



Salvadora Pérez Vilaplana

Departamento de Estomatología.
Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València.

ANÁLISIS DE MARCADORES BIOQUÍMICOS, MICROBIOLÓGICOS Y CLÍNICOS RELACIONADOS CON LA CARIES DENTAL

XVII Premio Estudiantes de Odontología Gaceta Dental 2017

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es evaluar la correlación entre parámetros clínicos, bioquímicos y microbiológicos con índices de caries en población adulta.

En cuanto al material y los métodos utilizados, de 75 voluntarios, se recopilaron IP, IG, CAO-D y flujo salival. Se tomaron muestras de placa, saliva y se midieron parámetros bioquímicos y microbiológicos.

El ácido láctico en placa se mostró significativamente asociado con edad, presencia de caries cavitadas, ausencias dentarias e índices de placa y gingival ($p < 0,05$). Niveles altos de *S. mutans* se asociaron con niveles altos de lactato en placa antes y después del choque ácido ($p < 0,05$). El porcentaje de *S. dentisani* en placa fue superior en los pacientes con mayor pH y menos ácido láctico.

La conclusión de este trabajo es que la frecuencia de cepillado fue el factor más asociado con salud oral.

Niveles bajos de pH y altos de ácido láctico tendían a asociarse con índices de caries altos. No se halló asociación entre niveles de bacterias e índices de caries.

Palabras clave: Caries, *S. dentisani*, *S. mutans*, ácido láctico y pH.

INTRODUCCIÓN

La caries es una enfermedad multifactorial que comparte factores de riesgo común con otras enfermedades transmisibles. Se analizarán a continuación los factores microbiológicos y bioquímicos y su interacción en el desarrollo de la lesión de caries.

Factores microbiológicos

La hipótesis ecológica es la más aceptada actualmente para explicar la influencia microbiana en el desarrollo de la caries (1). La transición de la salud oral a la enfermedad se produce cuando hay una perturbación que modifica las condiciones del medio bucal favoreciendo el desarrollo de una microflora más productora de ácidos y más ácido tolerante (2).

Esta capacidad de tolerancia y producción de ácidos no puede atribuirse a un solo grupo de microorganismos, sino que son consorcios bacterianos que interaccionan de forma compleja los que, en determinadas condiciones, van a tener una mayor preponderancia los más ácido tolerantes y productores de ácidos, en detrimento de otros cuyo

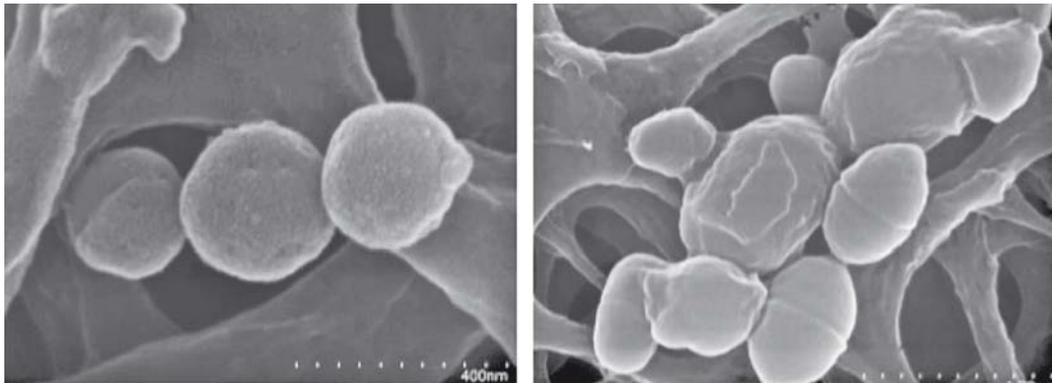


Figura 1. Las bacteriocinas producidas por *S. dentisani* se unen a la membrana celular de los organismos patógenos desestructurándola. En la imagen de la izquierda, se pueden observar poros en la membrana de *S. mutans* producidos por estos péptidos, generando un desequilibrio osmótico, que provoca que las células de *S. mutans*, que en circunstancias normales tienen forma esférica, se hinchen de forma desproporcionada (imagen derecha). Las bacterias cariogénicas están rodeadas por células en forma de bellota que corresponden a *S. dentisani* (10, 14). (Imagen cedida por Alejandra Mira)

resultado metabólico sería menos ácido (3). Cuando las condiciones ambientales se modifican, también la microbiota oral puede modificarse e invertir el sentido.

En el complejo microbioma oral, *S. mutans* no es siempre la especie más numerosa (4), muchos organismos son igualmente acidogénicos y acidúricos. Sin embargo, *S. mutans* es un productor importante de matriz y puede modular rápidamente la formación de biofilms cariogénicos; cuando la sacarosa y el almidón están presentes (5, 6). Los factores reconocidos que tienen más influencia sobre la composición y la actividad del biofilm oral, así como con su potencial patógeno, son el pH y el origen/disponibilidad de sustancias nutritivas tales como los carbohidratos. Algunos biofilms también tienen la capacidad de formar álcali (7). La urea y la arginina pueden ser metabolizadas rápidamente por algunas bacterias orales para provocar un aumento en el pH del medio ambiente oral (8).

La lesión de caries, comparada con la biopelícula dental, tiene una reducida diversidad microbiana; aunque es mayor de la que se conocía (9). Dentro de la compleja microbiota que se ha revelado en los estudios de ADN, se ha podido observar que gran parte de estos microorganismos son comensales y, por lo tanto, no dañinos. Algunos de los cuales nunca han sido cultivados, ni siquiera tienen todavía nomenclatura científica (10, 11).

En un estudio reciente del ADN total microbiano, realizado en muestras de placa dental de sujetos con caries y otros que no habían tenido la enfermedad, se observó en estos últimos una altísima presencia de *streptococos* del grupo Mitis; los cuales no coincidían con ninguna especie descrita (12). Posteriormente, se realizaron las pruebas bioquímicas, genéticas y genómicas, identificando a la bacteria hasta entonces desconocida como *S. dentisani* (13).

S. dentisani es una bacteria del grupo mitis descubierta por el laboratorio del Dr. Álex Mira. Cuando se aislaron estas bacterias en cultivo puro y se hicieron crecer en presencia de organismos cariogénicos como *S. mutans* o *S. sobrinus*, se observó cómo la bacteria destruía a los patógenos por medio de bacteriocinas. En la **Figura 1** se observa cómo actúa *S. dentisani* sobre la membrana del *S. mutans* (14). Al estudiar el ADN de esta placa dental *in vitro*, se identificó que el *S. dentisani* había colonizado el nicho y eliminado no solo *S. mutans*, sino también a *Veillonella*, que es una de las bacterias más frecuentes en lesiones de caries, favoreciendo el crecimiento de bacterias no cariogénicas (12).

