



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
ÁREA DE LA SALUD HUMANA  
ODONTOLOGÍA**

**TÍTULO**

**“ANÁLISIS MOLECULAR DE ADN DEL  
*STREPTOCOCCUS MUTANS* EN TRANSMISIÓN  
VERTICAL, BINOMIOS MADRE - HIJO, EN NIÑOS DE  
0 - 48 MESES”.**

TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN  
DEL TÍTULO DE ODONTÓLOGA.

**Autora:**

Gilma Katherine López Chamba

**Directora de tesis:**

Odont. Esp. Susana Patricia González Eras.

**Docente investigadora:**

Dra. Andrea Elizabeth Torres Gualán.

**LOJA-ECUADOR  
2016**



## **CERTIFICACIÓN**

Loja, 13 de diciembre del 2016

**Odont. Esp. Susana Patricia González Eras.**

### **DIRECTORA DE TESIS**

Certifica:

Que la presente tesis titulada “**ANÁLISIS MOLECULAR DE ADN DEL *STREPTOCOCCUS MUTANS* EN TRANSMISIÓN VERTICAL, BINOMIOS MADRE - HIJO, EN NIÑOS DE 0 - 48 MESES**”, elaborada por la **Srta. Gilma Katherine López Chamba**, ha sido planificada y ejecutada bajo mi dirección y supervisión, por tanto y al haber cumplido con los requisitos establecidos por el Régimen Académico por la Universidad Nacional de Loja autorizo su presentación, sustentación y defensa ante el tribunal designado para el efecto.



.....

**Odont. Esp. Susana Patricia González Eras**

### **DIRECTORA DE TESIS**

## **AUTORÍA**

El trabajo ha sido desarrollado con métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que la información, investigación, datos, criterios, análisis y conclusiones vertidos en la presente son de exclusiva responsabilidad de la Autora y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja, a sus representantes jurídicos de posibles o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi Tesis en el Repositorio institucional-biblioteca Virtual.

**Autor:** Gilma Katherine López Chamba

**Firma:**  \_\_\_\_\_

**Cédula:** 1105797136

**Fecha:** Loja, 13 de diciembre del 2016

## CARTA DE AUTORIZACIÓN

Yo, Gilma Katherine López Chamba, declaro ser autora de la tesis titulada: “ANÁLISIS MOLECULAR DE ADN DEL *STREPTOCOCCUS MUTANS* EN TRANSMISIÓN VERTICAL, BINOMIOS MADRE - HIJO, EN NIÑOS DE 0 - 48 MESES”, como requisito para optar el grado de Odontóloga General; autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de Información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja a los trece días del mes de diciembre del 2016

**Firma:** \_\_\_\_\_

**Autor:** Gilma Katherine López Chamba

**Cédula:** 1105797136

**Dirección:** Guillermo Arturo Bailón y Eduardo Mora Moreno

**Correo Electrónico:** gkathy\_lopez@hotmail.com

**Teléfono:** 0988331729

### **DATOS COMPLEMENTARIOS:**

**Director de Tesis:** Odont. Esp. Susana Patricia González Eras.

**Tribunal de Grado Presidente:** Odont. Esp. Zulema de la Nube Castillo Guarnizo.

**Vocal:** Odont. Esp. María Rosa Morales Campana.

**Vocal:** Odont. Esp. José Cristóbal Hidrobo Gómez.

## **DEDICATORIA**

*Con todo amor y gratitud dedico este trabajo a:*

*Mis padres Víctor y Rosario, quienes siempre han creído en mis capacidades y me han brindado el amor, la confianza, fortaleza y la comprensión necesaria para no desmayar en circunstancias que viví a lo largo de la vida universitaria, son y siempre serán el cimiento de todo lo que hago, me siento bendecida por tenerlos con vida celebrando mis triunfos que son muy suyos.*

*A ustedes hermanos Víctor, Michael y Santiago por estar siempre en todos los momentos en que necesitaba sin ningún reproche, ni objeción; por darme apoyo y palabras de ánimo, con su ejemplo han motivado en mí a seguir con este sueño que finalmente se cumplió.*

*A mis queridos docentes y amigos, por la paciencia y apoyo; prometo llevarlos siempre en mi corazón.*

**Gilma Katherine López Chamba.**

**AUTORA**

## **AGRADECIMIENTO**

*Inicio agradeciendo a Dios por todo lo recibido en estos años de aprendizaje y por permitirme alcanzar uno de mis grandes sueños. Así mismo agradezco a mis padres y hermanos por brindarme apoyo emocional y económico para el cumplimiento de mi sueño el ser Odontóloga, sin Ustedes no soy nada.*

*A la Universidad Nacional de Loja en especial a la carrera de Odontología por brindarme la dicha de aprender esta profesión de la mano de excelentes docentes, que no solo me han moldeado en saberes científicos y prácticos sino también en valores morales que los cumpliré día a día en el ejercicio profesional.*

*Agradezco a la Dra. Andrea Torres, Dra. Ruth Medina, Dr. Freddy Castillo y a mi directora de tesis Dra. Susana González, por el gran interés, colaboración, enseñanza, paciencia y tiempo que han dedicado en el presente trabajo, por sus buenas y excelentes orientaciones y a su vez por brindarme enriquecedores conocimientos.*

*Agradezco a las Autoridades de la Universidad Nacional de Loja que permitieron el uso de los Laboratorios para el desarrollo del siguiente trabajo investigativo.*

*Por ultimo agradezco a mis amigos de toda la vida por siempre brindarme su cariño y apoyo.*

**Gilma Katherine López Chamba.**

**AUTORA**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>TÍTULO .....</b>	<b>i</b>
<b>CERTIFICACIÓN.....</b>	<b>ii</b>
<b>AUTORÍA .....</b>	<b>iii</b>
<b>CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS .....</b>	<b>iv</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>v</b>
<b>AGRADECIMIENTO .....</b>	<b>vi</b>
<b>1. TÍTULO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. RESUMEN .....</b>	<b>2</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>4. REVISIÓN DE LA LITERATURA .....</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. ANTECEDENTES .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.1. Historia. ....</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 CARIES DENTAL .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1.1 Definición .....</b>	<b>9</b>
<b>2.1.2 Origen y desarrollo .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1.3 Consecuencias de la caries dental.....</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1 ECOLOGÍA ORAL. ....</b>	<b>12</b>
<b>3.1.1 Definición .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1.2 Origen y desarrollo de la Microbiota bucal. ....</b>	<b>12</b>

3.1.3 Factores de la cavidad oral que influyen en el crecimiento de microorganismos .....	13
3.1.3.1 FACTORES FÍSICOQUÍMICOS.....	14
3.1.3.2 FACTORES DE ADHESIÓN, AGREGACIÓN Y COAGREGACIÓN.....	16
3.1.3.3 FACTORES NUTRICIONALES .....	16
3.2 <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i> .....	17
3.2.1 Generalidades .....	17
3.2.2 Clasificación .....	18
3.2.3 Colonización Inicial por <i>Streptococcus mutans</i> .....	19
3.2.5 Asociación entre <i>Streptococcus mutans</i> y caries dental .....	20
3.2.6 Tipificación del <i>Streptococcus mutans</i> .....	20
CAPÍTULO IV .....	22
4.1 SALIVA .....	22
4.1.1 Definición .....	22
4.1.3 Funciones .....	23
CAPÍTULO V .....	27
5.1 MEDIOS DE CONTAGIO DE <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i> .....	27
5.1.1 Trasmisión salival del <i>Streptococcus mutans</i> .....	27
5.1.2 Transmisión vertical .....	27
5.1.3 Transmisión horizontal .....	28
CAPÍTULO VI.....	29
6.1 PRUEBAS DE LABORATORIO .....	29
6.1.1 Medios de cultivo .....	29

6.1.2 Reacción en cadena de polimerasa (PCR) .....	31
5. MATERIALES Y METODOS. ....	33
6. RESULTADOS .....	46
7. DISCUSIÓN .....	53
8. CONCLUSIONES.....	57
9. RECOMENDACIONES .....	58
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	59
11. ANEXOS.....	65
ANEXO 01.....	66
ANEXO 02.....	67
ANEXO 03.....	68
ANEXO 04.....	69
ANEXO 05.....	70
ANEXO 06.....	71
ANEXO 07.....	72
ANEXO 08.....	73
ANEXO 09.....	78
ANEXO 10.....	79

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla #1</b> Muestras obtenidas de binomios por género y edad según el niño.....	47
<b>Tabla #2</b> Cultivos de <i>S. mutans</i> analizado con pruebas bioquímicas en binomios madre-hijo.....	48
<b>Tabla #3</b> Muestras positivas de <i>S. mutans</i> por edades y género.....	49
<b>Tabla #4</b> Relación entre el nivel de <i>S. mutans</i> de la madre y su hijo independiente del grupo etario. (Pruebas microbiológicas).....	50 51
<b>Tabla #5</b> Perfiles de <i>S. mutans</i> con cada primer OPA-02 y OPA-05.....	

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Grafico #1.....	47
Grafico #2.....	48
Grafico #3.....	59
Grafico #4.....	50
Grafico #5.....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Pruebas bioquímicas para especie <i>S. mutans</i> .....	21
Fig. 2 Morfología de <i>S. mutans</i> en Agar Mitis Salivarius. ....	30
Fig. 3 Charla y breve explicación a los padres de familia.....	37
Fig. 4. Firma del consentimiento informado.....	37
Fig. 5. Recolección de la muestra de saliva.....	38
Fig. 6. Recolección de la muestra de saliva.....	38
Fig. 7. Recolección de la muestra de saliva.....	38
Fig. 8. Recolección de la muestra de saliva.....	38
Fig. 9. Recolección de la muestra de saliva.....	38
Fig. 10. Recolección de la muestra de saliva.....	38
Fig. 11. Rotulación y transporte de muestras al laboratorio.....	38
Fig. 12. Siembra de la muestra .....	38
Fig. 13. Siembra de la muestra.....	39
Fig. 14. Colocación de las muestras en la incubadora.....	39
Fig. 15. Reconocimiento de colonias.....	39
Fig. 16. Tinción Gram.....	39
Fig. 17. Vista de colonias en el microscopio.....	39
Fig. 18. Toma de una colonia presuntiva para pruebas bioquímicas.....	39
Fig. 19. Pruebas Bioquímicas.....	40
Fig. 20. Pruebas Bioquímicas de hidrolisis de Esculina.....	40
Fig. 21. Muestras en caldo cerebro-corazón.....	40
Fig. 22. Toma de muestras a madres cuyos niños dieron <i>S. mutans</i> positivo.....	40
Fig. 23. Muestras rotuladas y colocadas en tubos de caldo cerebro-corazón.....	40
Fig. 24. Asa metálica estéril.....	40
Fig. 25. Toma de colonias de <i>S. mutans</i> .....	41
Fig. 26. Colonias colocadas en tubos eppendorf con agua destilada.....	41
Fig. 27. Equipo UV transiluminador.....	41

Fig. 28. Solución de extracción de ADN en cada tubo que contiene las colonias...	41
Fig. 29. Mezcla de la solución .....	41
Fig. 30. Incubadora a 80°C por 20 minutos.....	41
Fig. 31. Incubadora a 80°C por 20 minutos.....	42
Fig. 32. Se vertió la solución en columnas con filtros para extracción de ADN....	42
Fig. 33. Centrifugadora a 6.082 xg por minuto.....	42
Fig. 34. Wash en cada filtro .....	42
Fig. 35. Centrifugadora a 6.082 xg por minuto.....	42
Fig. 36. Wash en cada filtro .....	42
Fig. 37. Centrifugadora a 16.060 xg por 4 minutos.....	43
Fig. 38. Cambio del filtro a un tubo eppendorf.....	43
Fig. 39. Solución de tampón Buffer.....	43
Fig. 40. Centrifugadora a 6.082 xg por minuto.....	43
Fig. 41. Calidad de ADN en el programa NUCLEIC ACID.....	43
Fig. 42. Suspensión de primers con agua de biología molecular.....	43
Fig. 43. Solución de trabajo de primers.....	44
Fig. 44. Go taq – DNTPs, MgCl <sub>2</sub> , Taq Polimerasa.....	44
Fig. 45. Agua.....	44
Fig. 46. Mezcla de la solución.....	44
Fig. 47. 48 µL en cada tubo para PCR .....	44
Fig. 48. 2 µL de ADN template.....	44
Fig. 49. Amplificación.....	44
Fig. 50. Gel de agarosa.....	44
Fig. 51. SYBER safe.....	45
Fig. 52. Marcador de peso molecular 1kbp.....	45
Fig. 53. Amplicones.....	45
Fig. 54. Electroforesis.....	45
Fig. 55. Transiluminador UV.....	45
Fig. 56. Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de <i>S. mutans</i> en niños de 0 a 48 meses de edad y sus respectivas madres OPA-05.....	52
Fig. 57. Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de <i>S. mutans</i> en niños de 0 a 48 meses de edad y sus respectivas madres OPA -02.....	52

Fig. 58. Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de <i>S. mutans</i> en niños de 0 a 48 meses de edad OPA-05.....	52
Figura 59. Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de <i>S. mutans</i> en niños de 0 a 48 meses de edad OPA-02.....	53

## **1. TÍTULO**

**“ANÁLISIS MOLECULAR DE ADN DEL *STREPTOCOCCUS MUTANS*  
TRANSMISIÓN VERTICAL, BINOMIOS MADRE - HIJO, EN NIÑOS DE 0 -  
48 MESES”.**

## 2. RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación fue analizar molecularmente el *Streptococcus mutans* en transmisión vertical presentes en binomios madre-hijo, en niños de 0 - 48 meses. Para el cumplimiento de este objetivo se seleccionó a 40 binomios madre-hijo y se los dividió en 5 grupos; G1 (0-9 meses), G2 (10 a 18 meses), G3 (19-27 meses), G4 (28 a 36 meses), G5 (37-48 meses); la investigación se dividió en tres fases, la fase de recolección de muestras e información, que por medio de la correspondiente autorización y firma de las madres se procedió a recolectar datos mediante las historias clínicas y a su vez a la recolección de la saliva la misma que se realizó con un hisopo previamente estéril colocado debajo de la lengua a nivel de los molares inferiores por 20 seg. en hijo y en madre; inmediatamente cada hisopo fue colocado en el medio Stuart previamente rotulado y llevadas en un contenedor con hielo al laboratorio microbiológico; en la segunda fase, las muestras fueron sembradas, cultivadas y aisladas en un medio de cultivo específico y fueron sometidas a pruebas bioquímicas para confirmar la presencia de *S. mutans*; en la tercera fase, los cultivos positivos fueron transportados al laboratorio bio-molecular en caldo cerebro-corazón, se cultivó nuevamente, se realizó la extracción de ADN y se amplificó por AP-PCR para el análisis genotípico de la bacteria en estudio; los resultados fueron: que del 100 % de madres investigadas, no presenta la especie *S. mutans*, mientras que en los bebés el 15% si la tiene, con mayor presencia en el rango de 10 a 18 meses con el 33 %; además, se evidencia la no existencia de relación genotípica entre binomios madre e hijo con ninguno de los dos cebadores aplicados; sin embargo se encuentra de forma interesante dos homologías de genotipo de *S. mutans* en niños investigados con un único cebador el OPA-05 y finalmente las homologías se encontraron en niños que se ubican en rangos de 0 a 9 meses, 10 a 18 meses, 28 a 36 meses y de 37 a 48 meses, respectivamente.

**Palabras clave:** ADN del *S. mutans*, transmisión vertical, AP- PCR

## ABSTRACT

The main objective of this research was to analyze molecularly the *Streptococcus mutans* in vertical transmission present in mother-child binomial, in children of 0-48 months. To achieve this objective, 40 mother-child binomials were selected and divided into 5 groups; G1 (0-9 months), G2 (10-18 months), G3 (19-27 months), G4 (28-36 months), G5 (37-48 months); The research was divided into three phases, the sampling and information collection phase, which through the corresponding authorization and signature of the mothers proceeded to collect data through the clinical records and in turn to the collection of saliva as well as performed with a before sterilizing the swab placed under the tongue in the lower molar for 20 seconds. In the son and in the mother; immediately each swab was placed in the Stuart medium previously labeled and carried in a container with ice to the microbiological laboratory; the second phase, the samples were seeded, cultivated and isolated in a specific culture medium and subjected to biochemical tests to confirm the presence of *S. mutans*; in the third phase, the positive cultures were transported to the bio-molecular laboratory in the brain-heart broth; was again cultured, DNA extraction and amplified by AP-PCR for the genotypic analysis of the bacterium studied; the results were: that 100% of the mothers investigated, did not present the *S. mutans* species, whereas in the babies 15% had it, with a greater presence in the range of 10 to 18 months with 33%; in addition, the existence of the genotypic relationship between the mother and child binomials is evidenced with neither of the two primers applied; however, two homologies of the *S. mutans* genotype were found in children investigated with a single OPA-05 primer and homologies were finally found in children from 0 to 9 months, 10 to 18 months, 28 to 36 months, and 37 to 48 months , respectively.

