

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA I.
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.**



* 5 3 0 9 5 7 7 2 8 X *
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

***ESTUDIO DE Streptococcus mutans EN UN
MODELO EXPERIMENTAL. APORTACIONES
ETIOPATOGENICAS.***

TESIS DOCTORAL

**MARIA JESUS CABRONERO FERNANDEZ
MADRID, 1991.**



ARCHIVO



JOSE PRIETO PRIETO y MARISA GOMEZ-LUS, Catedrático y Titular respectivamente del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN: que el trabajo de investigación presentado por Maria Jesús Cabronero Fernández, Licenciada en Ciencias Biológicas, que lleva por título: "ESTUDIO DE Streptococcus mutans EN UN MODELO EXPERIMENTAL. APORTACIONES ETIOPATOGENICAS", ha sido realizado bajo nuestra dirección y reúne todos los requisitos para optar al Grado de Doctora en Ciencias Biológicas.

Y para que conste, se expide y firma el presente certificado en Madrid, diciembre de mil novecientos noventa y uno.

*Fdo. Jose Prieto Prieto
Director de la tesis*

*Fdo. Marisa Gomez-Lus
Codirectora de la tesis*

*A Roberto,
a mi familia.*

*"Existen más animales en la espuma
de los dientes de la boca que hombres
en todo un reino".*

Antony Van Leeuwenhoek.

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de forma voluntaria se han prestado a participar en la realización de este trabajo:

** Al Prof. J. Prieto, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Medicina, quien me encauzó desde el principio en el campo de la Microbiología Oral, por asumir la dirección de este trabajo sin cuyos consejos, orientación, respaldo y apoyo no hubiera sido posible la realización del mismo y también por facilitarme los medios necesarios para llevarlo a cabo.*

** A la Dra. Marisa Gomez-Lus, titular de Microbiología de la Facultad de Medicina, por su dedicación y apoyo constante como codirectora de este trabajo, así como por sus enseñanzas y acertados consejos que han sido de gran valía.*

** Al Dr. J. Sanabria, del Dpto. de Cirugía Experimental del Hospital Gregorio Marañón, por la dedicación y valiosa colaboración prestada como experto en las técnicas microquirúrgicas y por su amabilidad constante.*

** Al Dr. Liébana y A. Castillo, Dpto. de Microbiología de la F. de Medicina de Granada, por la ayuda y conocimientos que me aportaron en el campo de la Microbiología Oral.*

** Al Prof. Ramos, Titular de Bioquímica de la F. Medicina, por sus conocimientos, ayuda y colaboración en el tratamiento estadístico de los datos.*

Muy especialmente quiero dedicar mi agradecimiento a los amigos con quienes he compartido este trabajo, que han estado dispuestos a ayudarme en todo momento, y que me han ofrecido una continua e incondicional dedicación:

** A Pepi, por todo el tiempo dedicado al ordenador durante este período y por la gran amistad y apoyo que ha mostrado compartiendo diariamente las "penas" de este trabajo.*

** A Fernando, por sus excelentes conocimientos en el campo de la informática,*

sin cuya ayuda no me hubiera sido posible el montaje de este trabajo, por su disponibilidad, apoyo, amistad y horas de trabajo dedicadas.

** A Roberto, de quien he recibido un impulso y apoyo continuo, por la colaboración prestada con el ordenador, por su "constante" interés para finalizar este proyecto, por la paciencia mostrada en los momentos más críticos y por compartir conmigo este trabajo.*

También quiero manifestar mi agradecimiento a mis amigos: Marta, Zoila y Lolo, así como a mis compañeros de la Cátedra de Microbiología: Carmen, Pilar, Silvia, Charo, Pedro, Imma, Jesu, Araceli, Fernando, Sagrario y demás miembros del departamento, por su interés y apoyo en la realización de esta tesis.

A mis compañeros de trabajo, Raquel, Mary Luz, Mercedes, Juan y Pío por su gran apoyo.

Especialmente quiero agradecer a mi familia su constante estímulo y apoyo moral durante el desarrollo íntegro de esta tesis doctoral.

A todos ellos mi más sincero agradecimiento.

INDICE

I. INTRODUCCION	1
1. <u>Streptococcus mutans</u>	3
1.1. AISLAMIENTO	5
1.2. CLASIFICACION Y CRITERIOS DE IDENTIFICACION	9
1.3. METABOLISMO DE LA SACAROSA	12
1.3.1. SINTESIS DE POLISACARIDOS.	13
1.3.2. PRODUCCION DE ACIDO.	18
2. PODER PATOGENO Y VIRULENCIA DE <u>S. mutans</u>.	20
2.1. CARIES DENTAL: PATOLOGIA	20
2.2. PAPEL DE <u>S. mutans</u> EN LA CARIES DENTAL	23
2.2.1. FACTORES DE VIRULENCIA	26
2.3. UTILIZACION DE MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE LA CARIES DENTAL	27
2.3.1. EFECTO DE DIETAS CARIOGENAS	29
3. <u>Streptococcus mutans</u> Y PREVENCION DE LA CARIES	33
3.1. FLUOR	35
3.1.1. MECANISMO DE ACCION DEL FLUOR	36
3.1.2. TRATAMIENTOS FLUORADOS EN LA PREVENCION DE LA CARIES	37
* <i>Fluoruros por vía general</i>	37
* <i>Aplicación tópica de fluoruros</i>	39
II. OBJETIVOS	44
III. MATERIALES Y METODOS	47
* MATERIAL Y METODO EMPLEADO EN EL ESTUDIO "in vitro"	48
3.1. MICROORGANISMO	48
3.2. CURVA DE CRECIMIENTO	48
3.2.1. MEDIOS DE CULTIVO	49

3.2.2. LECTURA DE LOS RESULTADOS	50
3.3. PRUEBAS REALIZADAS CON AZUCARES	51
3.3.1. CRECIMIENTO Y CAIDA DE pH	51
3.3.2. CAPACIDAD ACIDURICA	52
3.4. ENSAYO DE AGREGACION Y PRODUCCION DE PSE	53
3.4.1. SELECCION DE CEPAS	53
3.4.2. PREPARACION DE LAS CEPAS	54
3.4.3. ENSAYO DE AGREGACION	56
3.4.4. PRODUCCION DE POLISACARIDOS EXTRACELULARES	58
* Determinación de la producción de "slime"	
* Determinación de glucano insoluble en agua	
3.5. ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA DEL FLUOR	60
3.5.1. ANTIMICROBIANO	60
3.5.2. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD: CMI - CMB	60
3.5.3. CURVA DE LETALIDAD	61
3.5.4. EFECTO DE ELIMINACION DEL FLUOR	62
3.5.5. INFLUENCIA DE DIVERSOS PARAMETROS:	63
* Efecto de concentraciones de azúcar	
* Efecto de pH bajos.	
* Efecto de concentraciones subinhibitorias de flúor en la agregación y producción de polisacáridos extracelulares.	
* MATERIAL Y METODOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO "in vivo"	65
3.1. MODELO ANIMAL	65
3.2. DIETA.	65
3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL	67
3.3.1. DESCRIPCION DEL EXPERIMENTO	68
3.4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE <u>S. mutans</u>	69
3.4.1. TOMA DE MUESTRA	69
3.4.2. SIEMBRA	70
3.4.3. INCUBACION	71

3.4.4. OBTENCION DE MASA MICROBIANA	72
3.4.5. PRUEBAS BIOQUIMICAS	72
3.4.6. IDENTIFICACION	73
3.5. MEDIOS EMPLEADOS EN EL PROCESAMIENTO. TECNICA	73
3.5.1. MEDIO DE TRANSPORTE	73
3.5.2. MEDIO DE AISLAMIENTO SELECTIVO	74
3.5.3. MEDIO PARA LA OBTENCION DE MASA MICROBIANA	74
3.5.4. PRUEBAS DE IDENTIFICACION	75
3.5.5. MEDIO DE CONSERVACION	77
3.6. EXAMEN CLINICO DE CARIES	78
3.6.1. VISUALIZACION Y CRITERIO DIAGNOSTICO	78
3.6.2. ANATOMIA PATOLOGICA. TECNICAS EMPLEADAS	79
3.7. EVALUACION ESTADISTICA	80
IV. RESULTADOS	82
* RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO "IN VITRO"	83
3.1. ESTUDIOS PRELIMINARES:	83
3.1.1. CURVA DE DESARROLLO BACTERIANO	83
3.1.2. MEDIOS DE CULTIVO	84
3.2. PRUEBAS REALIZADAS CON AZUCARES	86
3.2.1. CAPACIDAD DE FERMENTACION DE AZUCARES	86
3.2.2. CAIDA DE pH	88
3.2.3. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE AZUCARES	89
3.2.4. CAPACIDAD ACIDURICA	89
3.3. ENSAYO DE COAGREGACION	90
3.4. ENSAYO DE "SLIME"	91
3.5. DETERMINACION DE GLUCANO INSOLUBLE	92
3.6. ACTIVIDAD DE FLUORURO SODICO SOBRE <i>S. mutans</i>	93
3.6.1. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD: CMI-CMB	93
3.6.2. CURVA DE LETALIDAD	94

3.6.3. INFLUENCIA DE DIVERSOS PARAMETROS EN LA ACTIVIDAD DE FLUORURO SODICO (NaF)	95
* INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE AZUCAR	
* INFLUENCIA DE pH	
* INFLUENCIA EN LA AGREGACION	
* INFLUENCIA EN LA PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDOS.	
* RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO "IN VIVO"	98
3.1. PESO	98
3.2. RECUENTOS MICROBIOLOGICOS EN SALIVA	99
3.3. EXAMEN CLINICO DE CARIES	102
3.4. RELACION MICROORGANISMO-CARIES	107
V. TABLAS Y FIGURAS	109
VI. DISCUSION	141
6.1. PRUEBAS REALIZADAS CON AZUCARES	142
6.2. CAPACIDAD DE AGREGACION BACTERIANA	148
6.3. CAPACIDAD DE ADHESION	151
6.4. ACTIVIDAD MICROBIOLOGICA DEL FLUOR	154
6.5. MODELO ANIMAL	160
6.6. EXAMEN MICROBIOLOGICO Y TECNICA DE PROCESAMIENTO	163
6.7. TRATAMIENTOS FLUORADOS	168
6.8. EXAMEN CLINICO DE CARIES	171
6.9. RELACION MICROORGANISMO-CARIES	173
VII. CONCLUSIONES	174
VIII. BIBLIOGRAFIA	177

NOTA: El texto y las gráficas que aparecen en este trabajo han sido procesados con los programas: Wordperfect versión 5.1 y Harward Graphics, para ello se han utilizado los siguientes equipos: ordenador - marca "Inves", modelo "PC-640 A turbo II" e impresora - marca "Hewlett Packard", mod. "Laserjet IIIp".

ABREVIATURAS

BHI	<i>Caldo Brain Heart Infusion</i>
CMB	<i>Concentración mínima bactericida</i>
CMI	<i>Concentración mínima inhibitoria</i>
FTasa	<i>Enzima fructosiltransferasa</i>
GTasa	<i>Enzima glucosiltransferasa</i>
MS	<i>Agar Mitis salivarius</i>
NaF	<i>Fluoruro sódico</i>
PSE	<i>Polisacáridos extracelulares</i>
SubCMI	<i>Concentraciones subinhibitorias</i>
ufc	<i>Unidades formadoras de colonias</i>
WC	<i>Medio Wilkins Chalgren</i>

I. INTRODUCCION

La primera suposición sobre la existencia de "pequeños animales" en la cavidad oral fue hecha en el siglo XVII por ANTONY VAN LEEUWENHOEK. Desde entonces, y fundamentalmente a partir de la segunda mitad del siglo XIX que tuvo como figuras a PASTEUR, LISTER, KOCK y COHN entre otros, se produjo el gran avance de la microbiología general y, por tanto de la bucal. Es precisamente a finales del siglo pasado cuando se asocia la flora normal de la boca, con la enfermedad oral que presenta mayor prevalencia, nos referimos a la Caries Dental.

En 1890 MILLER, un dentista norteamericano, formula la teoría quimioparasitaria, en la que señala que la causa de la caries son los ácidos producidos por los microorganismos de la boca. Las investigaciones en este sentido continuaron, y en 1922 se aislan microorganismos del tipo Lactobacillus a partir de una lesión cariogénica. Desde entonces, y hasta mediados de la década de los cuarenta se consideró, que los Lactobacillus eran la principal causa de la Caries Dental.

Hacia 1960 se sustituyó a los bacilos lácticos causantes de las lesiones cariogénicas en dientes, por los estreptococos acidogénicos fundamentalmente S. mutans.

El estudio que a continuación detallamos nos dará un mayor conocimiento de las características y propiedades que posee este microorganismo, que han llevado a considerarlo como el principal candidato, aunque no el único, en el inicio de las lesiones de caries.

1. *Streptococcus mutans*.

La primera información que se tiene sobre este microorganismo se remonta a 1924, cuando CLARKE lo aisló de lesiones de caries en dientes humanos y le da el nombre de "mutans" debido a que el microorganismo aislado tenía tendencia a ser pleomórfico, presentándose bien como cadena de cocos, o como bacilos cortos en forma de mutantes (38). Hoy día podemos añadir que puede presentar formas variables en cuanto a la morfología de sus colonias.

En 1946, diversas experiencias realizadas en roedores suprimen las caries dentales por medio de antibióticos, sugiriendo la implicación de bacterias sensibles a la penicilina en dicha infección. Este hecho sirvió de acicate para que diversas investigaciones trataran de aclarar la relación entre algunas especies bacterianas específicas y la caries dental (168).

En 1960, se aíslan algunas cepas de estreptococos de lesiones cariosas en roedores, pudiendo dichas cepas producir las mismas lesiones en otros roedores libres de caries (125). Desde entonces, especies similares se han aislado de lesiones de caries en el hombre, aunque fue CARLSSON el primero que indicó que las propiedades de los estreptococos cariogénicos aislados eran las mismas que las de la especie que inicialmente estudió CLARKE (32). Habían transcurrido cuarenta años.

En 1974, aún no era reconocida como especie independiente en la 8ª edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, pero el hecho de ser la especie mejor descrita entre los estreptococos orales hizo que fuera añadida a la lista aprobada de nombres de bacterias.

Actualmente en la 10ª edición del manual ocupa un lugar dentro del grupo "Oral Streptococci" (178), siendo muy numerosos los trabajos publicados que han ido apareciendo desde los primeros años de la década de los sesenta, probablemente debido a la observación de que muchas de sus cepas son altamente cariogénicas en animales de experimentación (94).

Diversos autores han descrito detalladamente cepas de colección de S. mutans, demostrando que esta especie tiene una serie de características que la hacen distinguirse de otros estreptococos orales, por lo que se considera como un grupo homogéneo de microorganismos esféricos Gram-positivos asociados en cadenas, no móviles y catalasa negativo (56). Todas las cepas fermentan el manitol y la gran mayoría el sorbitol, melobiosa, rafinosa, esculina e inulina; normalmente no desaminan la arginina produciendo amoníaco, y sintetizan glucanos solubles e insolubles en agua a partir de la sacarosa (68).

S. mutans es fundamentalmente α o no hemolítico en agar sangre, aunque se han encontrado cepas β hemolíticas que pueden llegar al 25% según el lugar de origen, como demostró WOLTJES y col. en 1982 (254). Aunque éstas, son a grandes rasgos, las características de S. mutans, no todas sus cepas cumplen estos requisitos, como se verá en posteriores clasificaciones.

El hábitat natural de S. mutans en el hombre es la boca, y dentro de ella, la placa dental que se forma sobre los dientes. Es por esta razón por lo que en el recién nacido es raro que se encuentre, haciendo su aparición con la erupción de los dientes y desapareciendo cuando ellos lo hacen. Hay que añadir, como dato de interés, que también se asocia con prótesis dentales. Podemos señalar que, desde un punto de vista ecológico, S. mutans ha desarrollado propiedades que le permiten colonizar selectivamente superficies duras tales como el esmalte dental.

Por tanto, dentro de la boca coloniza los dientes, fundamentalmente aquellas

zonas que son retentivas y facilitan su acumulación. La presencia de dicho microorganismo en saliva es muy frecuente, pero no en altas proporciones, posiblemente debido a la incapacidad de colonizar superficies mucosas. El hecho de que se encuentre en saliva se debe al efecto de "lavado" que ésta realiza sobre las superficies dentales (35,169).

La fuente de infección no está completamente clara; análisis microbiológicos en familias y ambientes cerrados parecen indicar una transferencia por contacto oral o salivar (196). De igual forma se ha sugerido una posible transmisión de una parte de la boca a otra, a través de instrumentos dentales como son el cepillo de dientes y la seda dental (169). Otro hábitat de S. mutans de donde puede ser aislado con frecuencia es a partir de heces humanas (93).

Diversos investigadores han estudiado la distribución de S. mutans en el reino animal, pudiéndose encontrar en algunos roedores, como hámster y ratas de laboratorio, y con menos frecuencia en animales salvajes (46).

1.1. AISLAMIENTO.

La gran cantidad de especies presentes en la cavidad oral ha hecho necesario que se desarrolle un medio específico de aislamiento para esta especie, que permita identificar y enumerar este microorganismo a partir de saliva y placa dental.

El medio más utilizado para el crecimiento selectivo de los estreptococos orales es el agar Mitis salivarius (MSA) (140). Este medio inhibe la mayor parte de las bacterias presentes en la cavidad oral a excepción de los estreptococos, debido a que contiene tres inhibidores: azul trypan, cristal violeta, y telurito potásico. El medio también contiene un 5% de sacarosa como fuente de carbono, a partir de la

cual la formación de polisacáridos extracelulares confiere a las colonias una morfología típica que hace que se puedan distinguir unas de otras (cuadro 1).

Aunque este medio da muy buenos resultados, la mayor importancia de S. mutans dentro del grupo de estreptococos orales hizo necesaria la obtención de un medio selectivo específico para este microorganismo. Han sido numerosos los distintos medios propuestos, siendo el primero de ellos el descrito por CARLSSON en 1967, conteniendo sulphadimentina, y basándose en la relativa resistencia de esta especie a las sulfamidas (31).

En 1972, IREDA y SANDHAM describen dos medios selectivos para S. mutans. El primero de ellos, al que denominan BCY, tiene como base el agar infusión cerebro-corazón suplementado con extracto de levadura, casitona y cistefna. No era un buen medio selectivo, pero permitía identificar fácilmente S. mutans por la morfología de sus colonias, blancas, relativamente planas y de superficie brillante (111). El segundo de los medios es el agar MS 40S, el cual consta de agar Mitis salivarius suplementado con sacarosa a una concentración final del 40% en lugar de un 5% que es la usual; las colonias de S. mutans son grandes y elevadas. Este medio era bastante selectivo aunque no era apropiado para recuento, ya que sólo crecía el 37,2 % del total en relación al agar Mitis salivarius (110).

Fueron OLGA GOLD y col. (89) un año más tarde, los primeros que desarrollaron un medio específico realmente eficaz para el aislamiento y recuento de este microorganismo. Se basaron en la resistencia de S. mutans a altas concentraciones de sacarosa así como en la propiedad de resistencia a la bacitracina. El medio base fue el agar Mitis salivarius, pero suplementado con un 20% de sacarosa y 0.2 U/ml de bacitracina (MSB). A dichas concentraciones, estos inhibidores impiden el crecimiento de otros estreptococos orales, pero no el de S. mutans. En este medio, los recuentos son similares a los del agar Mitis salivarius,

Cuadro 1. Características de las colonias de estreptococos orales en agar Mitis salivarius.