También se ha comprobado que *S. dentisani*, aparte de eliminar organismos patógenos, tiene la capacidad de metabolizar la arginina transformándola en amonio, que es una molécula reguladora del pH de la placa dental al neutralizar el ácido. La producción de amonio es una estrategia

de la bacteria para protegerse, ya que si el pH se vuelve demasiado ácido puede morir. Por lo tanto, el *S. dentisani* tendría un doble mecanismo anti-cariogénico (10, 14).

Factores salivales y bioquímicos

La tasa de flujo salival y sus componentes ejercen un papel preponderante como protectores frente a la caries dental (15-17).

La urea y la arginina son las dos fuentes principales de generación de álcali en la placa dental y saliva. El amoníaco producido a partir de urea y/o arginina neutraliza los ácidos y estabiliza la microbiota oral (18-21).

Stephan en 1940 demostró que de 2 a 5 minutos después de un enjuague con una solución azucarada, el pH de la placa dental desciende, siendo el ácido láctico el mayor responsable de este descenso y retornando a su nivel basal alrededor de los 40 minutos siguientes (22), gracias a la puesta en marcha de los mecanismos tampón, entre los que destaca el bicarbonato, la urea y la arginina ya comentados anteriormente (18, 23-25).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la correlación entre parámetros clínicos, bioquímicos y microbiológicos con los índices de caries en una muestra de población adulta.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio forma parte de un ensayo clínico CE-CET 7746 realizado en colaboración entre la Fundación FISABIO y la Fundació Lluís Alcanyis de la Universitat de València. Fue aprobado por el Comi-

té de Ética con la siguiente referencia (CEIG GGSP-CESISP de 30 de diciembre de 2015). Cuenta con la autorización del investigador principal del Ensayo Clínico (Dr. Alejandro Mira Obrador) para su presentación.

Selección de los participantes

Para llevar a cabo el presente estudio fueron reclutados 184 voluntarios, de los cuales, tras aplicar los criterios de inclusión y de exclusión establecidos en el ensayo clínico, se seleccionaron un total de 75.

Los criterios de inclusión para la selección de los participantes fueron:

- Edad entre 18 y 65 años.
- Con un pH basal (tras un cepillado con agua) en saliva igual o inferior a 7.
- Con historial previo de caries y/o caries activas.
- Ausencia de otras enfermedades orales.

En el presente trabajo se ha utilizado información relativa al estado basal de los participantes, es decir, antes de comenzar la fase experimental del estudio.

Exploración clínica y recogida de muestras

Tras ser incluido en el estudio, el participante recibía una cita a la cual debía asistir sin haberse cepillado los dientes desde la noche anterior. En ésta, se tomó una muestra de saliva basal no estimulada, obtenida por babeo durante cinco minutos, para determinar el flujo salival, como se muestra en la **Figura 2**, considerándose como tasa de secreción normal valores de 0,25 a 0,31 ml/mn, además en esta saliva se determinó también el pH y la capacidad tampón, como se explicará más adelante.

0: Sano
1: Careado (incluidas manchas blanca)
2: Obturado sin caries.
3: Obturado con caries.
4: Perdido por caries.
5: Perdido por otra razón.
6: Sellado de fisuras.
7: Pilar de puente, corona completa/parcial o implante.
8: Diente no erupcionado.
T: Diente con traumatismo.
9: No codificado.

Tabla 1. Valoración de las lesiones de caries.

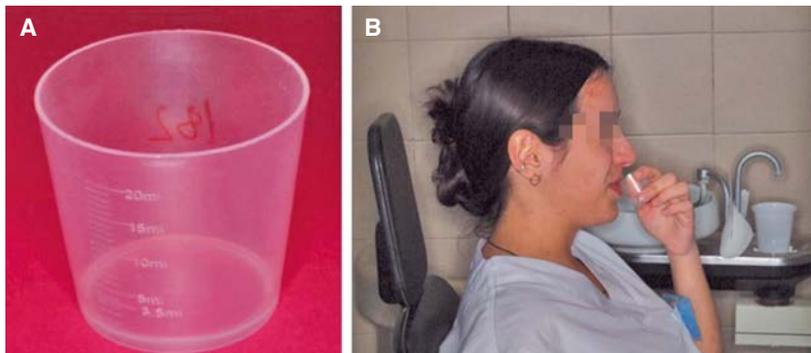


Figura 2. A) Recipiente de plástico calibrado (en ml) para la recolección de salivas y medición del flujo salival. B) Voluntaria depositando la saliva por babeo.

Grado 0: Ninguna placa.
Grado 1: Película fina de placa en el borde gingival, solo reconocible al pasar la sonda.
Grado 2: Moderada cantidad de placa a lo largo del borde gingival; espacios interdentes libres, reconocible a simple vista.
Grado 3: Gran cantidad de placa a lo largo del borde gingival; espacios interdentes ocupados por placa.

Tabla 2. Valoración del índice de placa.

0: Encía sana.
1: Ligera inflamación, cambio de color y edema (encía enrojecida).
2: Moderada inflamación, enrojecimiento y edema marcado, con sangrado al sondaje.
3: Severa inflamación, ulceración, con tendencia a la hemorragia espontánea.

Tabla 3. Valoración del índice gingival.

A continuación, se realizó una exploración bucodental y se determinó la presencia de caries de acuerdo a los criterios mostrados en la **Tabla 1** y el índice de placa y gingival de Silnes y Løe y Løe y Silnes, respectivamente (**Tablas 2 y 3**). Posteriormente se recogió en dos tubos Eppendorf de 1,5 ml; placa bacteriana supragingival de todas las superficies de los dientes. La placa de los cuadrantes 1/3 se depositó en 100 µl de PBS (solución tampón fosfato) para la cuantificación bacteriana, y la placa de los cuadrantes 2/4 se depositó en un tubo con 100 µl de H₂O estéril a pH = 7 para la posterior determinación del pH y ácido láctico (**Figura 3**). A continuación, se indicó a los pacientes que se cepillaran los dientes con agua y un cepillo manual y se recogió una muestra de saliva por babeo (saliva A), en la que se determinó el pH. Seguidamente, los vo-

“ LA CARIES ES UNA ENFERMEDAD MULTIFACTORIAL QUE COMPARTE FACTORES DE RIESGO COMÚN CON OTRAS ENFERMEDADES TRANSMISIBLES

luntarios realizaron un enjuague con una solución azucarada al 10% durante un minuto, y diez minutos tras el enjuague, se recogió la última muestra de saliva (saliva B).

Pruebas de laboratorio

Determinación de la capacidad tampón de la saliva: para determinar la capacidad tampón se utilizó la saliva basal y las tiras del test Buffer de GC (GC Europe). Según las puntuaciones obtenidas se interpretaron los resultados, considerándose una capacidad tampón baja valores

entre 0 y 5, media entre 6 y 9 y alta entre 10 y 12.

Determinación del pH salival: se determinó el pH de la saliva basal y de las muestras obtenidas antes y después del choque azucarado, mediante un reflectómetro (Reflectoquant), calibrado con las tiras correspondientes al pH (referencia: 116996) (**Figura 4**).

