, con base a la forma de las colonias, ovalada (1.49%) y redonda (98.51%)
n=12

Color

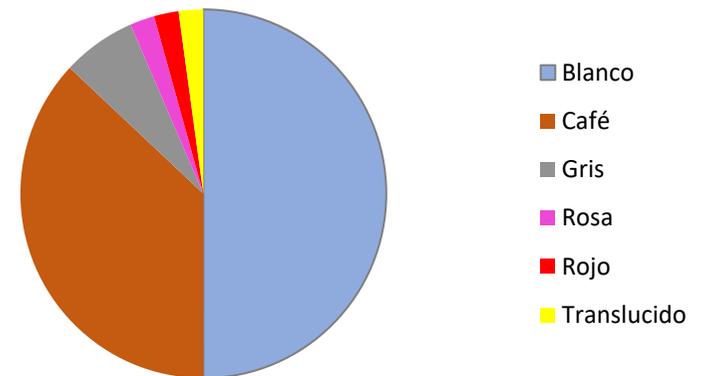


FIGURA 8. Distribución de la muestra, con base al color de las colonias fue;
Blanco (50%,) café (36.96%), gris (6.52%), rojo, rosa y translucido con (2.17%)
n=12

Superficie

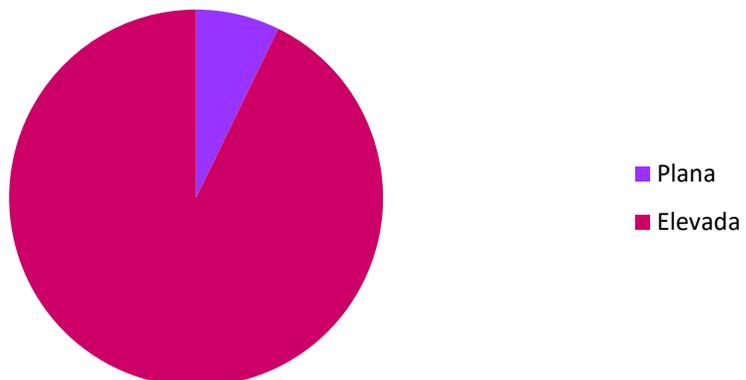


FIGURA 9. Distribución de la muestra, en base a la superficie de las colonias, plana con (7.25%) y elevada (92.75%)
 $n=12$

Textura

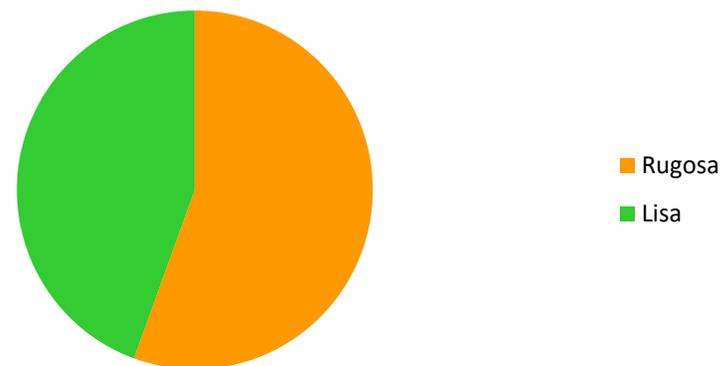


FIGURA 10. Distribución de la muestra en base a la textura de las colonias lisa; (94.20%) y rugosa (5.80%).
 $n=12$

Se analizaron los resultados según los objetivos planteados al inicio de este trabajo de investigación.

El segundo objetivo planteado es determinar los diferentes géneros bacterianos; según la estadística los valores obtenidos fueron los siguientes. **Figura 11**

Género	%
<i>Streptococcus</i>	49.3
<i>Neisseria</i>	37.7
<i>Candida</i>	7.2
<i>Staphylococcus</i>	4.3
<i>Lactobacillus</i>	1.5
Total	100

El tercer objetivo de acuerdo con la edad, sexo, y tipo de dentición, los **porcentajes** de los géneros bacterianos fueron los siguientes. **Figuras 12, 13 y 14**

Géneros	Edad (años)					
	2	5	6	7	8	10
<i>Streptococcus</i>	18	23	21	9	26	3
<i>Neisseria</i>	23	19	8	19	23	8
<i>Candida</i>	0	40	0	40	20	0
<i>Staphylococcus</i>	33	67	0	0	0	0
<i>Lactobacillus</i>	0	0	0	100	0	0