**Keywords:** *S. mutans* DNA, vertical transmission, AP-PCR

### 3. INTRODUCCIÓN

El *Streptococcus mutans* es un habitante de la microbiota oral que constituye la primera causa de caries dental; esta bacteria se adhiere fácilmente a la superficie del diente para la colonización (Schelenz, Page, & Emmerson, 2005; Featherstone, 2000). Se ha considerado que la colonización de la cavidad oral de los niños por *S. mutans* ocurre principalmente en la llamada «ventana de infección» entre los 19 y 31 meses de edad; sin embargo, nuevos estudios han demostrado que la colonización puede ocurrir mucho antes de este tiempo mediante la formación de colonias adherentes en las superficies mucosas y se ha relacionado mayor posibilidad de colonización en niños expuestos a factores que facilitan los procesos de transmisión del *S. mutans*. (Caufield, Cutter & Dasanayake, 1993; Wan, Seow, Walsh, Bird, Tudehope & Purdie, 2001)

La transmisión del microorganismo se produce entre los miembros de un grupo, diseminándose por las gotas de saliva con unidades formadoras de colonias de *S. mutans* ya sea por vía directa o indirecta (Lindquist & Emilson, 2004; Rojas & Echeverría, 2014); la principal fuente para la adquisición y transmisión del *S. mutans* en los niños es la saliva de sus madres, la evidencia al respecto proviene de diferentes estudios que han mostrado un patrón idéntico de ADN cromosomal en las bacterias de los niños y sus madres (Mattos, Li, Caufield, Duncan, & Smith, 2001; Liébana, 2002; Martinez & Rodriguez, 2009); a su vez se ha demostrado que los *S. mutans* pueden presentar cambios genéticos que les permiten ser más eficientes como causantes de enfermedad y que su potencial patógeno puede aumentar a causa de la presencia de varios genotipos en un individuo (Ojeda, Oviedo, & Salas, 2013; Nuñez & Garcia, 2010); por tal motivo se ha planteado en este trabajo “Realizar el análisis molecular del *Streptococcus mutans* en la transmisión vertical presentes en binomios madre-hijo, en

niños de 0 - 48 meses"; con el propósito de comparar los genotipos y establecer la relación genética entre ellos y a su vez aportar a la evidencia científica.

El presente estudio fue de tipo descriptivo, cuantitativo y de corte transversal-prospectivo. La investigación se dividió en tres fases, la fase de recolección de muestras e información, donde se procedió a informar y explicar el tema y a su vez la entrega de consentimientos informados, con la correspondiente autorización y firma de las madres se procedió a recolectar datos mediante las historias clínicas y a la toma de muestras. La muestra estuvo conformada por 40 binomios madre-hijo con edad de 0 a 48 meses. La recolección de la saliva se realizó con un hisopo previamente estéril colocado debajo de la lengua por 20 segundos a nivel de los molares inferiores tanto en madre como en hijo; la segunda fase fue la de laboratorio microbiológico donde las muestras de saliva se transportaron en medio Stuart, las muestras fueron sembradas, cultivadas y aisladas en un medio de cultivo específico además fueron sometidas a pruebas bioquímicas para confirmar la presencia de *S. mutans*; la tercera fase fue la del laboratorio de biotecnología, en la cual solo aquellos cultivos positivos fueron transportados a este lugar en caldo cerebro-corazón; se cultivó nuevamente, se realizó la extracción de ADN y por último se amplificó por AP-PCR para el análisis molecular de la bacteria en estudio.

De cuyos objetivos se obtuvo los siguientes resultados: que el 100 % de madres investigadas, no presenta la especie *S. mutans*, mientras que en los bebés el 15% sí la tiene, con mayor presencia en el rango de 10 a 18 meses con el 33 %; además, se evidencia la no existencia de relación genotípica entre binomios madre e hijo con ninguno de los dos cebadores aplicados; sin embargo se encuentra de forma interesante dos homologías de genotipo de *S. mutans* en niños investigados con un único cebador

el OPA-05 y finalmente las homologías se encontraron en niños que se ubican en rangos de 0 a 9 meses, 10 a 18 meses, 28 a 36 meses y de 37 a 48 meses, respectivamente.

Por lo tanto se concluye que aunque no se determinó una homologación genotípica entre binomios madre-hijo, a través de las dos homologías encontradas en niños se sustenta una transmisión horizontal como pauta para seguir investigando este medio de transmisión y a su vez aportar a la evidencia científica; de manera que se pueda tomar medidas urgentes de educación y prevención con la finalidad de erradicar hábitos nocivos que afecten a la salud bucal de los lactantes y niños.

## **4. REVISIÓN DE LA LITERATURA**

### **CAPITULO I.**

#### **1.1. ANTECEDENTES**

##### **1.1.1. Historia.**

La microbiología bucal fue descubierta en el año de 1676 por Antoni Van Leeuwenhoek, las muestras que examinó en un microscopio de lente simple fueron tomadas de su cavidad bucal y fueron contrastadas con muestras tomadas en la cavidad bucal de un hombre alcohólico, muelle y que se lavaba la boca por la mañana con un sorbo de vino, es así que pudo revelar la presencia de bacterias bucales y dibujarlas por primera vez, denominándolas inicialmente a las bacterias como animalículos; después de este hallazgo numerosos investigadores iniciaron procesos de identificación de agentes microbianos en la cavidad bucal relacionándolos con enfermedades bucales (Volcy, 2004; Medina, 2009).

Después de este hallazgo, Miller en 1890, planteó la etiología de la caries dental en la cual atribuía que el factor más importante en el desarrollo de la enfermedad es la capacidad de un gran número de bacterias bucales de producir ácidos a partir de los carbohidratos presentes en la dieta. No fue hasta 1924 que Clarke realizó un gran aporte a la identificación del agente microbiano principal en relación a la enfermedad de caries dental; el descubrimiento ocurrió cuando aisló microorganismos a partir de lesiones cariosas humanas observando cocos en cadena y en ocasiones cocobacilos, es decir, con un comportamiento pleomorfo, por tal motivo Clarke llamó por primera

vez a estos microorganismos *S. mutans*; la descripción de Clarke de este microorganismo fue la siguiente: *S. mutans* produce ácido de manera muy rápida en un medio donde el pH inicial es 7.0 obteniendo un pH de 4.2 cerca de las 24 horas. Este hallazgo fue clave del auténtico rol del *S. mutans* en relación a la caries dental, confirmando que este microorganismo prevalece siempre y cuando el cuerpo este en proceso de deterioro (Cawson & Odell, 2009; Hamada & Slade, 1980; Nagel, 2012; Rocha, Lozano, & Martinez, 2004).

En 1960 Keyes estableció que la caries es por naturaleza transmisible; esta teoría la demostró con experimentos en cricetos (hámsteres), en las que observo que una caries inactiva previa, se desarrollara en caries después del contacto con animales con caries activa. Aduciendo así el inicio y desarrollo de caries a través del microorganismo *S. mutans*. En la actualidad la mayor parte de estudios epidemiológicos han demostrado que el grupo mutans es el más estrechamente vinculado con la caries dental (Harris & Garcia, 2005; Negroni, 2009; Seif, 1997).

## **CAPÍTULO II**

### **2.1 CARIES DENTAL**

#### **2.1.1 Definición**

La caries dental es una enfermedad infecciosa, multifactorial, dinámica crónica que ocurre en la estructura dentaria por acción de ácidos derivados de depósitos microbianos que integran la placa dental en un periodo de tiempo suficientemente prolongado, lo que ocasiona una pérdida de mineral de la superficie dental, es así que el signo de esta enfermedad es la destrucción localizada de los tejidos duros (Harris & Garcia, 2005; Ramón, Castañeda, Hortencia, Estrada, & Quinza, 2016).

Pérez (2009) afirma que: “La caries dental es una enfermedad infecciosa endógena resultado del desequilibrio en la microflora oral autóctona producto de las alteraciones del medioambiente local, lo cual conduce al incremento de organismos patógenos”.

La Organización Mundial de la Salud (1996) define a la caries dental como: “toda cavidad en una pieza dental, que puede diagnosticarse mediante un examen visual y táctil practicado con un espejo y sonda fina”; a su vez en el boletín informativo de Abril del 2012, afirmo que el 60%-90% de los escolares y casi el 100% de los adultos tienen caries dental en todo el mundo, de manera que si se tiene en cuenta la cantidad de personas con este padecimiento, se pudiera hablar de la existencia de una pandemia de caries dental; a pesar de que se tiene conocimientos sobre las causas de este trastorno tan común, la prevalencia continua siendo elevada en la mayoría de los países.

### **2.1.2 Origen y desarrollo**

La etiopatogenia de la caries dental fue propuesta por W. Miller en 1889, el demostró que lesiones similares a la caries dental pueden producirse incubando dientes en saliva si se añadían carbohidratos. Miller llegó a la conclusión de que la caries era una consecuencia de descalcificación producida por el ácido producido por las bacterias seguidas de la invasión y destrucción de todos los tejidos restantes (Cawson & Odell, 2009). En 1960 Paul Keyes estableció la triada ecológica compuesto por tres agentes (Huésped, microorganismos y dieta) a lo que Newbrun en 1978 agregó el tiempo como el cuarto factor. Así se sostiene que el proceso de caries se fundamenta en los factores básicos, primarios o principales: dieta, huésped, microorganismos y tiempo, cuya interacción se considera indispensable para que se provoque la enfermedad, que se manifiesta a través de un síntoma clínico que es la lesión cariosa (Cuadrado & Gomez, 2008; Henostroza, 2007).

En conclusión la caries es un proceso o enfermedad dinámica crónica infecciosa, que se origina y desarrolla en la estructura dentaria que está en contacto con los depósitos microbianos y, debido al desequilibrio entre la sustancia dental y el fluido de placa circundante es el resultado de una enfermedad transmisible e irreversible, se considera que este proceso infeccioso es desencadenado por bacterias del género *Streptococcus*, encontradas en la flora bucal, las mismas son altamente cariogénicas y una vez que se encuentren en condiciones ácidas, producen una gran cantidad de ácido láctico y sintetizan polisacáridos extracelulares, que aumentan la adhesión de la placa bacteriana en la superficie de los dientes (Mussatto & Roberto, 2002; Nuñez & Garcia, 2010, Ramón, Castañeda, Hortencia, Estrada, & Quinza, 2016).

La susceptibilidad individual de la caries depende en su mayoría de la presencia del *S. mutans* en boca. Estudios indican que los niños infectados por esta bacteria antes de los dos años poseen ocho veces más caries que los niños que se infectan a los cuatro años. Como se ha expresado anteriormente el microorganismo se encuentra de manera significativa en la saliva antes de la formación de la caries dental, métodos que utilizan sondas de ADN indican que las superficies retentivas del dorso de la lengua funcionan como un reservorio de *S. mutans* para una posterior colonización de piezas dentarias. (Negroni, 2009; Ingraham & Ingraham, 1998)

### **2.1.3 Consecuencias de la caries dental**

La Organización Mundial de Salud (OMS) define a la salud como “un estado de bienestar físico, mental y social completo, no simplemente la ausencia de la enfermedad y dolencia”, en salud oral el estado de bienestar se desequilibra en presencia de caries dental la cual genera gran impacto a nivel de la salud en general y a la calidad de vida de las personas afectadas.

Las secuelas de la caries dental afecta de manera importante a la calidad de vida física, psicológica, conductual y social en los niños que la padecen, la consecuencia inmediata a la progresión de esta enfermedad es el dolor y malestar debido a infecciones o formación de abscesos, el cual puede afectar las actividades cotidianas del niño como alteración del sueño y dificultades para comer, lo que produce un retraso en el desarrollo físico del niño, manifestándose como bajo en peso y talla para su edad. La caries dental también causa ausentismo escolar por su estética reducida y con ello baja autoestima y problemas del manejo de comportamiento y por ultimo reduce las capacidades cognitivas (Rojas & Echeverría, 2014; Koch & Poulsen, 2011).

## **CAPITULO III**

### **3.1 ECOLOGÍA ORAL.**

#### **3.1.1 Definición**

La ecología comprende el estudio de las relaciones entre los microorganismos y el ambiente. Por lo tanto, la cavidad oral se considera un ambiente y está compuesto por cientos de especies de microorganismos diferentes, la mayoría de los cuales son bacterias y solo cerca del 50% de estas especies se pueden cultivar (Negroni, 2009; Barroso, 2009).

Los hábitats que proporcionan condiciones ecológicas propias para el crecimiento y desarrollo de la microorganismos orales incluyen los dientes, placa dental, saliva, surco gingival, materiales artificiales y las superficies mucosas tales como labios, carrillos, paladar, encía y la lengua; durante los primeros meses de vida la boca consiste solo en las superficies mucosas para la colonización microbiana y la misma cambiara por frecuencia y tipo de alimentación, variaciones en el flujo de saliva y tratamientos con antibioticoterapia (Philip & Martin, 2011; Liebana, 2008)

#### **3.1.2 Origen y desarrollo de la Microbiota bucal.**

Desde las primeras horas de vida hasta la muerte, el ser humano está colonizado por millones de microorganismos provenientes del medioambiente y de las personas que lo rodean. El único lugar en que el ser humano está libre de gérmenes es en el útero materno, la presencia de los microorganismos en la boca comienza a manifestarse a partir de las 4 a 12 horas del alumbramiento a estos primeros microorganismos colonizadores se los denominada como comunidades pioneras. Estas

especies pioneras limitan su crecimiento al estar expuestas a factores físicos como el cambio de células epiteliales y las fuerzas de ruptura de la masticación y del flujo salival, factores químicos como restricciones nutricionales o cambios desfavorables del pH. A los seis meses de vida la microbiota experimenta mayores cambios y da lugar a la comunidad clímax la misma que refleja una situación muy dinámica entre el huésped, el ambiente y la microflora. La cavidad bucal de un recién nacido es selectiva y los microorganismos que ingresan en ella no siempre son capaces de establecerse en nichos ecológicos (Bordoni, Escobar & Mercado, 2010; Negroni, 2009; Philip & Martin, 2011).

### **3.1.3 Factores de la cavidad oral que influyen en el crecimiento de microorganismos**

Las bacterias de la boca se encuentran en una relación de equilibrio y están sometidas a la acción de diversos factores bióticos y abióticos que conforman su distribución y organización en el ecosistema oral. Este equilibrio se rompe en los casos de enfermedad bucodental de manera irreversible en caries dental. (Valero, 2015)

Los factores que regulan la composición, el desarrollo, la cantidad, la coexistencia y la distribución de la microbiota oral en los diversos ecosistemas primarios se conocen como determinantes ecológicos. Son de cinco tipos: a) fisicoquímicos; b) de adhesión, agregación, y coagregación; c) nutricionales; d) protectores del hospedador (Negroni, 2009; Philip & Martin, 2011).

### **3.1.3.1 FACTORES FÍSICOQUÍMICOS**

#### **Temperatura**

La temperatura de la cavidad bucal se mantiene en valores de 35 a 36 °C, por lo tanto, esta temperatura resulta óptima para el desarrollo de un amplio espectro de microorganismos, debido a que los mismos presentan un sistema de adaptación al choque térmico, que les permite adaptarse puntualmente a estas fluctuaciones (Valero, 2015; Philip & Martin, 2011).

#### **Potencial de óxidoreducción**

En la boca convive un sinnúmero de bacterias aerobias, anaerobias facultativas y anaerobias estrictas; por lo tanto, se puede justificar que estos microorganismos están adaptados a distintas presiones parciales de oxígeno. Este ambiente especialmente anaerobio viene determinado por dos tipos de factores: a) anatómicos, ya que, por ejemplo las criptas de la lengua, los surcos gingivales, las fisuras y áreas proximales de los dientes, limitan la penetración de oxígeno y b) microbianos, puesto que en muchas especies consumen oxígeno y generan bajo potencial local de óxidoreducción (Valero, 2015; Sevillano & Eraso, 2005).

El nivel de óxido-reducción se expresa usualmente como el potencial redox (Eh), este potencial debe mantenerse en niveles bajos para facilitar el crecimiento y la distribución de anaerobios en la boca (Philip & Martin, 2011).

Por lo antes expuesto, se puede atribuir que las bacterias aerobias estrictas, que son relativamente pocas en la boca, no sobrevivirán en ambientes reducidos de oxígeno,

los anaerobios estrictos no lo harán en condiciones aerobias a diferencia de las bacterias anaerobias facultativas que se desarrollarán tanto en condiciones aerobias como anaerobias, y esta capacidad de adaptación que tiene estas bacterias anaerobias facultativas les hace que sean los más abundantes en la cavidad oral (Sevillano & Eraso, 2005).

## **Humedad**

El agua es un factor importante para las bacterias, y dependen de él para el intercambio de nutrientes, para las reacciones metabólicas y para la eliminación de productos inhibidores de desecho (Sevillano y Eraso, 2013).

## **Concentración de hidrogenoides (pH)**

El PH está regulado por el flujo salival, el bicarbonato y los cambios metabólicos bacterianos, por lo tanto, el pH en la boca en condiciones de salud se mantiene entre 6.5 y 7.5 (Valero, 2015).

“Los valores óptimos del pH para el crecimiento bacteriano son proporcionados en los sitios bañados por la saliva. El paladar tiene un pH medio de 7.34; mientras que el pH medio de la lengua, del piso de la boca y de la mucosa bucal es de 6.8, 6.5 y 6.3 respectivamente”. (Philip & Martin, 2011, p.15)

La producción de ácidos durante los procesos de fermentación de carbohidratos baja el pH a niveles menores de 5 propiciando un medio que favorece al desarrollo y crecimiento de los microorganismos dando lugar al incremento de colonización de especies. (Valero, 2015).

### **3.1.3.2 FACTORES DE ADHESIÓN, AGREGACIÓN Y COAGREGACIÓN**

La cavidad oral es un ecosistema abierto en el que constantemente se está produciendo el ingreso de microorganismos asociados a los alimentos sólidos u líquidos que se ingieren o que son aspirados del ambiente que nos rodea. La adhesión consiste en el fenómeno de unión que se establece entre los microorganismos y los tejidos del hospedador, lo que permite la colonización de estos últimos. La agregación y la coagregación son los procedimientos, que poseen los microbios, de las mismas con diferentes especies relativamente para adherirse entre sí dando origen a la formación de micro colonias o acumulaciones que fortalecerán y estabilizarán la colonización determinada por la adhesión en sentido estricto (Sevillano & Eraso, 2005)

### **3.1.3.3 FACTORES NUTRICIONALES**

Las poblaciones dentro de una comunidad microbiana son dependientes exclusivamente en el hábitat de los nutrientes esenciales para su crecimiento. La microbiota oral obtiene sus nutrientes de tres fuentes distintas: de los tejidos o secreciones del hospedador (fuentes endógenas), de otros microorganismos (fuentes bacterianas) y de la dieta (fuentes exógenas) (Liébana, 2002; Philip & Martin, 2011).