ESPECIE	DIAMETRO (μm)	CARACTERISTICAS DESCRIPTIVAS
<i><u>S. mutans</u></i>	0.5 - 1.5	<i>Elevada, convexa, ondulada, opaca, color azul oscuro, márgenes rugosos y superficie granular. Cuando producen muchos glucanos se detectan como una burbuja de color brillante.</i>
<i><u>S. sanguis</u></i>	0.5 - 1.0	<i>Elevada, superficie y bordes lisos, se adhiere con gran tenacidad al medio con agar.</i>
<i><u>S. salivarius</u></i>	5.0 - 10	<i>Colonia mucoide debido a la gran formación de levano a partir de la sacarosa. De gran tamaño, es una clásica gota de goma que se observa fácilmente a simple vista.</i>
<i><u>S. mitior</u></i>	0.5 - 1.5	<i>Plana, lisa y de color azul luminoso. Presenta una pequeña cúpula en el centro. No se adhiere al agar y es fácil de movilizar.</i>
<i><u>S. milleri</u></i>	0.5 - 1.5	<i>Puede ser o bien convexa y lisa de color azul luminoso, o cóncava de bordes rugosos, del mismo color. Son fáciles de movilizar de la superficie del agar.</i>

así como la morfología de las colonias, siendo además altamente sensible para dicho microorganismo. Actualmente es el medio más utilizado, y su uso está ampliamente difundido, llegando a emplearse en productos comercializados para recuentos de S. mutans en saliva (3).

La eficacia de este medio ha sido estudiado por diversos investigadores tal como KRZEMINSKI (142). En 1976, STAAT observa que el MSB inhibía el crecimiento de algunas cepas de serotipo "a", dato que es contradictorio con lo descrito por GOLD, de igual forma comprueba los distintos resultados de este medio según el laboratorio que lo comercializaba (220). Este mismo año EMILSON y BRATTHALL compara el agar MSB con otros medios selectivos, tales como MS y BCY entre otros, y vuelven a hacer notar que cepas del serotipo "a" no crecen en MSB, siendo este medio el más selectivo, pero dando recuentos menores (67). Estos resultados son confirmados por ELLEN y col. (65).

En vista de los inconvenientes que presentaba el medio MSB se intentaron describir nuevos medios selectivos que solucionaran estos problemas. LINKE describe, en 1977, el agar MSFA, este medio contiene manitol y sorbitol, pudiendo S. mutans utilizar dichos azúcares, distinguiéndose por la morfología de las colonias. Estas eran rosas o rojas y otras tenían un color azul o púrpura, brillantes, con apariencia semejante a cristal mate, y otras eran semejantes a frambuesa. El agar MSFA no inhibe el crecimiento de ningún serotipo, pero no es un buen medio selectivo ya que permite el crecimiento de aquellos microorganismos que puedan metabolizar el manitol (148).

En 1983, VAN PALENSTEIN HELDERMAN modifica el medio descrito anteriormente por IKEDA (BCY), añadiéndole un 20% de sacarosa y 0.1 U/ml de bacitracina, obteniendo muy buenos resultados (245). Este medio será modificado a su vez por SCHAEKEN y col. en 1986, aumentando la concentración de bacitracina a 0.2 U/ml. Los resultados obtenidos le dan ventajas sobre el agar MSB,

obteniendo recuentos más altos, y la posibilidad de distinguir los serotipos "d" y "g" de S. mutans de los otros serotipos. Aunque es necesario realizar nuevos estudios, podría desplazar al agar MSB (203). En este medio las colonias pueden ser rugosas, con típica morfología de cristal esmerilado, o bien lisas color blanco brillante y superficie aterciopelada; bajo la colonia se ve, a menudo, un halo blanco.

Otros medios han sido descritos recientemente, tales como el agar GSTB en 1984, que contiene: glucosa, sacarosa, telurito potásico y bacitracina, siendo este un medio que aunque obtiene buenos resultados, parece complicado de preparar (229).

1.2. CLASIFICACION Y CRITERIOS DE IDENTIFICACION.

Las cepas de S. mutans aisladas a partir de humanos y varios animales son generalmente similares en base a diversas características fenotípicas. Fermentan el manitol y el sorbitol, además de otros azúcares comunes. Sintetizan glucanos hidrosolubles a partir de la sacarosa, y requieren dientes o tejidos duros para la colonización bucal. No obstante, cuando son analizadas serológica, genética y bioquímicamente cepas de distintas fuentes, muestran gran heterogenicidad. Desde el punto de vista antigénico, las cepas de S. mutans presentan una gran variabilidad, estando divididas actualmente en ocho serotipos designados desde la "a" a la "h" (96).

Además de una clasificación serológica, las cepas de S. mutans pueden ser clasificadas según la composición y secuencia de bases de DNA. COYKENDALL, en 1971, encontró que desde un punto de vista genético, S. mutans presenta una marcada heterogeneidad, y describió cuatro grupos genéticos distintos dentro de la especie (44). En 1974 amplía sus investigaciones y relaciona los cuatro tipos

genéticos previamente descritos, con determinadas características bioquímicas, así como con los grupos serológicos descritos por BRATTHALL, proponiendo la división de S. mutans en cuatro subespecies (45). La clasificación en genotipos y subespecies se completa con una nueva subespecie aislada en la boca de ratas salvajes, denominada S. ferus (46). Esta relación entre clasificación serológica, genética y por propiedades bioquímicas ha sido también estudiada por SHKLAIR y KEENE, quienes proponen una clasificación bioquímica separando las cepas de S. mutans en cinco biotipos haciéndolos corresponder con los cinco grupos serológicos de BRATTHALL (212).

Teniendo en cuenta los trabajos realizados por estos autores, las cinco subespecies de S. mutans son:

1. Subespecie mutans, se corresponde al grupo genético I, reacciona con los antisueros de los serotipos "c", "e", y "f", siendo la composición de la base DNA guanina + citosina 36%-38%.
2. Subespecie rattus, grupo genético II, reacciona con antisuero del serotipo "b"; composición del DNA (G+C) 42%-44%.
3. Subespecie sobrinus, grupo genético III, reacciona con antisueros de los serotipos "d", "g", y "h"; composición DNA (G+C) 44%-46% (12,13).
4. Subespecie cricetus, grupo genético IV, reacciona con antisuero del serotipo "a"; composición DNA (G+C) 42%-44%.
5. Subespecie ferus, grupo genético V, reacciona con antisuero del serotipo "c"; composición DNA (G+C) 43%-45%. Es el único que no se ha podido aislar en el hombre.

Aunque las clasificaciones descritas hasta ahora son las más importantes, conservando actualmente su vigencia, se han realizado otros intentos taxonómicos (40), como el efectuado por IKEDA y col. en base a la morfología de las colonias. En este trabajo se intenta realizar una correlación entre dicha morfología y los grupos genéticos, serológicos y bioquímicos, ya descritos, de forma que la simple observación de las colonias de S. mutans en un medio conteniendo sacarosa nos orienta, en un primer momento, hacia un diagnóstico más preciso, pudiendo en algunos casos indicar la subespecie (112).

Como anteriormente habíamos comentado, algunos autores tales como PERCH y col. (190) y SHKLAIR (212), estudian las principales características bioquímicas de las subespecies y genotipos de S. mutans; es precisamente en estas características en las que nos basamos para establecer un diagnóstico, en primer lugar de esta especie para diferenciarla de aquellas que pueden crecer en los medios selectivos como el MSB (cuadro n° 2) y en segundo lugar distinguiendo las distintas subespecies reconocidas en la actualidad.

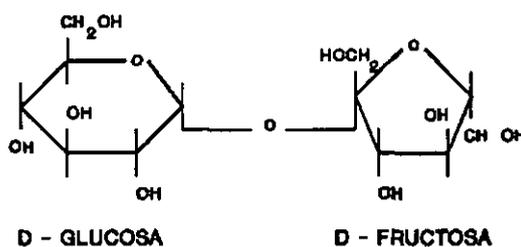
Cuadro 2. Esquema de identificación de estreptococos orales.

	Manitol	Sorbitol	Rafinosa	Inulina	Sacarosa	Arginina	Esculina
<u>S. mutans</u>	+	+	+	+	+	-	+
<u>S. sanguis I</u>	-	-	-	+	+	+	+
<u>S. sanguis II</u>	-	-	+	-	+	-	-
<u>S. mitior</u>	-	-	-	-	+	-	-
<u>S. milleri</u>	-	-	-	-	+	+	+
<u>S. salivarius</u>	-	-	+	+	+	-	+

*Este método de identificación bioquímica ha sido muy utilizado debido a que para la mayoría de los laboratorios, la preparación de antisueros específicos es costosa y lleva mucho tiempo, de forma que han llegado a desarrollarse micro-métodos bioquímicos para caracterizar las cepas de S. mutans, como es el descrito por **OLDERSHAW** y col. en 1982 (189).*

1.3. METABOLISMO DE LA SACAROSA.

El sustrato más importante para la bacteria oral S. mutans con respecto a su papel como agente etiológico del proceso carioso es un disacárido que se consume de forma habitual en la gran mayoría de la población humana : la sacarosa (199). Este carbohidrato está compuesto de una unidad D-glucosa y otra unidad D-fructosa, tal y como se puede observar en este esquema (163):



Este disacárido va a tener una gran importancia, ya que no sólo es utilizado como fuente primaria de energía, sino que permite el inicio de reacciones bioquímicas adicionales responsables del potencial cariogéno de esta bacteria. Las vías involucradas en el metabolismo de la sacarosa son tres:

1. Producción a partir de dicho azúcar de polímeros hidrocarbonados

extracelulares adhesivos, por enzimas extracelulares ligadas a la célula.

2. Transporte de la sacarosa al interior de la célula seguido de fosforilación y utilización de energía por medio de la vía glicolítica, conduciendo fundamentalmente a la producción de ácido láctico como producto final.

3. Utilización de los metabolitos intermedios de la sacarosa (glucosa y fructosa) para la síntesis de polisacáridos intracelulares que proporcionan un reservorio de energía (181).

A continuación iremos describiendo estos productos metabólicos, así como las enzimas necesarias para que, estas vías puedan llevarse a cabo.

1.3.1. SINTESIS DE POLISACARIDOS.

La síntesis de polisacáridos extracelulares (PSE) a partir de la sacarosa que no entra en la célula, es llevado a cabo fundamentalmente por dos enzimas: glucosiltransferasa y fructosiltransferasa, encargadas de sintetizar respectivamente glucanos y fructanos. GIBBONS y VAN HOUTE en 1975, recogen los trabajos de diversos investigadores observando que, en presencia de sacarosa, S. mutans forma colonias que se adhieren a superficies duras, cristal, o incluso esmalte dental, siendo los polisacáridos extracelulares los responsables de ésta particular característica. Esta propiedad jugará un papel importante en la ecología y patogenicidad de dicho microorganismo (87).

S. mutans es el único microorganismo de la cavidad oral que tiene la característica de producir dos tipos de glucanos, y además algunas de sus cepas fructano. Los dos tipos de polisacáridos de glucosa sintetizados por la polimerización

de las mitades glucosa de la sacarosa son llamadas "dextrano" y "mutano" .

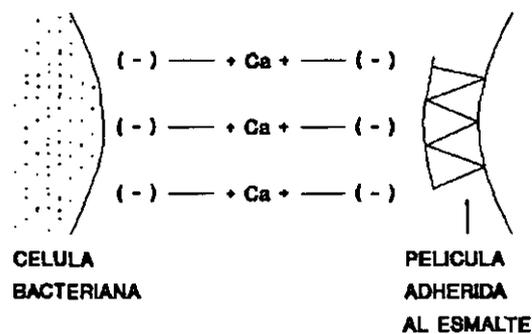
Hoy día sabemos que los dextranos contienen predominantemente eslabones α (1,6) y un ramificado de α (1,2), α (1,3) y α (1,4) en menores proporciones. Este polímero α (1,6) tiende a ser más hidrosoluble y degradable por enzimas producidas por algunas bacterias de la placa que los mutanos, estando formados estos últimos por un núcleo de eslabones α (1,3) en forma de largas cadenas y ramas en posición α (1,6). Estos polímeros son menos hidrosolubles que los dextranos y constituyen una parte importante de la matriz fibrilar de la placa. Parece ser que la alta proporción de eslabones α (1,6), es la responsable de la naturaleza insoluble de este polímero. Estas dos clases de glucanos, aunque presentan un predominio α (1,3) o α (1,6), contienen mezcla de los dos tipos de eslabones, presentando dificultad para definirlos químicamente (181, 92).

Además de los glucanos se pudo observar que ciertas cepas sintetizan fructanos a partir de la sacarosa, creyéndose en un principio que se trataba de eslabones α (2,6), aunque hoy día se ha confirmado que son eslabones β (2,1). Los fructanos, a diferencia de los mutanos, son muy solubles y pueden ser descompuestos por las bacterias de la placa, sirviendo en mayor medida como reservorio de azúcares (181). Como ya hemos señalado, no todas las cepas de S. mutans producen fructosiltransferasas, hoy día se conoce que sólo cepas de las subespecies rattus y mutans pueden hacerlo (143,235).

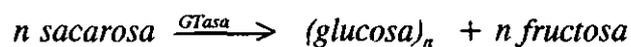
Otro polímero extracelular que se encuentra en los cultivos de S. mutans es el ácido lipoteicoico, que se localiza, o bien como componente de la pared celular, o extracelularmente en un gran número de especies bacterianas Gram-positivas, incluyendo todos los serotipos de S. mutans (161).

Está compuesto por un glucolípido covalentemente unido a un ácido glicerol teicoico al que puede estar adherida una mitad hidrocarbonada (181). El papel que

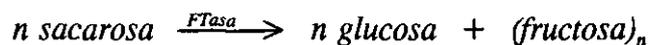
puede jugar no está completamente avalado por estudios experimentales, aunque parece evidente que juega un importante papel en la adherencia bacteriana, ya que se trata de un polímero aniónico que influye en que la bacteria esté cargada negativamente en la pared celular. Por otra parte, polímeros derivados de la saliva se adsorberían sobre las superficies de los dientes formando una película glucoproteica cargada negativamente. Hoy día se sugiere la formación de un puente divalente catiónico (que podría ser el calcio) entre las dos superficies cargadas (163).



Las enzimas responsables de la síntesis de polisacáridos extracelulares son llamadas glucosiltransferasa y fructosiltransferasa (GTasa y FTasa) y actúan catalizando las siguientes reacciones:



en la formación de glucanos, y



cuando se forman fructanos.

El equilibrio de estas reacciones es casi irreversible hacia la derecha, y dichas

enzimas son formadas constitutivamente (la presencia del enzima es independiente de la del sustrato principal: la sacarosa). Las moléculas de enzimas se encuentran extracelularmente o en la célula y son muy específicas para la sacarosa teniendo un bajo K_m , lo cual indica una gran afinidad entre enzima y sustrato. El pH óptimo tiene un amplio intervalo entre 5.2 - 7.

Tanto la GTasa como la FTasa han sido aisladas y purificadas a partir de diversas cepas de *S. mutans*. En alguno de estos estudios se ha evidenciado que la actividad de la enzima se manifestaba de múltiples formas, y se observó que los glucanos insolubles eran catalizados por fracciones enzimáticas de alto peso molecular, mientras que los glucanos solubles en agua eran sintetizados por fracciones de bajo peso molecular (181).

Algunos autores empiezan a observar la presencia de dos tipos distintos de GTasa, y sugieren que estas enzimas son de naturaleza glucoproteica (145). CIARDI y col. confirman en 1977 la presencia de dos GTasas, una responsable de la síntesis de glucanos insolubles, y otra de los solubles; así mismo parece ser que estos últimos pueden servir de sustrato para la síntesis de glucanos insolubles. Sin embargo no todo parece ser así de sencillo en la actualidad.

En 1983 SHIMAMURA y col. observan una tercera GTasa diferente a las anteriores en una cepa del serotipo "g", y ésta situación se amplía a cepas de otros serotipos tales como el "a" y "d"; incluso se empieza a hablar de una cuarta GTasa (TAKEHARA, 1984). Los últimos trabajos realizados en este sentido se dirigen a la purificación y caracterización de distintas GTasas de diferentes serotipos, como los estudios realizados por HAMADA y col. en 1987 (97) y KUMADA y col. en el mismo año (143).

La gran importancia de las enzimas que intervienen en la síntesis de polisacáridos extracelulares, fundamentalmente de los glucanos, se ha demostrado

claramente en los estudios realizados con cepas mutantes de S. mutans, las cuales presentan con mucha frecuencia una defectuosa producción de GTasa, y en otros un exceso de ésta. En el primero de los casos éstas formas eran avirulentas en ratas gnotobióticas (226), y en segundo daban lugar a formas hipercariogénicas (171). Es por ello que muchas de las investigaciones encaminadas a la prevención de la caries tratan de interferir la síntesis o la actividad de estas enzimas. Citaremos a modo de ejemplo, los trabajos realizados en 1986 por TAKADA y FUKUSHIMA sobre la influencia de diversas sales sobre la síntesis de GTasa (225), ó las realizadas por KOZAI y col. y SÖDERLING y col. en 1987 que estudian la inhibición de la producción de polisacáridos por dos ácidos (oleanólico y ursólico) y dos azúcares (sorbitol y xilitol) respectivamente (139,214).

Además de la síntesis de polisacáridos extracelulares, las cepas de S. mutans tienen la capacidad de producir y almacenar polisacáridos intracelulares a partir de varios azúcares cuando éstos están en exceso, lo cual contribuye a aumentar el poder patógeno de este microorganismo. Parece ser que éstos polisacáridos son la fuente de ácido cuando los aportes externos de azúcar no son suficientes o faltan por completo. Los polisacáridos intracelulares son del tipo glucógeno y amilopectina (181).

Antes de describir el metabolismo glucidolítico de S. mutans expondremos brevemente algunos aspectos de una enzima sintetizada por este microorganismo y que afecta a la síntesis de los polisacáridos extracelulares; nos referimos a la glucanhidrolasa o dextranasa, enzima que interviene en la degradación de glucanos. Parece ser que la heterogeneidad estructural de muchos glucanos puede ser el resultado de la acción enzimática combinada de la GTasa y la endoglucanasa o dextranasa, encontrándonos una fuerte correlación entre la actividad glucanhidrolasa y el porcentaje de glucanos insolubles sintetizados "in vitro" (71).

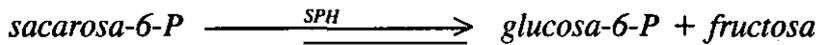
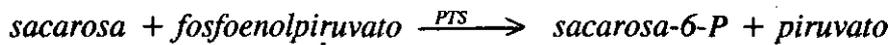
1.3.2. PRODUCCION DE ACIDO.

La vía que utiliza S. mutans para el metabolismo de los azúcares es la glucolítica, considerándose como fermentadores homolácticos ya que convierten más del 90% del carbohidrato en ácido láctico; esto ocurre fundamentalmente en presencia de un exceso de glucosa, mientras que cuando la fuente de glucosa es limitada produce cantidades significativas de ácido fórmico y acético (239).

La principal fuente de energía durante el crecimiento de S. mutans es la sacarosa, y sólo una pequeña cantidad de ella es desviada hacia la síntesis de polisacáridos extracelulares, y en menor grado intracelulares. A su vez, a bajas concentraciones de sacarosa este microorganismo puede utilizar dichos polisacáridos metabolizándolos hasta producir ácido láctico siendo éste un mecanismo que mantiene la producción de ácido aún en períodos de escasez de azúcares, lo que aumenta el potencial cariogénico de dicha bacteria. Si comparamos la disminución de pH producida por distintas bacterias cuando crecen en un determinado medio, las colonias con el pH terminal más bajo son las de S. mutans (181).

Hoy día se sabe que este microorganismo utiliza la sacarosa a velocidad significativamente mayor que otras bacterias tales como S. sanguis, S. mitis, o A. viscosus (174) y esto parece ser debido a que tiene dos mecanismos de transporte, operando uno de ellos en condiciones normales y otro en casos de cantidades elevadas de sacarosa y pH más bajo.