Nivel de significancia de: **p=0.636**

Sexo	Géneros				
	<i>Streptococcus</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Candida</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Mujer</i>	51	39	5	5	0
<i>Hombre</i>	45	36	11	4	4

Nivel de significancia de: **p= 0.732**

Dentición	Géneros				
	<i>Streptococcus</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Candida</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Temporal</i>	44	42	20	100	0
<i>Mixta</i>	55.88	57.69	80	0	100

Nivel de significancia de **p= 0.245**

El cuarto objetivo fue determinar que especies diferentes a *Streptococcus mutans* se encuentran en pacientes con caries dental, y los resultados fueron los siguientes.

Figura 15

Especies	%
<i>Neisseria</i>	14.93
<i>Candida</i>	7.46
<i>S. milleri</i>	41.79
<i>S. epidermidis</i>	7.46
<i>S. pyogenes</i>	28.36
<i>Total</i>	100

Quinto objetivo. Al encontrar el género de *Candida*, con un 7.25%, perteneciente a hongos, en pacientes con caries dental. **Figura 11**

El sexto objetivo, se analizó con las diferentes especies que se encontraron empleando métodos fenotípicos.

(Figura 15)

GÉNEROS

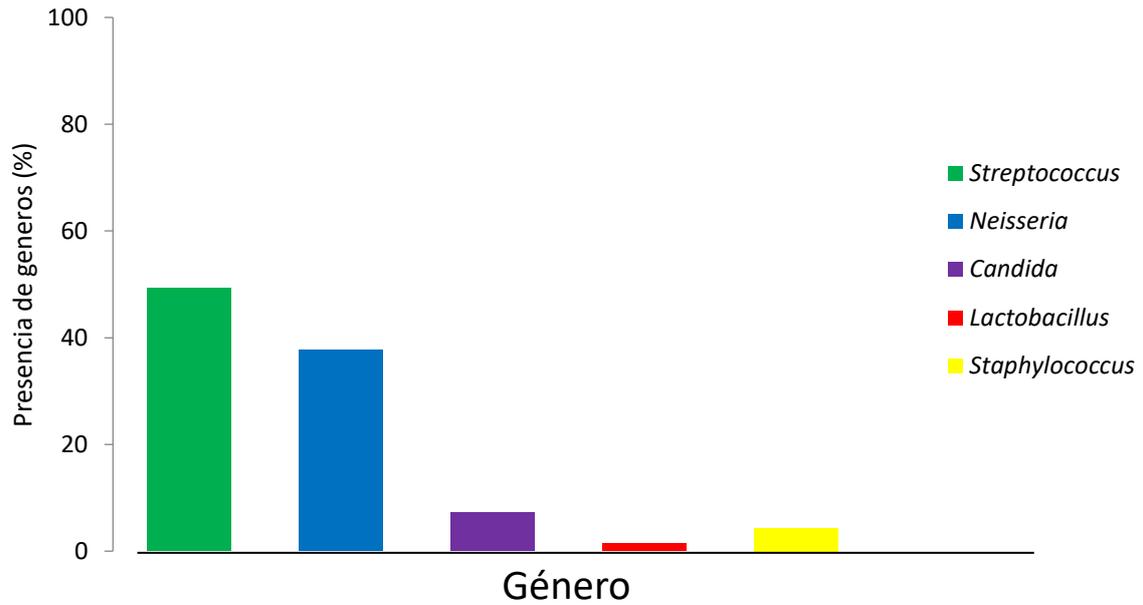


Figura 11. Porcentaje de crecimiento de los diferentes géneros bacterianos; de izquierda a derecha; *Streptococcus* (verde), *Neisseria* (azul), *Candida* (morado), *Lactobacillus* (rojo) y *Staphylococcus* (amarillo). Los datos son resultado de Fisher's exact. $n=12$.