Sevillano y Eraso (2013), menciona la existencia de dos fuentes de nutrición para los microorganismos las mismas que son: fuentes endógenas: La fuente principal de nutrientes endógenos para microorganismos que se encuentran en la mucosa oral, dorso de la lengua o superficies dentales supragingivales es la saliva, la cual contiene aminoácidos, péptidos, proteínas y glicoproteínas que ayudan al crecimiento y desarrollo de las especies bacterianas; fuentes exógenas: generalmente, el aporte

exógeno más importante de la microbiota oral está representado por la sacarosa y tiene además una notable significación ecológica. Gracias a ella, las bacterias sintetizan polisacáridos de reserva tanto intra como extracelulares y su fermentación, producen ácidos desmineralizantes, descienden el pH limitando el desarrollo de los microorganismos sensibles y ayudan a la adhesión y coagregación microbiana.

#### **3.1.3.4 FACTORES PROTECTORES DEL HOSPEDADOR**

Son todos aquellos que de alguna forma limitan, por parte del hospedador, la multiplicación, el establecimiento y la penetración de los microorganismos, contribuyendo al estado de salud de la cavidad oral; entre los mecanismos de defensa que desempeñan un papel esencial en el mantenimiento de la integridad de las superficies orales tenemos: barreras físicas como la integridad de la mucosa y esmalte que evita la penetración de microorganismo o antígenos y las barreras químicas como las mucinas de la saliva que dan lugar a geles hidrofílicos que funcionan como barreras protectoras sobre el epitelio oral (Sevillano & Eraso, 2005; Philip & Martin, 2011).

### **3.2 *STREPTOCOCCUS MUTANS***

#### **3.2.1 Generalidades**

Los *Streptococcus* del grupo *mutans* es una especie cocácea esférica u ovoidea, Gram positivo es decir reaccionan positivamente a la coloración de Gram, que se agrupa en cadenas debido a que los microorganismos permanecen adheridos por una parte de la pared celular, para desarrollarse necesita medios enriquecidos y ambientes de microaerofilia o anaerobiosis, con una tensión de dióxido de carbono al 10%. Su

metabolismo es fermentativo, produciendo abundantes ácidos que descienden mucho el pH de 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas (Seki, Yamashita, Shibata, Torigoe, Tsuda, Maeno; 2006).

Los *Streptococcus* representan un amplio grupo de microorganismos: algunos forman parte de la microbiota normal sin que se haya demostrado su patogenicidad, otros por el contrario se comportan como saprofitos, comensales e incluso patógenos produciendo diversas infecciones en el hombre (Liébana, 2002).

### 3.2.2 Clasificación

Liébana (2002), ha propuesto múltiples criterios para la clasificación de estos microorganismos; sin embargo, desde un punto de vista odontológico partiendo de una visión práctica, se ha dividido en dos grupos:

**a) Streptococcus viridans:** no son serogrupables, ni  $\beta$ -hemolíticos (en su mayoría suelen ser  $\alpha$ -hemolíticos, con un halo verdoso alrededor de las colonias) y difícilmente diferenciables por pruebas fisiológicas convencionales. Los estreptococos viridans son las bacterias más importantes en la cavidad oral; es así, que también se las llama estreptococos orales; actualmente y basándose en criterios fisiológicos, quimiogénéticos y nutricionales se admiten dentro de este los siguientes grupos: mutans, oralis, salivarius, milleri y variantes nutricionales (Hernandez, 2011, pág. 29).

**b) Otros Streptococcus:** Son serogrupables, habitualmente  $\beta$ -hemolíticos y diferenciables en ciertos casos por pruebas fisiológicas convencionales. Son importantes en patología médica, pero tienen escaso interés en la cavidad oral.

#### Componentes del grupo mutans

Recientemente se ha estudiado la distribución de estreptococos cariogénicos, niveles de infección y su asociación con la incidencia de caries, en donde el 80 % de los estreptococos correspondieron al grupo mutans y el 20 % restante correspondió a otros estreptococos (Sánchez & Acosta, 2007).

Es así que el grupo mutans está constituido por las especies *Streptococcus mutans*, *rattus*, *cricetus*, *sobrinus*, *ferus*, *downei* y *macacae*. Pero por el interés que la presente investigación tiene solo se hablará a fondo del *Streptococcus mutans* (Hernandez, 2011, pág. 30).

### **3.2.3 Colonización Inicial por *Streptococcus mutans***

Numerosos estudios han demostrado que el *S. mutans* es el primer microorganismo relacionado al desarrollo inicial de caries dental, por lo tanto, se ha considerado comúnmente que la colonización de la cavidad oral de los niños por *S. mutans* ocurre al producirse la erupción del primer diente, es decir, alrededor de los seis meses de edad. Sin embargo, es lógico pensar que en niños expuestos a factores que facilitan los procesos de transmisión, la colonización se produzca antes de la aparición de los primeros dientes (Negroni, 2009; Martinez & Rodriguez, 2009).

Existen dos factores por las que el *S. mutans* pueda aparecer durante la etapa predental: 1) *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* que son capaces de colonizar superficies mucosas y 2) algunos niños desarrollan lesiones de caries poco después de la erupción dental. Es por ello que numerosas investigaciones afirman que la colonización temprana de la cavidad oral (antes de la erupción dental) por *S. mutans* puede aumentar el riesgo de caries y hacer que su desarrollo se produzca a edades más tempranas (Wan, et al, 2001).

### **3.2.4 Distribución de *Streptococcus mutans* en la cavidad oral.**

El hábitat natural de *S. mutans* es la boca humana. En cavidad oral, las colonias se adhieren muy cerca de la superficie del diente e igualmente se puede recuperar en lesiones cariosas, indica que las superficies retentivas del dorso de la lengua funcionan como un reservorio para una posterior colonización de piezas dentarias, siendo el mayor nicho ecológico con el 52% de la microflora bacteriana presente en la cavidad del niño. Además, expone que los *Streptococcus* inician su colonización en las mucosas y que de cierta manera este microorganismo circula libre en la saliva (Negroni, 2009; Philip & Martin, 2011).

### **3.2.5 Asociación entre *Streptococcus mutans* y caries dental**

*Streptococcus mutans* es el microorganismo relacionado con el proceso cariogénico, desempeña un papel importante en el inicio de la desmineralización, no siempre se aísla antes del desarrollo de las lesiones, además es posible hacerlo en zonas libres de caries. Estudios epidemiológicos demuestran correlación significativa entre los niveles de estas bacterias en la placa y la saliva con la prevalencia e incidencia de caries (Chávez, 2005; Palomer, 2006).

### **3.2.6 Tipificación del *Streptococcus mutans***

Previo a la tipificación de *S. mutans*, es necesario la identificación de la especie mediante pruebas bioquímicas que consisten en test químicos que aplicados al medio biológico provocan características metabólicas propias de cada especie, estas reacciones en *S. mutans* por lo general aparecen en pruebas como: fermentación de

rafinosa, melobiosa e hidrolisis de esculina (Acuña, 2013). Koneman (2008), también atribuye como identificación bioquímica al manitol, sorbitol entre otras. fig.1

CEPA	Esculina	Inulina	Manitol	Rafinosa	Sorbitol
<i>S. sanguis</i> <i>Biotipo 3</i>	-	+	-	-	-
<i>S. mutans</i>	+	+	+	+	+
<i>S. sobrinus</i>	-	+	+	-	-

**Fig. 1:** pruebas bioquímicas para *S. mutans*

**Fuente:** (Koneman, 2005; Pedraza & Hernandez, 2006)

Las colonias ya identificadas son sometidas a tipificación la cual permite esclarecer la clonalidad así como sus patrones de colonización y transmisión. Los métodos de tipificación genotípica, como la robotipificación y la tipificación por AP-PCR, han permitido revelar una heterogeneidad genética entre cada cepa de *S. mutans*. Otro medio es de biotipificación que se analiza de acuerdo al perfil enzimático con el sistema api-ZYM el cual detecta rápidamente y sin dificultad cerca de 19 actividades enzimáticas de *S. mutans* a partir de pequeñas cantidades de inóculo de la bacteria (Gutierrez S. , 2006)

Numerosas investigaciones describen a las células de los *Streptococcus mutans* como cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 0.75 milimicras y su disposición en forma de cadenas, característica propia de este género. En medios de cultivo conteniendo sacarosa, esta bacteria puede producir polisacáridos extracelulares, adquiriendo una apariencia opaca, rugosa, de color blanco, no adherente al medio de cultivo y ocasionalmente rodeada por polímeros de glucano de aspecto húmedo (Seif, 1997; Duque, Pérez, & Hidalgo, 2006).

## **CAPITULO IV**

### **4.1 SALIVA**

#### **4.1.1 Definición**

La saliva es una secreción compleja proveniente de las glándulas salivales mayores en el 93% de su volumen y de las menores en el 7% restante, las cuales se extienden por todas las regiones de la boca excepto en la encía y en la porción anterior del paladar duro. Es estéril cuando sale de las glándulas salivales, pero deja de serlo inmediatamente cuando se mezcla con el fluido crevicular, restos de alimentos, microorganismos y células descamadas de la mucosa oral (Seif, 1997; Tenovuo, 1997).

“El volumen de saliva segregado por una persona varía entre 700 y 800 mL diarios con un promedio de 0,3 mL por minuto” (Negroni, 2009, p. 231). El mayor volumen salival se produce antes, durante y después de las comidas, alcanza su pico máximo alrededor de las 12 del mediodía y disminuye de forma muy considerable por la noche, durante el sueño (Nauntofte, Tenovuo, & Lagerlof, 2003).

Para determinar los niveles de infección causados por *S. mutans* se puede realizar pruebas de laboratorio utilizando la saliva; esta prueba se la realiza en las mañanas, justo después de despertar, antes de cepillarse los dientes e ingerir comidas; esto debido a que en esas horas la actividad microbiana se encuentra en niveles altos con una mayor concentración de *S. mutans* en la saliva (Seif, 1997).

#### **4.1.2 Composición.**

Liebana (1993), sostiene que el 99% de la saliva es agua mientras que el 1% restante está constituido por moléculas orgánicas e inorgánicas.

Entre los componentes orgánicos proteicos de la saliva completa o total se encuentran: albúmina, amilasa,  $\beta$ -glucoronidasa, carbohidrasas, cistatinas, factor de crecimiento epidermal, enterasas, fibronectina, gustinas, histatinas, Inmunoglobulinas A, G y M, kalicleína, lactoferrina, lipasa, deshidrogenasa láctica, lisozima, mucinas, factor de crecimiento nervioso, peptidasas, fosfatasas, proteínas ricas en prolina, ribonucleasas, peroxidasas, componente secretorio, IgA secretora, proteínas del suero, proteínas ricas en tirosina y proteínas unidas a vitaminas; los componentes orgánicos no proteicos son: creatinina, glucosa, lípidos, nitrógeno, ácido siálico, urea y ácido úrico (Sreebny & Yu, 1981)

En cuanto a los componentes inorgánicos, estos están conformados por los siguientes electrolitos: amoníaco, bicarbonato, calcio, cloruro, fluoruro, yodo, magnesio, fosfatos, potasio, sodio, sulfatos, tiocinatos y amortiguadores no específicos (Erejoan, 1986).

#### **4.1.3 Funciones**

La saliva ejerce muchas funciones en la cavidad oral, entre ellas tenemos las siguientes:

**Dilución y eliminación de los azúcares y otros componentes:** Una de las funciones más importantes de la saliva es la eliminación de los microorganismos y de los componentes de la dieta de la boca. Existen estudios que establecen que tras la

ingesta de carbohidratos la concentración de azúcares en la saliva aumenta exponencialmente, primero de una forma muy rápida en los primeros 6 minutos y luego más lentamente proporcional a los cambios en los niveles del flujo salival. Los azúcares de la saliva difunden fácilmente a la placa bacteriana de forma que a los pocos minutos de la ingesta de azúcar la placa ya se encuentra sobresaturada con concentraciones mayores de las que hay en la saliva, existiendo una correlación entre los cambios de pH de la placa y la eliminación de azúcares de la saliva. Estos cambios de pH y su capacidad de recuperación se expresan mediante la curva de Stephan, la recuperación del pH no es la misma en todas las superficies dentales, siendo más dificultosa en las zonas medias de las superficies interproximales por la difícil accesibilidad a ellas de la saliva y la consecuentemente menor dilución y el efecto tampón de los ácidos de la placa (Llena, 2006; Hernández & Aránzazu, 2012; Philip & Martin, 2011).

**Capacidad tampón:** En estado saludable, el pH de la saliva en reposo se mantiene en un estrecho rango entre 6.7 y 7.4. El principal sistema amortiguador presente en la saliva es el bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). La concentración de iones bicarbonato en la saliva en reposo es de aproximadamente 1 mmol/L, y bajo estímulo ésta aumenta a más de 50 mmol/L. Al aumentar la concentración de bicarbonato, también se incrementa el pH y la capacidad amortiguadora de la saliva. El aumento de los niveles de bicarbonato en la saliva, aumentará el pH salival y la capacidad amortiguadora, facilitando la remineralización, sino que ejercerá también efectos ecológicos sobre la flora oral. Específicamente, un mayor pH salival eliminará la tendencia al crecimiento de los microorganismos acidúricos (tolerantes al ácido), en particular los estreptococo mutans cariogénicos y la *Candida albicans* (Laurence & Walsh, 2008).

El fosfato también contribuye a las capacidades amortiguadoras de la saliva, particularmente en situaciones de saliva en reposo. El tampón fosfato, juega un papel fundamental en situaciones de flujo salival bajo, por encima de un pH de 6 la saliva está sobresaturada de fosfato con respecto a la hidroxiapatita, cuando el pH se reduce por debajo del pH crítico (5,5), la hidroxiapatita comienza a disolverse, y los fosfatos liberados tratan de restablecer el equilibrio perdido, lo que dependerá en último término del contenido de iones de fosfato y calcio del medio circundante. Algunas proteínas como las histatinas o la sialina, así como algunos productos alcalinos generados por la actividad metabólica de las bacterias sobre los aminoácidos, péptidos, proteínas y urea también son importantes en el control del pH salival (Hernández & Aránzazu, 2012; Llena, 2006; Philip & Martin, 2011).

**Equilibrio entre la desmineralización y la remineralización:** La lesión de caries se caracteriza por una desmineralización subsuperficial del esmalte, cubierta por una capa bastante bien mineralizada. Los factores que regulan el equilibrio de la hidroxiapatita son el pH y la concentración de iones libres de calcio, fosfato y flúor. El proceso de la caries se inicia por la fermentación de los carbohidratos que realizan las bacterias y la consiguiente producción de ácidos orgánicos que reducen el pH de la saliva y de la placa. En el equilibrio dinámico del proceso de la caries la sobresaturación de la saliva proporciona una barrera a la desmineralización y un equilibrio de la balanza hacia la remineralización, dicho equilibrio se ve favorecido por la presencia del flúor (Hernández & Aránzazu, 2012; Llena, 2006).

**Acción antimicrobiana:** La saliva juega un importante papel en el mantenimiento del equilibrio de los ecosistemas orales, lo cual es fundamental en el control de la caries dental. La función de mantenimiento del balance de la microbiota oral que

ejerce la saliva, se debe a la presencia de algunas proteínas, las cuales son constituyentes esenciales de la película adquirida, favorecen la agregación bacteriana, son fuente de nutrientes para algunas bacterias y ejercen un efecto antimicrobiano gracias a la capacidad de algunas de ellas de modificar el metabolismo bacteriano y la capacidad de adhesión bacteriana a la superficie del diente (Dowd, 1999; Llena, 2006).

Las proteínas más importantes implicadas en el mantenimiento de los ecosistemas orales son: las proteínas ricas en prolina, lisosima, lactoferrina, peroxidasa, aglutininas, e histidina, así como la inmunoglobulina A secretora y las inmunoglobulinas G y M (Dowd, 1999; Llena, 2006).

**Despeje oral:** El término “despeje oral” se refiere al tiempo transcurrido entre la introducción de una sustancia a la cavidad oral y el momento cuando su presencia allí no se puede detectar más. El despeje oral de sustratos y ácidos fermentables se ve altamente afectado por la tasa del flujo salival estimulado. Esta influencia depende de la ubicación, de tal manera que el despeje más rápido ocurre en sitios inmediatamente adyacentes a los canales de las glándulas salivales mayores. La evaluación del despeje de glucosa en diferentes sitios de prueba, como por ejemplo el piso anterior de la boca (lingual a 31) y el vestíbulo maxilar (labial del diente 11), durante periodos de medición variados, revelará que el despeje lingual a 31 ocurre en la mayoría de los individuos dentro de los 30 segundos. En contraste, el sitio labial maxilar cercano a la línea media, requiere típicamente de 20 minutos para despejar la glucosa por completo (Walsh, 2008).

## **CAPITULO V**

### **5.1 MEDIOS DE CONTAGIO DE *STREPTOCOCCUS MUTANS***

#### **5.1.1 Trasmisión salival del *Streptococcus mutans***

La caries dental es una enfermedad dental transmisible en la cual el *S. mutans* juega un papel principal para el inicio de este mal. La evidencia indica que una forma importante de transmisión de *S. mutans* durante los primeros años de vida es la que se produce de madre a hijo por contacto directo (transmisión vertical), mientras que el contacto con otros familiares, incluidos el padre, los hermanos y demás posibles cuidadores constituye la vía de transmisión horizontal (Ojeda, Oviedo & Salas; 2013; Gutierrez, 2006).

No existe uniformidad en relación con la edad media en que se considera que los niños adquieren *S. mutans*. La mayoría de los estudios sugieren que los niños se infectan antes del primer año de edad coincidiendo con el momento de erupción de los primeros dientes; sin embargo, todos coinciden que la velocidad con que se inicie la caries es proporcional a la colonización temprana en la cavidad bucal del diente (Bod, Catala, Garcia, & Mendoza, 2004).