En condiciones de crecimiento lento, el transporte de azúcar es mediado por el sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasa dependiente (PTS) específico para la sacarosa. Una vez que está la sacarosa fosforilada es hendida por una hidrolasa sacarosa-6-fosfato (SPH) dando lugar a glucosa-6-fosfato y fructosa.



La síntesis de SPH es independiente del sustrato aunque tiene una gran afinidad por él, mientras que la PTS puede ser inducida en un medio que contenga sacarosa (181). SLEE y TANZER observaron que la actividad PTS sacarosa puede ser inhibida por la rafinosa y la lactosa (213).

Además de este sistema para el transporte de la sacarosa, HAMILTON y MARTIN en 1982, estudiando un mutante de *S. mutans* cepa DR0001, pusieron de manifiesto la existencia de una vía de transporte alternativa que daba lugar a tasas de crecimiento rápidas con exceso de glucosa y a valores de pH bajos. Ellos sugirieron que esta actividad de transporte alternativa estaba ligada a algo similar a una bomba de protones, mediada por una ATPasa "expulsora" de protones (99).

Una vez está la sacarosa en el interior de la célula, *S. mutans* posee niveles significativos de invertasa, enzima que cataliza la hidrólisis de las uniones glucosídicas de la sacarosa dando lugar a cantidades equimolares de glucosa y fructosa que serán metabolizadas a ácido láctico en su mayor parte (144).

Aunque existe una invertasa extracelular, se localiza mayormente dentro de la célula calibrándose su peso molecular en 47.000-48.000, y presentando un Km para la sacarosa de 35-140 mM. Actualmente parece ser que es activado por fosfato inorgánico, siendo éste un posible mecanismo de regulación en el metabolismo de la sacarosa (181).

Dada la gran importancia del metabolismo glucidolítico de *S. mutans* en la

producción de ácidos en la placa, con la consecuente desmineralización del tejido dentario, muchas de las investigaciones se dirigen a inhibir o alterar el metabolismo de los carbohidratos, siendo muy recientes los trabajos de **BROWN** y **BEST** sobre los efectos de la sacarina en el metabolismo de la sacarosa (25), los de **TWETMAN** y col. sobre la interferencia en el transporte de azúcares mediado por la lisozima ó el importante papel que parece jugar el sistema de la peroxidasa salivar en la regulación del metabolismo de los estreptococos orales (232, 159).

2. PODER PATOGENO Y VIRULENCIA DE S. mutans.

2.1. CARIES DENTAL: PATOLOGIA.

La caries dental es una enfermedad común y raramente peligrosa, pero extremadamente frecuente, que está presente en casi todas las bocas y que representa un considerable costo socioeconómico.

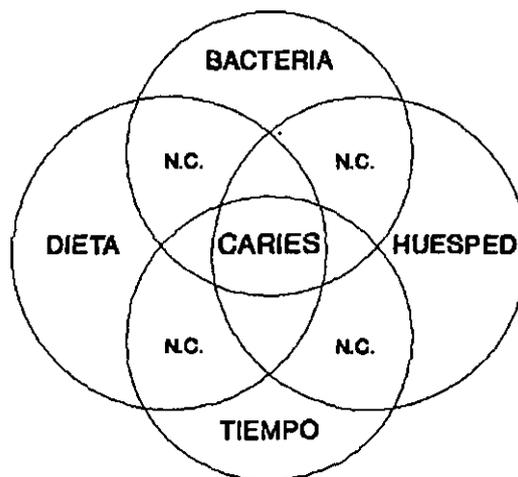
Es considerada comúnmente como una enfermedad infecciosa que causa la destrucción localizada de los tejidos dentales duros debido a los ácidos producidos por las bacterias que existen adheridas a los dientes. Este efecto puede afectar al esmalte, la dentina e incluso la pulpa. Clínicamente se caracteriza por un cambio de color, pérdida de translucidez y descalcificación de los tejidos afectados. A medida que avanza el proceso, se destruyen los tejidos y se forman cavidades (88,163).

Son varios los factores que intervienen en la formación de la caries dental por lo que se dice que es una enfermedad multifactorial. Algunos de estos factores son: la salud general del individuo, afecciones hereditarias, defectos de calcificación de los dientes, dieta... Este último es uno de los factores que más influencia tienen sobre la aparición de la caries, pues ejerce una acción decisiva tanto en el proceso

de calcificación del diente, como en la posible desmineralización del mismo.

KEYES en 1962, representó en forma esquemática los tres factores principales requeridos para el desarrollo de la caries, como 3 círculos que se superponen parcialmente (126). Un círculo representa el agente (microorganismo), otro el medio ambiente (sustrato), y el tercero el huésped (diente). **NEWBRUN** en 1989 agregó posteriormente un cuarto factor, el tiempo lo que significa que para que se produzca la caries, los parámetros representados por los otros tres círculos deben no solo estar en funcionamiento al mismo tiempo, sino que el tiempo mismo constituye un factor en el desarrollo de la caries (180).

El esquema siguiente representa, los parámetros involucrados en el proceso cariogéno expresando que los microorganismos cariogénicos (los agentes) deben actuar sobre un sustrato cariogénico para crear un ambiente que favorezca la producción de caries, y que este fenómeno se producirá durante un período en el cual el diente susceptible (el huésped) será atacado.



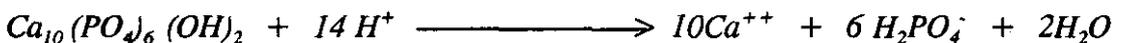
Más específicamente se puede decir, que la caries dental es un proceso patológico provocado por una desmineralización localizada de la estructura

inorgánica del diente, seguida de la desintegración de los componentes orgánicos, lo que origina la cavidad dental. Esto implica la existencia de un desequilibrio entre las fuerzas mineralizantes (acción a través del metabolismo corporal), y las desmineralizantes que actúan en el medio ambiente de la boca.

La verdadera disolución de la materia inorgánica de la estructura dentaria es producida por los ácidos orgánicos que son subproductos del metabolismo bacteriano de los hidratos de carbono de la dieta (122). Cuando la concentración de iones H^+ sobre la superficie del diente aumenta como resultado de la fermentación de los azúcares o por parte de enzimas bacterianas de la placa dental, la hidroxiapatita del esmalte comienza a disolverse al igual que hará la dentina en estados posteriores del proceso de la caries. De una manera simplificada este proceso de descalcificación puede representarse según la reacción que tiene lugar a un pH aproximado de 5,5:



Esta reacción representa el primer estado de desmineralización donde solo la décima parte del calcio se solubiliza, y si la reacción no continúa es posible que el fosfato cálcico pueda volver a transformarse en hidroxiapatita pues la reacción es reversible. Al aumentar la concentración de ión hidrógeno, por ejemplo a $pH = 5.2$, el fosfato tricálcico se escinde en fosfato dicálcico y agua y con pH más bajo (menor de 5.0), la apatita se disuelve completamente:



La materia orgánica es destruída luego por medios mecánicos o enzimáticos una vez ha comenzado la desmineralización. Con frecuencia a medida que aumenta la ingestión de azúcares, aumenta la formación de ácidos produciéndose la desmineralización del diente. Cuando la tasa de formación de ácido y la velocidad de desmineralización es mayor que las fuerzas tamponantes que determinan la

remineralización, el esmalte del diente se corroe y finaliza originando la cavidad en el diente.

En clínica el esmalte sano aparece duro y brillante; consiste en cristales de hidroxiapatita dispuestos de manera ordenada formando prismas y espacios interprismáticos. Si se produce la disolución del mineral, los cristales disminuyen y esto origina un agrandamiento de los espacios interprismáticos. Al incrementarse la porosidad del esmalte gradualmente, se hace menos traslúcido, siendo uno de los primeros síntomas visibles de la caries, la manifestación de una opacidad blanquecina en el esmalte, clásicamente llamada "lesión de mancha blanca".

Después de una semana no pueden observarse cambios macroscópicos. A nivel ultraestructural sin embargo, hay distintos signos de disolución directa que es el resultado de una disolución parcial de los cristales periféricos individuales que conducen a un agrandamiento uniforme de los espacios intercrystalinos. Un detallado examen de las secciones del esmalte en microscópico de luz polarizada muestra, un leve incremento en la porosidad del tejido que indica una pérdida de mineral extremadamente modesta.

La evolución de estas lesiones puede ser una lesión del esmalte hacia la desmineralización total o puede producirse una remineralización. Esta puede originarse parcialmente, antes de comenzar la cavitación del esmalte. Una vez la lesión está establecida, no se puede dar un proceso de remineralización ni por tanto tomarse medidas preventivas.

2.2. PAPEL DE S. mutans EN LA CARIES DENTAL.

Existen hoy día considerables evidencias que implican a S. mutans como el

agente infeccioso más importante en la iniciación de la caries dental (154). Para llegar a esta afirmación que parece en sí muy sencilla, son muchos los trabajos e investigaciones que se han tenido que realizar (156,157). Nos basamos en amplios estudios efectuados en animales experimentales, mientras que en el hombre solo se han podido realizar, como es obvio, estudios epidemiológicos.

La primera experiencia transcendental fue la de **ORLAND** y col. en 1954, demostrando que las ratas libres de gérmenes no desarrollaban caries aún cuando eran alimentadas con dietas que producían dichas lesiones. Desde entonces han sido numerosos los trabajos realizados con distintos animales provocando caries dental utilizando distintas cepas de *S. mutans*. Se demostró que este microorganismo generaba en casi todos los casos caries en superficies lisas y en fisuras del diente del animal tratado (171), pudiéndose observar que los niveles de *S. mutans* estaban correlacionados con la caries. Otro factor importante que fue aclarado ha sido la influencia de la dieta en las lesiones de caries, ya que ésta afecta al potencial patógeno de los microorganismos, demostrándose que la sacarosa era el azúcar más cariogénico (228,188).

Como ya habíamos comentado, la relación de *S. mutans* con la caries en el hombre tiene únicamente una base epidemiológica. En 1974, **GIBBONS** y col. estudian la colonización de las superficies proximales en los molares de niños entre 9 y 13 años de edad, observando que el número de superficies infectadas con *S. mutans* está relacionado con la experiencia de caries de esa población (85).

En 1975, **LOESCHE** y col. observan que hay una asociación significativa entre los niveles de *S. mutans* en placa y caries ($p < 0,001$), mientras que no existía correlación con los niveles de dicho microorganismo en la saliva. Esta última afirmación será discutida por posteriores investigaciones, como la realizada en 1981 por **KOHLER** y col. que relacionan los niveles de *S. mutans* en saliva con la prevalencia y proporción de este microorganismo en superficies seleccionadas

(151,132). Siguiendo cronológicamente algunos de los estudios realizados, es importante citar que el aumento de susceptibilidad a la caries observado en pacientes con xerotomía debido a la irradiación de cabeza y cuello se asocia a una elevada proporción de S. mutans en placa interproximal. Así mismo, en pacientes con bandas de ortodoncia, los niveles de S. mutans en placa fueron superiores para aquellos con una prevalencia de caries menor.

Los estudios que relacionaban la prevalencia de caries con los niveles de S. mutans en placa y saliva fueron completados con otros trabajos que realizaban un seguimiento de la incidencia de caries y los niveles de infección de dicho microorganismo durante un período de tiempo determinado. Los resultados obtenidos relacionaban claramente estos dos parámetros (29,152,249).

La relación de la dieta con la caries ha sido más dificultosa de estudiar en la población humana, pudiéndose determinar mediante algunas experiencias "in vitro" (39), o por medio de estudios epidemiológicos entre los que se pueden citar el estudio **HOPEWOOD** en Australia, realizado sobre niños institucionalizados alimentados con dietas desprovistas de hidratos de carbono refinados, o el famoso estudio **VIPEHOLM** en Suecia, llevado a cabo en un hospital psiquiátrico, en donde se estudió la influencia de diversos tipos de dieta en seis grupos experimentales y uno control. Los resultados manifestaron que dietas azucaradas, especialmente aquellas que contenían sacarosa, influyen directamente en la actividad de caries (181).

La relación de una dieta rica en azúcares, con los niveles de S. mutans en placa y saliva, ha quedado demostrada por algunos trabajos, como el **KRISTOFFERSSON** y **BIRKHED** en 1987, que observaron una disminución de este microorganismo en boca al disminuir los azúcares en la dieta durante un período de tiempo de seis semanas (141).

2.2.1. FACTORES DE VIRULENCIA.

Una vez que ha sido establecida la relación de S. mutans con la etiología de la caries, queda por considerar cuáles son los factores o características que posee este microorganismo, que lo hacen responsable de las lesiones de caries. Para estudiar los factores de virulencia son muy útiles los trabajos realizados con mutantes de este microorganismo, los cuales pierden una o más propiedades características, posiblemente las responsables de los procesos patogénicos, siendo utilizados como instrumento para analizar dichos mecanismos.

La adherencia de S. mutans a la superficie del diente tiene dos fases: una interacción inicial reversible entre el microorganismo y la superficie del diente, que es normalmente precedida de la formación de una película de origen salivar, debiendo ser dicha interacción suficientemente firme como para resistir las fuerzas de flujo salivar y los movimientos musculares que se producen en el hábitat oral; y otra fase irreversible que depende fundamentalmente del glucógeno insoluble, que se sintetiza a partir de la sacarosa gracias a la acción enzimática de la glicosiltransferasa (GTasa) (95).

FREDMAN y TANZER aislaron mutantes de S. mutans 6715 que perdían la capacidad de adherirse a las superficies de alambre, aunque producían cantidades mayores de glucanos extracelulares solubles; estas cepas sintetizaban menores cantidades de GTasa extracelular (76,97) y su adherencia a superficies lisas de los dientes, así como la capacidad de producir caries en estas superficies, estaba disminuida cuando se inocularon en ratas gnotobióticas (227). Sin embargo estos mutantes sí producían caries en los surcos aunque de menor intensidad. Estos resultados indicaron que la adherencia producida por la síntesis de glucanos insolubles a partir de la sacarosa entre la célula bacteriana y una superficie era un

factor importante en la patogénesis de la caries dental (226).

Por el contrario, han sido aislados mutantes que producían niveles elevados de GTasa, siendo mayor su capacidad de adherirse a superficies duras y por lo tanto de producir más lesiones de caries (201). En un trabajo publicado en 1974 por NALBANDIAN y col. se sospechó que las estructuras filamentosas o fimbrias denominadas "fuzzy coat" o "abrigo velloso" que recubren la superficie de S. mutans, puedan contener a los receptores de glucanos responsables de inducir la aglutinación de dichos polisacáridos.

De esta forma se ha demostrado una clara correlación entre cariogenicidad, adherencia "in vitro", y síntesis de glucanos insolubles por S. mutans. Por esto, un modo de prevenir la caries dental podría ser la interrupción del proceso de adherencia del glucano insoluble a la superficie dental (95).

Sin embargo la síntesis de glucanos no es lo único que determina la virulencia. En presencia de sacarosa S. mutans produce grandes cantidades de polisacáridos intracelulares, los cuales pueden ser metabolizados durante los períodos de tiempo en que no consumen carbohidratos, siendo éste un importante factor de virulencia.

De igual forma, la gran capacidad que presenta S. mutans para producir ácido, fundamentalmente ácido láctico, hace que sea uno de los microorganismos que bajan más el pH de la placa dental, produciendo una desmineralización del esmalte dentario. Es por ello que dietas ricas en sacarosa, siendo éste el principal sustrato para el metabolismo de S. mutans, confieren a este microorganismo una ventaja selectiva (95,51).

2.3. UTILIZACION DE MODELOS ANIMALES EN EL ESTUDIO DE LA CARIES DENTAL.

La caries dental se ha convertido en uno de los principales objetivos de la investigación oral, debido a su aumento en los países industrializados. Para estudiar la etiología de la enfermedad y diseñar métodos efectivos de prevención se han utilizado diversas estrategias de investigación. Por un lado se han utilizado bocas artificiales, realizadas con diseños más o menos complejos, lo cual ha permitido resolver en parte las dudas planteadas sobre determinados aspectos de este tipo de alteraciones, como por ejemplo la composición del ecosistema de la placa y las interacciones entre sus constituyentes o los productos metabólicos formados y sus efectos sobre la superficie del esmalte.

El uso de estos modelos es una estrategia aceptada para trabajar con sistemas complejos, según NOORDA y col. 1986 (185). La estimulación de algunos de los componentes del sistema, bajo circunstancias que se aproximen a las condiciones "in vivo", proporciona la oportunidad de estudiar su efecto sobre el resto de los componentes del sistema, bajo condiciones estandarizadas, que se asemejan a la situación biológica. Su aspecto negativo es que incluso los modelos más sofisticados no pueden reflejar la situación exacta que aparece en una boca humana.

El progreso en la investigación dental ha sido en parte debido a la utilización de modelos animales. La existencia de diferencias interespecie en los efectos de diversas variables ambientales hacen difícil la comparación entre los resultados encontrados en animales y en humanos. Pese a ello, la amplia variabilidad en el número y severidad de las caries producidas, hace a este tipo de investigación conveniente para probar toda una serie de variables de investigación y evitar el exceso de investigación en humanos.

El uso de la rata como modelo para el estudio de la caries dental está plenamente establecido (177), habiéndose reconocido su importancia como sistema "in vivo" para la evaluación de la cariogenicidad de los alimentos. Los animales son a veces inoculados con bacterias cariogénicas, como S. mutans OMZ 176, y

Actinomyces viscosus Ny-1 (59), para asegurar la formación de caries o para cuantificar su disminución, cuando se realizan tratamientos anticariogénicos.

2.3.1. EFECTO DE DIETAS CARIOGENAS.

Una aportación nutricional es de considerable importancia a la hora de trabajar con modelos animales de caries (183). Si se selecciona una dieta adecuada, los efectos sobre la caries del compuesto a investigar, serán más valorables al poder considerar un efecto cariogénico local y no una respuesta sistémica indirecta.

Los modelos animales se han utilizado para estudiar el potencial cariogénico de diversos alimentos con azúcar (179), así como el efecto anticariogénico de las proteínas (117,193), o de los ácidos grasos. La sustitución del azúcar fácilmente fermentable, en dulces y otros alimentos por edulcorantes no acidogénicos y/o no cariogénicos se ha considerado generalmente como una valiosa contribución a la prevención de la caries (106,113,121).

El grado de acidogenicidad de un alimento, de una dieta o de un edulcorante, puede determinarse por tests microbiológicos "in vitro" o por medidas del pH de la placa dental tanto en condiciones "in vivo" como "in vitro". La medida del pH de la placa como índice de la cariogenicidad de los alimentos presenta algunas objeciones. La presencia en éstos de diversos factores que reducen o incrementan la solubilidad del hidroxapatito de los dientes, puede modificar el efecto de los ácidos sobre la placa. La demostración de que un sustitutivo de un azúcar no es cariógeno debe basarse en pruebas clínicas por lo que es indispensable el máximo conocimiento que pueda acumularse en experimentos animales. Este tipo de experimentación previa se realiza preferentemente en ratas.

Según REYNOLDS y BLACK 1987 (194), el chocolate con leche y los caramelos son menos cariogénicos que cantidades equivalentes de sacarosa o dietas con sacarosa lo que confirma los estudios de NAVIA y col. 1983 (179), con chocolate con leche. En el mismo trabajo se indica que el contenido en proteínas, fósforo y calcio no varió en la saliva de los animales frente a sus controles, por lo que el aumento de caries en las que consumían sacarosa no debe asociarse a una disminución en la protección por la saliva, sino a un efecto tópico relacionado con la composición de las dietas probadas. También sugiere que la proteína (caseína), y/o la grasa presente en la dieta podría ser responsable de la disminución de caries.

Se sabe que el almidón gelatinizado por cocción es un sustrato cariogénico para la rata y la combinación de almidón y sacarosa en una dieta animal es más cariogénica que cada uno de ellos por separado (73). Un requisito para que el almidón sea cariogénico, es su digestión por la α -amilasa salivar, que produce cantidades considerables de hidratos de carbono de bajo peso molecular fermentables, lo que demuestra la relación de su cariogenicidad con el tiempo de permanencia en la boca.