EDAD / GÉNERO

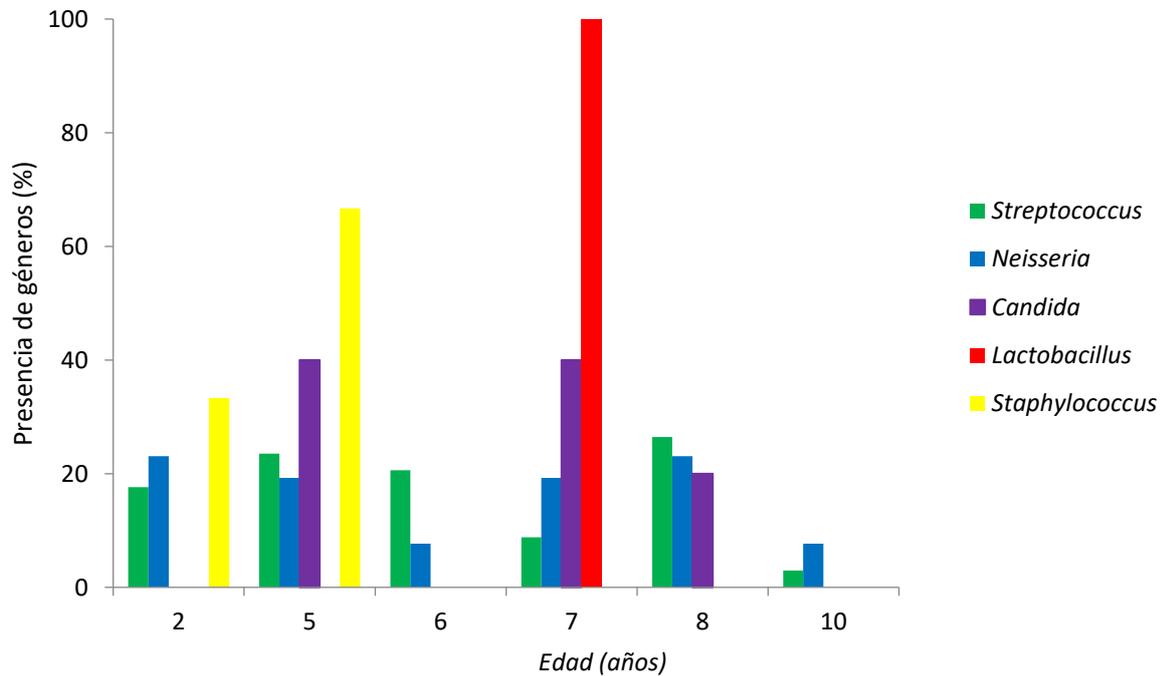


Figura 12. Porcentaje de crecimiento de los diferentes géneros de microorganismos, por edad. De izquierda a derecha: 2, 5, 6, 7, 8 y 10 años. *Streptococcus* (verde), *Neisseria* (azul), *Candida* (morado), *Lactobacillus* (rojo) y *Staphylococcus* (amarillo).

Los datos son resultado de Fisher's exact. $n=12$.