#### **5.1.2 Transmisión vertical**

La transmisión de microorganismos desde la saliva de la madre al niño, fue sugerida por primera vez en 1975 por Berkowitz y Jordan, quienes usaron el método de tipificación de la mutacina para demostrar que los microorganismos de las muestras tomadas desde la boca de los niños, eran idénticos a los encontrados en la boca de sus madres. En 1985, Berkowitz y colaboradores trabajaron comparando la producción de bacteriocina por *Streptococcus mutans*, aislado de la boca de 20 pares de madres e

hijos y concluyeron que la correspondencia de los microorganismos era estadísticamente significativa (Palomer, 2006; Harris & Garcia, 2005; Seif, 1997).

La mayor fuente externa de *S. mutans* es su propia madre. La certeza de este concepto viene de varios estudios clínicos, los cuales han demostrado que las cepas de *S. mutans* aisladas de las madres y de sus hijos exhiben idénticos o similares perfiles de tipificación de bacteriocina, así como idénticos patrones de ADN plasmático o cromosómico en aproximadamente el 71% de las parejas madre-hijo (Velásquez & Podestá, 2008; Philip & Martin, 2011).

### **5.1.3 Transmisión horizontal**

“La transmisión horizontal es la transmisión de microorganismos entre los miembros de una familia, incluidos el padre, los hermanos y demás posibles cuidadores. Esta ocurre mediante actividades de intercambio de saliva” (Velásquez & Podestá, 2008, pág. 23).

El padre es considerado dentro de la vía horizontal, debido a que la mayor posibilidad de transmisión es desde la madre, debido a que incluye el paso transplacentario y en la leche materna de anticuerpos contra *S. mutans*, que originan una similitud importante en la inmunidad de las mucosas orales entre madres e hijos, dándoles por lo tanto mayor ventaja en la transmisión a los microorganismos que colonizan a la madre. Se han realizado muchos estudios en niños y padres para determinar los niveles orales de *S. mutans* y el desarrollo de lesiones de caries los resultados concluían en que los niveles de dichos microorganismos encontrados en las muestras se asociaban significativamente con el desarrollo de lesiones de caries. Esto indicaría que el *S. mutans* también puede ser transmitido horizontalmente por medio del padre (Velásquez & Podestá, 2008; Mattos, Li, Caufield, Duncan, & Smith, 2001).

## CAPITULO VI

### 6.1 PRUEBAS DE LABORATORIO

#### 6.1.1 Medios de cultivo

“Los medios de cultivo son sustancias nutritivas que permiten obtener en el laboratorio, es decir, in vitro, el desarrollo de los microorganismos” (Negroni, 2009, p.50). Cultivar un microorganismo en un medio consiste en brindar artificialmente las condiciones óptimas para el crecimiento y desarrollo de los mismos. En general hay muchas dificultades técnicas para obtener muestras representativas de diferentes sitios orales y para aislar, cultivar y contar los microorganismos. Sin embargo, muchas de las especies de estreptococos orales pueden aislarse de varios sitios usando medios selectivos entre ellos son:

**Agar sangre de carnero:** crecen cepas alfa hemolíticos (destruyen parcialmente los eritrocitos), beta hemolíticos (destruyen totalmente los eritrocitos) y gama hemolíticos (no tienen actividad destructora sobre los eritrocitos).

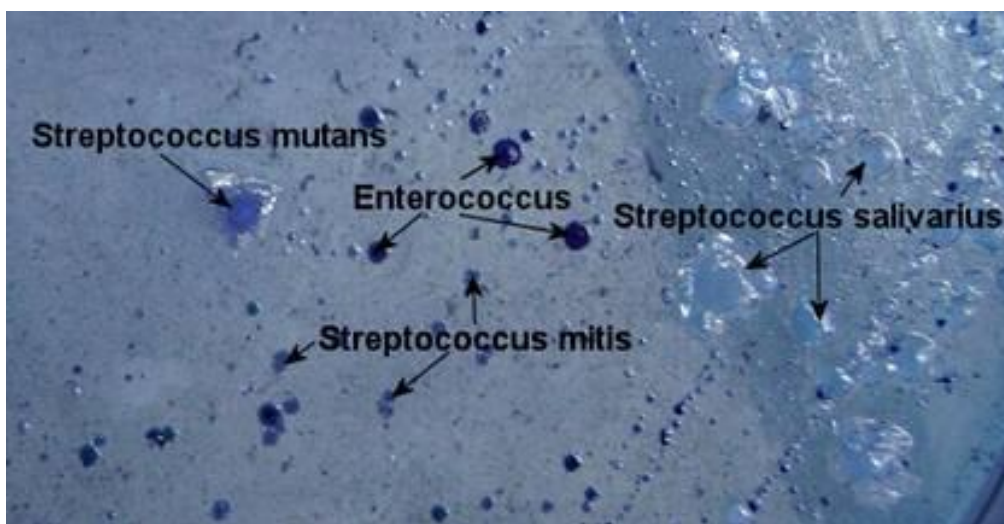
**Agar mitis-salivarius (MSA)** que contiene un 5 por 100 de sacarosa y como sustancias inhibidoras telurito potásico, azul tripán y cristal violeta, este medio es poco selectivo.

**Mitis-salivarius-bacitracina (MBS)** contiene agar mitis-salivarius al que se le añade 0.2 u/mL de bacitracina y 15 gramos más de sacarosa por 100. Este medio es muy selectivo

**Agar con tripticasa,** extracto de levadura, cisteína, sacarosa y bacitracina (TYCSB) se ha desarrollado debido a que no es inhibidor del serotipo *Streptococcus criceteus*

como en el caso de los medios de cultivo anteriores los cuales inhiben completamente al microorganismo.

Las colonias en agar mitis-salivarius MSA y mitis-salivarius-bacitracina MSB aparecen elevadas, convexas, onduladas, opacas, de color azul oscuro, con márgenes irregulares, superficie granular, más o menos adheridas, y cuando producen polisacáridos extracelulares aparece una burbuja de color brillante rodeándolas. Las colonias en agar con tripticasa, extracto de levadura, cisteína, sacarosa y bacitracina TYCSB pueden variar mucho y a menudo tienen dificultad de reconocimiento (Ojeda, Oviedo, & Salas, 2013; Liébana, 2002).



**Fig. 2:** Morfología de *S. mutans* en Agar Mitis Salivarius.

**Fuente:** (Reynols, 2012)

Usualmente, la placa de agar se cultiva en una atmósfera del 95% de nitrógeno y 5% de dióxido de carbono a 37°C por 1 o 2 días seguida de una incubación en aire por 1 o 2 días. Además de la morfología característica de las colonias, los estreptococos orales pueden diferenciarse por su habilidad para fermentar ciertos azúcares (especialmente

manitol y sorbitol) y por adherirse a superficies lisas en presencia de sacarosa; por tanto, el medio más común empleado para el aislamiento del *S. mutans* en el laboratorio es el Agar Mitis Salivarius suplementado con sacarosa y bacitracina el cual permite la diferenciación de especies a través de la morfología de las colonias (Ojeda et al, 2013; Seif, 1997).

### **6.1.2 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)**

La Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es una técnica que se utiliza comúnmente en los laboratorios de investigación médicos y biológicos para amplificar (crear copias múltiples de) el ADN (Saunders et al., 2001). Gracias a la ingeniería genética, esta técnica puede tener dos objetivos: la detección de microorganismos de forma rápida y eficaz, así como el estudio de variaciones en los genes humanos que pueden condicionar la aparición de enfermedades. (Ojeda, Oviedo, & Salas, 2013)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se fundamentan en: la amplificación de genes o secuencias de ADN polimórficas y la separación electroforética de los productos de amplificación. Un ensayo típico de PCR requiere aproximadamente de 3 horas para completar 30 ciclos, donde cada ciclo consiste de una fase de desnaturalización, en donde la doble hebra de ADN es fundida en hebras únicas; una fase de alineación, en donde los primers se unen a las secuencias blanco en las hebras separadas; y una fase de extensión, en donde la síntesis de ADN procede de los primers a partir de cada hebra de la plantilla de ADN, generando dos nuevas copias de la doble hebra de la plantilla original. Después de cada 30 ciclos, una sola copia inicial de la

plantilla de ADN teóricamente puede ser amplificado a 1 billón de copias (Saunders, 2001).

En la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Primers Arbitrarios (AP-PCR) la discriminación es buena y puede correlacionarse con otras técnicas de genotipificación. El poder discriminatorio es variable de acuerdo al número y secuencia de los primers arbitrarios y a las condiciones de amplificación. Aunque requiere de varios factores técnicos para ser estrictamente estandarizado para una reproducibilidad óptima (Tenover, 1995).

La amplificación al azar de ADN polimórfico con iniciadores arbitrarios (AP-PCR) se utilizan uno o varios cebadores con secuencias de nucleótidos aleatorias y de corta longitud (8-12 nucleótidos) que hibridan con regiones inespecíficas del genoma en condiciones de baja estringencia (temperatura de anillamiento a 36 - 45 °C y > 2 mM MgCl<sub>2</sub>). Las ventajas más interesantes de la AP-PCR son su rapidez, flexibilidad, fácil interpretación y relativamente bajo coste (Fernandez, 2004).

En la actualidad es considerado el método más adecuado para una tipificación comparativa rápida (Linossier, Vargas, Zillmann, Arriagada & Rojas, 2003; Costa, Amoroso, Marin, & Ávila, 2007).

## 5. MATERIALES Y METODOS.

El estudio realizado es de tipo experimental-comparativo, debido a que describe la relación de *S. mutans* presentes en la cavidad oral de madres e hijos mediante el análisis molecular de ADN por AP-PCR.

Es un estudio transversal debido a que es realizado en el período de tiempo determinado, pre establecido y controlado siguiendo el cronograma.

También es de tipo comparativo debido a que se eligen dos poblaciones en este caso el de madre e hijo y se comprobó si existe el mismo nivel de *S. mutans* tanto en la madre como en el hijo.

La población de estudio estuvo conformada por binomios madre-hijo que son registrados en el área de vacunación del Hospital Universitario de Motupe. El tamaño de muestra fue de 40 binomios madre-hijo; esta muestra fue elegida mediante un muestro no probabilístico ajustándose a los criterios de inclusión tales como: niños de 0 a 48 meses con estado de salud general bueno al igual que su madre, niños que conviven todos los días con su madre, madre e hijo con buena colaboración, madres que decidan participar en el estudio y cultivos positivos de *S. mutans*; a su vez a criterios de exclusión como niños y madres que estén bajo terapia antibiótica o estén usando fármacos que alteren el flujo o composición salival (incluyendo uso de flúor por lo menos una hora antes de la toma de muestra), niños que tengan enfermedades sistémicas que alteren su flujo salival y cultivos negativos de *S. mutans*.

## **Procedimiento.**

Se inició con una charla a los padres o tutores para informarles acerca de la importancia de este tema de investigación así como la prevención que se recomiendan practicar para evitar este contagio (fig. 3). Seguidamente se procedió a la firma del Consentimiento Informado (Anexo N° 7) y luego, se tomaron los datos generales y clínicos del infante y su respectiva madre (Anexo N° 4). (Fig. 3)

## **TOMA DE MUESTRA**

La muestra quedo conformada por niños de 0 a 48 meses de edad que comparten diariamente con sus madres respectivas. La muestra se tomó una hora antes de la ingesta de alimentos y limpieza de la boca tanto en madre como en hijo.

Se colocó el hisopo previamente estéril por 20 segundos debajo de la lengua del niño sin estimular la saliva, el mismo procedimiento se realizó a la madre y el hisopo se colocó a nivel de los molares inferiores, luego se introdujo el hisopo en el tercio superior del medio Stuart, se tapó el tubo e inmediatamente se rotulo, las muestras fueron llevadas al laboratorio en un contenedor con hielo (Arellano, 2009). (Fig. 5 - 10)

## **ANALISIS MICROBIOLOGICO-BIOQUIMICO**

Las muestras se sembraron en Agar Mitis Salivarius (DIPCO) con el 1% de telurito de potasio (DIPCO), se incubaron a 37° C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas para el crecimiento bacteriano de *S. mutans* (Acuña, 2013). (Fig.11 - 14). Se procedió al análisis morfológico macroscópico de las colonias para luego detectar por microscopía óptica el tipo de bacteria mediante tinción Gram (Fig.15 - 17); la prueba

bioquímica consistió en tomar con una asa calibrada 2 a 3 colonias presuntivas la cual se suspendió en 500 µl de Esculina (DIPCO), los tubos fueron incubados por 24 h a 37°C; pasado este tiempo, se agregó tres gotitas de citrato férrico amoniacal dando una coloración negra en aquellos cultivos positivos de *S. mutans*. (Acuña, 2013) (Fig.18 - 20).

## **EXTRACCIÓN DE ADN**

Para mantener integras las colonias puras se colocaron en caldo de infusión cerebro-corazón (DIPCO) (Fig.21); las colonias fueron cultivadas nuevamente en el medio Agar Mitis Salivarius con suplemento para a partir de este cultivo extraer el ADN, con una asa metálica estéril se tomaron de 3 a 4 colonias de cada cultivo y se suspendieron individualmente en cada tubo eppendorf previamente rotulado (PROMEGA) que contenían 100 µl de agua estéril; añadimos 455 µl de reactivo de extracción de ADN mezclamos por vortex y llevamos al baño maría (MEMMERT) a 80°C por 20 minutos, colocamos esta suspensión en una columna (PROMEGA) y centrifugamos a 6.082 xg por minuto, desechamos sobredonante y colocamos en la columna 500 µL de Buffer de lavado (PROMEGA) y centrifugamos a 6.082 xg por 1 minuto, se desechó el sobredonante y se colocó en la columna nuevamente 500 µL de Buffer de lavado con un centrifugado de 16.060 xg por 4 minutos; se desechó el sobredonante y se cambió el filtro en un tubo eppendorf previamente rotulado, se colocó 100 µL de Buffer de Elución (PROMEGA) y centrifugamos a 6.082 xg por 1 minuto; por último se cuantifico la concentración y calidad de ADN en el equipo NANODROP 2000 y se escogió solo aquellas muestras con una concentración de ADN igual o mayor a 50 ng/µL. (Fig.22 - 41).

## AMPLIFICACIÓN

Para la amplificación se utilizaron los cebadores OPA-02 (5'-TGCCGAGCTG-3) y OPA-05 (5'-AGGGGTCTTG-3) (Tabchoury; Sousa; Arthur; Mattos-Graner; Del Bel Cury; Cury, 2008). Para OPA- 02 se realizó la mezcla de la reacción con un volumen final de 50  $\mu$ L, y las concentraciones finales de cada componente fueron: 19,75  $\mu$ L de agua nuclear-free, 1X de Go taq Green Master Mix (Invitrogen), 1 $\mu$ M de primer (Invitrogen), y 3  $\mu$ L de DNA. Se realizó 13 reacciones de cada primer, 12 de cada muestra y 1 de control. Para OPA-05 se realizó la mezcla de la reacción con un volumen final de 50  $\mu$ L, y las concentraciones finales de cada componente fueron: 17,5  $\mu$ L de agua nuclear-free, 5 X de Go taq Flexi DNA (Invitrogen), 1 $\mu$ M de primer (Invitrogen), 7  $\mu$ M de  $MgCl_2$  (Invitrogen), DNTPs 0,50  $\mu$ M, Taq Polimerasa 0,25  $\mu$ M (Invitrogen) y 2  $\mu$ L de DNA. Se realizó 13 reacciones de cada primer, 12 de cada muestra y 1 de control (Saarela, Hannula, Matto, Asikainen, & Alaluusua, 1996). (fig. 42-48)

Las condiciones para amplificación (Tabchoury, y otros, 2008) son:

- OPA 02: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 2 min, seguido de 45 ciclos de 94 ° C durante 30 s (desnaturalización), 36°C durante 30 s (alineamiento) y 72°C durante 1 min (extensión) y una extensión final a 72 ° C para 5 minutos.
- OPA 05: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos de 95°C durante 1 min (desnaturalización), 36°C durante 2 minutos (hibridación) y 72 ° C durante 2 min (extensión) y una extensión final a 72 ° C por 5 min (Fig. 49)

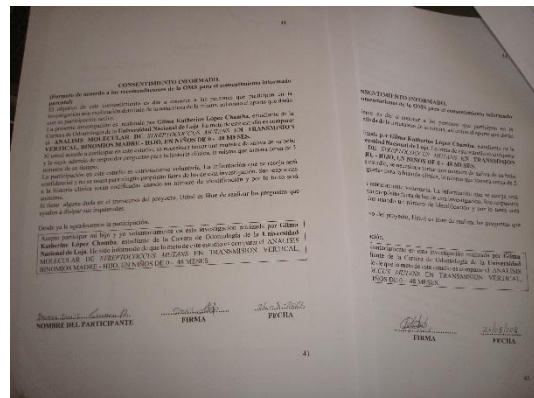
## ELECTROFORESIS

Los amplicones fueron sometidos a pruebas de electroforesis en gel de agarosa al 1,4 % y Buffer TAE al 1X, los geles fueron teñidos con 5 µL de SYBR Safe - DNA Gel Stain (INVITROGEN); fueron sometidos bajo luz UV por 30 minutos a 80 V y visualizados con un transiluminador de UV (LABNET). El marcador de peso molecular utilizado fue el 1kbp (INVITROGEN). (Fig.50 – 55)

A cada banda amplificada se le asignó el número 1 cuando está presente y 0 cuando está ausente el genotipo de *S. mutans* en binomios madre-hijo. Se evaluó según los patrones seguidos en la banda de amplificación mediante electroforéticos. Las cepas se consideraron pertenecientes en genotipo tanto madre como hijo cuando hubo una homología igual o superior al 50% (Carletto, González, & Cornejo, 2008)



**Fig. 3:** Charla a las madres  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 4:** Firma de consentimiento informado  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 5:** Recolección de muestras  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 6:** Recolección de muestras  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 7:** Recolección de muestras