HARPER y col. 1986 (104), han evaluado la cariogenicidad de diversos tipos de quesos, basándose en la influencia de su textura, tiempo de contacto, así como presencia de grasas y ácidos grasos libres, incremento del aclaramiento salivar (y de su capacidad tampón), prevención de desmineralización y/o promoción de remineralización por caseína y/o fósforo, calcio.

Desde que se introdujo la dieta cariogénica 580 por STEPHAN y HARRIS 1955, y la dieta 2000 por KEYES y JORDAN 1955, ambos tipos en su composición original o con diversas modificaciones se han utilizado en múltiples estudios sobre caries en hámster, ratas, gerbils o ratones.

Aunque ambas dietas han probado su utilidad científica para los experimentos

sobre caries a corto plazo, no suelen ser muy adecuadas para el estudio de algunos sucedáneos de azúcares (107). La sustitución de la sacarosa por polioles en concentraciones superiores al 5 - 10%, retrasó mucho la ganancia de peso. Los animales sufren diarreas severas y a menudo no sobreviven el período experimental por lo que se han investigado otros tipos de dietas para obviar este problema. Estos autores han descrito otra dieta base denominada SSP, que ha sido ampliamente utilizada posteriormente.

Una objeción a estos modelos es que algunas veces impiden el adecuado crecimiento del animal. Para evitarlo las ratas reciben un suplemento nutritivo que puede influir en la formación de caries, lo que añade una nueva incógnita en estos estudios. Este método presentó diversos problemas sobre la salud general y la ganancia de peso de las ratas intubadas, consiguiéndose peores resultados que aquellos obtenidos en ratas que recibieron un suplemento alimenticio normal, (204).

Las variables nutricionales pueden dar lugar a alteraciones en el esmalte dental y a cambios en la función de las glándulas salivares. **MENAKER Y NAVIA 1974 (170)**, han indicado que la malnutrición proteica incrementa la susceptibilidad a la caries y origina una marcada disminución en el peso de las glándulas salivares, contenido de proteínas y volumen de saliva estimulado por pilocarpina.

Un flujo salivar disminuido puede afectar no sólo a la ingesta de alimentos y de agua, sino también a la extensión del tiempo de comidas, a la retención de los alimentos, a cambios microbiológicos y a cambios en la maduración del esmalte, factores todos ellos que aparecen asociados con la caries. También **REYNOLS y DEL RIO 1984 (193)**, han indicado que las ratas con una concentración de proteínas disminuida en saliva estimulada por pilocarpina, presentan un incremento en su susceptibilidad a las caries.

Se han diseñado máquinas y dispositivos para controlar la frecuencia de las

comidas y estudiar su efecto sobre la caries (137). Esta técnica de alimentación programada se realiza usando una máquina alimentadora que hace accesible a los animales cantidades preestablecidas de dieta a intervalos determinados lo que incrementa el control y flexibilidad de dicho tipo de experimentos.

Esto permite estudiar interacciones entre diferentes tipos de alimentos consumidos en diversas secuencias de administración, lo que intenta reproducir los patrones de alimentación humana. **BOWDEN** y **FIRESTONE** (72), han descrito, la relación de la caries con la frecuencia de ingestión de azúcar y con los intervalos de tiempo entre las colonias.

EDGAR y col. 1982 (59), estudiaron el posible efecto anticariogénico de la adición de quesos y cacahuete a una comida base. Para ello aplicaron 22 comidas/día de dieta 2000, de las cuales 12 eran de queso o cacahuetes, en los respectivos grupos experimentales. El queso dio resultados positivos, mientras que los cacahuetes no; posiblemente porque fueron administrados en polvo. En este trabajo se describe que los animales que sólo recibieron dieta 2000, aparecieron subalimentados cuando se compararon con los que recibieron queso o cacahuetes, aunque han comprobado que la alimentación "ad libitum" con dieta 2000, implica un crecimiento más rápido y un mayor índice de caries que el visto en este estudio. El efecto cariostático esta acompañado por una reducción en el número de S. mutans.

Diversos autores han utilizado la dieta 2000 clásica sin que se produzcan problemas en los animales utilizados. **HATTAB** en 1984 (105) estudió en ratas, el efecto de la aplicación tópica de alginatos con fluoruro, o de fluoruros y clorhexidina sobre la caries dental frente a placebo, siendo ambos tipos de tratamientos efectivos en la prevención de la caries.

AFSETH y col. 1984 (2), han estudiado en ratas el efecto de aplicaciones

tópicas de ión cúprico en combinación con fluoruros presentes en el agua de bebida, lo que incrementa considerablemente el efecto cariostático obtenido para cada uno de ellos por separado.

GRON y col. 1987 (91), usando syrian hámster han realizado comparaciones entre la diferente efectividad de repetidas aplicaciones tópicas FNa o FNH_4 en diferentes condiciones de aplicación de ambos derivados del flúor.

A veces se han utilizado dietas incluso más ricas en sacarosa, como la dieta Stephan 580, que contiene un 10% de sacarosa más que la 2000, (sacarosa 66%, leche en polvo 32%, polvo de hígado 2% y fluoruro 25-30 mg/kg.), y ha sido usada por LORMEE y col. 1986 (155), para el estudio morfológico e histoquímico de las caries presentes en la dentina.

Otras veces se han utilizado variantes de la dieta 2000 con menor contenido de sacarosa, como la 2022 que contiene 28% de sacarosa y 28% de glucosa, para el estudio de varios tipos de antisépticos orales sobre la formación de la placa y el consecuente desarrollo de la caries en ratas, habiéndose observado una disminución del número de caries.

3. Streptococcus mutans Y PREVENCIÓN DE LA CARIES.

No hay duda de que la caries es una infección, sin embargo el enfoque que se le ha dado ha variado a lo largo del tiempo. Para MILLER, autor de la teoría quimioparasitaria, la placa dental es considerada como una estructura patógena no diferenciándose de un individuo a otro, lo cual nos llevaría a pensar que el único control posible de la enfermedad estaría en la eliminación mecánica.

Actualmente recibe más apoyo y credibilidad la hipótesis sobre la placa específica. De acuerdo con dicha hipótesis, la mayoría de las lesiones son debidas a especies bacterianas específicas. Esto nos sugiere el desarrollo e implantación de procedimientos preventivos, que en el caso de las lesiones de caries apuntan a S. mutans por ser el microorganismo con mayor poder patógeno (181).

En el amplio campo de la prevención, S. mutans está implicado en dos sentidos: uno de ellos es la utilidad de dicho microorganismo en los test de control de la actividad de caries (66); y el otro consiste en los métodos utilizados hoy día para prevenir la colonización de las superficies dentales por S. mutans. Nos referimos a agentes antimicrobianos tales como los antibióticos, antisépticos, enzimas y como no, al estado actual de una posible vacuna contra la caries (51).

El control de actividad de caries es considerado de gran valor para seleccionar los grupos de riesgo en grandes muestras de población. Esto permite la aplicación adecuada de diversas medidas preventivas. Han sido por tanto, muchos los tests de actividad de caries que se han venido utilizando desde los años cincuenta. Actualmente se están utilizando tests como la evaluación de la capacidad buffer de la saliva (77), o la cuantificación de S. mutans. La importancia de los recuentos de este microorganismo en saliva se debe a que están corroborados por estudios epidemiológicos que señalaban que el aumento del porcentaje de S. mutans en la saliva estaba en función con el incremento de caries.

En 1978, KLOCK y KRASSE (129) comparan diversos tests de actividad de caries encontrando que solo la frecuencia de caries y los niveles de S. mutans en saliva mostraban una correlación significativa con la actividad cariogénica. KOHLER y col. 1981 (132), observan una relación entre los niveles de S. mutans en saliva y la prevalencia de dicha bacteria en las superficies dentales, encontrando que la infección de esta especie precedió al desarrollo de lesiones de caries. Estos resultados fueron confirmados por ZICKERT y col. en 1983 (259), ilustrando de

esta forma el valor del tratamiento antimicrobiano y por **STECKSEN-BLICKS** en 1985 (221).

Como se sabe hay una serie de agentes antimicrobianos que son utilizados actualmente para prevenir la colonización de las superficies dentarias por *S. mutans*. Dentro de estos agentes citamos la clorhexidina, yodo, antibióticos, enzimas y agentes inespecíficos como los fluoruros (248). A continuación estudiaremos el estado actual del agente antibacteriano elegido en este estudio.

3.1. FLUOR.

Con las investigaciones de la reacción entre el fluoruro de calcio y el ácido sulfúrico, fueron **MARGGRAF** en 1768 y **SCHEELE** en 1771 quienes informaron que esta reacción tenía como resultado la liberación de un ácido gaseoso y es este último quien merece el crédito del descubrimiento del flúor.

En 1886 **MOISSAN** logró liberar el flúor gaseoso por primera vez a través de la electrólisis del ácido hidrofluórico en una célula de platino y a partir de 1930 comenzaría la mayor parte de la investigación sobre este elemento.

Fue **CHURCHILL** en 1931, quien estableció con rigor la relación caries-flúor. Las investigaciones ulteriores en animales de experimentación confirmaron el hecho de que no sólo el fluoruro era responsable del fenómeno de fluorosis dental, sino que el efecto se producía efectivamente durante el desarrollo, que coincide con el período de formación del diente (191).

DEAN comenzó en 1942 una serie de investigaciones para establecer la relación entre la concentración de flúor en el suministro de agua y la prevalencia

de fluorosis dental, y los resultados indicaron una relación directa entre ambos factores, aumentando la gravedad de fluorosis dental con las mayores concentraciones de fluoruro en el suministro de agua comunal.

RUSSELL y ELVOVE en 1951 informaron que la presencia de flúor en el agua de consumo durante el período de formación del diente produce una marcada disminución en la prevalencia de caries dental, estando el grado de efectividad directamente relacionado con la concentración de fluoruro hasta por lo menos alrededor de 1,5 ppm. Asimismo HODGE y SMITH en 1954 notaron que había una incidencia de fluorosis dental, asociada con la concentración de fluoruro en el agua de consumo de menor de aproximadamente 2 ppm. Los beneficios preventivos del fluor aumentan con el incremento de la concentración de fluoruro en agua hasta aproximadamente 1,5 - 2 ppm por encima del cual no se evidencian más aumentos en el grado de protección (191).

Estudios sobre las dosis tóxicas del flúor, establecen como dosis letal aguda en humanos de 2,5 a 5 gramos o aproximadamente de 5 a 10 gramos en el caso de fluoruro de sodio (195,252).

3.1.1. MECANISMO DE ACCION DEL FLUOR.

El flúor es un agente antibacteriano inespecífico que ejerce un efecto inhibitorio sobre los procesos enzimáticos bacterianos involucrados en el metabolismo de los hidratos de carbono (102,103,181). Hoy día se consideran tres mecanismos de inhibición de caries por flúor y normalmente más de uno de ellos está implicado:

1. Incremento en la resistencia del esmalte a la solubilización por ácidos como

resultado de un aumento de la concentración de flúor en la superficie externa del esmalte (1,64).

2. La capacidad del flúor para remineralizar esmaltes desmineralizados.

3. Efecto antibacteriano en el crecimiento de la placa, síntesis de glucano, producción de ácidos y polisacáridos extracelulares necesarios para la adhesión de la placa a la superficie dental y solubilidad de los depósitos de fosfato cálcico dentro de la placa (11,62).

3.1.2. TRATAMIENTOS FLUORADOS EN LA PREVENCIÓN DE LA CARIES.

En la interacción ácido-diente susceptible-microorganismo acidogénico, la prevención de la caries puede intentarse mediante dos tipos de enfoques:

1. Incrementando la resistencia de los dientes a la disolución. La ingestión de flúor produce una acentuada reducción de la incidencia de caries por medio de la incorporación de aquel al esmalte en formación, que por ese mecanismo se hace más resistente al ataque cariogénico. La fluoración de las aguas de consumo es el método más práctico para proporcionar flúor a la población.

2. Previniendo la formación o procediendo a la eliminación inmediata de los agentes que atacan el medio dental.

Existen dos formas de administrar el flúor que son las siguientes:

*** Fluoruros por vía general.**

Con el nombre de terapia sistémica con flúor, se conocen una serie de procedimientos por su ingestión en particular durante el periodo de formación de los dientes. Esto es, la fluoración de las aguas, aunque existen otras vías de administración sistémica de flúor, como la adición de éste a la leche, cereales, sal y el uso de pastillas y soluciones de flúor.

Hace casi 50 años, DEAN y col. 1942, demostraron una relación inversa entre la concentración de flúor en agua de bebida y los datos sobre caries en niños, obtenidos de 21 ciudades de Estados Unidos. Desde entonces varios estudios epidemiológicos han confirmado la idea de este autor. En todos esos estudios, se observó una reducción del 50 % en el número de caries por niño, en poblaciones que consumían agua de flúor (1ppm). El flúor que se ingería durante la formación del diente se incorporaba al esmalte dental además de reducir la solubilidad de éste.

Así pues la fluoración de las aguas reduce la incidencia de caries en un 50 a 60 %. La concentración total de flúor en el agua no debería ser mayor que la necesaria para producir la más débil forma de fluorosis detectable clínicamente en no más del 10 % de los niños. La concentración necesaria para causar este efecto es de alrededor 1,0 ppm, reduciendo la caries un 60 % (14).

Desde que se vió que la cantidad de flúor que se ingiere con el agua varia con la cantidad de ésta que se consume, y ésta a su vez con el clima, los investigadores establecieron una fórmula que calculara la concentración óptima de flúor. Su aplicación dió como resultado la recomendación de una concentración de 0,7 ppm para zonas con una temperatura máxima promedio de 30 grados centígrados y 1,1 ppm para regiones cuya temperatura máxima fuera de 10 grados centígrados.

Los verdaderos mecanismos responsables de las propiedades cariostáticas del fluoruro sistémico, no se comprenden por completo. Generalmente se está de acuerdo en que el beneficio es atribuible, principalmente a la incorporación del

fluoruro en la apatita del esmalte durante el periodo de la formación y maduración temprana de éste. Por esta razón, la influencia benéfica del fluoruro sistémico provisto como fluoración comunal frecuentemente ha sido considerado como un efecto permanente que persiste durante la vida de la dentición.

Se realizaron cuatro estudios que sirvieron para documentar la seguridad y la eficacia de la fluoración comunal, como medio que aportaba una protección parcial contra la caries. Estos fueron:

- * GRAND RAPIDS, 1945*
- * NEWBURGH-KINGSTON, 1945*
- * BRANTFORD, 1945*
- * EVANSTON, 1946*

Estudios posteriores han aportado que los adultos que han residido en una zona con agua de consumo fluorado, siguen recibiendo los beneficios de prevención de la caries a lo largo de la edad adulta, además de los niños. También, que el grado de protección no se produce por igual en todas las superficies dentales expuestas, sino que la fluoración es más efectiva en la prevención de las lesiones de caras lisas y menos en aquellas presentes en puntos y fisuras.

Se entiende que un método eficaz y económico para ingerir flúor sistémico es el uso de aguas fluoradas a una concentración óptima. Esta medida es poco costosa, no requiere la participación activa de los beneficiarios y produce una reducción de caries entre el 50 y 60 %.

** Aplicación tópica de fluoruros.*

Esta expresión se refiere al uso de sistemas que contengan concentraciones relativamente grandes de fluoruro, que se aplican en forma local o tópicamente a las

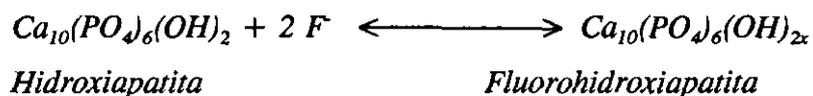
caras erupcionadas de los dientes para prevenir la formación de caries (69,70).

El hallazgo hacia 1940 de que la concentración máxima de flúor en el esmalte se produce en la superficie exterior de este tejido, condujo a la formulación de la hipótesis de que soluciones concentradas de fluoruros aplicadas sobre la superficie adamantina, deberían reaccionar con los componentes del esmalte y contribuir a aumentar la reacción de los dientes a la caries.

Podemos hablar de dos vías para la incorporación de flúor al esmalte. La primera ocurre durante la calcificación del esmalte por medio de la precipitación del ion de fluoruro presente en los fluidos circulantes juntamente con los otros componentes de la apatita. La segunda consiste en la incorporación al esmalte bien sea parcial o totalmente calcificado de iones fluoruros presentes en los fluidos que bañan la superficie del esmalte.

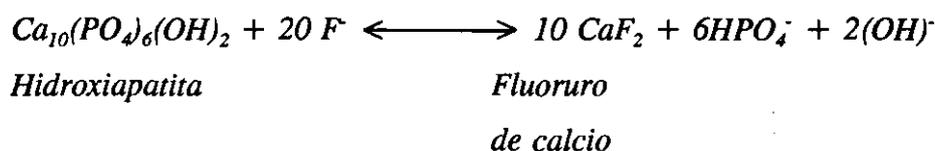
*** Mecanismo de acción:**

Esta bien documentado que el flúor presente en los líquidos orgánicos circulantes, es depositado en tejido calcificados o excretados metabólicamente (53,80). La manera en que el flúor es incorporado a la porción calcificada de los huesos y de los dientes, se demuestra por la siguiente reacción de sustitución:

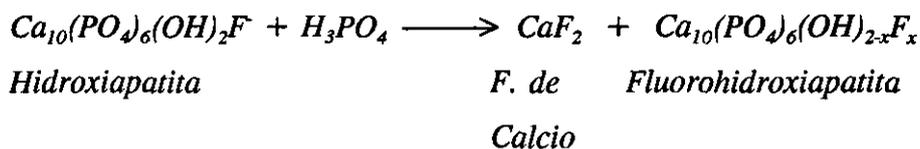


Aunque inicialmente se sugirió que la efectividad del fluoruro de sodio aplicado en forma tópica se debía a la formación de una fluorohidroxiapatita, las investigaciones ulteriores indicaron que si la concentración de fluoruro agregado a la solución de calcio y fosfato se aumenta sensiblemente, se produce una reacción diferente que trae como resultado la transformación de hidroxiapatita superficial en

fluoruro de calcio (198):



Se ha demostrado que el principal producto de reacción del fluorfosfato acidulado (APF) en el esmalte es también fluoruro de calcio, aunque hay una mayor cantidad de fluorhidroxiapatita formada que con los sistemas de fluoruro tópico previos. La reacción química del APF con el esmalte puede escribirse de la siguiente manera:



Se evidencia de lo anterior que el principal producto de la reacción química con tres de los sistemas de fluoruros tópicos NaF, SnF, y APF es la formación de fluoruro de calcio sobre la superficie del esmalte.

Los compuestos de flúor en uso que existen son:

1. **FLUORURO DE SODIO (NaF).** Se usa generalmente al 2 %. La solución es estable siempre que se la mantenga en envases de plástico.
2. **FLUORURO ESTANNOSO (SnF).** Se utiliza al 8 y 10 % en niños y adultos respectivamente.
3. **FLUORFOSFATO ACIDULADO (FPA).** Se usa al 1,2 %, tiene fluorfosfato y su pH es muy ácido, cuyo valor es 2,4 lo que facilita la

movilidad de protones en el esmalte y favorece la formación de fluorhidroxiapatita.

4. FLUORURO DE PLATA (F_{Ag}).

5. FLUORAMINAS. *Su estructura no cíclica de larga cadena rodea al esmalte y disminuye la fuerza de atracción de protones que tiene el esmalte.*

La consecuencia del uso de soluciones concentradas, es que en lugar de una reacción de sustrato en la cual el flúor reemplaza parcialmente los grupos hidroxilo de la apatita, lo que se traduce en una reacción en la que el cristal de apatita se descompone y el flúor reacciona con los iones calcio, formando básicamente una capa de fluoruro de calcio sobre la superficie del diente (109). Afortunadamente, el fluoruro de calcio, es menos soluble que la apatita, y esto explica, al menos en sus líneas básicas, los efectos cariostáticos de las aplicaciones tópicas (200).