Nivel de significancia de: $p=0.636$

SEXO / GÉNERO

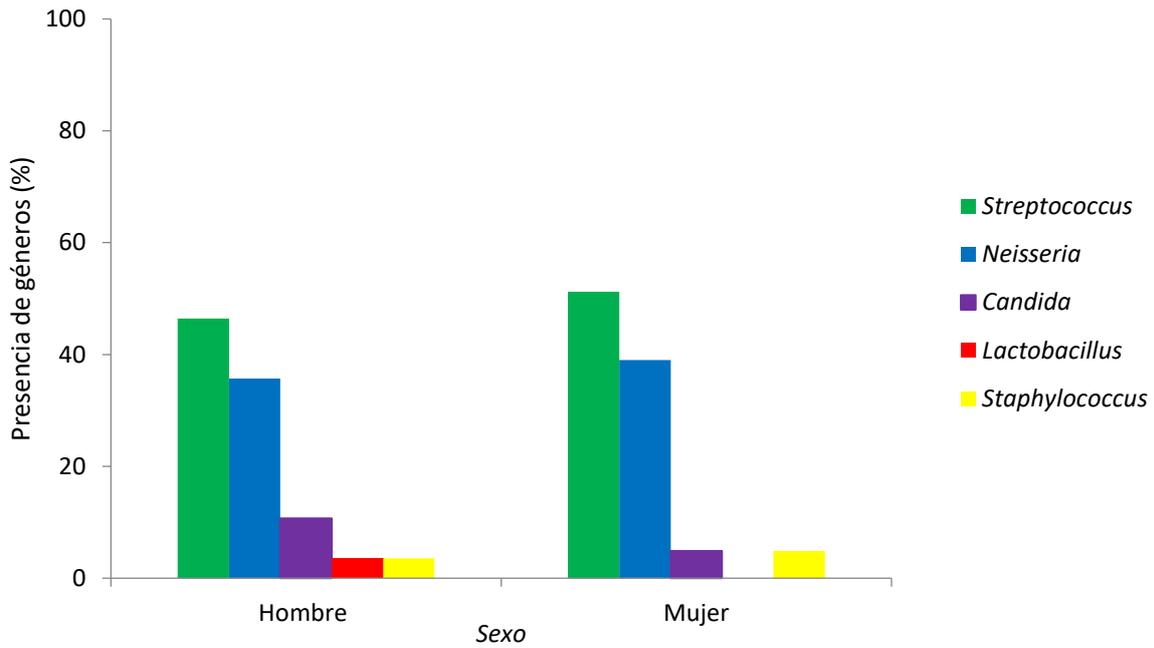


Figura 13. Porcentaje de crecimiento en cuanto al sexo del paciente y género de los microorganismos, de izquierda a derecha. Hombres; *Streptococcus* (verde), *Neisseria* (azul), *Candida* (morado), *Lactobacillus* (rojo) y *Staphylococcus* (amarillo). Mujeres; *Streptococcus* (verde), *Neisseria* (azul), *Candida* (morado), *Lactobacillus* (rojo) y *Staphylococcus* (amarillo). Los datos son resultado de Fisher's exact. $n=12$. Nivel de significancia de: $p=0.732$

DENTICIÓN / GÉNERO

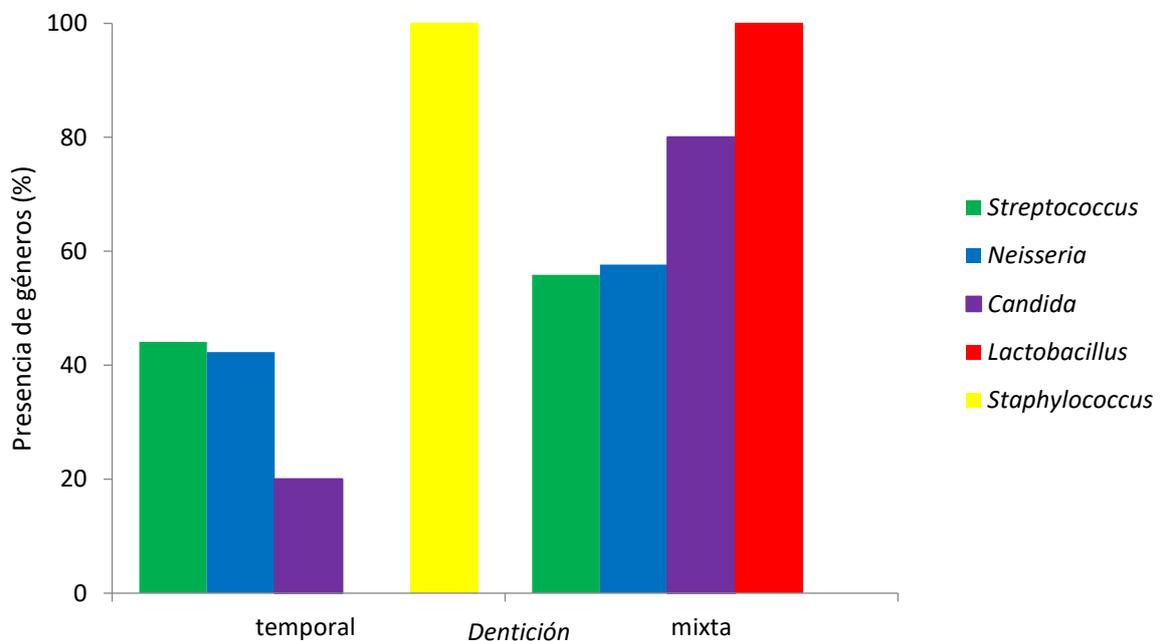


Figura 14. Porcentaje de crecimiento con base a la relación de las denticiones y el género microbiano; de izquierda a derecha: Temporal, *Streptococcus* (verde), *Neisseria* (azul), *Candida* (morado), *Lactobacillus* (rojo) y *Staphylococcus* (amarillo). Mixta, *Streptococcus* (verde), *Neisseria* (morado), *Candida* (morado), *Lactobacillus* (rojo) y *Staphylococcus* (amarillo). Los datos son resultado de Fisher's exact. $n=12$. Nivel de significancia de $p=0.245$