**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 8:** Recolección de muestras

**Fuente:** (López, 2016)



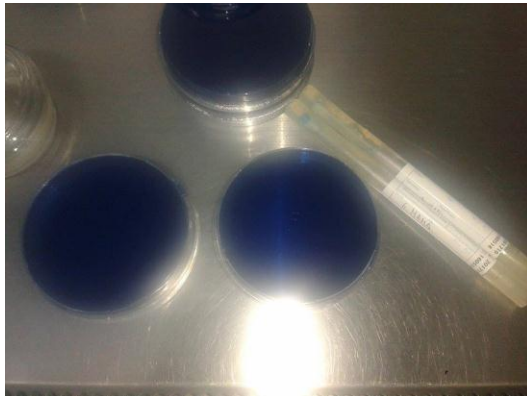
**Fig. 9:** Recolección de muestras

**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 10:** Recolección de muestras

**Fuente:** (López, 2016)



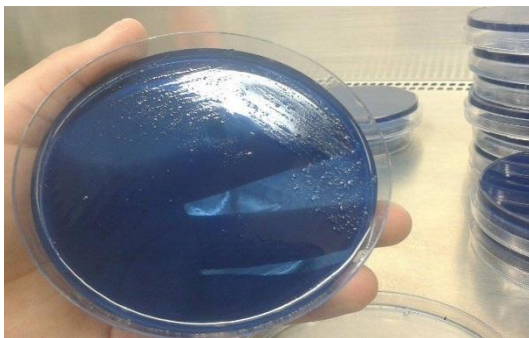
**Fig. 11:** Rotulación y transporte de muestras al laboratorio

**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 12:** Siembra de la muestra

**Fuente:** (López, 2016)



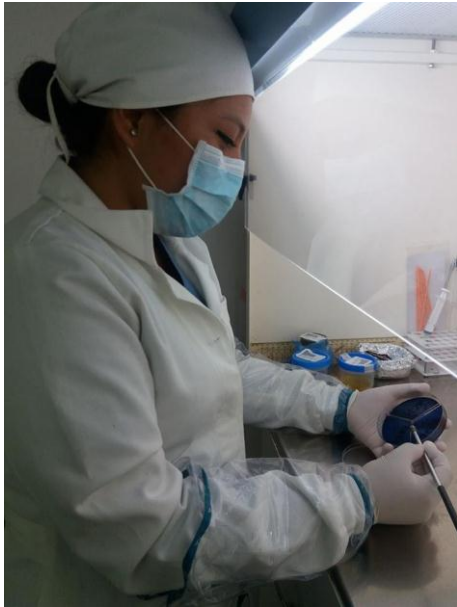
**Fig. 13:** Siembra de la muestra

**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 14:** Incubadora

**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 15:** Reconocimiento de colonias  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 16:** Tinción Gram  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 17:** Vista de colonias en el microscopio  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 18:** Toma de una colonia presuntiva para pruebas bioquímicas  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 19:** Pruebas Bioquímicas  
**Fuente:** (López, 2016)



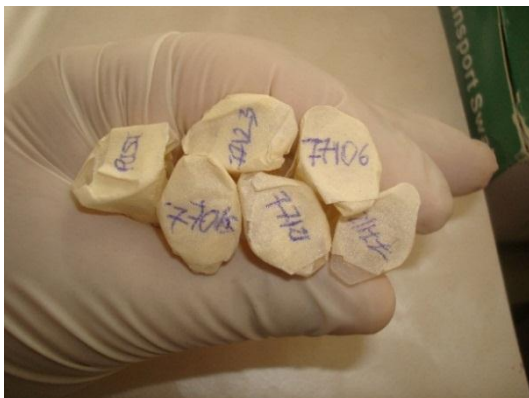
**Fig. 20:** Pruebas Bioquímicas de Esculina  
**Fuente:** (López, 2016)



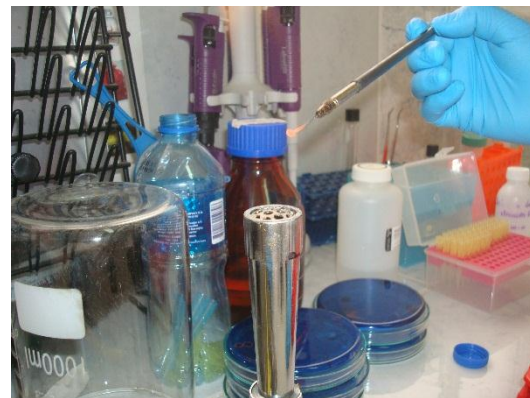
**Fig. 21:** Muestras positivas en caldo cerebro-corazón  
**Fuente:** (López, 2016)



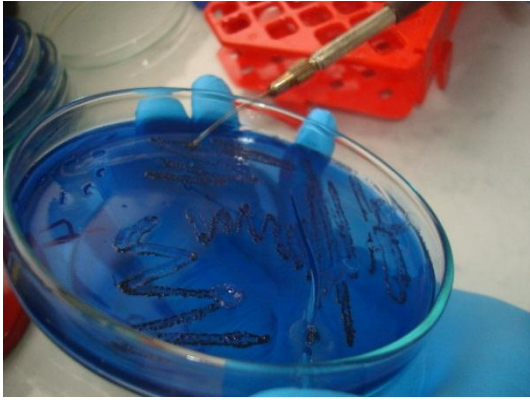
**Fig. 22:** Toma de muestras a madres cuyos niños dieron *S. mutans* positivo  
**Fuente:** (López, 2016)



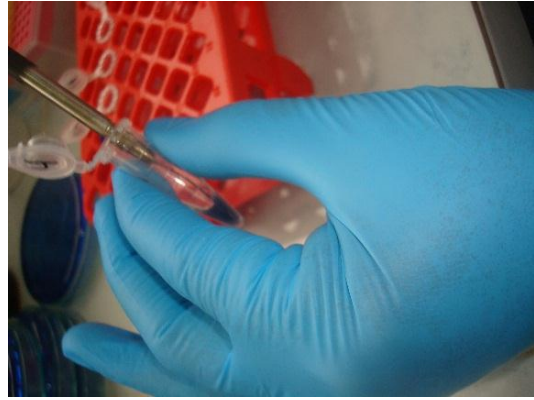
**Fig. 23:** Muestras rotuladas y colocadas en tubos de caldo cerebro-corazón  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 24:** Asa metálica estéril  
**Fuente:** (López, 2016)



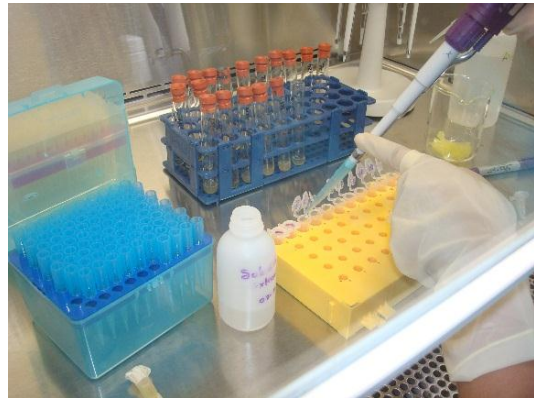
**Fig. 25:** Toma de colonias de *S. mutans*  
**Fuente:** (López, 2016)



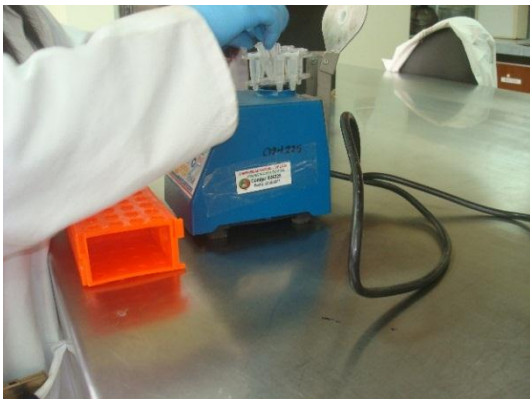
**Fig. 26:** Colonias colocadas en tubos eppendorf con agua destilada  
**Fuente:** (López, 2016 )



**Fig. 27:** Equipo UV  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 28:** Solución de extracción de ADN en cada tubo que contiene las colonias.  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 29:** Mezcla de la solución  
**Fuente:** (López, 2016)



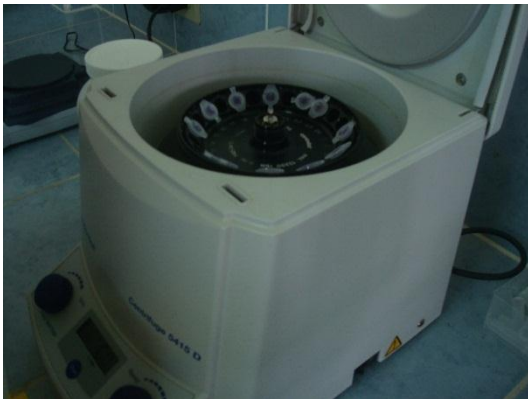
**Fig. 30:** Incubadora a 80°C por 20 minutos  
**Fuente:** (López, 2016)



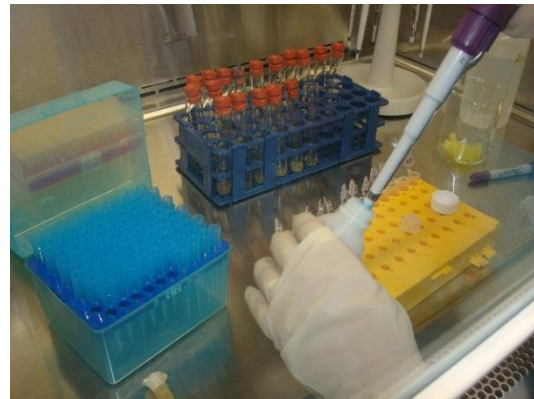
**Fig. 31:** Incubadora a 80°C por 20 minutos  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 32:** Se vertió la solución en columnas con filtros para extracción de ADN  
**Fuente:** (López, 2016)



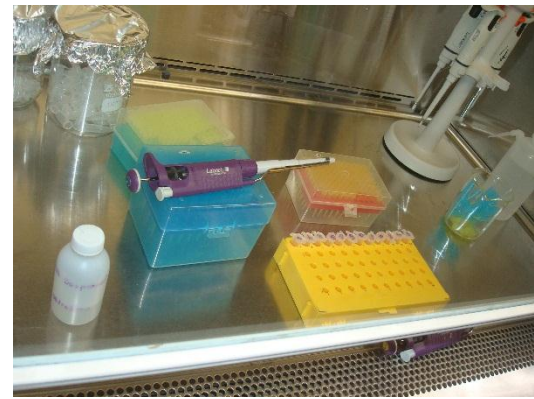
**Fig. 33:** Centrifugadora a 6.082 xg por minuto  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 34:** Añadimos Wash en cada filtro con tubo  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 35:** Centrifugadora a 6.082 xg por minuto  
**Fuente:** (López, 2016)

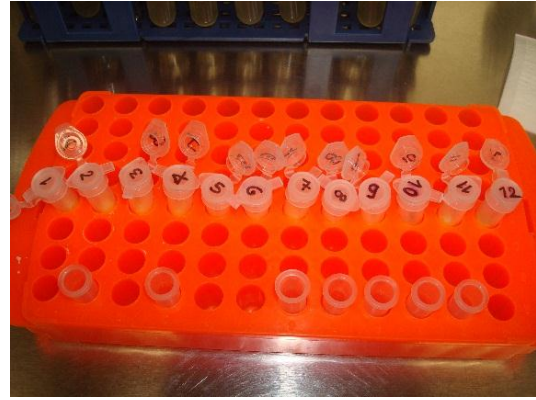


**Fig. 36:** Añadimos Wash en un nuevo tubo  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 37:** Centrifugadora a 16.060 xg por 4 minutos

**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 38:** Cambio del filtro a un tubo eppendorf

**Fuente:** (López, 2016)



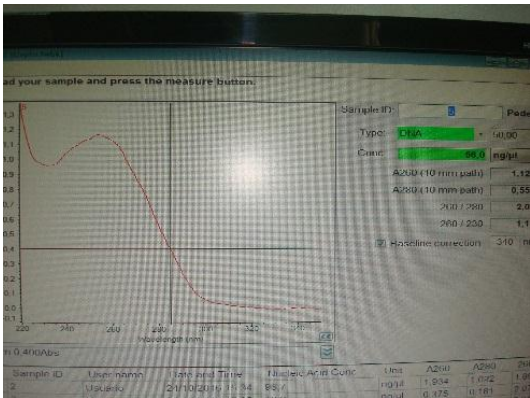
**Fig. 39:** Solución de tampón Buffer

**Fuente:** (López, 2016)



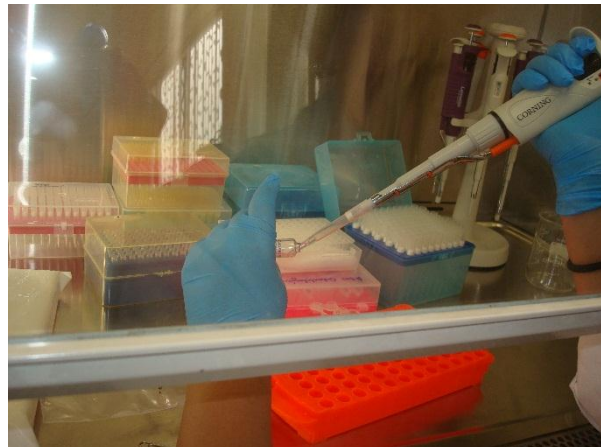
**Fig. 40:** Centrifugadora a 6.082 xg por minuto

**Fuente:** (López, 2016)



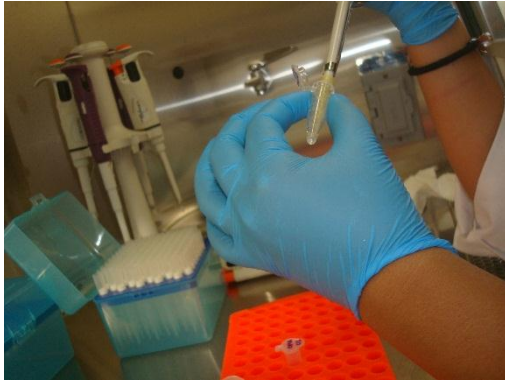
**Fig. 41:** Calidad de ADN en el programa NUCLEIC ACID

**Fuente:** (López, 2016)

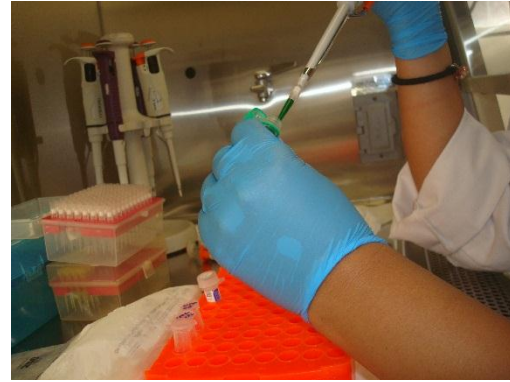


**Fig. 42:** Suspensión de primers con agua de biología molecular

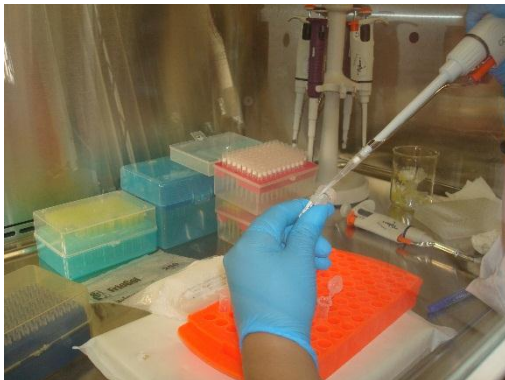
**Fuente:** (López, 2016)



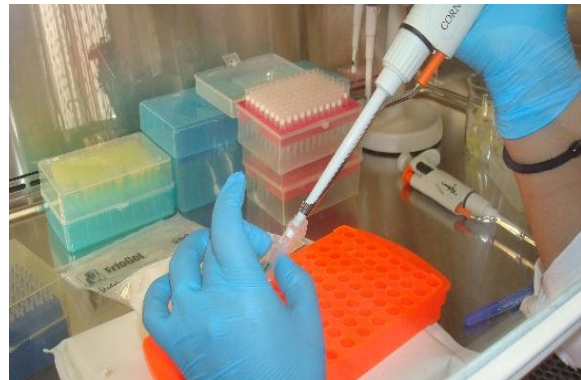
**Fig. 43:** Solucion de trabajo de primers  
**Fuente:** (López, 2016)



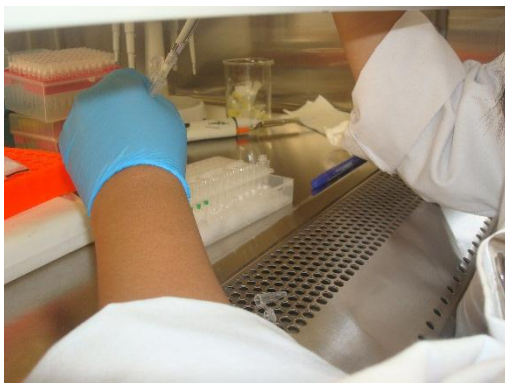
**Fig. 44:** Go taq – DNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Taq Polimerasa  
**Fuente:** (López, 2016)



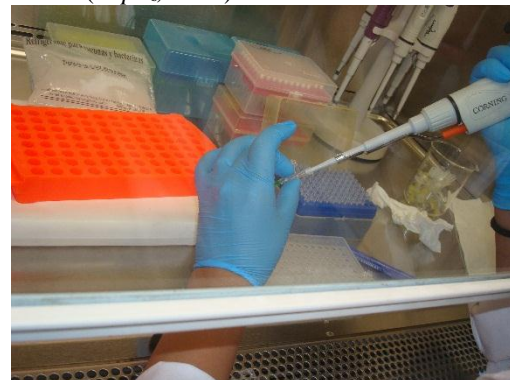
**Fig. 45:** agua  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 46:** Se mezcla y se resuspende  
**Fuente:** (López, 2016)