Cuando el agente tópico es SnF, los iones flúor y estaño reaccionan con los fosfatos del esmalte y forman un fluorfosfato de estaño que es muy adherente e insoluble. Estos cristales proporcionan protección contra la progresión del ataque carioso siendo, un factor importante en el efecto preventivo total de este compuesto. La reducción de caries obtenida con el uso de SnF y soluciones o geles acidulados de fosfatos fluorados varía entre 30 y 40 %.

Respecto a la acción de las aplicaciones tópicas, se sabe que éstas producen una acentuada elevación del contenido en flúor del esmalte superficial, seguida rápidamente por una pérdida sustancial de dicho flúor hacia el medio bucal (130). Una parte de este sin embargo, permanece retenida más o menos permanentemente y es a ésta a la que se le atribuye la acción cariostática de estas aplicaciones.

La capacidad del fluoruro de inhibir la glicolisis a nivel de la enzima enolasa

se conoce desde hace tiempo y se ha demostrado que las concentraciones de fluoruro de sólo 50 ppm interfieren el metabolismo bacteriano (22,230). Aunque el fluoruro presente en la placa esté en gran medida combinado (y de tal modo no disponible para la acción antibacteriana), se disociara dando fluoruro-ionico cuando disminuya el pH de la placa, es decir se formen ácidos.

La aplicación de estas soluciones hace que la superficie del esmalte sea menos sensible a los ácidos. El ion flúor sustituye a los iones hidroxilo de la hidroxiapatita, y de este modo se consigue cargar de fluoroapatita las capas externas del esmalte. El resultado no solo es una mayor resistencia a los procesos de desmineralización, sino además, una mayor capacidad de captación de los iones de calcio de la saliva, lo cual favorece la remineralización.

Finalmente otro objetivo sobre el que debe incidir la prevención de la caries es la flora bucal. La higiene oral consiste en eliminar mecánicamente y/o la placa dental y para ello se han utilizado detergentes de superficie, antisépticos, urea y fosfatos de amonio para neutralizar la acidez de la placa, flúor y dextranasas que despolimerizan los dextranos de la matriz extracelular de la placa. La administración de antibióticos ha sido objeto de estudios experimentales en los animales; los resultados son contradictorios en cuanto a su eficacia. En el hombre, el uso local y prolongado de antibióticos, puede inducir reacciones alérgicas, favorecer el desarrollo de cepas de resistentes a la penicilina o provocar el crecimiento de microorganismos indeseables.

II. OBJETIVOS

Actualmente existen una serie de evidencias basadas, por una parte en estudios experimentales realizados sobre animales, y por otra en trabajos fundamentalmente epidemiológicos en el hombre que implican a S. mutans como el agente infeccioso más importante en el inicio de la caries dental, especialmente en superficies lisas o no retentivas.

La importancia de la caries dental debido fundamentalmente a su amplia distribución por todo el mundo, hace que sea S. mutans uno de los microorganismos patógenos más interesantes a estudiar en todos los aspectos, y sobre todo en aquellos que puedan estar relacionados de una u otra forma con esta enfermedad.

A la vista de esta breve revisión bibliográfica creemos necesario realizar un estudio profundo sobre este microorganismo con el que aportar un mayor conocimiento de la patogenia de su infección sirviendo esto de base para la aplicación de futuras medidas preventivas.

Por tanto, los objetivos de este trabajo se han enfocado a:

1. Analizar "in vitro" los principales factores de virulencia de este microorganismo que intervienen en el inicio de la caries dental, mediante el siguiente estudio:

* Efecto de varios azúcares en el crecimiento de S. mutans y acidogénesis del medio.

* Estudio de agregaciones bacterianas entre S. mutans y otras bacterias orales patógenas.

* Evaluar la capacidad de adherencia de S. mutans mediante la determinación de los polisacáridos extracelulares producidos.

2. *Estudiar la actividad "in vitro" del flúor frente a S. mutans, mediante la utilización de técnicas estándar: CMI, CMB y curva de letalidad.*
3. *Analizar la influencia de diversos parámetros implicados en el proceso cariogénico, sobre la actividad "in vitro" del flúor: concentración de azúcar y pH ácido, así como la influencia de concentraciones subinhibitorias de flúor en la capacidad de agregación y producción de exopolisacáridos de S. mutans.*
4. *La creación de un modelo animal experimental que reproduzca lesiones cariogénicas mediante el aporte de dietas ricas en hidratos de carbono y que responda a la acción antimicrobiana del flúor administrado bajo dos formas diferentes.*
5. *Aislamiento, identificación y determinación de recuentos bacterianos de S. mutans y Lactobacillus a partir de muestras de saliva.*
6. *Estudiar la relación existente entre los recuentos bacterianos de S. mutans en saliva y la incidencia de lesiones cariogénicas.*

III. MATERIALES Y METODOS

*** MATERIAL Y METODO EMPLEADO EN EL ESTUDIO "in vitro".**

3.1. MICROORGANISMO.

La especie bacteriana utilizada en este estudio fue *Streptococcus mutans* ATCC 25175, cepa procedente de la colección española de cultivos tipo del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad de Valencia).

3.2. CURVA DE CRECIMIENTO.

La cinética del crecimiento bacteriano de *S. mutans*, se estudió a lo largo del tiempo, empleando como medio de cultivo Wilkins-Chalgren (WC).

Se utilizó como inóculo de partida, un caldo con crecimiento de 18 h., obtenido éste al inocular 50 ml de caldo WC con 4 ó 5 colonias e incubar posteriormente a 37°C durante una noche. Se prepararon dos matraces, cada uno de ellos con 50 ml de caldo WC, a los que se añadió la misma cantidad de inóculo madre, aproximadamente 2 ó 3 ml para obtener un inóculo inicial de 10² UFC/ml en cada uno. La curva se desarrolló en dos etapas, para cubrir las 24 horas de crecimiento bacteriano:

* En la 1ª fase, se incubó el matraz que abarcaría las 12 primeras horas.

* En la 2ª fase, el matraz que había permanecido en nevera durante las 12 horas anteriores para impedir el crecimiento bacteriano, se utilizó para valorar las

12 últimas horas. Con el fin de comprobar el inóculo de partida de este segundo matraz, se sembró una alícuota en medio Mitis salivarius antes de ponerlo a incubar.

Los matraces se incubaron a 37°C en baño (UNITRONIC 320 OR) con agitación a 40-50 rpm durante las 24 horas y se sembraron alícuotas, tomadas a cada hora en agar Mitis salivarius para el recuento del número de células viables.

La curva de crecimiento de S. mutans se obtuvo por solapamiento de los resultados obtenidos en cada fase de experimentación, ya que se partió de inóculos iguales.

3.2.1. MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios empleados en conseguir el más idóneo, para obtener un buen aislamiento y crecimiento de S. mutans, son los que se describen a continuación. La técnica no la especificamos ya que se ha expuesto anteriormente y es la misma en todos los casos. Cada curva representada se realizó dos veces para una mayor fiabilidad y comprobación de los datos. Como medios se usaron:

- 1. Agar Mitis salivarius (MSA). DIFCO.*
- 2. Agar Mitis salivarius suplementado con 20% sacarosa y 200 U/ml bacitracina (MSB). DIFCO.*
- 3. Agar Wilkins-Chalgren , enriquecido con un 5% de sangre desfibrinada de oveja (WC) OXOID.*
- 4. Caldo Shaedler. BECTON-DICKINSON.*
- 5. Caldo Wilkins-Chalgren (WC). OXOID.*
- 6. Caldo BHI. DIFCO.*
- 7. Caldo Todd-Hewitt. DIFCO.*

8. Caldo tioglicolato sin indicador o dextrosa. BECTON-DICKINSON.

Todas las placas se incubaron en atmósfera de CO₂ para lo cual se utilizó una jarra de Gas-Pack, donde se introducía una mezcla de gases en las siguientes proporciones: 95% de N₂, 5% de CO₂ (43,81).

3.2.2. LECTURA DE LOS RESULTADOS.

El control de crecimiento se llevó a cabo utilizando los siguientes métodos:

*** Recuento de unidades formadoras de colonias (ufc).**

*Mediante la técnica de recuento de ufc/ml en placa (41). Con tal fin se realizaron diferentes diluciones (10³, 10⁴...) de las alícuotas recogidas cada hora, según el grado de turbidez del caldo. Para el recuento bacteriano se retiraron de cada matraz 100 µl que se añaden a 9.9 ml. de solución salina estéril, contenida en un tubo de ensayo y agitando para homogeneizar la mezcla. Para diluir 10 veces esta primera mezcla, se retiraron 0.5 ml de la misma y se diluyeron seriadamente en tubos de 4.5 ml de solución salina. Cada pase diluía 10 veces el cultivo inicial. A partir de cada dilución se tomaron 25 µl, previa agitación del tubo (vortex) y se extendieron sobre la superficie de la placa que contenía *Mitis salivarius*, mediante un asa de Drigalsky, incubándose a 37°C durante 48 h., en atmósfera de CO₂.*

Cada colonia se desarrolló a partir de una unidad viable formada por uno o varios microorganismos y se desecharon las placas que no contenían entre 30-200 ufc/ml., por la posibilidad de obtener resultados no fiables. Contando el número de colonias de la placa se supo el número de microorganismos viables existentes en 25 µl de la dilución que se sembró, y multiplicando dicho número por el que indicaba

el grado de dilución alcanzado se pudo saber con mucha aproximación, el número de bacterias presentes en la muestra inicial.

*** Espectrofotometría.**

La medida de la masa celular se realizó usando un espectrofotómetro (HITACHI U-1100), y midiendo el valor de absorbancia a una $\lambda = 660$ nm, frente a un control que contenía el medio de cultivo.

3.3. PRUEBAS REALIZADAS CON AZUCARES.

3.3.1. CRECIMIENTO Y CAIDA DE PH.

Se evaluó el crecimiento y capacidad de fermentación de un cultivo puro de S. mutans ATCC 25175, frente a 6 azúcares diferentes.

El estudio se hizo sobre medio WC (sin azúcar) con una concentración de inóculo inicial de 10^5 ufc/ml en fase logarítmica de crecimiento, al que añadimos la solución de azúcar correspondiente. Este previamente se filtró utilizando filtros Millipore (DIFCO), para adicionar al medio en condiciones asépticas.

Los azúcares se incorporaron al caldo en condiciones límite, correspondiente a una concentración final de 1% y sólo en el caso de dos azúcares: glucosa y sacarosa, añadimos el azúcar en exceso a una concentración de 10%. Se empleó como control un cultivo sin azúcar, siendo el valor del pH inicial en todos ellos 7.0. El pH de la mezcla de reacción, se midió antes y después de la adición del azúcar. Estos azúcares fueron:

Glucosa (MERCK).

Sacarosa (PANREAC).

Manitol (PANREAC).

Lactosa (MERCK).

Xilitol (MERCK).

Sorbitol (MERCK).

Las células que servirían de inóculo, se preparon previamente haciéndolas crecer durante 3 pases sucesivos de 8h. cada cultivo, en un medio basal sin sustrato azucarado. Entre cada cultivo, las células se centrifugaron durante, 20 minutos a 2000 rpm, y el pellet así obtenido se incorporó nuevamente a un medio fresco. Tal preparación del inóculo, se hizo con la finalidad de agotar la posible reserva de polisacáridos intracelulares almacenados que pudiera interferir en los resultados experimentales. Durante la cinética bacteriana, se evaluaron 3 parámetros:

- 1. Recuento bacteriano, para determinar el crecimiento celular.*
- 2. Cambios de pH, para determinar la caída de pH, empleando tiras de pH (MERCK).*
- 3. Cambios morfológicos de la bacteria, mediante tinción Gram.*

Mediante este ensayo se estimó, el crecimiento de S. mutans en medios azucarados valorando la capacidad de fermentación que ejerce la bacteria sobre cada uno de ellos, y además la actividad glicolítica o acidogénesis es decir capacidad para producir ácidos y que se calcula mediante la caída de pH. Gráficamente corresponde con el declive originado en la curva de caída de pH desde un valor inicial de pH=7.0.

3.3.2. CAPACIDAD ACIDURICA.

Este ensayo pretendió investigar la capacidad acidúrica de este microorganismo que se define como la resistencia que muestran las bacterias a ambientes ácidos.

El crecimiento bacteriano se hizo en caldo WC, en este caso modificando el pH del caldo de crecimiento. Tanto la bajada como la subida de pH del medio se realizó añadiendo HCl 1N y NaOH 0.01 N, y comprobando posteriormente que el pH deseado en cada caso se mantenía. Se tomó como control un matraz con pH=7.0.

Se evaluaron en estas condiciones, el crecimiento de S. mutans y también las posibles modificaciones del pH inicial, como reflejo de la capacidad acidogénica de esta bacteria a diferentes pH. Con tal motivo, se midieron recuentos celulares, cambios de pH y cambios morfológicos en la bacteria.

El ensayo se llevó a cabo a pH 6.5, pH 5.0, pH 4.0 y pH 3.0. La selección de los mismos se hizo teniendo en cuenta los valores de pH que se alcanzan en estado de reposo, tras un proceso metabólico y en placa dental ácida (115).

3.4. ENSAYO DE AGREGACION Y PRODUCCION DE POLISACARIDOS EXTRACELULARES.

3.4.1. SELECCION DE CEPAS.

El total de las cepas empleadas para establecer el esquema de asociaciones bacterianas fue de 85, de las cuales 72 fueron aisladas a partir de muestras de saliva de ratas utilizadas éstas en el estudio "in vivo", otras 11 procedían de pacientes que presentaron infecciones orales agudas y 2 eran cepas standard

pertenecientes a colecciones tipo. No obstante, el número de cepas aisladas e identificadas en el estudio fue de 150, aunque se tuvieron que establecer criterios de selección que disminuyeran el número de cepas para que éstas no resultaran excesivas; se escogieron las especies bacterianas más variadas con el fin de conseguir un estudio más completo.

Del conjunto de bacterias pertenecientes al grupo control estudiado "in vivo" elegimos 10 y del resto de los grupos tratados fueron 40 para que hubiese representación bacteriana de cada uno de los grupos tratados, siempre elegidos al azar. En cuanto al resto de cepas anaerobias, se seleccionaron diferentes especies bacterianas procedentes de aislamientos clínicos y existentes en la colección de nuestro departamento, incluidos en el estudio por tratarse de microorganismos también presentes en el hábitat oral e implicados en procesos infecciosos orales.

En los ensayos para determinar la producción de PSE se emplearon cepas de S. mutans aislados de ratas Wistar y la cepa control S. mutans ATCC 25175. La relación final de cepas elegidas para realizar ambos ensayos aparecen listados en el cuadro nº 3 (209,210).

3.4.2. PREPARACION DE LAS CEPAS.

72 de las cepas de S. mutans estudiadas para detectar la posible coagregación, se obtuvieron a partir de tubos de WC con glicerol al 50% utilizado éste como medio de conservación de la colección.

Como se encontraban a -20°C fue necesario para aumentar la fluidez del medio dejarlo durante unos minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, con una pipeta Pasteur estéril, se tomó una muestra del cultivo y se inoculó

Cuadro 3. Cepas seleccionadas para realizar el ensayo de agregación y adherencia.

MICROORGANISMO	Nº CEPAS	PROCEDENCIA	LOCALIZACION
<i><u>S. mutans</u></i> ATCC 25175	1	Colección tipo	-
<i><u>S. mutans</u></i>	50	Rata Wistar	Saliva
<i><u>S. mitior</u></i>	2	Rata Wistar	Saliva
<i><u>S. salivarius</u></i>	10	Rata Wistar	Saliva
<i><u>Prevotella melaninogenicus</u></i>	1	Muestra clínica	Bolsa periodontal
<i><u>Prevotella loescheii</u></i>	1	Muestra clínica	Bolsa periodontal
<i><u>Porphyromonas gingivalis</u></i>	1	Muestra clínica	Bolsa periodontal
<i><u>Veillonella alcalescens</u></i>	1	Muestra clínica	Bolsa periodontal
<i><u>Fusobacterium nucleatum</u></i>	3	Muestra clínica	Bolsa periodontal
<i><u>A. actinomycetemcomitans</u></i>	1	Muestra clínica	Bolsa periodontal
<i><u>B. intermedius</u></i>	3	Muestra clínica	Bolsa periodontal
<i><u>Lactobacillus spp</u></i>	10	Rata Wistar	Saliva
<i><u>Actinomyces odontolyticus</u></i> ATCC 17982	1	Colección tipo	-

en tubos con 3 ml de caldo Wilkins-Chalgren. A continuación se realizó la incubación a 37°C, durante 24-48 horas hasta apreciarse crecimiento.

Pasado este tiempo se hicieron aislamientos del caldo de cultivo en medio agar *Mitis salivarius*, efectuándose así mismo la incubación a 37°C durante 48 horas en atmósfera de CO₂, para observar contaminaciones y obtener colonias aisladas.

Las bacterias anaerobias se conservaron en leche descremada a -20°C. Se dieron pases a medios de cultivo adecuados según la especie: Agar Rogosa (197) (para *Lactobacillus spp*), Wilkins-Chalgren suplementado con 5% de sangre (resto de bacterias anaerobias) y agar *Mitis salivarius* (*Streptococcus mutans*). La incubación para bacterias anaerobias, se realizó en jarras Gas-Pack, en atmósfera de anaerobiosis: 85%N₂-10%H₂-5%CO₂, durante 2-3 días a 37°C.

3.4.3. ENSAYO DE AGREGACION.

* Técnica seguida.

El ensayo se realizó según el método de CISAR y KOLENBRANDER (1979) (37). A partir de cada uno de los cultivos en caldo Wilkins-Chalgren, incubados durante una noche a 37°C en la atmósfera correspondiente y previa agitación para homogeneizar su contenido, se tomaron alícuotas que se diluyeron en tubos con solución salina estéril (10², 10³, 10⁴...), se sembraron en los medios adecuados para cada tipo bacteriano y se realizaron recuentos bacterianos posteriores con el fin de evaluar el inóculo de partida.

A continuación, tubos con 5 ml. de cada cultivo de 18 horas, se centrifugaron 3 veces a 2000 rpm durante 10 minutos, realizando lavados sucesivos del pellet en PBS pH: 7.2; finalmente se resuspendían en un buffer de coagregación estéril, que

consiste en disolver 0.001 M TRIS ajustado a pH: 8.0, en 0.1 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 0.15 M NaCl y 0.02% Na₃N) (37).

*** Ensayo de agregación.**

La suspensión bacteriana así obtenida se ajustó a una DO = 2.0 con un espectrofotómetro medido a 660 nm que corresponde aproximadamente a 10¹⁰ ufc/ml, inóculo similar en cantidad al de partida.

Cada suspensión se homogeneizó por agitación en vortex durante 20 segundos y se mezclaron iguales volúmenes de cada una de ellas (0.3 ml), según la mezcla de bacterias deseada. Agitamos los tubos mezcla durante 10 s., se dejaron a temperatura ambiente 1 ó 2 h. y nuevamente homogeneizamos, permaneciendo en reposo durante una noche. Como control se utilizó cada suspensión bacteriana (0.3 ml) con igual cantidad de buffer de coagregación, para observar posibles casos de autoagregación.

*** Lectura.**

A las 24 h., tanto en reposo como después de agitar los tubos, se evaluaron visualmente para detectar la posible formación de agregados, según el siguiente criterio:

- : **AUSENCIA DE AGREGACION** (agregados no visibles en la suspensión celular).
- + : **AGREGACION APRECIABLE PERO DEBIL** (agregados pequeños y uniformes en suspensión).
- + + : **AGREGACION PESADA** (agregados definidos, fácilmente visible aunque la suspensión permanece turbia sin que éstos sedimenten inmediatamente).