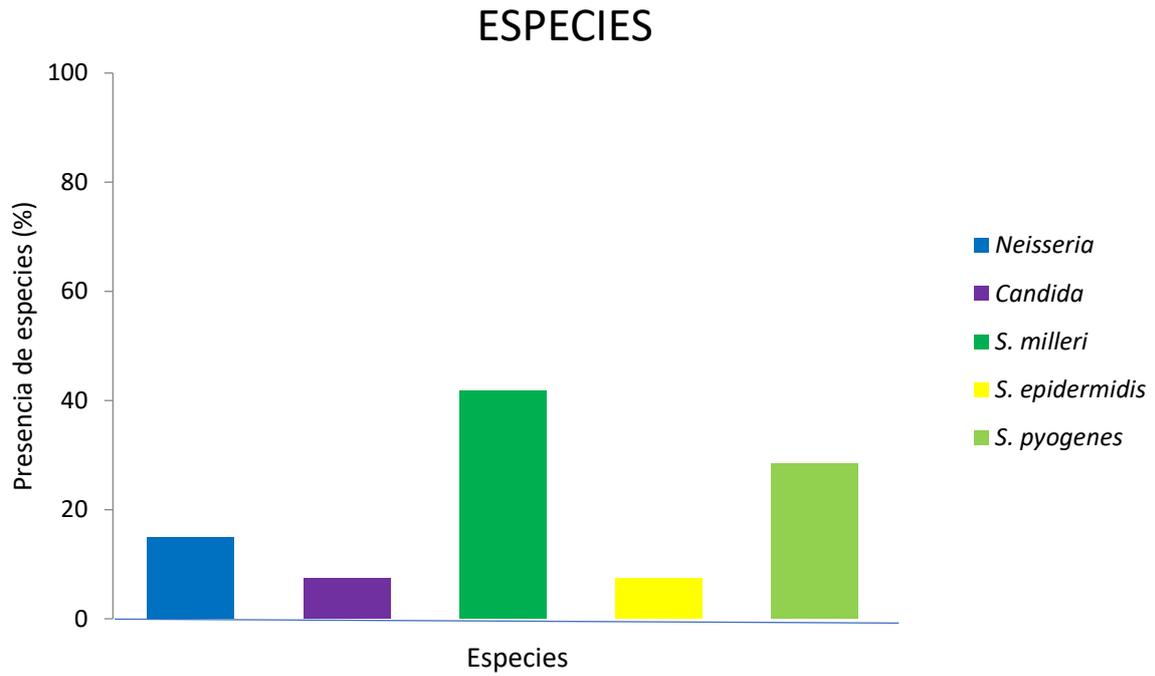


Figura 15. Porcentaje de crecimiento con base a las diferentes encontradas en los cultivos; de izquierda a derecha. *Neisseria* sp. (azul), *Candida albicans* (morado), *Streptococcus milleri* (verde fuerte), *Staphylococcus epidermidis* (amarillo) y *Streptococcus pyogenes* (verde claro)

Los datos son resultado de Fisher's exact. $n=12$

DISCUSIÓN

Al realizar el análisis de las muestras obtenidas de pacientes pediátricos que acudieron a la clínica de odontopediatría de la Facultad de Odontología, se obtuvo que el *S. mutans*, en efecto es el que mayor prevalencia tuvo, tanto en la dentición mixta como temporal, además de esta especie se encontraron *Streptococcus pyogenes*, y *Streptococcus milleri*. Cuyas especies complementan las que en la literatura están descritas (18).

El género *Lactobacillus*, tiene gran influencia en lesiones cariosas con extensión a la dentina; y en los pacientes estudiados, se encuentra en la mayoría de los pacientes con grado de caries 2, 3 y 4, los cuales tienen dentición mixta principalmente (17).

La presencia del género *Neisseria*, fue encontrada en la mayoría de los pacientes estudiados.