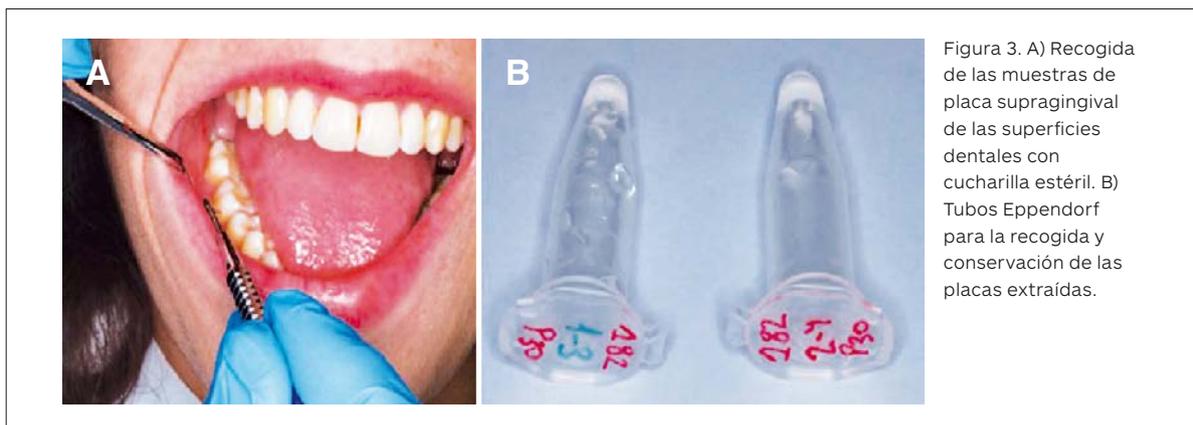


Figura 3. A) Recogida de las muestras de placa supragingival de las superficies dentales con cucharilla estéril. B) Tubos Eppendorf para la recogida y conservación de las placas extraídas.



Figura 4. A) Materiales utilizados para la determinación del pH salival. De izquierda a derecha: frasco que contiene las tiras indicadoras de pH y tira de calibrado (VWR referencia: 116996), aparato para la medición del pH (Reflectoquant), micropipeta de 2-20 µl. B) Depósito de la saliva en la tira indicadora. C) colocación de la tira indicadora en el dispositivo de medición.

Determinación del pH y ácido láctico de la placa bacteriana: se determinó el pH y el ácido láctico de la placa ex vivo con un Reflectoquant calibrado con las tiras de ácido láctico; referencia: VWR referencia 116127 (Figura 5) y para la medición del pH calibrado con las tiras (VWR referencia: 116996).

Recuento de *S. mutans*, *S. dentisani* y bacterias totales: el recuento de microorganismos se realizó en las muestras de placa y saliva. Para la realización del mis-

LA HIPÓTESIS ECOLÓGICA ES LA MÁS ACEPTADA PARA EXPLICAR LA INFLUENCIA MICROBIANA EN EL DESARROLLO DE LA CARIES

mo se utilizaron 250 µl de saliva basal, y las muestras de placa de los cuadrantes 1/3 resuspendidas en 100µl de tampón PBS. En primer lugar se extrajo el ADN de forma automatizada, utilizando el equipo MagnaPure LC JE379 y el kit de extracción MagnaPure LC DNA Isolation Kit, ambos de Roche (Figura 6 a y b). Para la cuantificación del ADN se utilizó un método fluorimétrico (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assa, Invitrogen) (Figura 6 c y d). Las reacciones para la cuantificación de *S. mutans*, *S. dentisani* y bacterias totales se llevaron a cabo mediante qPCR (quantitative PCR) con el equipo LightCycler 480 y el kit LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix, ambos de Roche (Figura 6 e y f).

Los cebadores específicos utilizados para la cuantificación de *S. dentisani* se diseñaron para este estudio (CkSdF y CkSdR). Éstos amplifican una región de 77 pares de bases del gen de la carbamato quinasa. Para la cuantificación de *S. mutans* se utilizaron cebadores ya reportados en la literatura, que amplifican

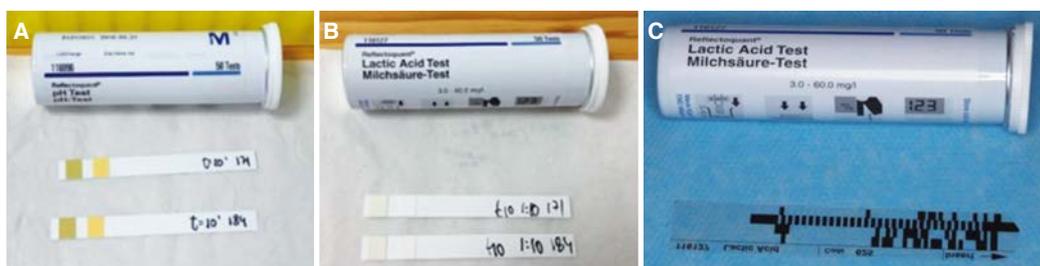


Figura 5. A) Tiras reactivas para la medición del pH a t0 y t10. B) Tiras reactivas de medición de ácido láctico a t0 y t10. C) Tiras de calibrado del ácido láctico (VWR referencia: 116127).

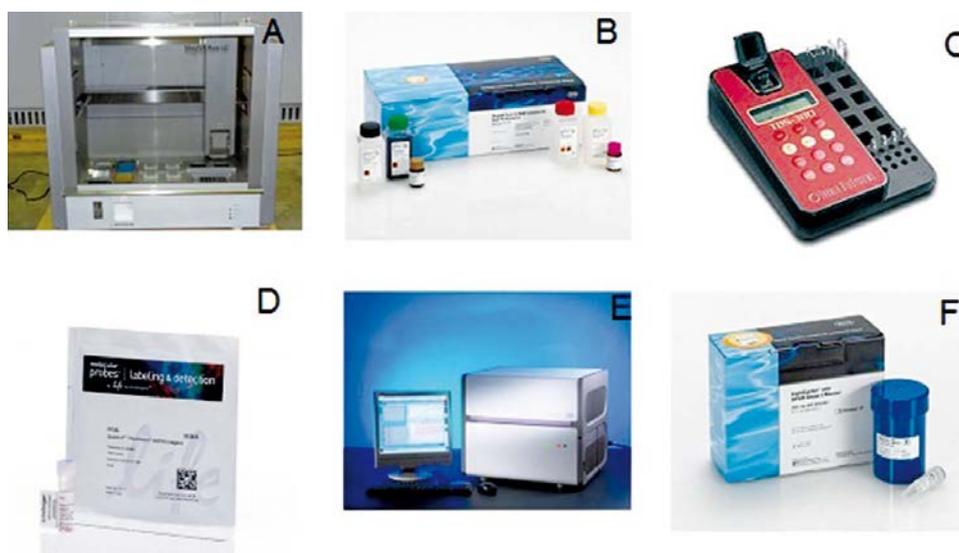


Figura 6. A) Robot de extracción de ADN (MagnaPure LC JE379). B) Kit de extracción ADN (MagnaPure LC DNA Isolation Kit). C) Fluorímetro utilizado para la cuantificación del ADN (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assa). D) Reactivos utilizados para la cuantificación del ADN (Kit de Invitrogen). E) Equipo para la cuantificación de *S. mutans*, *S. dentisani* y bacterias totales mediante qPCR (LightCycler 480). F) Reactivos utilizados para la cuantificación de *S. mutans*, *S. dentisani* y bacterias totales (LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix).

un fragmento de 415 pb del gen de la glicosil transferasa (26). En el caso de bacterias totales el gen diana es el gen ribosómico 16S rDNA, altamente conservado en el Dominio Bacteria. Los cebadores utilizados (515F-789R) amplifican una región de 274 pb (27, 28).