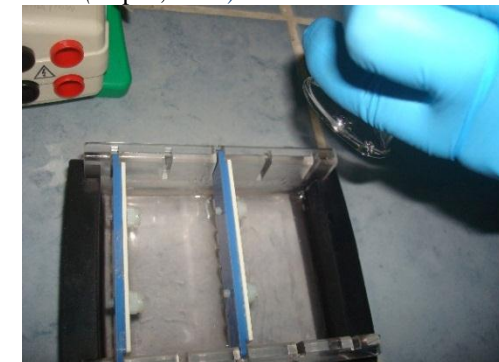
**Fig. 47:** 48  $\mu$ L en cada tubo para PCR  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 48:** 2  $\mu$ L de ADN template para cada primer  
**Fuente:** (López, 2016)



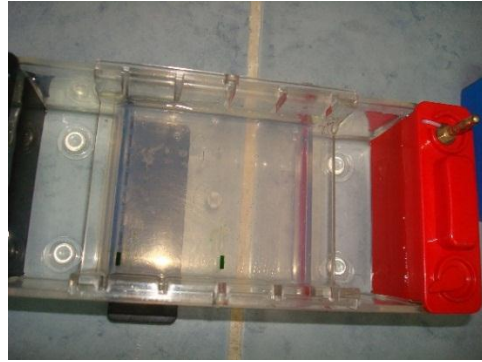
**Fig. 49:** Amplificación  
**Fuente:** (López, 2016)



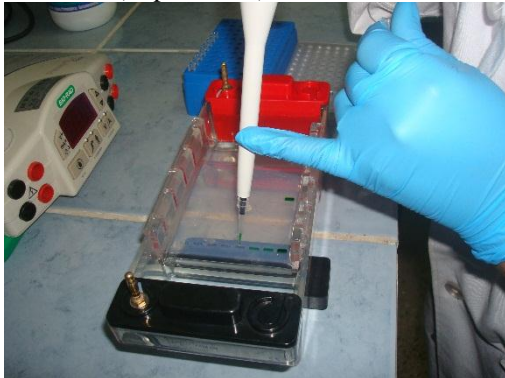
**Fig. 50:** Gel de agarosa  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 51:** SYBR safe  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 52:** Marcador de peso molecular 1kbp **Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 53:** Amplicones  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 54:** Electroforesis  
**Fuente:** (López, 2016)



**Fig. 55:** Transiluminador UV  
**Fuente:** (López, 2016)

## **6. RESULTADOS**

El análisis de resultados partió de la elaboración de una tabla de vaciado de datos en Microsoft Excel 2010

### **ASPECTOS ÉTICOS**

Debido a que los participantes eran menores de edad se procedió a elaborar un consentimiento informado a sus representantes legales para que lean detalladamente el procedimiento que se iba a llevar a cabo obteniendo su respectiva autorización.

## 1. Muestras obtenidas de binomios por género y edad según el niño

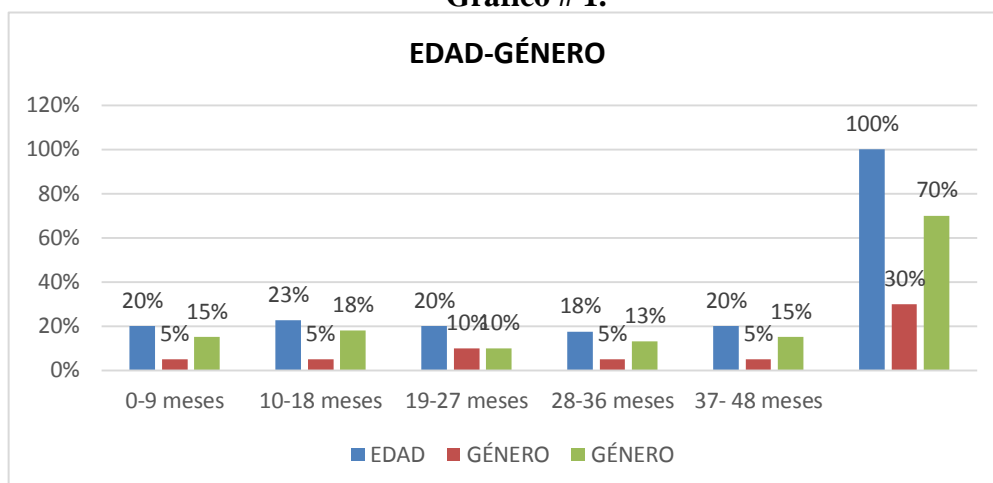
**Tabla # 1. Total de muestras de niños por género y edad**

EDAD			GÉNERO			
RANGO	FRECUENCIA	%	FEMENINO	%	MASCULINO	%
0-9 meses	8	20%	2	5%	6	15%
10-18 meses	9	23%	2	5%	7	18%
19-27 meses	8	20%	4	10%	4	10%
28-36 meses	7	18%	2	5%	5	13%
37- 48 meses	8	20%	2	5%	6	15%
<b>TOTAL</b>	<b>40</b>	<b>100%</b>	<b>12</b>	<b>30%</b>	<b>28</b>	<b>70%</b>

**Fuente:** Tomado de Ficha de Recolección de Datos.

**Autor:** Gilma Katherine López Chamba

**Grafico # 1.**



**Fuente:** Tomado de Ficha de Recolección de Datos.

**Autor:** Gilma Katherine López Chamba

## Análisis e Interpretación

Para poder analizar de una forma justa a cada binomio en rango de edad, se hace conocimiento en esta tabla que fueron recogidos 8 casos de cada rango de edad en excepción del rango de 10 a 18 meses con nueve casos y en el rango de edad de 28-36 meses con 7 casos dando un total de 40 casos estudiados como el 100%; en la edad la tabla refleja que las muestras obtenidas son mayormente del género masculino, determinando así el total de todas las muestras obtenidas en niños.

## 2. Cultivos de *S. mutans* analizados con pruebas bioquímicas en binomios madre-hijo

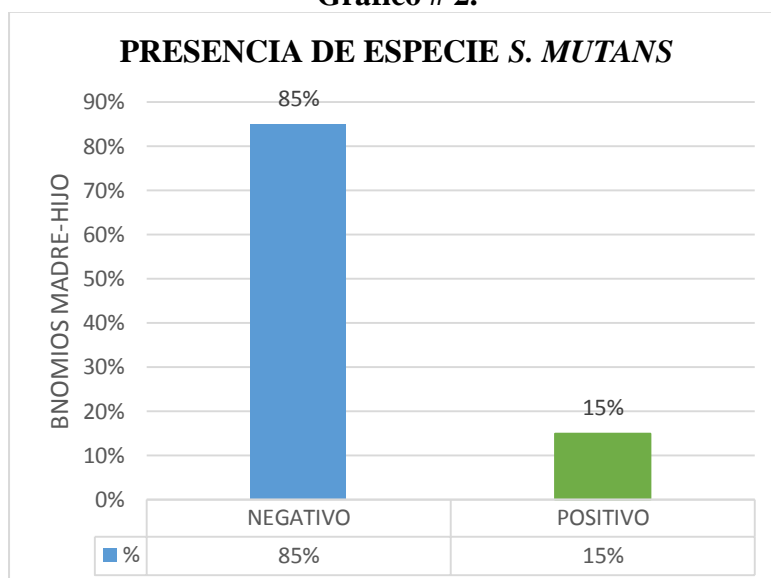
**Tabla # 2. Cultivos positivos de especie *S. mutans***

PRESENCIA <i>S. MUTANS</i> EN HIJOS		
EXAMEN MICROBIOLOGICO	FRECUENCIA	%
NEGATIVO	34	85%
POSITIVO	6	15%
TOTAL	40	100%

**Fuente:** Tomado de Ficha de Recolección de Datos.

**Autor:** Gilma Katherine López Chamba

**Grafico # 2.**



**Fuente:** Tomado de Ficha de Recolección de Datos.

**Autor:** Gilma Katherine López Chamba

### Análisis e Interpretación

Luego de las muestras recogidas de los niños de 0 a 48 meses con sus respectivas madres, se determinó por medio de pruebas bioquímicas específicas para la especie *S. mutans* que un 85% no presenta este microorganismo; mientras que solo un 15% de binomios estudiados si presentaron *S. mutans* en su saliva, concluyendo que existe muy pocos binomios positivos comprobados por medio de estudios microbiológicos - bioquímicos.

### 3. Muestras positivas de especie *S. mutans* por edades y género en niños

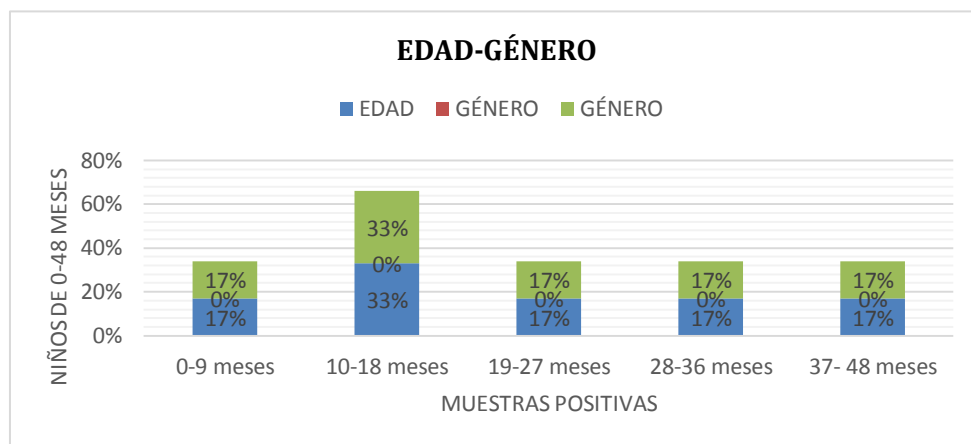
**Tabla # 3. Presencia de especie *S. mutans* por edades y género**

EDAD			GÉNERO			
RANGO	FRECUENCIA	%	FEMENINO	%	MASCULINO	%
0-9 meses	1	17%	0	0%	1	17%
10-18 meses	2	33%	0	0%	2	33%
19-27 meses	1	17%	0	0%	1	17%
28-36 meses	1	17%	0	0%	1	17%
37- 48 meses	1	17%	0	0%	1	17%
TOTAL	6	100%	0	0%	6	100%

**Fuente:** Tomado de Ficha de Recolección de Datos.

**Autor:** Gilma Katherine López Chamba

**Grafico # 3.**



**Fuente:** Tomado de Ficha de Recolección de Datos.

**Autor:** Gilma Katherine López Chamba

### Análisis e Interpretación

Luego de las muestras recogidas de los niños de 0 - 48 meses de edad, se determinó que el grupo con mayor presencia de *S. mutans* fue de 10-18 meses con dos casos de 6 estudiados, con un porcentaje de 33 %; con un 17% se encuentran los rangos de edad de 0-9 meses, 19-27 meses, 28-36 meses y 37 - 48 meses que tiene menor presencia de *S. mutans*. Además se determinó que en todos los rangos de edad hay un predominio del género masculino en poseer este microorganismo.

#### 4. Relación entre el nivel de especie *S. mutans* de la madre y su hijo independiente del grupo etario. (Pruebas microbiológicas)

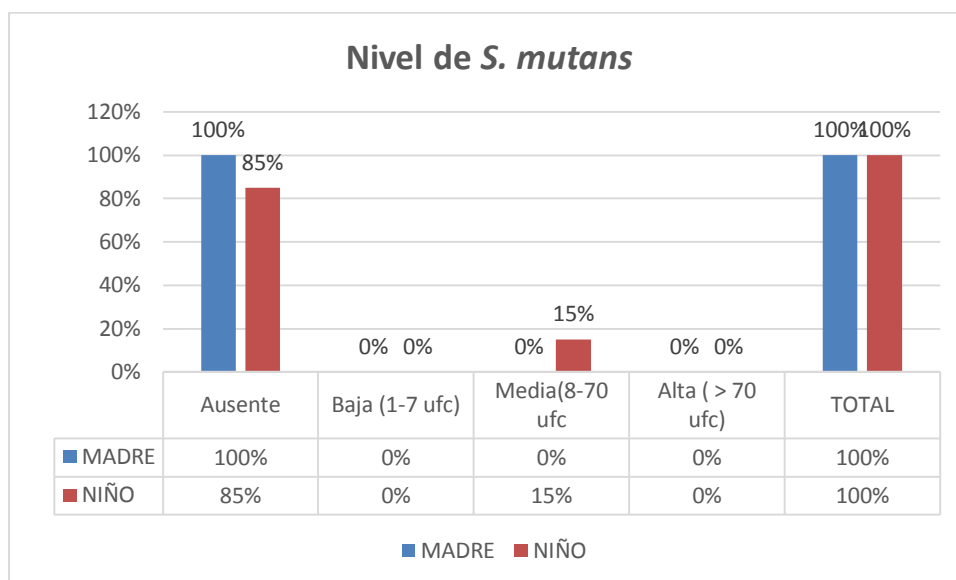
**Tabla # 4. Relación entre el nivel de especie *S. mutans* en binomios madre-hijo**

NIVELES	MADRE		NIÑO	
	Frecuencia	%	Frecuencia	%
Ausente	40	100%	34	85%
Baja (1-7 ufc)	*	0	0	0%
Media(8-70 ufc)	*	0	6	15%
Alta ( > 70 ufc)	*	0	0	0%
TOTAL	40	100%	40	100%

**Fuente:** Tomado de Ficha de Recolección de Datos.

**Autor:** Gilma Katherine López Chamba

**Grafico # 4**



**Fuente:** Tomado de Ficha de Recolección de Datos.

**Autor:** Gilma Katherine López Chamba

#### **Análisis e interpretación:**

Al analizar el nivel del *S. mutans* en los binomios independientemente del rango de edad, se determinó que el 100% de casos revisados en madres fue de ausencia de *S. mutans*; en los niños hubo ausencia con el 85 %; sin embargo un 15 % hubo presencia de *S. mutans* en nivel medio.

## 5. Perfiles de especie *S. mutans* con cada primer OPA-02 y OPA-05

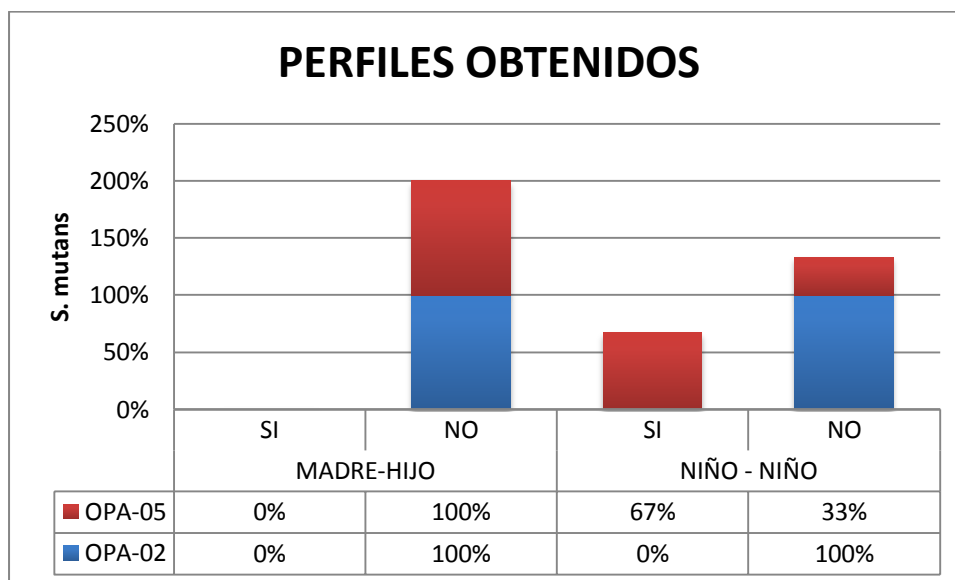
**Tabla # 5. Perfiles de especie *S. mutans* con cada primer OPA-02 y OPA-05**

	MADRE-HIJO				NIÑO – NIÑO			
	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%	Frecuencia	%
	SI		NO		SI		NO	
<b>OPA-02</b>	0	0%	6	100%	0	0%	3	100%
<b>OPA-05</b>	0	0%	6	100%	2	67%	1	33%

**Fuente:** Tomado de Ficha de Recolección de Datos.

**Autor:** Gilma Katherine López Chamba

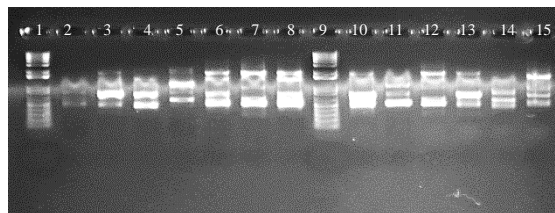
**Grafico # 5**



**Fuente:** Tomado de Ficha de Recolección de Datos.

**Autor:** Gilma Katherine López Chamba

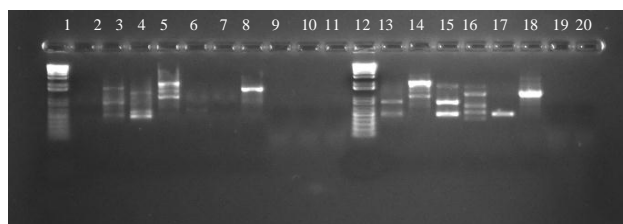
## OPA- 05



**Figura 56.** Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de *S. mutans* en niños de 0 a 48 meses de edad. Línea 1: marcador de peso molecular 1 Kb (1KB PLUS DNA LADDER – Invitrogen). Línea 2: control negativo. Línea 3-8: muestras positivas de *S. mutans* de niños. Línea 9: marcador de peso molecular 1 Kb (1KB PLUS DNA LADDER – Invitrogen). Línea 10-15 muestras positivas de *S. mutans* de madres.