Las interacciones de bacterias y hongos existen, ya que los hongos tienden a presentarse en zonas en donde existe en exceso placa dentobacteriana, y como consecuente gran actividad cariogénica, y es ahí en donde se localizan las bacterias; en los pacientes estudiados, hubo presencia de ambos géneros, tanto *Candida* y *Streptococcus*. Ambos en las denticiones temporales y mixtas, así como en los dos sexos estudiados (20).

La presencia de *Lactobacillus* y *Staphylococcus*, parece que está ligada dependiendo de la dentición, puesto que entre mayor preveleía había de uno como fue el caso de *Staphylococcus* con un 100% en la dentición temporal, los *Lactobacillus* fueron 0%, y en la dentición mixta estos valores se invirtieron (18).

Estudiando los parámetros de sexo, se observó que no hay una diferencia muy significativa entre uno y otro, ambos tendrán crecimiento bacteriano simplemente por presentar procesos cariogénicos.

CONCLUSIONES

Se llegó a la conclusión de que, la disbiosis de la microbiota oral de pacientes con procesos cariogénicos, conlleva a contar con una variedad de géneros bacterianos y de hongos, así como diferentes especies.

La diferencia de edad, de sexo y tipo de dentición en los pacientes, no son predisponentes para padecer caries dental, y por consiguiente encontrar diferencia en la microbiota oral cariogénica, puesto que en ambos sexos y en ambas denticiones, se hallaron diferentes géneros y especies de microorganismos que originan el proceso carioso.

Por último, de acuerdo a este estudio, la disbiosis en la microbiota oral de pacientes con caries, si juega un papel importante durante el proceso cariogénico, ya que cuenta con la presencia de microorganismos bacterianos y fúngicos, que por sus características que agravan el estado de salud de los órganos dentarios.

Determinar mediante métodos fenotípicos la composición de la microbiota oral, de individuos pediátricos con dentición temporal; con presencia de actividad cariogénica.

ANEXOS



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
HISTORIA CLÍNICA Y CONSENTIMIENTO VÁLIDAMENTE INFORMADO



Nombre del Tutor: MIRA MORALES VÍCTOR MANUEL

Nombre del Asesor: OSEGUEDA ESPINOSA ALFREDO ALAN

Nombre del alumno: CHAVARRÍA GARCÍA KARLA BEATRÍZ

1. INFORMACIÓN GENERAL

Nombre del paciente: _____

Fecha de nacimiento: _____ Lugar de nacimiento: _____ Edad: _____ Sexo: _____

Grado escolar: _____

Nombre del padre/madre/tutor: _____

Motivo principal de la consulta: _____

2. HISTORIA CLÍNICA POR APARATOS Y SISTEMAS

¿Actualmente está bajo tratamiento médico por alguna enfermedad?

Si está bajo tratamiento, ¿Qué medicamentos toma regularmente? _____

¿Es alérgico a algún alimento o medicamento? _____

¿Tiene su esquema de vacunas completo? _____

Presenta o ha presentado	SI	NO
Reflujo		
Epilepsia		
Parotiditis		
Difteria		
Escarlatina		
Varicela		
Sarampión		
Rubeola		

3. ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES

Padre: _____

Madre: _____

4. ANTECEDENTES PERSONALES

¿Se alimenta o alimentó? Por seno materno ____ Por biberón: ____

¿Endulza o endulzó su leche? _____

¿Lleva a cabo algún procedimiento bucal en el paciente? _____

¿Quién lo realiza? _____

¿Con que y con que frecuencia? _____

5. CARTA DE CONSENTIMIENTO VÁLIDAMENTE INFORMADO

Ciudad de México a _____

Nombre del padre o tutor con domicilio en _____

_____ en calidad de familiar o tutor de _____

Declaro que la alumna CHAVARRÍA GARCÍA KARLA BEATRÍZ con numero de cuenta 31131721-5, me ha explicado que las preguntas anteriormente planteadas, las fotografías tomadas de la cavidad bucal del menor, sin exposición del rostro y la toma de muestras serán utilizadas únicamente para fines académicos, así como en su caso, la exposición de éstas en congresos relacionados al ámbito odontológico.