Análisis estadístico

Tras comprobar que los valores de pH, ácido láctico, capacidad tampón, los indicadores de caries, los índices de placa y gingival y los niveles de *S. mutans* y *S. dentisani*, no seguían una distribución normal, se procedió a utilizar test no paramétricos para su análisis. Se utilizaron

los test no paramétricos Kruskal Wallis y U de Mann-Whitney, para las comparaciones dos a dos, las variables cualitativas se compararon mediante el test Chicuadrado. Finalmente se efectuó un análisis de correlaciones entre los diferentes parámetros del estudio mediante el coeficiente de correlación de Spearman. En todos los casos se utilizó un nivel de significación del 95%.

RESULTADOS

La distribución por sexos fue de un total de 24 varones (32%) y 51 mujeres (68%), con una edad media de $34,72 \pm 10,84$ años.

Parámetros clínicos y bioquímicos

En la **Tabla 4** se muestran los valores medios y las desviaciones estándar para cada una de las variables cuantitativas.

El análisis por sexos demostró que los varones se cepillaban significativamente con menos frecuencia que las mujeres $p=0,02$. No se halló asociación significativa entre el sexo y la capacidad tampón de la saliva $p=0,30$ (analizado mediante Chicuadrado). Los varones presentaban valores más elevados de CAO-D y sus componentes, excepto para el componente O que fue superior para las mujeres. Sin embargo, solo para el componente A las diferencias fueron significativas estadísticamente ($p=0,00$). Los índices de placa y gingival fueron superiores para los varones, con significación estadística para el índice de placa $p=0,00$. Los niveles de lactato en placa tanto en t0 como en t10 fueron significativamente superiores para los varones (Test U de Mann-Whitney).

	Media	Desviación estándar
Edad	34,72	10,84
C cavitadas	1,76	2,49
C incipientes	,79	1,86
A	,73	1,98
O	4,96	3,90
CAOD	7,45	4,83
CAOD con incipientes	8,24	4,80
IP	,651	,66
IG	,431	,62
Flujo salival	3,42	1,40
pH salival basal	6,68	,42
pH saliva A	6,92	,37
pH saliva B	6,28	,54
pH placa t0	6,19	,29
pH placa t10	5,60	,56
Lactato placa t0	62,17	60,06
Lactato placa t10	251,89	153,67

Tabla 4. Media y desviación estándar de las variables clínicas y bioquímicas incluidas en el estudio: C cavitada= caries cavitada, C incipiente= caries incipiente, A= dientes ausentes, O= dientes obturados, CAOD= dientes careados + ausentes a causa de caries + obturados. CAOD con incipientes= CAOD + caries no cavitadas, IP= índice de placa, IG= índice gingival, pH saliva basal= pH de la saliva al inicio de la visita, pH saliva A= pH salival tras el cepillado en la consulta, pH saliva B= pH salival tras el choque de azúcar, pH placa t0= pH de la placa antes del choque de azúcar, pH placa t10= pH de la placa tras el choque de azúcar. Lactato placa t0= Lactato en placa antes del choque de azúcar, lactato en placa t10= lactato en placa tras el choque de azúcar.

Se halló que las personas que se cepillaban solo una vez al día presentaban una media de 4,2 caries cavitadas frente a los que se cepillaban 2 ó 3 veces que presentaban 1,57 y 1,51, respectivamente. La media de dientes ausentes y el CAO-D también fue significativamente superior en las personas que se cepillaban una vez al día respecto a los que lo hacían 2 ó 3 veces al día. $P<0,05$. Se halló un índice de placa y gingival significativamente mayores en las personas que se cepillaban una vez al día respecto a los que se cepillaban tres ($p=0,00$). Los niveles de lactato en placa fueron significativamente inferiores en los pacientes que se cepillaban tres veces al día respecto a los que lo hacían una o dos veces al día $p=0,00$ (Test de Kruskal Wallis).

En la **Tabla 5** se presenta el análisis de correlación de las diferentes variables clínicas y de laboratorio analizadas (coeficiente de correlación de Spearman).

Parámetros microbiológicos

Se determinaron los niveles de *S. mutans* y *S. dentisani* en saliva y en placa tras normalizar la cuantificación de acuerdo al DNA bacteriano total presente y se calculó el porcentaje de ambos microorganismos de acuerdo al número total de bacterias presentes en la placa. En la **Tabla 6** se muestran los valores medios para cada una de las variables.

Los niveles de *S. dentisani* tendían a aumentar cuando aumentaba la frecuencia de cepillado, siendo significativamente superiores en placa, mientras