- + + + : **AGLUTINACION DE LA MAYORIA DE LAS BACTERIAS**
(agregados grandes que sedimentan rápidamente dejando una pequeña turbidez en el sobrenadante).
- + + + + : **GRANDES AGREGADOS** (que sedimentan rápidamente dejando un sobrenadante claro).

Cada determinación se realizó por triplicado y los resultados fueron evaluados en ciego por dos observadores diferentes. De las suspensiones obtenidas, se tomaron alícuotas para observarse al microscopio la morfología de las diferentes cepas mediante una tinción Gram.

3.4.4. PRODUCCION DE POLISACARIDOS EXTRACELULARES.

La capacidad de producir sustancia mucoide o exopolisacáridos de naturaleza polisacárida, es considerado como una propiedad de la bacteria que actúa como factor de virulencia, mediando la capacidad de adherencia bacteriana al esmalte dental (95). Se evaluó la producción de PSE mediante dos ensayos:

*** Determinación de la producción de "slime".**

Se define la producción de "slime" como la capacidad de producir la sustancia adherente. Se utilizó la técnica de "macrométodo en tubo", según fue descrito por **CHRISTENSEN** y col. (48), aunque modificada por nosotros para **Streptococcus mutans**. Con el fin de estudiar la producción de "slime" en tubo, se inocularon las cepas en tubos de vidrio que contenían 10 ml. de WC y se incubaron estáticamente durante 72 h. a 37°C en estufa. Tras la incubación se vació el contenido en los tubos, retirándolo con pipeta y lavándolo 3 veces con agua destilada; se dejaron secar a temperatura ambiente y se fijaron con calor.

A continuación se tiñeron con 10 ml. de una solución acuosa de violeta genciana (MERCK) al 0.1 % durante un minuto y se vaciaron nuevamente dejándose secar boca abajo en estufa. Tras este período se valoró la producción de "slime" en función del grosor de la película formada en la superficie del tubo a las 24, 48 y 72 h. En la prueba, la producción de sustancia mucoide se expresó como (+) si había tinción de la pared del tubo o (-) en caso contrario. Como control se utilizó la cepa de S. mutans ATCC 25175.

Se establecieron 4 categorías (0+, 1+, 2+, y 3+) en función de la capacidad de producir "slime". Cada determinación se realizó por duplicado en 3 días diferentes. Los resultados fueron evaluados en ciego por 3 observadores diferentes.

*** Determinación de glucano insoluble en agua.**

Se empleó la técnica de GHIONE y col. (83) para determinar la presencia de polisacáridos extracelulares del tipo glucanos de los cuales existen dos tipos: unos insolubles en agua y otros solubles.

Después de incubar el microorganismo en medio WC suplementado con sacarosa (en un intervalo de concentraciones finales de 1-10%) los cultivos se sedimentaron centrifugando a 2000 rpm durante 10 minutos, y lavando 3 veces con agua destilada para retirar el sobrenadante. Posteriormente se tiñó la masa de lo obtenido en el "pellet" con una solución de violeta genciana-etanol al 10%, durante 1 minuto, lavando de nuevo 3 veces con agua destilada. El residuo teñido se extrajo con etanol absoluto (PANREAC) y se diluyó a continuación con agua destilada hasta el volumen original del cultivo. El ensayo se evaluó, midiendo la densidad óptica de la solución elaborada en el espectrofotómetro a una $\lambda = 305 \text{ nm}$. Se utilizó como control, un cultivo crecido en medio sin sacarosa, de forma que el valor correspondiente a la tinción absorbida por las estructuras bacterianas además de glucano, se determinó con cultivos de crecimiento bacteriano crecidos en medio sin

sacarosa. El valor de DO corregido (COD) correspondiente a la producción de glucano real de la bacteria, se obtuvo restando los datos valorados en el control. La producción de glucano se midió como:

AUSENTE (-) : COD valor menor de 0.05.

DEBIL (+) : COD de 0.05 a 0.15.

MARCADO (++): COD de 0.15 a 0.45.

PESADO (+++): COD mayor de 0.45.

3.5. ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA DEL FLUOR.

3.5.1. ANTIMICROBIANO.

El antimicrobiano empleado fué el flúor en forma de fluoruro sódico, suministrado por (lab. KIN) en forma de polvo valorado con una potencia del 100%.

3.5.2. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD: CMI - CMB.

*** Manejo del antimicrobiano.**

Se pesaron 0.5 g. de polvo valorado y se diluyeron en 20 ml. de agua destilada estéril, quedando una actividad de 25000 mg/l. Tal volumen se guardó en viales stock, que se congelaron a -20°C. Estas alícuotas se utilizarían como soluciones madre, en estudios posteriores.

*** Técnica seguida.**

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la cepa control *S. mutans* ATCC 25175 se realizó por el método de "macrodilución en caldo" (146).

Se hizo en caldo Wilkins-Chalgren, al que añadimos la solución de antimicrobiano; para ello se preparó una batería de tubos con 1 ml. de caldo de cultivo a excepción del tubo inicial que llevaba 2 ml. y la concentración de antimicrobiano. A partir de éste se pasó 1 ml. de un tubo a otro hasta completar la serie y a continuación se añadió 1 ml. de inóculo bacteriano obtenido de un cultivo puro de 18 h. en caldo Wilkins-Chalgren que se diluyó hasta alcanzar la concentración adecuada de 10^4 - 10^5 ufc/ml, ajustando la turbidez con la escala de McFarland. Se incluyó un tubo control sin antimicrobiano.

Se considera como CMI la concentración de antimicrobiano más baja capaz de inhibir un crecimiento bacteriano visible, tras 24 horas de incubación a 37°C.

La concentración mínima bactericida (CMB) se determinó por subcultivo de 10 μ l de cada caldo que no presentaba crecimiento visible, sobre placas de agar *Mitis salivarius*, que se incubaron en atmósfera de CO₂ a 37° C. La lectura correspondiente se realizó a las 48 h.

La CMB es el caldo con la concentración de antimicrobiano más baja que inhibe el crecimiento visible en el subcultivo. Se considera éste como bactericida si el cociente entre CMI y CMB es < 32 y bacteriostático en caso contrario (52).

3.5.3. CURVA DE LETALIDAD.

La cinética de la acción antimicrobiana del flúor como fluoruro sódico a lo

largo del tiempo se estudió sobre medio Wilkins-Chalgren, con la cepa Streptococcus mutans ATCC 25175.

El inóculo bacteriano inicial fué de 10^7 UFC/ml, en fase logarítmica de crecimiento, obtenido de un cultivo de 18 h. en 50 ml. de caldo Wilkins-Chalgren que se ajustó mediante la escala de McFarland. La incubación se realizó en baño a 37°C, con agitación a 50 rpm durante 8 horas. El recuento del número de células viables, ya descrito anteriormente se realizó a cada hora, tomando alícuotas tanto del control (sin antimicrobiano) como del matraz con flúor.

La acción antibacteriana ejercida por el flúor se comparó con un control de iguales características y manipulación. Cada curva se realizó dos veces para una mayor fiabilidad y comprobación de los datos.

3.5.4. EFECTO DE ELIMINACION DEL FLUOR.

Paralelamente a esta acción se evaluó como afectaba la eliminación del fluoruro sódico del medio de cultivo, sobre el crecimiento de Streptococcus mutans.

El efecto causado al retirar el fluoruro sódico del medio se cuantificó tras 3 horas de exposición del cultivo bacteriano a la concentración del antimicrobiano utilizado. Transcurrido este tiempo, se eliminó el flúor del cultivo por el método de dilución (90). La dilución se realizó añadiendo 50 μ l de la suspensión antimicrobiano-microorganismo y de los cultivos controles a 50 ml. de medio cultivo fresco, obteniéndose una dilución 1/1000. La suspensión bacteriana libre de antimicrobiano se incubó a 37°C en baño con agitación. Se determinó el número de microorganismos viables en todos los cultivos, inmediatamente antes y después de la dilución y a cada hora después de la eliminación del fluoruro sódico, hasta que

se desarrollara una turbidez marcada. Para el recuento bacteriano se retiraron de cada muestra y a cada hora 100 μ l realizando diluciones decimales seriadas en solución salina. Posteriormente se sembraron 25 μ l de cada solución en agar Mitis salivarius. Las placas se leyeron, después de incubar durante 48 h. a 37°C en atmósfera de CO₂.

3.5.5. INFLUENCIA DE DIVERSOS PARAMETROS:

* Efecto de concentraciones de azúcar.

Se investigó como interfería el flúor en el crecimiento y metabolismo de S. mutans cuando crecía en un medio enriquecido con azúcar.

Se preparó un inóculo de 10⁷ UFC/ml en medio Wilkins-Chalgren a pH=7.0, a partir de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento. La glucosa se añadió asepticamente al medio hasta alcanzar una concentración final del 10%; finalmente se incorporó el flúor en una concentración capaz de inhibir el crecimiento de este microorganismo, este valor fue el correspondiente a la CMI de flúor, cuya solución stock se encontraba almacenada en viales congelados. Como control se consideró un inóculo de S. mutans en las mismas condiciones de cultivo, sin añadir antimicrobiano.

El crecimiento se evaluó, sembrando alícuotas diluídas a cada hora en agar Mitis salivarius e incubando durante 48 h. para determinar el número de ufc/ml según la técnica descrita anteriormente, también medimos los cambios que se produjeron en el pH del medio.

* Efecto de pH bajos.

Se determinó el crecimiento de S. mutans bajo unas condiciones de pH definidas, para calcular el efecto que éste ejercía sobre la acción inhibitoria del flúor.

Las células en presencia de flúor se suspendieron en medio Wilkins-Chalgren y se separaron 3 alicuotas de un inóculo de S. mutans en fase logarítmica, con una concentración final de 10^7 ufc/ml y se resuspendieron en este medio sometiéndolas a los siguientes valores de pH: 6.5, 5.0, 4.0. Estos pH se conseguían añadiendo HCl 1N. Un matraz con un inóculo bacteriano, mantenido en las mismas condiciones y a pH 7.0 es el que se tomó como control. Los recuentos en ufc/ml se valoraron a lo largo del periodo de incubación.

*** Efecto de concentraciones subinhibitorias de flúor en la agregación y producción de polisacáridos extracelulares.**

Para estudiar el efecto de concentración subinhibitoria (Sub CMI) de flúor, tanto en la producción de polisacáridos extracelulares como en la capacidad de coagregación se utilizaron los métodos correspondientes a cada ensayo detallados anteriormente.

Se realizó una batería de tubos que contenía WC como medio utilizado para crecimiento bacteriano al que añadimos flúor en un intervalo de concentraciones que iba desde el valor de la CMI hasta 1/5 del valor de la misma, para evaluar las posibles modificaciones respecto de un control sin antimicrobiano. A estos se les añadió un inóculo bacteriano de 10^4 - 10^5 UFC/ml. La lectura se realizó a las 24 horas en el caso de la agregación mientras que la producción de "slime" se evaluó a las 48 h. por visualización directa y la producción de glucano por espectrofotometría. Los experimentos se realizaron 5 veces cada uno de ellos.

*** MATERIAL Y METODOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO "in vivo".**

3.1. MODELO ANIMAL.

Se empleó como animal de experimentación ratas macho, variedad Wistar, suministradas por PANLAB S.L. (Barcelona), con un peso medio al destete de 43 gr. (± 4). Se caracterizan por ser de talla mediana, albinos y tener una buena tasa de crecimiento. La edad de pubertad del animal es de $27 \pm 1,1$ días, siendo el periodo de crecimiento a partir del destete, de 19 semanas.

3.2. DIETAS.

Las dietas y componentes empleados en el estudio fueron los siguientes:

*** DIETA PANLAB, pienso completo para rata-ratón cría, cuya fórmula es:**

Humedad	12,0%
Proteína bruta	23,9%
Grasa bruta	4,4%
Fibra bruta	3,0%
Minerales	5,5%
Glúcidos	50,8%
Valor calorífico (Kcal/Kg) .	3200

*** DIETAS RICAS EN HIDRATOS DE CARBONO, comercializadas por Panlab. Se dieron dos variedades:**

* *Dieta "K2000" (con un 56% de sacarosa), cuya composición es:*

<i>Sacarosa</i>	56%
<i>Leche Spray</i>	28%
<i>Higado</i>	1%
<i>Lupo</i>	6%
<i>Levadura</i>	4%
<i>Luceina deshidratada</i>	3%
<i>NaCl</i>	2%

* *"Fibra Gwar" (Con un 54% de sacarosa), cuya composición es igual que la anterior a diferencia de:*

<i>Sacarosa</i>	54%
<i>"Fibra Gwar"</i>	2%

Estas dietas se administraron "ad libitum " como único alimento en las dos series de grupos.

* **BARNICES DE FLUOR (DURAPHAZ)**, administrado por pincelaciones con un contenido de 50 mg NaF/ml. Este fluoruro tópico tiene la siguiente composición (lab. Kin).

- 10 ml. de flúor*
- 10 ml. de flúor barniz*
- 10 ml. de laca de flúor + Calcio*
- 10 cc. de barniz de flúor*
- 1 ml. 50 mg fluoruro sódico*
- 1 cc. 50 mg fluoruro sódico*

*** AGUA FLUORADA** , con una concentración de 4 mg/l fluoruro sódico (4 ppm), administrada como agua de bebida. Durante el tiempo en que fue administrada el agua fluorada en la proporción descrita, ésta fue la única bebida.

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Para el objeto de nuestro estudio se seleccionaron 7 grupos de ratas Wistar machos, en número de 15 cada uno, con edades de 25 días que es prácticamente el final de su crecimiento y se desecharon las hembras para eliminar la posible influencia hormonal (estrógenos).

Desde los 25 días, momento en que comienza el periodo de destete de las ratas (día 0), hasta los 3 meses en que finaliza el experimento se mantuvieron en jaulas de mackrolon de 50x15 cm., en número de 5 ratas por jaula. Las ratas se dividieron en grupo control y grupos de prueba, sometidos a los siguientes tratamientos en su dieta:

GRUPO I. Grupo control, alimentado con pienso completo para ratas-cría más agua (no fluorada) "ad libitum".

GRUPO II. Se le sometió a una dieta rica en hidratos de carbono, dieta "K2000", que contiene un 56% sacarosa. Esta dieta fue suministrada, junto con agua "ad libitum".

GRUPO III. Se le sometió a un dieta rica en hidratos de carbono, dieta "Fibra Gwar" (dieta "K2000" + "Fibra Gwar") y agua "ad libitum".

GRUPO IV. Se alimentó con dieta "K2000", aportándole como agua de

bebida, agua fluorada, siendo la concentración de flúor de 4 mg/l.

GRUPO V. *Se mantuvo con dieta rica en hidratos de carbono, dieta "K2000", agua "ad libitum" y además fue tratado con barnices fluorados, dados en forma de pincelaciones y aplicado directamente sobre el esmalte dental.*

GRUPO VI. *Se le alimentó con dieta "Fibra Gwar", aportándole agua fluorada como agua de bebida, siendo ésta la única bebida suministrada durante el tratamiento.*

GRUPO VII. *Se le mantuvo con dieta "Fibra Gwar", agua "ad libitum" y barnices de flúor, administrado a modo de pincelaciones. Los dientes se cubrían con esta mezcla en forma de pasta o barniz usando una torunda de algodón la cual permitía un buen acceso a la boca del animal y facilitó la impregnación de los dientes con el barniz; se dió con una periodicidad de una vez a la semana en cada uno de los dientes y en todas las superficies dentales, vía tópica. El barniz se endurecía aproximadamente a los 2 minutos.*

Se realizaron valoraciones del estudio en dos momentos del desarrollo del animal: la primera toma de muestra fue a los 45 días y la segunda a los 90 días del inicio del tratamiento; finalizado el periodo experimental, las ratas se sacrificaron. La duración del experimento con cada grupo fue de 3 meses, comenzando por el grupo control y a continuación cada uno de los distintos grupos de prueba.

3.3.1. DESCRIPCION DEL EXPERIMENTO.

En cada toma de muestra se realizó la misma técnica; todos los animales se

pesaron en una báscula (modelo AUSO) y luego se introdujeron en una cámara con algodón impregnado en éter (PANREAC) que inhalaban "ad libitum", vigilando su respiración durante aproximadamente 1-2 minutos.

Una vez anestesiada la rata se la mantuvo dormida mediante un canuto (modelo Pobel) que se colocaba sobre la cabeza relleno de algodón empapado en éter y abierto por un lado, lo cual permitía la respiración espontánea del animal hasta la obtención de la muestra. Ya anestesiada, se introdujo en la boca del animal una tira de papel tornasol (MERCK) para la obtención del pH salivar tras observar el viraje de color.

Otro tipo de estudio que se efectuó fue la recogida de la muestra de saliva que a continuación describiremos y también se evaluó la presencia y localización de caries dentales realizando un estudio exhaustivo de la mandíbula.

En todos los casos las ratas se sacrificaron entre las 12 y 14 semanas, equivalente a los 3 meses de tratamiento (2ª toma) y se extrajo entonces la mandíbula para el estudio clínico correspondiente. Como hemos visto, en cada muestreo se pesaron las ratas, se tomó muestra de saliva, se midió el pH salivar y se evaluó la presencia de caries unido al estudio anatomopatológico de las piezas dentales.

3.4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE S. mutans.

3.4.1. TOMA DE MUESTRA.

Uno de los objetivos de este trabajo fue el aislamiento de la especie S. mutans de la saliva de las ratas que fueron sometidas a diferentes tratamientos en la dieta.

Para estudiar el papel que desempeña esta especie en las lesiones cariosas fue necesario establecer una sistemática que permitiera su aislamiento y un buen método de identificación que la diferenciase del resto de los estreptococos orales (16). El método que nosotros desarrollamos fue el siguiente:

La muestra que se recogió para el aislamiento de la bacteria en estudio fue una cantidad no cuantificable de saliva (aproximadamente 5 o 6 gotas), mediante un catéter estéril (modelo C) que aspiraba la secreción salivar de la boca. Esta se depositó en un tubo de ensayo estéril que contenía 1 cc de solución Ringer-Lactato (estéril). La muestra así obtenida se procesó dentro de las 3 horas siguientes al muestreo.

A partir de esta muestra se hizo el estudio microbiológico de la especie buscada S. mutans, por recuento del número de células viables por ml. de muestra de saliva. Las tomas de muestra se realizaron una a los 45 días y otra a los 3 meses del destete (día 0), momento a partir del cual se suministraron las dietas experimentales. Otra especie aislada e identificada fue Lactobacillus spp., por su relación con la caries dental.

3.4.2. SIEMBRA.

La muestra de saliva contenida en el tubo con solución Ringer se agitó en Vortex durante 30 segundos. Debido a la variada y numerosa flora existente en la cavidad oral, procedimos a aislar los microorganismos en estudio empleando varios medios selectivos (119):

* Agar Mitis salivarius (MSA), para cuantificación y diferenciación de S. mutans.

* *Agar Mitis salivarius suplementado con 20% sacarosa y 0.2 U/ml bacitracina (MSB), para diferenciación y cuantificación de S. mutans.*

* *Agar Rogosa, como medio de crecimiento selectivo de Lactobacillus spp.*

El recuento de bacterias por ml de la muestra (ufc/ml) se determinó usando el método de la micropipeta (251). Este consiste en agitar la muestra en un vortex, realizando varias diluciones de la misma en solución salina estéril ($10^1, 10^2, 10^3, \dots$). De cada dilución se tomaron con un micropipeta 25 μ l y se sembraron en las placas de cultivo correspondientes. La extensión se hizo de una forma uniforme sobre toda la superficie del medio usando un asa de Drigalsky estéril (133).