**Fuente:** Resultado de la prueba de Biología Molecular –AP- PCR, en el Centro de Biotecnología UNL.

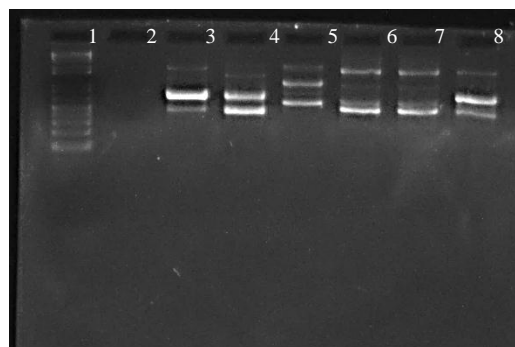
## OPA- 02



**Figura 57.** Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de *S. mutans* en niños de 0 a 48 meses de edad. Línea 1: marcador de peso molecular 1 Kb (1KB PLUS DNA LADDER – Invitrogen). Línea 2: control negativo. Línea 3-8: muestras positivas de *S. mutans* de niños. Línea 12: marcador de peso molecular 1 Kb (1KB PLUS DNA LADDER – Invitrogen). Línea 13 -18 muestras positivas de *S. mutans* de madres.

**Fuente:** Resultado de la prueba de Biología Molecular –AP- PCR, en el Centro de Biotecnología UNL.

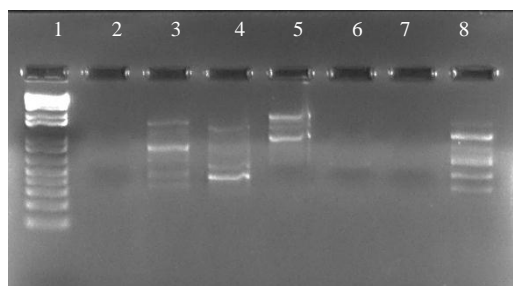
## OPA-05



**Figura 58.** Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de *S. mutans* en niños de 0 a 48 meses de edad. Línea 1: marcador de peso molecular 1 Kb (1KB PLUS DNA LADDER – Invitrogen). Línea 2: control negativo. Línea 3-8: muestras positivas de *S. mutans*. Línea 3 y 8 – 6 y 7 relación genética de *S. mutans*.

**Fuente:** Resultado de la prueba de Biología Molecular –AP- PCR, en el Centro de Biotecnología UNL.

## OPA-02



**Figura 59.** Verificación del producto de PCR en gel de agarosa de *S. mutans* en niños de 0 a 48 meses de edad. Línea 1: marcador de peso molecular 1 Kb (1KB PLUS DNA LADDER – Invitrogen). Línea 2: control negativo. Línea 3-8: muestras positivas de *S. mutans*. Sin homologación de ADN *S. mutans*

**Fuente:** Resultado de la prueba de Biología Molecular –AP- PCR, en el Centro de Biotecnología UNL.

### **Análisis e interpretación:**

Al analizar la homología de *S. mutans* en madre como hijo se encuentra que en un 100 % no hay relación genotípica, rechazando la transmisión vertical; sin embargo, en relación niño-niño se obtuvo dos homologías de genotipo con el primer OPA-05 con un 67%, argumentando una transmisión horizontal de niño a niño.

## **7. DISCUSIÓN**

El propósito de la investigación fue conocer la transmisión y colonización de la especie *S. mutans* en la cavidad oral y así aportar conocimiento científico en beneficio a la prevención de la caries dental; numerosos estudios revelan que la transmisión del microorganismo se produce entre los miembros de un grupo, diseminándose por las gotas de saliva ya sea por vía directa o indirecta; genotípicamente estudios relacionan a la saliva de las madres como fuente para la adquisición y transmisión vertical de la especie *S. mutans* en los niños; sin embargo, otros estudios relacionan una transmisión horizontal que se da por contagio de saliva con otras personas muy cercanas a los niños, por lo que variabilidad genética de este microorganismo en los niños es muy probable.

En este contexto, se llegó a los siguientes resultados: En exámenes microbiológicos y bioquímicos para identificación de la especie *S. mutans* se atribuye de forma general en un 15% de las 80 muestras estudiadas, la edad en que la especie tiene mayor presencia fue en niños de 10-18 meses con un 33%. Este resultado se contrapone con la investigación realizada por (Li, Wang, & Caufield, 2000) que arrojó como resultado de una muestra de 137 entre padres e hijo que el 75 % fue identificado como *S. mutans* y su mayor presencia fue en niños de 2 años de edad con un 36%. Favoreciendo a los resultados emitidos en esta investigación, un estudio realizado por (Lynch; Villhauer; Warren; Marshall; Dawson; Blanchette; Phipps; Starr; Drake, 2015) consideró una muestra de 239 diadas madre-hijo en la cual solo un 39 % fue identificado bioquímicamente como especie *S. mutans*, los niños de 16 meses fueron colonizados mayormente con un 57,5%. (Sanchez & Acosta, 2007) identificaron bioquímicamente estreptococos orales en niños de 2 a 10 años, los resultados se proporcionaron en orden de importancia: *S. sobrinus* con el 40%, *S. mutans* con el 31%, *S. rattus* con el 5 % y *S. cricetus* con el 3 %, se toma en

consideración esta información puesto que no necesariamente dentro del grupo mutans debe haber un mayor número de especie *S. mutans*; sino que, se debe considerar estudios que se dirigen a la importancia de las especies orales restantes de este grupo como el *S. sobrinus* que está obteniendo un papel importante pues en países como Suecia con 93% (Palenstein, Matee, Van der, & Mikx, 1996), Australia 35% y Japón y Egipto con un 45% (Loesche, 1986), la reportan como una bacteria predominante en la cavidad oral por encima de la especie *S. mutans* y lo consideran como la especie más cariogénica, debido a que producen y metabolizan menos polisacáridos extracelulares que los *S. mutans* y toda la glucosa disponible es utilizada en la producción de ácidos que permiten la formación de caries. (Lindquist & Emilson, 2004) reportan que de 1.230 muestras, no encontraron *Streptococcus mutans* en ninguno de los niños durante su periodo predentado, cuatro de los 15 niños se convirtió en positivo durante el período de "infectividad" a los 1,5-2,5 años de edad, once niños escaparon de esta ventana, pero 6 de ellos lo adquirieron entre 3 y 6 años de años. Al final del estudio, cinco de los 15 niños no albergaba cepas de *Streptococcus mutans* a la edad de 5 años y todavía estaban sin estos dos años después, estos autores refieren que es posible permanecer libre de *Streptococcus mutans* durante años si no se coloniza a una edad temprana.

En cuanto al análisis molecular por AP-PCR con los primer OPA-02 y OPA-05, tuvo como resultado que ninguno de estos primers dieron positivo a la homología de perfiles entre madre e hijo; sin embargo, se presentó homología de genotipos de *S. mutans* entre niños con un 67% apoyando a la transmisión horizontal con el cebador OPA-05, es necesario aclarar que estos niños están en permanente contacto y una homología se dio en niños de la misma familia. Los resultados de esta investigación es similar a la investigación realizada por (Lindquist & Emilson, 2004),

su investigación obtuvo como resultado una baja transmisión materna y concluyen que además de la madre, otros miembros de la familia podrían ser una fuente de transmisión. Sin embargo, (Tedjosasongko & Kozai, 2002) en su investigación encontraron 33.3% homologías de tipos de cepas entre el niño y la madre y 8.3% homologías entre el niño y el padre, la misma que sustenta una transmisión vertical muy marcada. (Doméjean, DenBesten, Stamper, Boyce, & Featherstone, 2010) en su estudio de relación genotípica entre niños, identificaron que uno de cada seis niños aparentemente estaba infectados por transmisión horizontal, compartiendo resultados similares con esta investigación.

A partir del año 2004 la mayoría de los autores que realizaron estudios genotípicos de *S. mutans* se inclinaron por el uso de AP-PCR empleando OPA-02, OPA-05 y OPA-13 bien de forma independiente como cebadores únicos en cada estudio o comparando dos entre sí. De esta manera (Hames, Uca, Kocataş, Uzel, & Alpöz, 2008), partieron de 8 madres con altos niveles de *S. mutans* estudiándolas junto con sus hijos de 2-3 años e incluyendo en tres de las familias a los padres; para esta experiencia utilizaron OPA-05 y encontraron similitud entre los genotipos de los esposos entre sí pero no en madre e hijos; en este estudio el cebador que dio mayor exactitud luego de realizar una optimización en  $MgCl_2$  fue el OPA-05 del cual resultó dos homologías entre niños pero entre madre e hijo fueron inexistentes; OPA-02 no se registró ninguna homología y por tanto no fue de gran ayuda en esta investigación.

Los resultados de este trabajo dan a conocer dos homologías de genotipos de la especie *S. mutans* en los niños estudiados; por tanto nos permite cuestionarnos acerca del medio de transmisión en este grupo de estudio, apoyando a una transmisión horizontal.

## 8. CONCLUSIONES

- Se evidencia en esta investigación la no existencia de relación genotípica entre binomios madre e hijo con ninguno de los dos cebadores aplicados; sin embargo se encuentra de forma interesante con un 67 % dos homologías de genotipo de especie *S. mutans* en niños investigados con un único cebador el OPA-05, esto da apoyo a numerosas investigaciones que ubican a la transmisión horizontal como vía principal de estos agentes patológicos especialmente en escolares.
- Se concluye por medio de las pruebas microbiológicas y bioquímicas aplicadas al 100 % de madres investigadas, la totalidad de ellas no presenta la especie *S. mutans* en boca, mientras que en los bebés el 15% tiene presente la bacteria, el 17 % corresponde a los rangos de edad de 0 a 9 meses, 19 a 27 meses, 28 a 36 meses y de 37 a 48 meses, y el 33% al rango de 10 a 18 meses, en cuanto al género el 100% corresponde al género masculino.
- El nivel mayor de especie *S. mutans* se encuentra en el rango de edad de 10 a 18 meses con el 33%, con un nivel medio de la bacteria del 100%, las homologías se encontraron en niños que se ubican en rangos de 0 a 9 meses, 10 a 18 meses, 28 a 36 meses y de 37 a 48 meses, respectivamente.

## 9. RECOMENDACIONES

- Ampliar el grupo de estudio, tomando en cuenta factores predisponentes en la aparición de esta especie.
- Realizar pruebas microbiológicas ayudadas de pruebas moleculares que permitan la identificación de cada especie del grupo mutans y a su vez darles importancia como agentes iniciadores de caries dental.
- Con el presente trabajo se espera contribuir a otros estudios que pudieran apoyarse en esta base de datos para enriquecer aún más los conocimientos en cuanto a la transmisión horizontal de *S. mutans* en niños.
- Se requiere el aporte de charlas educativas a madres y padres acerca de la importancia de evitar hábitos contaminantes y a su vez explicarles los cuidados que deben seguir para prevenir o retardar la adquisición, inicial de *Streptococcus* del grupo mutans a sus hijos; esto, con la única finalidad de contribuir al Plan Nacional para el Buen Vivir 2013 – 2017, y mantener el buen estado de la salud oral en toda la población.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acuña, N. (2013). *Estudio clínico comparativo de recuento de Streptococcus mutans antes y despues de la aplicacion de sellante*. Santiago: Universidad de Chile.
- Arellano, C. (2009). Conteo de unidades formadoras de colonias de Sterptococcus mutans en madre y sus bebes. *Vis dent*, 583-587.
- Barberia, E., Boj, J., Catalá, M., Garcia, C., & Mendoza, A. (2001). *Odontopediatria*. Barcelona: Masson.
- Bod, J., Catala, M., Garcia, C., & Mendoza, A. (2004). *Odontopediatría*. Barcelona: Masson.
- Bordoni, N., Escobar, A., & Mercado, R. (2010). *Odontología Pediátrica. La salud bucal del niño y el adolescente en el mundo actual*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Carletto, F. (2006). *Identificación, transmisión y homología de Streptococcus Mutans de la madre durante la gestación y el niño en el periodo post natal*. España: Universidad Nacional de Cordova.
- Carletto, F., González, R., & Cornejo, L. (2008). *Transmisión y homología de Streptococcus mutans en binomios madre-niño*. España: Universidad de Cordoba.
- Caufield, P., Cutter, G., & Dasanayake, A. (1993). Initial Acquisition of Mutans Streptococci by Infants: Evidence for a Discrete Window of Infectivity. *Journal of dental research*, 37-45.
- Cawson, R., & Odell, E. (2009). Fundamentos de medicina y patologia oral. En Cawson, *Caries dental* (págs. 40-41). Barcelona: Elsevier.
- Costa, T., Amoroso, P., Marin, J., & Ávila, F. (2007). Detection of streptococcus mutans and streptococcus sobrinus in dental plaque samples from Brazilian preschool children by polymerase chain reaction. *SciELO: Brazilian Dental Journal*, 329-333.

- Cuadrado, D., & Gomez, J. (2008). *Cariología: el manejo contemporáneo de la caries dental*. México: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.
- Dowd, F. (1999). Saliva y Caries Dental. *PubMed*, 677-696.
- Duque, J., Pérez, J., & Hidalgo, I. (2006). Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Scielo: Revista Cubana de Estomatología*.
- Erejoan, M. (1986). Sustitutos de la saliva. *Revista Española de Estomatología*, 326-332.
- Featherstone, J. (2000). La ciencia y la práctica de la prevención de la caries. *PubMed – Medline*, 2.
- Gutierrez, L. (2006). Infecciones congénitas poco habituales de transmisión vertical. *Scielo*, 55-63.
- Gutierrez, S. (2006). Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología. En F. Gamboa, *Estrategias micobiológicas con Streptococcus mutans* (págs. 31-36). Bogota: Universidad Javeriana.
- Hamada, S., & Slade, H. (1980). Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Pub Med*, 331-384.
- Harris, N., & Garcia, F. (2005). *Odontología Preventiva Primaria*. Mexico: Manual Moderno.
- Henostroza, G. (2007). *Caries Dental*. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia.
- Hernández, A., & Aránzazu, G. (2012). Características y propiedades fisico-químicas de la saliva: una revisión. *Research Gate*, 100-111.
- Hernandez, M. (2011). *Aislamiento y cuantificación de Streptococcus mutans en saliva en niños de la escuela primaria “Ignacio Ramírez”*. Veracruz: Universidad Veracruzana.
- Ingraham, J., & Ingraham, C. (1998). *Introducción a la microbiología*. Barcelona, España: Reverté S.A.
- Koch, G., & Poulsen, S. (2011). *Odontopediatría abordaje clínico*. Amolca.

- Koneman, E. (2005). *Diagnóstico microbiológico*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Li, Y., Wang, W., & Caufield, P. (2000). The Fidelity of Mutans Streptococci transmission and Caries Status Correlate with Breast-Feeding Experience among Chinese Families. *Caries Res*, 123-132.
- Liébana, J. (2002). *Microbiología Oral*. España: Mc Graw Hill- Interamericana.
- Liebana, J. (2008). *Estabilidad de genotipos de Streptococcus mutans en escolares usando la tecnica AP-PCR y el cebador OPA-2*. Granada: Universidad de Granada.
- Lindquist, B., & Emilson, C. (2004). Colonization of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus genotypes and caries development in children to mothers harboring both species. *PubMed*, 95-103.
- Linossier, A., Vargas, A., Zillmann, G., Arriagada, M., Rojas, R., & Villegas, R. (2003). Streptococci mutans: Método semicuantitativo para establecer el rango de riesgo de infección bucal en niños preescolares chilenos. *Pontificia Universidad Católica de Chile*.
- Llena, C. (2006). La saliva en el mantenimiento de la salud oral y como ayuda en el diagnóstico de algunas patologías. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal* , 449-455.
- Loesche, W. (1986). Role of Streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiol Rev*, 353-380 .
- Lourdes, N. D. (2010). Bioquímica de la caries dental. *Scielo*.
- Martinez, M., & Rodriguez, A. (2009). Estudio de las cepas de Estreptococos del grupo mutans presentes en binomios madre-hijo. *Revista Facultad de Odontologia/Universidad de Antioquia*, 177-185.

- Martinez, M., & Rodriguez, A. (2009). *Estudio de las cepas de Streptococos del grupo mutans presentes en binomios madre-hijo*. Bogota: Universidad Javeriana de Colombia.
- Mattos, R., Li, Y., Caufield, P., Duncan, M., & Smith, D. (2001). Genotypic Diversity of Mutans Streptococci in Brazilian Nursery Children Suggests Horizontal Transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, 2313–2316.
- Medina, M. (2009). Desarrollo histórico de la microbiología bucal. *Imbiodent*, 7.
- Mussatto, S., & Roberto, I. (2002). Xilitol: edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. *SciELO: Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas*, 401-413.
- Nagel, R. (2012). Cure la caries dental: remineralice las caries y repare sus dientes naturalmente con buena comida. *Golden Child Publishing*.
- Nauntofte, B., Tenovou, J., & Lagerlof, F. (2003). Secretion and composition of saliva: The disease and its clinical management. . *In Dental Caries*, 7-29.
- Negroni, M. (2009). *Microbiología Estomatológica; fundamentos y guía práctica*. Editorial Medica Panamericana.
- Núñez, D., & Garcia, L. (2010). Bioquímica de la caries. *Revista Habanera de Ciencias Medica*, 9(2), 156-166. Recuperado el 2 de Julio de 2016, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2010000200004](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2010000200004)
- Ojeda, J., Oviedo, E., & Salas, L. (2013). Streptococcus mutans y caries dental Streptococcus mutans and dental caries. *SciELO*, 44-56.
- Palenstein, W., Matee, M., Van der, J., & Mikx, F. (1996). Cariogenicity depends more on diet than the prevailing mutans streptococcal species. *Journal of Dental Research*, 535-542.
- Palomer, L. (2006). Caries dental en el niño. Una enfermedad contagiosa. *Revista Chilena de Pediatría*, 56-60.