EL TRABAJO CONCLUYE QUE LA FRECUENCIA DE CEPILLADO FUE EL FACTOR MÁS ASOCIADO CON LA SALUD ORAL

	Edad	C_cavitado	C_incipient	A	O	CAOD	CAOD con incipientes	Caries activa	IP	IG	Flujo salival	Ph_salival basal	Ph_saliva_A	Ph_saliva_B	Ph_placa_t0	Ph_placa_t10	Lac_placa_t0
C_cavidades	CC P	,11 ,34															
C_incipientes	CC P	-17 ,20															
A	CC P	,60* ,48	-02 ,80														
O	CC P	,17 ,00	,14 ,23	,20 ,08													
CAOD	CC P	,33 ,00	,23 ,04	,50 ,00	,69 ,00												
CAOD con incipientes	CC P	,27 ,01	,15 ,19	,54 ,00	,61 ,00	,887 ,00											
C cavitada+incipient	CC P	-03 ,79	,42 ,00	,06 ,59	,32 ,00	,15 ,17	,36 ,00										
IP	CC P	,21 ,06	,39 ,00	,26 ,02	,09 ,39	,23 ,03	,20 ,07	,29 ,01									
IG	CC P	,18 ,11	,16 ,16	,24 ,03	,07 ,14	,17 ,23	,14 ,23	,09 ,41	,53 ,00								
Flujo salival	CC P	-03 ,77	,08 ,46	,09 ,42	,06 ,58	,16 ,14	,15 ,18	,15 ,19	,15 ,51	,07 ,51							
pH_saliva_basal	CC P	-15 ,19	-12 ,27	,07 ,53	-06 ,93	-09 ,58	-10 ,41	-10 ,35	,05 ,36	,05 ,66	,07 ,52						
pH_saliva_A	CC P	-08 ,47	-05 ,63	,15 ,17	,05 ,65	-12 ,28	-07 ,53	,07 ,51	,00 ,98	,02 ,84	,03 ,75	,56 ,00					
pH_saliva_B	CC P	-25 ,02	,05 ,66	,15 ,19	-21 ,17	-21 ,06	-17 ,13	,10 ,36	-09 ,41	,00 ,94	,18 ,10	,32 ,00	,39 ,00				
pH_placa_t0	CC P	-03 ,79	-03 ,79	,04 ,68	,06 ,56	,15 ,18	,08 ,48	,11 ,32	,01 ,89	-07 ,54	,03 ,78	-02 ,81	,00 ,72	-04 ,72			
pH_placa_t10	CC P	,18 ,11	-14 ,21	,05 ,61	-22 ,05	-04 ,38	-10 ,37	-10 ,37	-09 ,42	-27 ,01	,12 ,28	-08 ,44	-26 ,02	-03 ,79	,53 ,00		
Lactato_placa_t0	CC P	,31 ,00	,17 ,13	-16 ,16	,27 ,01	-03 ,75	,16 ,16	,16 ,16	,05 ,61	,35 ,00	-17 ,13	-05 ,65	,01 ,87	-10 ,39	-18 ,11	-59 ,00	
Lactato_placa_t10	CC P	,29 ,01	,28 ,01	-11 ,33	,29 ,00	-07 ,53	,17 ,13	,15 ,17	,39 ,00	,34 ,00	-03 ,77	,02 ,83	,17 ,14	,01 ,88	-19 ,10	-67 ,00	,75 ,00

Tabla 5. Análisis de correlaciones de las variables cuantitativas del estudio.

N=74	Media	Desviación estándar
<i>S. mutans</i> en saliva	1,50E+04	5,17E+04
<i>S. dentisani</i> en saliva	2,60E+04	4,40E+04
<i>S. dentisani</i> norm. en placa	1,29E+03	3,23E+03
<i>S. mutans</i> norm. en placa	5,49E+02	1,67E+03
% <i>S. dentisani</i> en placa	,39	,79
% <i>S. mutans</i> en placa	,17	,45

Tabla 6. Valores medios y desviación estándar de los niveles de *S. mutans* y *S. dentisani*.

que los niveles de *S. mutans*, presentaban la tendencia contraria (test de Kruskal Wallis).

Se establecieron mediante un histograma de frecuencias los niveles a partir de los cuales las variables bioquímicas y clínicas dejaban de asimilarse a la normalidad para establecer el punto de corte de recodificación y compararlas con los parámetros microbiológicos del estudio. Se hallaron valores más elevados de *S. mutans* en saliva en los pacientes con CAO-D mayor de 8 y valores de *S. dentisani* en placa y % de *S. dentisani* en placa superiores en los pacientes con niveles de CAOD ≤ 8 . Cuando se consideraron también las lesiones incipientes en la recodificación del CAO-D, los valores más elevados de *S. mutans* en saliva se aproximaban a la significación estadística, en los pacientes con un CAO-D con incipientes >9 , también los valores de esta bacteria en placa eran más elevados (Test U de Mann-Withney).

Los niveles de *S. mutans* en saliva fueron superiores en pacientes con pH basal $<6,4$. Los valores de *S. dentisani* en placa fueron considerablemente superiores en los pacientes con pH $\geq 6,4$. Los pacientes con niveles de ácido láctico antes del choque de azúcar, superiores a 50 mostraron significativamente más *S. mutans* y *S. dentisani* en saliva. Los valores de *S. dentisani* normalizados en placa y el porcentaje de *S. dentisani* fue ligeramente superior en los pacientes con niveles de ácido láctico inferiores o iguales a 50. Tras el choque de azúcar, los niveles de *S. mutans*

en placa fueron superiores en los pacientes con niveles de ácido láctico >350 (Test U de Mann-Withney).

En la **Tabla 7** se muestra el análisis de correlaciones entre los parámetros microbiológicos y los parámetros clínicos y bioquímicos (Análisis de correlación de Spearman).

“ NO SE ENCONTRÓ ASOCIACIÓN ENTRE NIVELES DE BACTERIAS E ÍNDICES DE CARIES

DISCUSIÓN

La edad media de la muestra estudiada correspondería al grupo de adultos jóvenes propuesto por la OMS que incluye la población de entre 35 y 44 años. Si se toma como referencia ese grupo de población en los datos obtenidos en la última encuesta nacional realizada en 2015 (29); en la que el índice CAOD era de $8,43 \pm 5,30$, se aprecia que la población estudiada presentaba valores inferiores $7,45 \pm 4,83$, aseme-

jándose cuando se consideraban también las lesiones incipientes. Los valores medios de lesiones cavitadas y obturadas fueron similares a los del mencionado estudio, mientras que los valores medios de dientes ausentes fueron inferiores $0,73$ frente a $2,56$. En el estudio de Eustaquio M.V. et al de 2010, sobre la salud oral de la población de la Comunidad Valenciana, se observaron en los adultos jóvenes (35-44) valores de CAOD similares a los del presente estudio ($7,45$ vs $7,64$) (30).

Al relacionar el sexo con la frecuencia del cepillado, se observó que los hombres se cepillaban con una menor frecuencia que las mujeres. También se pudo observar que los varones tenían valores más elevados de CAOD y sus componentes, a excepción del índice