3.4.3. INCUBACION.

Una vez realizada la siembra, se procedió a la incubación durante 48 h. en estufa a 37°C, en jarras Gas-Pack con una atmósfera 95%N₂-5%CO₂ la cual proporciona el ambiente necesario para el crecimiento de S. mutans.

Al cabo de este tiempo, las colonias de S. mutans se identificaron fácilmente por sus características morfológicas (184), ya que esta atmósfera les permite reducir el telurito potásico presente en el medio y debido precisamente a esta característica metabólica las colonias crecen de color negro o azul oscuro. La observación de las colonias se hizo de "visu" o examinándolas con lupa, dado su pequeño tamaño. De esta manera se realizó una identificación preliminar de las cepas de estreptococos, basada en la morfología de la colonia en MSA, tinción Gram (cocos positivos) y prueba de catalasa (negativa).

Respecto a Lactobacillus spp., se incubó en Jarras de Gas-Pack con una

atmósfera de anaerobiosis: 85%N₂, 10%H₂, 5%CO₂, a 37°C durante 3 días (118). A partir de este cultivo primario se determinó el recuento de bacterias (ufc/ml).

Después de incubar las diferentes colonias que habían crecido en las placas (generalmente 4 ó 5), se seleccionaron a su vez subcultivos en medio MSA y Rogosa según la especie, incubando en las condiciones requeridas.

3.4.4. OBTENCION DE MASA MICROBIANA.

Una vez aisladas las colonias, se inocularon los diferentes tipos morfológicos de colonias que crecían en placa, en 3 ml. de caldo Wilkins-Chalgren, al que previamente se había regenerado para facilitar de esta forma el crecimiento. Se incubó a 37°C, durante 24 h. en aerobiosis. Transcurrido este tiempo, se obtuvo suficiente masa microbiana para relizar las pruebas bioquímicas que permitirían por una parte, confirmar el diagnóstico de S. mutans y por otra diferenciarlo fundamentalmente de los enterococos y del resto de estreptococos orales presentes en la boca.

3.4.5. PRUEBAS BIOQUIMICAS.

Las pruebas realizadas son las que se indican a continuación: Tinción Gram, bilis esculina, fermentación de azúcares (manitol, sorbitol, inulina, rafinosa, sacarosa), producción de amoniaco a partir de la arginina e hidrólisis de la esculina.

El resultado de las pruebas bioquímicas se consideró positivo, cuando

aislabamos de los tubos *S. mutans* por subcultivo en MSA. De esta manera confirmamos su identificación.

3.4.6. IDENTIFICACION.

A continuación señalamos el esquema que se siguió en este trabajo experimental para la identificación de los estreptococos orales obtenidos en la muestra (cuadro n° 2) (75). Las especies bacterianas se examinaron por cultivo selectivo y atendiendo a las características bioquímicas descritas por COLMAN 1984 (42), COYKENDALL 1989 (47) y MURRAY 1990 (178).

3.5. MEDIOS EMPLEADOS EN EL PROCESAMIENTO. TECNICA Y CRITERIOS.

La sistemática seguida para la descripción de los medios se basa en el orden de utilización desde que se tomó la muestra hasta que la cepa fue identificada.

3.5.1. MEDIO DE TRANSPORTE.

Se empleó solución Ringer (PALEX SA). Este medio mantuvo la viabilidad de los microorganismos durante el tiempo mediado entre la toma y su tratamiento en el laboratorio, generalmente menor de 2-3 horas.

3.5.2. MEDIO DE AISLAMIENTO SELECTIVO.

Las características de la flora oral, en cuanto a número y variedad de especies, nos obligó a utilizar para el aislamiento de S. mutans un medio selectivo.

Aunque son muchos los medios descritos, se utilizó el medio MSB definido por GOLD y col. en 1973 (89). Este medio utiliza como base Mitis salivarius (DIFCO). Para prepararlo se diluyeron 90 gr. del medio deshidratado en 1000 ml. de agua destilada, añadiendo 150 gr. de sacarosa; se mezclaron bien hasta obtener una mezcla uniforme, calentando suavemente. Entonces se autoclavó a 121°C, al baño maría, añadiendo en este momento una ampolla de 1 ml. de telurito potásico al 1%, así como 1 ml. de una solución de bacitracina a una concentración de 200 U/ml.

El otro medio empleado para la obtención de estreptococos fue agar Mitis salivarius (MSA): se preparó como el MSB, pero sin añadir la sacarosa y la solución de bacitracina.

El medio empleado para cultivo selectivo de Lactobacillus spp. fue el medio agar Rogosa (197). La gran selectividad del medio permite el crecimiento casi exclusivo de este género, que se identifica y enumera en base al aspecto morfológico de la colonia: formas redondeadas, lisas, color blanco, muy convexas, de consistencia cremosa y de 2-4 mm de diámetro. Se trata de bacilos positivos según la técnica de tinción Gram.

3.5.3. MEDIO PARA LA OBTENCION DE MASA MICROBIANA.

Una vez aisladas y crecidas las colonias de S. mutans, se pasaron éstas a un

medio de cultivo idóneo para obtener una masa microbiana suficiente para su posterior estudio bioquímico. Con este fin, se empleó el caldo Wilkins-Chalgren (OXOID) regenerado por ebullición previo a su inoculación. Se tomaron suficientes colonias para obtener una densidad bacteriana igual al n°5 McFarland.

3.5.4. PRUEBAS DE IDENTIFICACION.

Se procedió después de obtener suficiente masa microbiana a realizar las siguientes pruebas:

*** TINCION GRAM**

Por la técnica habitual, nos fijamos en los cocos Gram-positivos.

*** BILIS ESCULINA**

Mediante esta prueba se pudo diferenciar los enterococos de los estreptococos orales. Utilizamos el medio de DIFCO. La siembra se realizó en la superficie del medio, incubándose a 37°C, durante 24 h. en anaerobiosis; transcurrido este tiempo, se llevó a cabo la lectura de la prueba en la superficie del tubo.

PRUEBA POSITIVA..... Coloración negruzca.

PRUEBA NEGATIVA..... Color original.

*** FERMENTACION DE AZUCARES**

La fórmula recomendada para estudiar dichas fermentaciones consiste en utilizar un medio que tenga un indicador de fermentación, adicionándole los

diferentes hidratos de carbono. El medio base fue el caldo Rojo Fenol (DIFCO) que no lleva azúcares en su composición. Algunos azúcares no soportan el autoclave por lo que se utiliza el medio base anteriormente descrito pero sin ellos. Se prepararon soluciones apropiadas de los carbohidratos seleccionados, se esterilizaron por filtración y se añadieron asépticamente al medio basal hasta alcanzar una concentración final de azúcares del 1%.

El medio se inoculó con 10 μ l de un caldo con crecimiento de 18 h. y los resultados se observaron después de 24, 48 y 72 horas de incubación a 37°C. La interpretación de la prueba se realizó por 2 métodos: cambio de coloración y variaciones de pH.

* La fermentación del azúcar se reconoce por un viraje del indicador de rojo a amarillo. En todos estos casos el pH varía en al menos 0.5 unidades, lo que nos confirma las fermentaciones positivas.

* La ausencia de fermentación del azúcar se manifiesta al permanecer el color original, encontrándose al realizar la medida de pH que éste no varía, o lo hace por debajo de 0.5 unidades.

En los casos en que el cambio de coloración fue dudoso, el pH era decisivo para realizar la lectura de la prueba, considerándose negativo por debajo de una variación de 0.5 unidades y positivo por encima de dicho cambio. Se utilizaron los siguientes carbohidratos (146):

MANITOL (PANREAC)

RAFINOSA (MERCK)

INULINA (MERCK)

SORBITOL (MERCK)

SACAROSA (PANREAC)

*** ARGININA**

La capacidad de S. mutans para desaminar la arginina se estudió usando el medio desarrollado por NIVEN y col. en 1941 (182). Después de realizar la inoculación a partir de un caldo WC con abundante crecimiento se cubrió el tubo con 1 cc aproximadamente de parafina líquida estéril; esto tiene como finalidad prevenir el escape del amoniaco durante la desaminación de la arginina. La incubación se realizó 37°C, durante 48 h; transcurrido este tiempo se añadieron 2-3 gotas del reactivo NESSLER a una cantidad similar del tubo de arginina ya crecido. El cambio de color a rojo anaranjado indicó que se había formado amoniaco por desaminación de la arginina, por lo tanto la prueba es positiva. Si por el contrario se mantiene el color original, o vira hacia algún otro color, la prueba es negativa.

*** ESCULINA**

La hidrólisis de la esculina se investigó utilizando el medio de DIFCO. La hidrólisis de la esculina se traduce en un ennegrecimiento del medio después de una incubación a 37°C. durante 48 h.

3.5.5. MEDIO DE CONSERVACION.

El hecho de utilizar un número considerable de cepas de S. mutans para el estudio de coagregaciones y detección de polisacáridos hizo necesario emplear un medio de conservación que permitiera almacenar las cepas según se iban aislando e identificando (55).

Para ello se partió de un cultivo fresco crecido en agar Mitis salivarius. Tomamos 4 ó 5 colonias perfectamente aisladas e identificadas, las inoculamos en

tubos que contenían 1.5 ml de caldo WC y lo incubamos a 37°C en atmósfera de CO₂. Una vez se tuvo el crecimiento en fase logarítmica se utilizaron tubos con 1.5 ml. del cultivo y una cantidad similar de glicerol (50%). La conservación se realizó a una temperatura de -20°C.

3.6. EXAMEN CLINICO DE CARIES.

Se hizo un estudio para ver como afectaban estos tratamientos y posteriormente se observó al microscopio la histología de la lesión.

3.6.1. VISUALIZACION Y CRITERIO DIAGNOSTICO.

Se examinaron las mandíbulas de la presencia o ausencia de lesiones cariogénas en sus superficies dentales. Todas las ratas, tanto de grupo control como de grupos de prueba, se controlaron clínicamente en los dos periodos de control microbiológico. El examen clínico se realizó usando una aguja (0.36x13 mm). Para ello se limpiaron las superficies dentales con solución Ringer y se evaluaron las superficies de los dientes con lupa (ZEISS) utilizando como visualizador un microscopio OPMI.

*** CRITERIO DIAGNOSTICO**

El diagnóstico seguido en la exploración clínica fué el criterio propuesto por la OMS (1972) (255), según el cual, las caries iniciales de fosas y fisuras se distinguen por ser cavitaciones o áreas reblandecidas. Sus características son:

- * Entra la sonda o aguja 0.5 mm.
- * Fondo blando
- * Hay desplazamiento transversal
- * Aureola gris o blanquecina
- * Hay lesión radiográfica
- * Pérdida de minerales 30%

Se evaluaron el número de ratas con caries en cada tratamiento, y sus localizaciones en la mandíbula. Se tomaron luego fotografías de éstas, así como de anomalías que se encontraron y se utilizó como visualizador para realizar el procedimiento un microscopio OPM1, modelo que tiene un sistema modular que ofrece múltiples posibilidades de combinar y ampliar el número de aumentos de acuerdo con las necesidades de las individualidades del caso. Además de la lámpara de hendidura operatoria, el OPM1 con esterotubo de coobservador, tiene un dispositivo fotográfico X-Y para tomar muestras de diapositivas.

3.6.2. ANATOMIA PATOLOGICA. TECNICAS EMPLEADAS.

Las técnicas empleadas para su evaluación fueron las siguientes:

* **Método de fijación:** Las muestras de maxilar previo a su examen anatómopatológico se fijaron en formol nítrico al 5% por ser necesario para esta toma una técnica de decalcificación que posteriormente permitiera su corte. El periodo de duración con dicho fijador fue de 24 h.

* **Método de inclusión:** Los tejidos una vez fijados pasaron por los siguientes reactivos: alcoholes de concentraciones progresivamente superiores para proceder a la completa deshidratación del bloque. Tras dos pasos de 4 h. por

toluol, usado este como agente aclarante se procedió a la inclusión de los bloques en una parafina líquida. Los cortes realizados se mantuvieron en una estufa a 60°C durante un total de 6 h.

** Método de corte:* Una vez confeccionados los bloques donde iba incluida una muestra representativa de las distintas tomas, se insertaron en la platina de un microtomo MINOT, procediéndose a hacer cortes con un espesor máximo de 4 μ .

Obtenidos los cortes y montados en portaobjetos se procedió a la desparafinización de los mismos tras tres baños sucesivos en xilol de 20 minutos cada uno. Realizado esto se volvió a hidratar los bloques y se tiñeron.

** Método de observación:* Las preparaciones obtenidas a partir de muestras procedentes de maxilares se observaron al microscopio óptico. Como variante de observación microscópica, se utilizó un método de luz polarizada con dos prismas de NICOL para que de esa manera se pudieran separar estructuras amorfas de estructuras cristalinas y las probables variaciones de estas últimas.

Este método permite valorar las estructuras cristalinas que muestran una birrefringencia en blanco brillante, efecto conseguido cuando ambos prismas se orientan formando un ángulo de 90° entre sí. Para esta técnica de observación se empleó un microscopio de la casa LEITZ, modelo DIALUX 2OEP, que incluye un sistema automático de fotografía de tipo ORTHOMAT.

3.7. EVALUACION ESTADISTICA.

Para comparar los resultados obtenidos en este estudio se realizaron los

siguientes tipos de pruebas:

La valoración estadística se realizó mediante el test ANOVA (análisis de varianza), que estudia el efecto de un determinado factor cualitativo sobre una variable, seguido de una prueba de homogeneidad de varianzas, para comparar posteriormente la media de los grupos 2 a 2. En este estudio se empleó como test para establecer diferencias significativas entre las medias de los recuentos de microorganismos obtenidos en los 7 grupos tratados.

Además de esta prueba, se aplicaron los coeficientes de correlación de Pearson y de Kendall para estudiar la relación entre los parámetros microbianos (S. mutans, y Lactobacillus spp.) y las caries observadas en la mandíbula del animal.

IV. RESULTADOS

*** RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO " IN VITRO "**

3.1. ESTUDIOS PRELIMINARES:

3.1.1. CURVA DE DESARROLLO BACTERIANO.

El desarrollo bacteriano de Streptococcus mutans ATCC 25175 se observa en la figura 1, que representa la curva de crecimiento que manifiesta este microorganismo a lo largo de sus tres etapas.

Según la gráfica, la fase logarítmica se inicia alrededor de las 10^a hora, alcanzando su punto más elevado a las 18 horas. La fase estacionaria o de reposo tenía lugar a continuación y el descenso bacteriano comienza a partir de las 24 horas de incubación.

Este experimento se hizo partiendo de un inóculo muy pequeño (10² ufc/ml), que se incubó durante 24 horas, periodo durante el cual evaluamos el crecimiento, tanto por recuento bacteriano para determinar el número de células viables a lo largo de este tiempo, como por espectrofotometría, para medir la absorbancia ($\lambda = 660$).

De estos resultados fue posible establecer una relación entre cada valor de ufc/ml y su correspondiente valor de absorbancia, siendo esta equivalencia muy útil por la comodidad y rapidez que supuso para su uso en posteriores ensayos, en particular en el estudio de agregaciones bacterianas. Así, una D.O. = 2.0 corresponde aproximadamente a 10¹⁰ ufc/ml.

3.1.2. MEDIOS DE CULTIVO.

La figura 2, representa gráficamente el crecimiento desarrollado por S. mutans en los 5 caldos de cultivo empleados. La cinética de crecimiento celular se realizó midiendo la absorbancia a una $\lambda = 660 \text{ nm}$ a partir de alícuotas que se tomaron a cada hora durante el periodo de incubación.

Aparece reflejado en esta figura que existen diferencias entre los valores de masa celular obtenidos al medir la absorbancia en cada medio de cultivo. El valor de absorbancia más alto se obtiene con el caldo Wilkins-Chalgren, cuya fase estacionaria alcanza un valor de $DO = 1.88$, este valor disminuye con el caldo Schaedler cuyo valor de $DO = 1.75$. En cuanto a los caldos Tioglicolato y Todd-Hewitt, ambos presentan una fase exponencial de crecimiento muy similar. El valor más bajo se obtiene con medio BHI, con una $DO = 0.08$.

Esto nos indica que en general, se da buen crecimiento en todos los caldos de cultivo, a excepción del medio BHI que no manifestó apenas crecimiento, teniendo en cuenta que el mayor crecimiento se alcanza con el caldo WC, seguido del caldo Schaedler y de los medios Tioglicolato y Todd-Hewitt que muestran valores muy similares.

Tras realizar la elección del medio Wilkins-Chalgren como caldo de cultivo procedimos a evaluar un medio sólido de crecimiento adecuado que se pudiera emplear en experimentos posteriores. Los medios ensayados fueron: *Mitis salivarius* (MS), *Mitis salivarius* bacitracina (MSB) y Wilkins-Chalgren enriquecido con 5% sangre. La figura 3, representa el recuento celular ($\lg \text{ ufc/ml}$) obtenido con cada medio. Según esta gráfica, se consiguieron resultados muy semejantes con éstos, es decir en todos ellos se obtuvieron recuentos altos de esta especie del orden de 10^0 ufc/ml . Si comparamos con el inóculo de partida 10^4 ufc/ml , vemos que el

crecimiento de *S. mutans* en estos medios supone al cabo de 10h. un aumento de 5 logaritmos, luego se consideran buenos medios de crecimiento.

Sin embargo, al examinar la morfología y tamaño de las colonias, se vieron algunas diferencias. Como por ejemplo, que sobre MS crecen manifestando una coloración negruzca ó azul intenso, a veces lisas, prominentes, con mucha frecuencia firmemente adheridas al agar, algunas veces presentan una gota brillante de polisacaridos extracelulares en la parte superior o al lado y un tamaño relativamente apreciable (foto n° 1), teniendo en cuenta que en la mayoría de los estreptococos orales es muy pequeño; por el contrario en WC las colonias son puntiformes y de aspecto blanquecino. Se trata de dos características a valorar en la elección de un medio, ya que dificultan su diferenciación de otras bacterias, en caso de crecer en cultivos mixtos.



Foto 1. Aspecto de una colonia de *S. mutans* en medio Mitis salivarius.

Estas observaciones nos llevaron a emplear el medio MS como medio sólido de siembra en los estudios "in vitro", descartando MSB por ser un medio de escasa duración, ya que al contener bacitracina, ésta pierde su actividad a la semana de preparar la solución.

Hay que tener en cuenta que S. mutans es un microorganismo que crece en agar dando una morfología característica, de aspecto mucoso, rugosa y sobre todo muy adherente al agar, esto representó una gran dificultad a la hora de trabajar con el, tanto para homogeneizarlo en el medio, como en el momento de realizar las subcultivos posteriores para su aislamiento.

3.2. PRUEBAS REALIZADAS CON AZUCARES

3.2.1. CAPACIDAD DE FERMENTACION DE AZUCARES.

Se estudió el efecto de cuatro azúcares y dos polioles en el crecimiento de un cultivo puro de S. mutans en fase logarítmica y su capacidad para fermentarlos, durante un periodo de 12 h. de incubación. Como control se empleó un medio de cultivo que no contenía azúcar.

En la figura 4, se ve representado el recuento celular expresado en (log ufc/ml) obtenido con cada azúcar. Los resultados muestran que los recuentos bacterianos más elevados son con sacarosa y glucosa. La fase exponencial coincide en ambos casos y alcanzan un valor final aproximado de 7.9×10^{10} ufc/ml, partiendo de un inóculo inicial próximo a 4×10^5 ufc/ml; esto significa que produjo un incremento en el número de bacterias de 5 logaritmos desde el momento en que S. mutans se puso en contacto con el azúcar. En un segundo plano, se obtiene un crecimiento menor con manitol, aumentando hasta 4 logaritmos su valor inicial,

siendo el valor final 5×10^8 ufc/ml y finalmente la lactosa, que es uno de los azúcares que menor valor de recuento celular presentó (5.5×10^8 ufc/ml). En el control, el valor máximo de recuento celular obtenido tras 12 h. fue de 7.9×10^7 ufc/ml, es decir aumenta hasta 2 logaritmos su valor inicial (3.9×10^5).