Declaro que comprendo y acepto los puntos planteados anteriormente, y que toda la información que proporcioné es verás. Asimismo, manifiesto mi conformidad con la información recibida, otorgo mi consentimiento para que se lleven a cabo los procedimientos necesarios.

Nombre y firma del padre o tutor

Nombre y Firma de la alumna

Nombre y firma del tutor y asesor y número de Cédula Profesional



BIBLIOGRAFÍA

1. Almaguer Flores A, Villagómez Olea JG. ecología oral. 1era edición. CDMX; 2017.
2. Lilian D, Vilvey J. Revisión Bibliográfica Caries dental y el primer molar permanente Dental caries and the first permanent molar. Vol. 17, Gaceta Médica Espirituana Univ. Ciencias Médicas. Sancti Spíritus. 2015.
3. Sandra Rojas F, Sonia Echeverría L. Caries temprana de infancia: ¿enfermedad infecciosa? Rev Médica Clínica Las Condes. 2014;
4. Palomer R L. Caries dental en el niño: Una enfermedad contagiosa. Rev Chil pediatría [Internet]. 2006 feb [cited 2019 Sep 3];77(1):56–60. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-41062006000100009&lng=en&nrm=iso&tlng=en
5. Jennifer Alexandra Robayo Freire. FACULTAD DE ODONTOLOGÍA EFECTIVIDAD DEL TEST DE RIESGO DE CARIES CRT PARA LA MEDICIÓN DE *STREPTOCOCCUS MUTANS* EN PERSONAS CON NECESIDADES ESPECIALES DEL VALLE DE LOS CHILLOS. Facultad de odontología; 2014.
6. L Kent Jr R. RL: Microbial complexes in subgingival plaque. Vol. 25, J Clin Periodontol. 1998.
7. Ribeiro AA, Azcarate-Peril MA, Cadenas MB, Butz N, Paster BJ, Chen T, et al. The oral bacterial microbiome of occlusal surfaces in children and its association with diet and caries. PLoS One. 2017 jul 1;12(7).
8. Cruz Quintana SM, Díaz Sjostrom P, Arias Socarrás D, Mazón Baldeón GM. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. Rev cubana Estomatol. 2017;54(1):84–99.
9. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Vol. 29, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2011. p. 601–8.
10. Daniel Pedro Núñez, Lourdes García Bacallao. Bioquímica de la caries dental. vol9 no 2. 2010;156–66.
11. Peralisi FJS, Rodrigues MR, Segura VG, Maciel SM, Ferreira FBA, Garcia JE, et al. Genotypic Diversity of *Streptococcus mutans* in Caries-Free and Caries-Active Preschool Children. Int J Dent [Internet]. 2010 [cited 2019 Sep 3]; 2010:1–5. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/ijdent/2010/824976/>
12. Koch G, Poulsen S. Odontopediatría abordaje clínico. 2da ed. Amaolca actualidades., editor. Venezuela; 2011. 61 p.
13. Boj RJ. Odontopediatría, la evolución del niño al adulto joven. 1era edición. Ripano S.A., editor. Madrid; 2011.
14. Angus, C Cameron, Richard PW... Manual de odontología pediátrica. 3era edición. Elsevier, editor. España; 2010. 49 p.
15. Revista Cubana de Estomatología. 2009; 46(2) [Internet]. Available from: <http://scielo.sld.cu>
16. Catalina Pérez M. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA BACTERIANA.
17. Nasco Hidal N, Gispert Abreu E de los A, Roche Martínez A, Alfaro Mon M, Pupo Tiguero RJ. Risk factors for incipient dental caries lesions in children. Rev cubana Estomatol. 2013;50(2):142–52.
18. Loreto Núñez F, Javier Sanz B, Gloria Mejía L. Caries dental y desarrollo infantil temprano estudio piloto. Rev Chil Pediatr. 2015 feb 1;86(1):38–42.
19. Tamez Delgado Nora Anesyh. “EFECTO DE LA DIETA SOBRE SELLADORES

CON RELLENO Y SIN RELLENO EN MOLARES DE RATAS SPRAGUEDAWLEY.” UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE ODONTOPEDIATRÍA; 2012.