		<i>S. mutans</i> saliva	<i>S. dentisani</i> salival	<i>S. dentisani</i> norm en placa	<i>S. mutans</i> norm. en placa	% <i>S. dentisani</i> en placa	% <i>S. mutans</i> en placa
Edad	CC	,154	,311	,220	-,105	,254	-,084
	P	,200	,008	,065	,385	,033	,486
IP	CC	,27	,412	,226	,098	,246	,040
	P	,020	,000	,058	,415	,039	,742
IG	CC	,168	,108	,088	,046	,098	,000
	P	,162	,370	,467	,706	,415	,998
Flujo salival	CC	-,034	-,197	-,036	,048	-,142	-,015
	P	,777	,100	,763	,688	,236	,899
C_cavidad	CC	,242	,349	,107	-,046	,159	-,045
	P	,042	,003	,373	,705	,185	,709
C_Incipiente	CC	-,027	-,013	,134	,065	,187	,011
	P	,825	,915	,264	,593	,118	,928
A	CC	,149	,150	,068	,085	,018	,114
	P	,214	,211	,574	,479	,882	,346
O	CC	-,123	-,234	-,120	,003	-,128	,040
	P	,308	,049	,320	,981	,287	,738
CAOD	CC	,084	,044	-,049	,007	-,074	,058
	P	,488	,718	,688	,951	,539	,633
CAOD_con incipientes	CC	,110	,037	-,001	,053	-,012	,084
	P	,363	,760	,993	,659	,919	,484
Caries_activa	CC	,210	,260	,186	,068	,245	,027
	P	,079		,119	,574	,039	,823
<i>S. mutans</i> _saliva	CC		,594	,116	,488	,013	,460
	P		,000	,335	,000	,913	,000
<i>S. dentisani</i> salival	CC	,594		,399	,181	,429	,179
	P	,000		,001	,131	,000	,136
<i>S. dentisani</i> norm. en placa	CC	,116	,399		,300	,893	,160
	P	,335	,001		,011	,000	,182
<i>S. mutans</i> norm. en placa	CC	,488	,181	,300		,151	,922
	P	,000	,131	,011		,208	,000
% <i>S. dentisani</i> en placa	CC	,013	,429	,893	,151		,079
	P	,913	,000	,000	,208		,512
% <i>S. mutans</i> en placa	CC	,460	,179	,160	,922	,079	
	P	,000	,136	,182	,000	,512	
pH_salival basal	CC	-,177	-,238	-,103	-,111	-,124	-,154
	P	,139	,046	,392	,359	,302	,201
pH_saliva_A	CC	,146	-,131	-,044	,132	-,113	,125
	P	,223	,278	,715	,273	,348	,298
pH_saliva_B	CC	-,167	-,216	-,020	-,111	-,018	-,172
	P	,165	,071	,867	,357	,879	,152
pH_placa_t0	CC	-,207	-,351	-,411	-,289	-,296	-,230
	P	,084	,003	,000	,015	,012	,053
pH_placa_t10	CC	-,368	-,286	-,286	-,427	-,177	-,394
	P	,002	,016	,016	,000	,141	,001
Lac_placa_t0	CC	,333	,324	,045	,249	,112	,332
	P	,005	,006	,710	,036	,353	,005
Lac_placa_t10	CC	,362	,402	,137	,246	,148	,293
	P	,002	,001	,254	,039	,218	,012

Tabla 7. Análisis de correlación entre los niveles de *S. mutans* y *S. dentisani* en saliva y placa respecto a los índices de caries y a los parámetros bioquímicos.

de restauración que fue superior entre las mujeres, no obstante solo se encontró diferencia significativa respecto al componente ausente. En diferentes estudios se ha podido comprobar la relación directa entre la higiene oral y la experiencia de caries (31-33). En estudios realizados sobre la población adulta italiana, encontramos resultados similares, se observó que el CAOD está relacionado significativamente con el género, que las mujeres tienen un mayor número de dientes sanos y que las personas que se cepillan menos de dos veces al día tenían peores condiciones de salud dental, al mismo tiempo que se relacionaban con un nivel educativo más bajo (34, 35). Sin embargo, en el estudio de Eustaquio M.V. et al, el CAOD de las mujeres fue significativamente superior al de los hombres (7,89 vs 7,04) (30).

Con respecto a los índices de placa y gingival, éstos también resultaron ser superiores en los hombres, siendo significativo para el índice de placa. Estos datos coinciden con los estudios nombrados anteriormente sobre la población italiana (34, 35).

También en los varones se encontraron niveles más elevados de *S. mutans* y *S. dentisani* respecto a las mujeres. Estos datos están correlacionados con los resultados obtenidos respecto al índice de placa. Un buen hábito de higiene bucal controla la microbiota oral a niveles compatibles con salud (36). Asimismo, los niveles de lactato fueron más elevados en los hombres, tanto antes como después del choque azucarado. Esto soporta que la cantidad de lactato está relacionada con una mayor cantidad de placa, así como de una placa más acidogénica. Sabemos que los biofilm acidogénicos y acidúricos están relacionados con mayor riesgo de enfermedad (37).

En un estudio reciente que evaluó microbiológicamente 268 pacientes jóvenes en Holanda, también se observó un fuerte patrón de género en la composición y el metabolismo microbiano, con una microbiota más cariogénica en los varones, que resultó en diferencias significativas de pH, y que podría estar relacionada con determinados componentes proteicos de la dieta (38).

Con los datos obtenidos en nuestro estudio podemos decir que factores asociados al género influyen en la incidencia de caries dental, observando que los hombres tienen peor salud oral, y que las mujeres cuidan más su higiene oral, tanto individual (cepillado) como profesionalmente (restauraciones).

Tras analizar la frecuencia del cepillado con las variables cuantitativas, se observó que las personas que se cepillaban 1 vez al día tenían peor salud oral que

las que lo realizaba 2-3 veces al día. Además, las personas que se cepillaban 3 veces al día tenían significativamente menor índice gingival y menores índices de lactato en placa. El efecto beneficioso del cepillado dental sobre el riesgo de caries ha sido demostrado en numerosos estudios, siendo el método más eficaz de eliminación de la placa (39), y pudiendo suponer un mayor aporte de fluoruros (40, 41). Así pues podemos decir, que cepillarse 3 veces al día reduce el riesgo de caries dental, y que la frecuencia de cepillado es predictiva del riesgo de caries.

Al correlacionar las variables clínicas y de laboratorio se observó que el CAOD aumenta con la edad, que las ausencias dentarias están relacionadas significativamente con los índices de placa y gingival, y que los índices de placa y gingival tienen una asociación significativa con los niveles de pH y lactato antes y después del choque de azúcar. En 1987 Firestone et al comprobaron cómo la madurez de la placa dental aumenta considerablemente la caída del pH después de una ingesta de comida (42), pudiendo este hecho explicar la correlación observada entre índice de placa, el pH y lactato de la propia placa.

Entre los factores asociados a la microbiología, el lactato se presenta como el marcador más fiable de caries. Dado que éste se ha medido en la placa, y que los niveles de *S. mutans* se correlacionan mejor con los parámetros de caries cuando esta bacteria se cuantificó en la placa, el presente trabajo apoya el uso de la placa dental para medir parámetros microbiológicos con mayor fiabilidad que la saliva, que mostró tendencias erráticas y poco consistentes en los diferentes factores

LOS NIVELES DE *S. DENTISANI* TIENDEN A CRECER CUANDO AUMENTA LA FRECUENCIA DE CEPILLADO

a medir. A pesar de ello, es interesante que los niveles tanto de *S. mutans* como de *S. dentisani* en placa se correlacionaron de forma significativa con los valores de estas bacterias en saliva. Ello se debe probablemente a que ambas especies son habitantes mayoritarios de los tejidos duros, y por tanto sus mayores niveles en placa implican una mayor liberación a la saliva, mientras que en otros organismos que, aparte de vivir en la placa dental, puedan encontrarse también en tejidos blandos, la correlación es probable que no se mantenga.

Los datos microbiológicos apoyan que, a pesar de que *S. mutans* es un habitante minoritario de la placa dental, representando menos del 1% del total de la microbiota, su presencia se correlaciona con la producción de lactato y es, por tanto, una bacteria importante en la generación de ácido. A pesar de ello, las correlaciones de esta bacteria con los niveles de caries no fueron positivas ni significativas, ni con los valores de pH ni en los niveles de caries, ni con los índices de caries.