- Pedraza, D., & Hernandez, Y. (2006). *Diseño y valoración de una clase de cultivo selectivo SULBAC para Streptococcus mutans*. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.
- Philip, S., & Martin, M. (2011). *Microbiología Oral*. Gran Bretaña: Amolca.
- Ramón, R., Castañeda, M., Hortencia, M., Estrada, G., & Quinza, A. (2016). *Factores de riesgo de caries dental en escolares de 5 a 11 años*. Santiago de Cuba: Medisan.
- Reynols, J. (2012). *LAB PROCEDURES MANUAL*. Obtenido de [http://delrio.dcccd.edu/jreynolds/microbiology/2421/lab\\_manual/atlas/biol2420photoatlas\\_ms.htm](http://delrio.dcccd.edu/jreynolds/microbiology/2421/lab_manual/atlas/biol2420photoatlas_ms.htm)
- Rocha, R., Lozano, P., & Martinez, Y. (2004). Mecanismos de Patogenicidad e interacción parasito-hospedero. *Universidad Autonoma de Puebla*, 129.
- Rojas, S., & Echeverría, S. (2014). CRIES TEMPRANA DE INFANCIA: ¿ENFERMEDAD INFECCIOSA? *Revista Médica Clínica Las Condes*, 581-587.
- Saarela, M., Hannula, J., Matto, J., Asikainen, S., & Alaluusua, S. (1996). TYPING OF MUTANS STREPTOCOCCI BY ARBITRARILY PRIMED POLYMERASE CHAIN REACTION. *Archs oral Biol*, 821-826.
- Salazar, L., Vasquez, C., Almuna, A., Oporto, G. S., Herrera, C., & Sanhueza, A. (2008). Detección Molecular de Estreptococos Cariogénicos en Saliva. *Scielo*, 951-958.
- Sanchez, L., & Acosta, E. (2007). Estreptococos cariogénicos predominantes, niveles de infección e incidencia de caries en un grupo de escolares. *Asociación dental mexicana*, 45-51.
- Sánchez, L., & Acosta, E. (2007). Estreptococos cariogénicos predominantes, niveles de infección e incidencia de caries en un grupo de escolares. *Revista de la Asociación Dental Mexicana*, 45-51.
- Schelenz, S., Page, A., & Emmerson, A. (2005). Streptococcus mutans endocarditis: beware of the "diphtheroid". *Journal of the Royal Society of Medicine*, 420-421.

- Seif, T. (1997). *Cariología: prevención, diagnóstico y tratamiento contemporaneo de la caries dental*. Caracas: Actualidades Médico Odontológicas Latinoamericana, C.A.
- Seki, M., Yamashita, Y., Shibata, Y., Torigoe, H., Tsuda, H., & Maeno, M. (2006). Effect of mixed mutans streptococci colonization on caries development. *PubMed*, 47-52.
- Sevillano, E., & Eraso. (2005). Determinantes ecológicos orales. Madrid, España. Recuperado el 17 de Abril de 2016, de [https://ocw.ehu.eus/pluginfile.php/7495/mod\\_resource/content/1/Material\\_de\\_estudio/Tema\\_3.\\_Determinantes\\_ecologicos\\_orales.pdf](https://ocw.ehu.eus/pluginfile.php/7495/mod_resource/content/1/Material_de_estudio/Tema_3._Determinantes_ecologicos_orales.pdf)
- Sreebny, L. V., & Yu, A. (1981). Xerostomia: Part II: Relationship to non-oral symptoms, drugs, and diseases . *Oral Med Oral Pathology*, 419-427.
- Tabchoury, C., Sousa, M., Arthur, R., Mattos-Graner, R., Del Bel Cury, A., & Cury, J. (2008). EVALUATION OF GENOTYPIC DIVERSITY OF Streptococcus mutans USING DISTINCT ARBITRARY PRIMERS. *J Appl Oral Sci*, 403-407.
- Tenovuo, J. (1997). Salivary parameters of relevance for assesSing caries activity in individuals and populations. *PubMed*, 82-86.
- Valero, P. (2015). *Bacterias de interes odontológico*. Murcia-España: Universidad de Murcia.
- Velásquez, O., & Podestá, M. (2008). Adquisición temprana de Streptococcus mutans y caries dental. *Dental Tribune Hispanic & Latin America*, 22-26.
- Volcy, C. (2004). *Lo malo y lo feo de los microbios*. Bogota: Universidad Nacional de Colombia.
- Walsh, L. (2008). Aspectos clínicos de biología salival para el Clínico Dental. *Minima Intervencion en Oodntología*, 1-24.
- Wan, A., Seow, W., Walsh, L., Bird, P., Tudehope, D., & Priedie, D. (2001). Association of Streptococcus mutans infection and oral developmental nodules in pre-dentate infants. *Journal of Dental Resoarch*, 1945-1948.

## **11. ANEXOS.**



## UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

Dirección Administrativa

Of. N° -359- D. ADM.-UNL  
Loja, 17 de agosto del 2016

Doctor.  
Martha Esther Reyes Coronel, Mg.Sc.  
**Rectora Subrogante de la Universidad Nacional de Loja**  
Ciudad.


De mi consideración:

En atención a su pedido de informe mediante sumilla en trámite N° 225398, relacionado a lo que solicita la Od. Susana González Eras, Esp., Coordinadora de la Carrera de Odontología, a la autorización para que la Srta. Gilma Katherine López Chamba, haga uso de las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de la UNL, con la finalidad que desarrolle la 2ª fase del proyecto de investigación titulado "Análisis Molecular de Streptococcus Mutans en Transmisión Vertical, Binomios Madre, Hijo, en Niños de 0-48 meses.

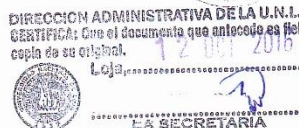
Se solicitó a parte interesada que presente un certificado de que es estudiante de la Carrera de Odontología del Área de Salud Humana.

Por lo expuesto señora Rectora, y de acuerdo a la certificación suscrita por la Coordinadora de Carrera de Odontología, la Srta. Gilma Katherine López Chamba con N° C.I 1105797136, está legalmente matriculada en el X Ciclo de la Carrera de Odontología para el período Abril-Agosto del 2016, por lo cual demuestra que es estudiante de dicha carrera; por tanto dejando a salvo su más ilustrado criterio, es procedente que haga uso del Laboratorio de Biotecnología, se adjunta el certificado respectivo.

Atentamente,

  
Dr. Omer Vicente Torres Jumbo,  
**Director Administrativo (e)**

María del Carmen H.  
c.c. archivo



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
DEPARTAMENTO DE ARCHIVO  
RECIBIDO POR   
Fecha 18/08/2016  
Hora \_\_\_\_\_

## ANEXO 02



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
ÁREA DE LA SALUD HUMANA  
CARRERA DE ODONTOLOGÍA

Of. No. 750 -CCO-ASH-UNL  
Loja, 13 de octubre de 2016

Doctor  
Nikolay Aguirre Mendoza  
**DIRECTOR DE INVESTIGACIONES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
Ciudad.-

De mi consideración:

Con un cordial y atento saludo, me dirijo por medio del presente para solicitarle de la manera más comedida, se autorice el ingreso a los Laboratorios de Biotecnología para continuar con la segunda fase del desarrollo de tesis titulado: **"ANÁLISIS MOLECULAR DE ADN DEL STREPTOCOCCUS MUTANS EN TRANSMISIÓN VERTICAL, BINOMIOS MADRE-HIJO, EN NIÑOS DE 0 - 48 MESES"** en la Institución que Usted muy acertadamente dirige. Dicho proyecto será elaborado por la señorita GILMA KATHERINE LÓPEZ CHAMBA, con número de cédula 1105797136, estudiante del X Módulo de la Carrera de Odontología.

Segura de contar con su favorable acogida, le anticipo mi sincero agradecimiento

Atentamente,

**EN LOS TESOROS DE LA SABIDURÍA  
ESTA LA GLORIFICACIÓN DE LA VIDA**

Dr. Ángel Vicente Ortega Gutiérrez  
**COORDINADOR CARRERA DE ODONTOLOGÍA**

cc. Archivo  
AVOG/



Centro de imágenes, Clínica & Laboratorio

Loja, 13 de octubre del 2014.

**DRA. SANDRA FREIRE CUESTA**  
**PATOLOGA CLINICA, DIRECTORA DEL LABORATORIO CLINICO MEDILAB**

**CERTIFICA:**

Que en el Laboratorio de Análisis Clínico MEDILAB, área de Microbiología a cargo de la Dra. Elizabeth Betancourt Patiño, Microbióloga Clínica de la institución; se realizó la primera fase: "identificación bacteriana de *Streptococcus mutans*", a 80 muestras de saliva, de las cuales 6 muestras resultaron positivas para mencionado microorganismo; en el marco la tesis: "ANÁLISIS MOLECULAR DE ADN STREPTOCOCCOS MUTANS DE TRANSMISIÓN VERTICAL BINOMIO MADRE HIJO EN NIÑOS DE 0 A 48 MESES", de autoría de la Srta. GILMA KATHERINE LOPEZ CHAMBA, portadora de la cédula N° 1105797136. Es todo cuanto puede certificar en honor a la verdad, autorizando a la portadora hacer uso del presente para lo que estime necesario

Atentamente:

**Dra. Sandra Freire Cuesta.**  
**PATOLOGA CLINICA**  
**DIRECTORA LABORATORIO CLINICO MEDILAB.**



**Dra. Sandra Freire Cuesta**  
**MEDICA PATOLOGA CLINICA**  
CML 998 - INHMT 11 - 08 - 00200 - 06  
SENESCYT: 1006 - 11 - 720435

ATENCIÓN

**24 HORAS**

Laboratorio: Manuel Montero y Alfredo Mora esq. • Telf. 2581 404 / 2580 515  
Clínica: Rocafuerte 15-22 y Sucre. • Telf. 2587 636 / 2577 056  
Correo: medilablaja@hotmail.com - Loja - Ecuador

[www.medilab.com.ec](http://www.medilab.com.ec)

## ANEXO 04

Loja, 17 de junio del 2016

Od. Esp. Susana González Eras

**COORDINADORA CARRERA DE ODONTOLOGIA**

Ciudad.-

De mi consideración:

Con un cordial y atento saludo me dirijo por medio de la presente a Usted, para hacer conocer la AUTORIZACIÓN Y PERMISO correspondiente en la obtención de la nómina de niños de 0 a 48 meses que acuden al centro de vacunación del Hospital Universitario de Motupe, a la señorita Gilma Katherine López Chamba, con número de cédula 1105797136, estudiante de X módulo de la Carrera de Odontología, para el respectivo desarrollo de trabajo de tesis **“ANALISIS MOLECULAR DE ADN DEL *STREPTOCOCCUS MUTANS* EN TRANSMISIÓN VERTICAL, BINOMIOS MADRE-HIJO, EN NIÑOS DE 0 A 48 MESES”**.

Atentamente,



Dra. Sonia Caraguay Gonzaga

**RESPONSABLE DEL BANCO DE VACUNAS  
DEL CENTRO DE SALUD MOTUPE HUM-UNL.**

**ANEXO 05**

**FICHA CLÍNICA**

**INFORMACIÓN DEL NIÑO.**

**ANAMNESIS**

Participante N°: .....

Edad: .....

Enfermedades sistémicas:.....

Está recibiendo tratamiento médico: .....

**EXAMEN INTRAORAL Y DE LABORATORIO**

<b>Especie <i>S. mutans</i></b>	
<b>AUSENTE</b>	<b>PRESENTE</b>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**FOTOGRAFIA DE SIMILITUD DE BANDAS EN BINOMIOS MADRE-HIJO**

## ANEXO 06

### FICHA CLÍNICA

#### INFORMACIÓN DE LA MADRE.

##### ANAMNESIS

Participante N°: .....

Edad: .....

Enfermedades sistémicas:.....

Está recibiendo tratamiento médico: .....

#### EXAMEN INTRAORAL Y DE LABORATORIO

**Especie *S. mutans***

**AUSENTE**

☐

**PRESENTE**

☐

**FOTOGRAFIA DE SIMILITUD DE BANDAS EN BINOMIOS  
MADRE-HIJO**

## ANEXO 07

### CONSENTIMIENTO INFORMADO.

**(Formato de acuerdo a las recomendaciones de la OMS para el consentimiento informado parental)**

El objetivo de este consentimiento es dar a conocer a las personas que participen en la investigación una explicación detallada de la naturaleza de la misma, así como el aporte que darán con su participación activa.

La presente investigación es realizada por **Gilma Katherine López Chamba**, estudiante de la Carrera de Odontología de la **Universidad Nacional de Loja**. La meta de este estudio es comparar el **ANALISIS MOLECULAR DE STREPTOCOCCUS MUTANS EN TRANSMISION VERTICAL, BINOMIOS MADRE - HIJO, EN NIÑOS DE 0 - 48 MESES.**

Si usted accede a participar en este estudio, se necesitara tomar una muestra de saliva de su bebe y la suya, además de responder preguntas para la historia clínica, la misma que tomara cerca de 5 minutos de su tiempo.

La participación en este estudio es estrictamente voluntaria. La información que se recoja será confidencial y no se usara para ningún propósito fuera de los de esta investigación. Sus respuestas al cuestionario serán codificadas usando un número de identificación y por lo tanto será anónima.

Si tiene alguna duda en el transcurso del proyecto, Usted es libre de realizar las preguntas que ayuden a disipar sus inquietudes. Si alguna de las preguntas de la encuesta le parecen incómodas, tienes Usted el derecho de hacérselo saber al investigador o de no responderlas.

Desde ya le agradecemos la participación.

Acepto participar mi hijo y yo voluntariamente en esta investigación realizada por <b>Gilma Katherine López Chamba</b> , estudiante de la Carrera de Odontología de la <b>Universidad Nacional de Loja</b> . He sido informado de que la meta de este estudio es comparar el <b>ANALISIS MOLECULAR DE STREPTOCOCCUS MUTANS EN TRANSMISION VERTICAL, BINOMIOS MADRE - HIJO, EN NIÑOS DE 0 - 48 MESES.</b>
--

.....  
NOMBRE DEL PARTICIPANTE

.....  
FIRMA

.....  
FECHA

## ANEXO 08.

# TRANSMISIÓN DE *STREPTOCOCCUS* *MUTANS*

GILMA KATHERINE LOPEZ CHAMBA  
ESTUDIANTE DE ODONTOLOGIA  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

## *S. MUTANS*



Adhiere fácilmente a la superficie del diente para la colonización



«ventana de infección»  
19 y 31 meses de edad  
(1 año 7 meses a 2 años 7 meses)



4 a 12 horas del alumbramiento  
comunidades pioneras

A los seis meses de vida  
comunidad clímax

Colonias adherentes en las  
superficies mucosas

Expuestos a factores que facilitan los procesos  
de transmisión del *S. Mutans*.



Labios

Carillos

Paladar

Encía

Lengua

La colonización microbiana cambia por frecuencia y tipo  
de alimentación, variaciones en el flujo de saliva y  
tratamientos con antibioticoterapia

Tomado: (Caulfield, Cutter & Desmanayake, 1993; Wen, Seow, Walsh, Bird, Tudehope & Purdie, 2001)



#### DISEMINACIÓN

Gotas de saliva con unidades formadoras de colonias de  
*S. mutans* depositadas en superficies inanimadas



La supervivencia fuera de la cavidad bucal es de 24 horas

Tamaño del inculo



Frecuencia de la  
inoculaciones



Dosis mínima de  
infección

## Mecanismos de contagio

---



## Caries dental

---

La caries dental es una enfermedad infecciosa, multifactorial caracterizada por la destrucción de tejidos duros dentarios y provocados por acción de ácidos producidos por los microorganismos que integran la placa dental en un periodo de tiempo suficientemente prolongado



## Consecuencias de la caries dental

---

Las secuelas de la caries dental afecta de manera importante a la calidad de vida física, psicológica, conductual y social en los niños:

- ✓ Dolor y malestar
- ✓ Alteración del sueño y dificultades para comer
- ✓ Retraso en el desarrollo físico del niño
- ✓ Ausentismo escolar
- ✓ Autoestima y problemas del manejo de comportamiento



## Prevención

---

1. Evitar hábitos de contacto directo e indirecto familia-bebe
2. Fluorización
3. Alimentación balanceada
4. Visitar el odontólogo al menos cada seis meses
5. Tratamiento para reducir carga bacteriana.

Sabe si su hijo presenta *S. mutans* en la  
cavidad oral?



## **ANEXO 09**

### **OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

Realizar el análisis molecular del *Streptococcus mutans* en la transmisión vertical presentes en binomios madre-hijo, en niños de 0 - 48 meses.

#### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Identificar bioquímicamente la especie *S. mutans* del grupo mutans.

Determinar mediante la amplificación por PCR la presencia de *S. mutans* en binomios madre-hijo.

Determinar los grupos etarios en que existe mayor nivel de *S. mutans* en binomios madre-hijo.

## ANEXO 10



Lic. Mónica Guarnizo Torres  
SECRETARIA DE "BRENTWOOD LANGUAGE CENTER"

### CERTIFICA:

Que el documento aquí compuesto es fiel traducción del idioma español al idioma inglés del resumen para el trabajo de titulación denominado: "ANÁLISIS MOLECULAR DE ADN DEL *STREPTOCOCCUS MUTANS* EN TRANSMISIÓN VERTICAL, BINOMIOS MADRE - HIJO, EN NIÑOS DE 0 - 48 MESES", de la estudiante GILMA KATHERINE LÓPEZ CHAMBA, egresada de la carrera de Odontología de la Universidad Nacional de Loja.

Lo certifica en honor a la verdad y autoriza a la interesada hacer uso del presente en lo que a sus intereses convenga.

Loja, 29 de noviembre de 2016

Lic. Mónica Guarnizo Torres  
SECRETARIA DE B.L.C.