20. Angel J, Moreno C. LOS HONGOS: HÉROES Y VILLANOS DE LA PROSPERIDAD HUMANA [Internet]. Available from: <http://www.revista.unam.mx/vol.17/num9/art69/>
21. Micología.
22. Sigmund S, Socransky y Anne D. Haffajee. Biofilms dentales: objetivos terapéuticos difíciles. *Periodontology*. 2000; 3:12–55.
23. Tanzer JM, Livingston J, Thompson AM. The microbiology of primary dental caries in humans. *J Dent Educ*. 2001 oct 1;65(10):1028–37.
24. en Odontología Operatoria Estética E, en Ciencias D. *Acta Odontológica Venezolana-VOLUMEN 47 N° P á g i n a | 1*. Available from: www.actaodontologica.com/fuente:www.actaodontologica.com/ediciones/2008/1/microorganismos_progresion_lesion_caries_dental.asp
25. Esaú López-Jácome L, Hernández-Durán M, Colín-Castro CA, Ortega-Peña S, Cerón-González G, Franco-Cendejas R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología [Internet]. Available from: www.medigraphic.org.mx
26. Antonio J, Nieto S, Ramos SV. Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón Coordinador: Germán Bou Arévalo Autores: Ana Fernández Olmos Celia García de la Fuente.
27. Sinner C. 4 Metodología. In: *El castellano de Cataluña*. DE GRUYTER; 2013.
28. Juan Carlos Ojeda-Garcés, Eliana Oviedo-García, Luis Andrés Salas3. *Streptococcus mutans y caries dental*. volumen 26 no1. 2013 jun;13.
29. UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA NACIONAL FACULTAD REGIONAL ROSARIO DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA CATEDRA DE BIOTECNOLOGIA.
30. caries.
31. Hace visible lo invisible CRT Test de Riesgo de Caries ®.
32. Lima. APLICACIÓN DEL SISTEMA INTERNACIONAL DE DETECCIÓN Y VALORACIÓN DE CARIES (ICDAS-II) E ÍNDICE CEO-S EN NIÑOS DE 3 A 5 AÑOS DEL HOSPITAL NACIONAL DOCENTE MADRE NIÑO SAN BARTOLOMÉ, LIMA, 2010 TESIS PRESENTADA POR LA BACHILLER MARÍA ISABEL NUREÑA PÉREZ PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE CIRUJANO DENTISTA. 2011.
33. Inmunidad natural o innata. *Rev la Fac Med*. 2008;51(4):171–2.
34. Paola TP. Visión panorámica del sistema inmune. *Rev Médica Clínica Las Condes* [Internet]. 2012 jul 1 [cited 2019 Sep 1];23(4):446–57. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0716864012703358>
35. Mistry D, Stockley RA. IgA1 protease. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2019 Sep 2];38(8):1244–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272505003079?via%3Dihub>
36. original1.
37. Prado Vanesa P, Natalia A, Delmira A, Rossy Luis B, Gabriel T, Molina Ronell B. Metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) en Odontología Metaloproteinasas (MMPs) of the extracellular matrix in Dentistry. Vol. 28. 2016.
38. Díaz Caballero A, Méndez Cuadro D, Martínez Serrano E, Orozco Páez J, Velásquez MR. Metaloproteinasas de la matriz en odontología y sus

- consideraciones desde el campo de la química computacional. Rev cubana Estomatol. 2014 Jan 1;51(1):80–92.
39. Angosto MC, Álvarez-Gómez JÁ. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. Vol. 76, Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2010. p. 59–84.
 40. Paola TP. Visión panorámica del sistema inmune. Rev Médica Clínica Las Condes. 2012 jul;23(4):446–57.
 41. Picazo Juan J, Prieto Prieto Juan. compendio de Microbiología. 2da edición. Picazo Juan J, Prieto Prieto Juan, editors. Barcelona España: Elsevier; 2016.
 42. Uberos José. Vacunación frente a la caries. 2012 jul;3.
 43. Gómez SI BS. Antígenos usados en vacunas contra la caries dental. 2013 jul;73–82.
 44. Rivas-Santiago B, Sada E, Hernández-Pando R, Tsutsumi V. Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. Vol. 48, Salud Publica de México. 2006. p. 62–71.
 45. González García Melaine, San Juan Galán I Javier, Morales Vicente Fidel Ernesto, Otero González Anzelmo. Antimicrobial peptides: their therapeutic potential. vol. 69 no 2. 2017 jul;