Estudios posteriores deberían incluir los niveles de otras bacterias acidogénicas para poder establecer el riesgo microbiológico de caries con más exactitud. Se observó, por ejemplo, que la medida de *S. mutans* y *Lactobacillus* de forma combinada se correlaciona más con parámetros de caries que cada uno por separado (43) y otros autores están tratando de incorporar otras especies bacterianas en el mapa de la predicción del riesgo a padecer la enfermedad (44).

Los niveles de *S. dentisani* fueron superiores en individuos sin restauraciones, pudiendo indicar una asociación negativa con historial de caries, mientras que el patrón opuesto se detectó en *S. mutans*. Sin embargo, estos datos fueron inconsistentes con los niveles de caries activas o de caries cavitadas, por lo que no existe una relación claramente protectora entre presencia de *S. dentisani* y caries en individuos que ya padecen la enfermedad. Dado que sí existen niveles mayores de *S. dentisani* en individuos sin caries, es posible que el efecto beneficioso de *S. dentisani* necesite de unos ni-

veles mínimos de la bacteria para ser efectivo, aunque no es descartable que dicho efecto protector dependa de la cepa de *S. dentisani* presente en cada individuo.

A diferencia de lo que ocurre con *S. mutans*, los niveles de *S. dentisani* no se correlacionaron con la producción de lactato en la placa, aunque el porcentaje de *S. dentisani* en placa sí que fue mayor en aquellos pacientes con niveles menores de lactato tanto antes como después del choque azucarado. Sin embargo, los niveles de ambas bacterias se relacionaron de forma negativa con el pH de la placa, tanto antes como después del choque con azúcar.

Esto sugiere que el pH se relaciona con la cantidad total de placa o carga bacteriana, esté o no presente el efecto protector de *S. dentisani*.

En experimentos in vitro, se muestra que el efecto tampón de *S. dentisani* a través de la ruta arginina conlleva varias horas (14) y por tanto no se apreciaría en los datos del presente trabajo. Una segunda explicación para esta falta de correlación entre pH y niveles de *S. dentisani* vendría dada por la ausencia de individuos sin caries (CAOD=0) en el estudio, ya que son estos individuos los que han mostrado mayores niveles de *S. dentisani* y de actividad arginolítica en general (21, 45). Por tanto, los datos apoyarían

la idea de que una vez la enfermedad está presente, la presencia de *S. dentisani* a los niveles presentes en estos individuos no es suficiente para impedir ni los niveles de *S. mutans* ni la producción de lactato o para mantener un pH basal más alcalino. De hecho, es sorprendente que, a pesar de la enorme inhibición que se produce por parte de esta bacteria frente a organismos cariogénicos en condiciones de laboratorio, no exista una correlación negativa entre la presencia de *S. dentisani* y los niveles de *S. mutans*. Trabajos futuros, por tanto, deberían establecer dicha correlación en individuos que nunca hayan padecido caries, así como si la aplicación del *S. dentisani* como probiótico aumentaría los niveles de esta bacteria hasta niveles suficientes para reducir la frecuencia de organismos cariogénicos.

“ LA TASA DE FLUJO SALIVAL Y SUS COMPONENTES EJERCEN UN PAPEL PREPONDERANTE COMO PROTECTORES FRENTE A LA CARIES DENTAL

Por tanto, si el efecto anticaries de la bacteria se debiera a los niveles de la misma en la placa, estaría justificado el uso de dicha bacteria como probiótico para aumentar la carga de la misma y así poder producir un efecto significativo. Mientras tanto, en pacientes que ya tengan la enfermedad, el cepillado se presenta como el método más efectivo para mejorar el riesgo de caries. En este sentido, es interesante la correlación significativa que existe entre el cepillado y los niveles de *S. dentisani*, indicando que esta bacteria se ve favorecida por la higiene dental. Ello sugiere que se trata de un colonizador temprano de la placa y/o que se ve favorecido por la menor frecuencia de una placa madura y acidogénica. Por tanto, se podría producir un efecto sinérgico entre el cepillado y la presencia de *S. dentisani*.

Dado que esta bacteria utiliza arginina para su acción tamponadora del pH, sería interesante testar si el uso de pastas de dientes con arginina y la administración de *S. dentisani* como probiótico pueden tener un efecto sinérgico en individuos con caries. En cualquier caso, el presente trabajo muestra que el efec-

to beneficioso de *S. dentisani* puede no ser alcanzado, a menos que venga acompañado de la adecuada higiene dental o de niveles elevados de la bacteria.

CONCLUSIONES

Se puede concluir que la frecuencia de cepillado fue el factor más determinadamente asociado con salud oral. Los niveles bajos de pH y altos de ácido láctico tendían a asociarse con índices de caries más altos, sin embargo no se halló ninguna asociación entre los niveles de bacterias y la caries dental. ■

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación FISABIO, especialmente al Dr. Alex Mira de la Fundación FISABIO de Valencia, «por proporcionar los datos de los ensayo clínicos ABB-dent-Colonization y ABB-Dentisani 2015», y con mucho cariño a mi tutora del TFG, la Dra. Carmen Llena Puy, de la Universitat de València.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Marsh PD.** Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv Dent Res.* 1994; 8 (2): 263-71.
2. **Morou-Bermudez A, Elias-Boneta A, Billings RJ, Burne RA, Garcia-Rivas V, Brignoni-Nazarro V, et al.** Urease activity in dental plaque and saliva of children during a three-year study period and its relationship with other caries risk factors. *Arch Oral Biol.* 2011; 56 (11): 1282-9.
3. **Simon-Soro A, Mira A.** Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol.* 2015; 23 (2): 76-82.
4. **Simon-Soro A, Guillen-Navarro M, Mira A.** Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *J Oral Microbiol.* 2014; 6: 25443.
5. **Marsh PD.** Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 2003; 149 (2): 279-94.
6. **Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA.** The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation-new insight. *J Dent Res.* 2006; 85 (10): 878-87.
7. **Burne RA, Marquis RE.** Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 193(1):1-6.
8. **Morou-Bermudez E, Burne RA.** Genetic and physiologic characterization of urease of *Actinomyces naeslundii*. *Infect Immun.* 1999; 67 (2): 504-12.
9. **Simon-Soro A, Mira A.** Determinación de la diversidad bacteriana de la caries dental mediante pirosecuenciación. *Gaceta Dental.* 2012; 236: 96-103.
10. **Mira A, Simon-Soro A.** De la etiología a la clínica en la caries dental. *Gaceta Dental.* 2015; 266: 102-12.
11. **Nascimento MM, Zaura E, Mira A, Takahashi N, Ten Cate JM.** Second Era of OMICS in Caries Research: Moving Past the Phase of Disillusionment. *J Dent Res* 2017; doi: 10.1177/0022034517701902.
12. **Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R, Romero H, Simon-Soro A, Pignatelli M, et al.** The oral metagenome in health and disease. *ISME J.* 2012; 6 (1): 46-56.
13. **Camelo-Castillo A, Benítez-Paez A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Mira A.** *Streptococcus dentisani* sp. a novel member of the mitis group. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2014; 64 (1):60-5.
14. **López-López A, Camelo-Castillo A, Ferrer MD, Simon-Soro A, Mira A.** Health-Associated Niche Inhabitants as Oral Probiotics: The Case of *Streptococcus dentisani*. *Front Microbiol.* 2017; 8: 379.
15. **Leone CW, Oppenheim FG.** Physical and chemical aspects of saliva as indicators of risk for dental caries in humans. *J Dent Educ.* 2001; 65 (10): 1054-62.
16. **Llena-Puy C.** The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006; 11 (5): 449-55.
17. **Preethi BP, Reshma D, Anand P.** Evaluation of Flow Rate, pH, Buffering Capacity, Calcium, Total Proteins and Total Antioxidant Capacity Levels of Saliva in Caries Free and Caries Active Children: An In Vivo Study. *Indian J Clin Biochem* 2010; 25(4): 425-28.
18. **Burne RA, Marquis RE.** Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 193(1): 1-6.
19. **Nascimento MM, Gordan VV, Garvan CW, Browngardt CM, Burne RA.** Correlations of oral bacterial arginine and urea catabolism with caries experience. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24(2): 89-95.
20. **Gordan VV, Garvan CW, Ottenga ME, Schulte R, Harris PA, McEdward D, et al.** Could alkali production be considered an approach for caries control? *Caries Res* 2010; 44(6): 547-54.
21. **Nascimento MM, Liu Y, Kalra R, Perry S, Adewumi A, Xu X, et al.** Oral arginine metabolism may decrease the risk for dental caries in children. *J Dent Res* 2013; 92(7): 604-8.
22. **Dawes C.** What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *J Can Dent Assoc* 2003; 69(11): 722-24.
23. **Kleinberg I.** A mixed-bacteria ecological approach to understanding the role of the oral bacteria in dental caries causation: an alternative to *Streptococcus mutans* and the specificplaque hypothesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13(2): 108-25.
24. **Aminabadi NA, Najafpour E, Razavi Rohani Z, Sighari Deljavan A, Ghojzadeh M, Jamali Z.** Linear reciprocal interaction between dental caries and salivary characteristics. *J Oral Sci.* 2013; 55 (4): 337-42.
25. **Lenander-Lumikari M, Loimaranta V.** Saliva and dental caries. *Adv Dent Res* 2000; 14: 40-7.
26. **Yano A, Kaneko N, Ida H, Yamaguchi T, Hanada N.** Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2002; 217 (1): 23-30.
27. **Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al.** Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108 (1): 4516-22.
28. **Cruaud P, Vigneron A, Lucchetti-Miganeh C, Ciron PE, Godfroy A, Cambon-Bonavita MA.** Influence of DNA extraction method, 16S rRNA targeted hypervariable regions, and sample origin on microbial diversity detected by 454 pyrosequencing in marine chemosynthetic ecosystems. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80 (15): 4626-39.
29. **Bravo M, Almerich JM.** Encuesta de Salud Oral en España. 2015. *Rcoe.* 2016; 21 (1): 8-48.
30. **Eustaquio MV, Montiel JM, Almerich JM.** Oral health survey of the adult population of the Valencia region (Spain). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010; 15 (3): 538-44.
31. **Ozdemir D.** Dental Caries: The Most Common Disease Worldwide and Preventive Strategies. *International Journal of Biology.* 2013; 5 (4): 55.
32. **Carta G, Cagetti MG, Cocco F, Sale S, Lingstrom P, Campus G.** Caries-risk profiles in Italian adults using computer caries assessment system and ICDAS. *Braz Oral Res.* 2015; 29(1): 1-8.
33. **Broadbent JM, Zeng J, Foster Page LA, Baker SR, Ramrakha S, Thomson WM.** Oral Health-related Beliefs, Behaviors, and Outcomes through the Life Course. *J Dent Res.* 2016; 95 (7): 808-13.
34. **Arrica M, Carta G, Cocco F, Cagetti MG, Campus G, Ierardo G, et al.** Does a social/behavioural gradient in dental health exist among adults? A cross-sectional study. *J Int Med Res.* 2017; 45 (2): 451-61.
35. **Vano M, Gennai S, Karapetsa D, Miceli M, Giuca MR, Gabriele M, et al.** The influence of educational level and oral hygiene behaviours on DMFT index and CPITN index in an adult Italian population: an epidemiological study. *Int J Dent Hyg.* 2015; 13(2): 151-7.
36. **Marsh PD, Head DA.** Ecological approaches to oral biofilms: control without killing. *Caries Res.* 2015; 49 (1): 46-54.
37. **Tanner AC, Kressler CA, Faller LL.** Understanding Caries From the Oral Microbiome Perspective. *J Calif Dent Assoc.* 2016; 44 (7): 437-46.
38. **Zaura E, Brandt BW, Prodan A, Teixeira de Mattos MJ, Imangaliyev S, Kool J, et al.** On the ecosystemic network of saliva in healthy young adults. *ISME J.* 2017; 11 (5): 1218-31.
39. **Struzyccka I.** The oral microbiome in dental caries. *Pol J Microbiol.* 2014; 63 (2): 127-35.
40. **Chankanka O, Marshall TA, Levy SM, Cavanaugh JE, Warren JJ, Broffitt B, et al.** Mixed dentition cavitated caries incidence and dietary intake frequencies. *Pediatr Dent.* 2011; 33 (3): 233-40.
41. **Teles RP, Teles FR.** Antimicrobial agents used in the control of periodontal biofilms: effective adjuncts to mechanical plaque control? *Braz Oral Res.* 2009; 23 (1): 39-48.
42. **Firestone AR, Graves C, Caufield PW, Feagin FF.** Root surface caries subsequent to gingivectomy in rats inoculated with *Streptococcus sobrinus* (mutans) and *Actinomyces viscosus*. *J Dent Res.* 1987; 66 (10): 1583-86.
43. **Young DA, Featherstone JD, Roth JR.** Curing the silent epidemic: caries management in the 21st century and beyond. *J Calif Dent Assoc.* 2007; 35 (10): 681-5.
44. **Kanasi E, Johansson I, Lu SC, Kressin NR, Nunn ME, Kent R Jr, et al.** Microbial risk markers for childhood caries in pediatricians' offices. *J Dent Res.* 2010; 89(4): 378-83.
45. **Moncada G, Maureira J, Neira M, Reyes E, Oliveira Junior OB, Faleiros S, et al.** Salivary Urease and ADS Enzymatic Activity as Endogenous Protection against Dental Caries in Children. *J Clin Pediatr Dent.* 2015; 39 (4): 358-63.