Se puede decir que para esta cepa, tanto la glucosa como la sacarosa y en menor grado el manitol, son los azúcares que degrada con más facilidad mediante vía glicolítica y que por tanto permiten un mayor crecimiento de la bacteria; a consecuencia del crecimiento en tales condiciones, vimos que se originaba la formación de grandes agregados o flóculos que se agitanban en el medio y que iban incrementándose con el tiempo en tamaño y número, dando una turbidez característica al medio. Esto iba asociado con la formación de largas cadenas de cocos gram positivos, que aumentan de longitud especialmente en las últimas horas de incubación, según observamos al microscopio mediante tinción gram.

Respecto al crecimiento en el medio de cultivo, y sólo en el caso de utilizar sacarosa como fuente hidrocarbonada, se desarrollaba una capa muy adherente y compacta en la base del matraz que no se elimina, ni tan siquiera con la agitación del baño a que estuvo sometido para homogeneizar el medio.

Para realizar este experimento empleamos el azúcar en condiciones límites (1%), de forma que se obtuviera el máximo valor de actividad glicolítica, hecho que influiría en la velocidad de crecimiento de esta bacteria (258). La interpretación de los resultados que se muestran en la fig. 4, reflejan la capacidad de fermentación del S. mutans respecto de estos sustratos, que en el caso de la glucosa y sacarosa es muy elevada, alcanzando con ellos el mayor crecimiento.

Respecto al efecto que causan el xilitol y sorbitol en el crecimiento celular de este microorganismo, se observa que el sorbitol provoca un crecimiento menor y mas lento, ya que su intervalo de crecimiento no supera el valor máximo del control, es

decir, esta especie apenas muestra capacidad para fermentar este sustrato, siendo el mayor valor de recuento celular alcanzado de 6.3×10^7 ufc/ml.

En cuanto a la presencia de 1% de xilitol en el medio, éste provoca una inhibición del crecimiento. El valor final de recuento celular desciende en relación con el control, siendo estos valores 5×10^4 y 7.9×10^7 ufc/ml respectivamente.

3.2.2. CAIDA DE PH.

Durante el crecimiento bacteriano con las diferentes fuentes de carbono se midió como variaba el pH a fin de evaluar la capacidad acidogénica de S. mutans. Esta es el resultado de la producción de ácidos a causa de la actividad glicolítica ejercida por esta bacteria sobre cada azúcar.

Según esto, la figura 5 ilustra los cambios de pH experimentados por cada azúcar a lo largo de las 12 horas de estudio mediante curvas que representan la caída de pH, partiendo en todos los casos de un pH inicial 7.0. El control sigue siendo un medio que no contiene azúcar.

Se vió que el pH final con glucosa y sacarosa es de $\text{pH} = 5.0$ y $\text{pH} = 5.2$ respectivamente. El pH final obtenido en presencia de manitol es algo menor de 6.0, es decir 5.8, mientras que la lactosa es curiosamente menos acidogénica, cuyo pH es 6.0. Con respecto a sorbitol y xilitol, el descenso de pH es algo inferior, entre 6.2 - 6.6 y por tanto con un valor considerablemente más bajo que el correspondiente a la glucosa y sacarosa. El control en ausencia de azúcar va modificando lentamente su pH hasta alcanzar un pH de 6.8 próximo al inicial ($\text{pH} = 7.0$).

En función de los resultados, se comprueba que la mayor capacidad para

producir ácidos se obtiene con sustratos tales como la glucosa y la sacarosa y en menor grado con el manitol. Por otro lado, tanto el sorbitol como xilitol originan en el medio un descenso de pH muy bajo en comparación con otros azúcares.

3.2.3. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE AZUCARES.

La figura 6, representa el crecimiento celular en un medio de cultivo enriquecido con dos azúcares: sacarosa y glucosa, a dos diferentes concentraciones. Una de ellas corresponde a un aporte de carbohidratos al medio de crecimiento en condiciones límites (1%) (258), y otra de ellas a altas concentraciones de azúcar (10%). Se empleó como curva control, un cultivo de S. mutans en ausencia de azúcar. Se comprueba que ambos azúcares manifiestan un crecimiento celular equivalente, hecho que se evaluó mediante recuento celular medido en (log ufc/ml).

Analizados los posibles cambios de pH originados en situaciones de alta y baja concentración de azúcar en el medio, se observó que cuando la glucosa y la sacarosa están presentes a baja concentración se consiguen valores de pH: 5.0 - 5.2, mientras que para una concentración alta de glucosa y sacarosa es un pH más bajo, siendo el valor final obtenido con ambos alrededor de pH=4.5 (figura 7).

3.2.4. CAPACIDAD ACIDURICA.

En la figura 8, se presentan los recuentos celulares obtenidos con S. mutans sometido a diferentes valores de pH (6.5, 5.0, 4.0, 3.0) en el medio, tomando como control pH = 7.0.

S. mutans alcanza los recuentos celulares más altos a pH = 7.0, siendo el mayor valor de recuento celular alcanzado de 3.1×10^9 ufc/ml, mientras que a medida que baja el valor de pH a que es sometido el medio de cultivo, se origina una reducción progresiva del crecimiento de este microorganismo; esta inhibición es muy elevada a pH = 4.0 y pH = 3.0 alcanzando en estos últimos valores de recuento de 10^5 y 10^3 ufc/ml respectivamente.

Con pH tales como pH: 6.5, 5.0, aunque se produce un importante descenso inicial (en las 3 primeras horas) la bacteria se recupera mostrando un progresivo crecimiento, alcanzando valores finales de recuento 7.9×10^7 y 1.5×10^8 ufc/ml respectivamente, paralelo al que manifiesta el control donde se consiguen los valores máximos de crecimiento bacteriano. No se produce tal situación cuando el pH del medio es 3.0, mientras que en un ambiente a pH = 4.0, S. mutans se ve que sufre un drástico descenso inicial, a continuación comienza un ligero ascenso, para finalmente mantenerse.

Además de estas observaciones se anotaron los cambios originados en el pH del medio a lo largo de las 10 horas de estudio, respecto de los valores iniciales. En el caso de pH 6.5 y pH 5.0, éste se va modificando hasta establecerse en un valor alrededor de 5.5. En cuanto a la situación altamente ácida que se crea sometiendo la bacteria a un pH = 4.0, esta hace descender ligeramente este valor a 3.5, para finalmente experimentar un pequeño ascenso coincidiendo con las últimas horas de la curva de desarrollo bacteriano.

3.3. ENSAYO DE COAGREGACION.

Realizados los ensayos de coagregación entre S. mutans ATCC 25175 y otras especies bacterianas orales procedentes de aislamientos clínicos y colecciones tipo,

se observaron los diferentes grados de coagregación que se dieron entre ellas. Estos resultados se muestran en la tabla 1, que incluye los porcentajes de coagregación que se obtuvieron en cada caso.

Todas las parejas de coagregación se observaron segundos después de agitarlos, y se comprueba que la cepa standard S. mutans muestra un elevado grado de coagregación con Actinomyces odontolyticus, Veillonella alcalescens, Bacteroides intermedius y Prevotella loescheii. Así mismo existe agregación aunque débil con Fusobacterium nucleatum y no se encontró coagregación en ningún caso con cepas del gen. Lactobacillus spp., gen. Streptococcus spp. (S. mitior, S. salivarius), Prevotella melaninogenicus, Porphyromonas gingivalis y Actinobacillus actinomycetemcomitans. Estos resultados se observaron en la totalidad de los casos probados de cada especie, a excepción de B. intermedius y S. mutans que sólo mostraron coagregación en un 66.6% y 90% de los casos respectivamente.

En todos los casos se evaluaron las autoagregaciones de las cepas que enfrentamos, sólo en dos casos se dió la capacidad de agregar consigo mismo, como fue con la cepa standard S. mutans ATCC 25175 con un grado de coagregación (+ +) y Actinomyces odontolyticus ATCC 17982.

En la mayoría de los casos se tomaron muestras de las parejas de bacterias enfrentadas que eran capaces de coagregar y realizamos una tinción Gram, con el fin de confirmar la existencia de agregación entre ambas especies bacterianas.

3.4. ENSAYO DE "SLIME".

La capacidad de S. mutans ATCC 25175 para producir "slime" en función del tiempo de incubación, aparece reflejado en la tabla 2. De los resultados obtenidos,

podemos deducir, que este microorganismo alcanza a las 48 horas la mayor cantidad de polisacáridos extracelulares producidos siendo su actividad más elevada a las 24 h. que a las 72 horas.

Los resultados de la prueba de "slime" realizada con otras especies bacterianas pertenecientes al Gen. Streptococcus y Gen. Lactobacillus, se muestran en la tabla contigua; en ella se especifica el origen de cada uno de los microorganismos ensayados, así como el número total de bacterias empleadas y el recuento porcentual de especies productoras de "slime" en función del tiempo de incubación. Este ensayo se llevó a cabo con cepas procedentes de la saliva de ratas que utilizamos en el modelo experimental.

Evalúados cada uno de los grupos se observa que las cepas de S. mutans en su mayor número obtienen el máximo grado de producción entre las 24 y 48 h., mientras que las cepas del Gen. Lactobacillus ensayadas lo alcanzan a las 72 h. Sólo hubo un 70% de los casos pertenecientes a este último género, en los cuales no se detectó elaboración de polisacáridos extracelulares.

La determinación del grado de producción de "slime" se valoró en relación a 4 categorías, significando 0 la ausencia de ésta y +3 el mayor grado de elaboración de "slime" conseguido.

Tal como se observa en la tabla 2, en el caso de Lactobacillus spp., el mayor número de cepas no presenta capacidad para producir estos mucopolisacáridos; por el contrario el total de cepas de S. mutans valoradas, sí presentan esta propiedad.

3.5. DETERMINACION DE GLUCANO INSOLUBLE.

La determinación de la cantidad de glucano insoluble se hizo teniendo en cuenta los valores de DO obtenidos en el ensayo que corresponde a 4 categorías diferentes.

En la tabla 3, aparece reflejado el glucano insoluble producido por S. mutans a diferentes concentraciones de azúcar, que en este caso es la sacarosa. Según los valores obtenidos de COD (DO corregido) vemos que la cantidad de glucano producido aumenta a medida que aumenta la concentración de sacarosa, siempre referido a un control sin azúcar, el cual no manifestó capacidad alguna para elaborar glucano.

También en este caso hicimos un seguimiento con las cepas de S. mutans, aisladas del modelo "in vivo", con el fin de averiguar que porcentaje de ellas son productoras de glucano. La muestra valorada consta de 30 cepas, divididas en 3 grupos según la procedencia. Analizados los resultados, observamos en cada grupo de estudio que el mayor número de cepas, producen glucano a la concentración de sacarosa más elevada (10%).

En todos los casos tomamos como control un inóculo de S. mutans cultivado en ausencia de azúcar, siempre valorando aquellos casos en los que la medida mínima en el espectrofotómetro marcara 0.05.

3.6. ACTIVIDAD DE FLUORURO SODICO SOBRE S. mutans.

3.6.1. ESTUDIO DE SENSIBILIDAD: CMI-CMB.

Determinamos la CMI y CMB de fluoruro sódico, utilizando un método estandarizado como es la técnica de dilución en caldo frente a S. mutans ATCC

25175 y obtuvimos que el valor de CMI es de 128 mg/l, mientras que la CMB es 4096 mg/l, es decir 32 veces mayor que el valor de CMI.

3.6.2. CURVA DE LETALIDAD.

La actividad antimicrobiana del flúor frente a un cultivo puro de esta cepa, en función del tiempo y a la concentración de CMI, viene representada en la fig. 9. Como se puede apreciar en ella, a dicho valor de CMI se produce un efecto inhibitorio del crecimiento de esta bacteria mostrando durante las cinco primeras horas un progresivo descenso en el recuento celular, para estacionarse a continuación.

Con las curvas de letalidad se consigue saber el poder bactericida de la droga respecto al tiempo, aplicandolo como el tiempo requerido para bajar la población bacteriana 3lg, es decir el 99.9 % (16); en nuestro caso el descenso máximo no superó este valor.

Pasadas 2h. de exposición del flúor frente a S. mutans y eliminado éste por un proceso de dilución, se valoró el efecto que tendría la retirada del antimicrobiano en el crecimiento de este microorganismo. En la fig. 10, se muestran los recuentos celulares obtenidos a partir de este momento observandose en estas condiciones, una recuperación bastante rápida del crecimiento de S. mutans a partir de la primera hora; alcanzando al cabo de siete horas de incubación en baño con agitación, un valor de 10^7 ufc/ml, teniendo en cuenta que el recuento inicial fue de 1.5×10^3 ufc/ml, luego se consigue un incremento de 4 lg. Esta recuperación una vez eliminado el flúor nos indica el efecto bacteriostático que ejerce este antimicrobiano sobre S. mutans, es decir inhibe el crecimiento pero no mata la bacteria.

3.6.3. INFLUENCIA DE DIVERSOS PARAMETROS EN LA ACTIVIDAD DE FLUORURO SODICO (NaF).

Uno de los objetivos que nos propusimos fue valorar la influencia de algunos parámetros sobre la actividad del antimicrobiano en la cinética de crecimiento de S. mutans ATCC 25175.

*** INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE AZUCAR.**

Se valoró la inhibición que ejerce el NaF en el crecimiento de S. mutans utilizando dos concentraciones de azúcar diferentes en el medio de cultivo.

Los resultados reflejados en la fig. 11, muestran que la inhibición producida por NaF frente a este microorganismo a la concentración de CMI, es similar a ambas concentraciones de azúcar. Así, cuando la concentración de glucosa en el medio es un 1% encontramos al cabo de 8h. un recuento celular de 10^3 ufc/ml, mientras que a la misma hora y cuando el azúcar alcanza una concentración del 10% el recuento que se consigue es de 2.5×10^3 ufc/ml. Según esto, el flúor a la concentración de CMI, ejerce el mismo efecto de inhibición sobre el crecimiento de S. mutans, independientemente de la concentración de glucosa que hubiese en el medio.

Estudiado el efecto del flúor en asociación con bajas y altas concentraciones de sustrato sobre este microorganismo se observa, según se muestra en la tabla nº 4 que al medir el pH del medio, éste apenas experimenta cambio alguno ya que frente a un pH inicial 7.0 se produce un descenso a pH 6.5, mientras que en los controles con concentraciones de glucosa en el medio de 1 y 10%, libre de flúor el pH obtenido es de 5.0 y 4.5 respectivamente, luego en estos últimos el pH baja.

Estos resultados indican que el flúor inhibe o cesa la producción continua de ácidos a partir de estos azúcares.

*** INFLUENCIA DE PH.**

La actividad del flúor se estudió a diferentes valores de pH; para conseguir el pH deseado añadimos HCl diluído en el medio.

Queda reflejado en las fig. 12 y 13, que existen diferencias entre los recuentos celulares obtenidos con los diferentes pH. Partiendo de un inóculo inicial 10^7 ufc/ml y al cabo de 8 h., se observa:

* a pH 6.5 el valor de recuento celular en el control de flúor es 5×10^4 ufc/ml y en el control de pH: $7,9 \times 10^7$ ufc/ml, mientras que cuando actúan conjuntamente, es decir flúor en un medio a pH 6.5, el recuento obtenido es $7,9 \times 10^4$ ufc/ml, similar en este caso al valor alcanzado con la actividad del flúor.

* a pH 5.0, el valor de recuento frente a la actividad del flúor es igual que la anterior, a pH 5.0 el recuento es 1×10^8 ufc/ml y la actividad del flúor en un medio con dicho pH es $7,9 \times 10^3$, inferior en 1 logaritmo al dato mostrado con el pH anterior.

* a pH 4.0, disminuye considerablemente el valor de recuento celular obtenido tras 8 h. de actividad del flúor frente al crecimiento de S. mutans, siendo este valor inferior a 1×10^3 ufc/ml y en los correspondientes controles de flúor y pH 4.0 de 5×10^4 y $1,9 \times 10^5$ ufc/ml, respectivamente.

Sometido esta especie a medios con pH ácido y a una concentración de flúor igual al valor de CMI (128 mg/l) según las fig. 12 y 13 se ve, un aumento de la actividad del flúor frente a S. mutans a medida que disminuye el pH del medio. La

combinación de ambos factores provocan una inhibición del crecimiento bacteriano y de la acidez del medio mayor que cuando cada una de estas condiciones se evalúan individualmente respecto del control.

*** INFLUENCIA EN LA AGREGACION.**

El fenómeno de agregación se estudió con la cepa S. mutans ATCC 25175 y vimos que tiene capacidad para autoagregar. Evaluamos la actividad que desempeña el flúor a concentraciones subinhibitorias sobre esta cepa, datos que aparecen reflejados en la tabla 5, donde se especifica el grado de agregación que muestra esta bacteria frente a las distintas concentraciones de flúor aplicadas.

Según estos resultados y teniendo en cuenta las condiciones experimentales a que fue sometido el ensayo, vemos que las concentraciones subCMI no influyen en el fenómeno de autoagregación de esta especie.

*** INFLUENCIA EN LA PRODUCCION DE EXOPOLISACARIDOS.**

Evaluamos el efecto que produce el flúor en la capacidad de S. mutans para producir PSE del tipo glucano. En la tabla 6, se representan los valores subCMI del flúor y valores de DO corregida obtenidas por espectrofotómetro relativas a la producción de glucano de este microorganismo.

Cuando la concentración de flúor coincide con el valor de la CMI (100%), se inhibe la producción de glucano ya que el valor de COD obtenido (0.02) no se incluye dentro del mínimo establecido para la producción de este polisacárido. Por el contrario valores de subCMI de 64 mg/l y 32 mg/l de NaF afectan a este microorganismo originando un aumento en la producción de glucano en un grado. Finalmente cuando la concentración subCMI de flúor es de 16 mg/l, la cantidad de glucano producida por S. mutans aumenta hasta 0.29, valor que se incluye dentro

de la 2ª categoría (2+) y con 8 mg/l el valor de COD sigue aumentando hasta 0.44, valor muy próximo al que corresponde a la categoría (3+).

Según esto, el flúor a concentraciones subinhibitorias aumentan la producción de glucano y por consiguiente favorecen la capacidad de adherencia de S. mutans.

*** RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO "IN VIVO".**

3.1. PESO

En el estudio llevado a cabo con ratas Wistar, el consumo de las dietas originó algunas variaciones en el peso, pero no suficientemente representativas como para que se viera afectada su salud.

En cada uno de los grupos de ratas ensayadas se calculó la media (\bar{x}) de los pesos obtenidos y el error standard (ee) con el fin de estudiar las posibles modificaciones (tabla 7).

El aporte de la dieta "K2000" y "fibra Gwar" "ad libitum" no supuso ninguna alteración en el peso del animal, como se pudo comprobar a lo largo de los dos controles periódicos que mostraron como resultado final un aumento de peso.

Respecto a los tratamientos fluorados, tanto en la forma de agua fluorada como de barnices se observó una disminución de peso, aunque solo cuando se administraron conjuntamente con la dieta "K2000".

Los resultados relacionados con el peso obtenido en cada grupo experimental,

se encuentran reflejados en la fig. 14, señalando el primer control (C1) a los 45 días y el segundo control (C2) a los 90 días.

3.2. RECuentos MICROBIOLÓGICOS EN SALIVA.

En este estudio se ha valorado mediante un estudio microbiológico la influencia de una dieta presumiblemente cariogénica, así como la acción del flúor suministrado por dos vías distintas y el posible desarrollo de lesiones dentales sobre S. mutans, por tratarse de la principal bacteria implicada en la caries.

Las gráficas que a continuación exponemos representan el número de ratas ($n=15$) y los recuentos de S. mutans y Lactobacillus obtenidos en cada grupo experimental.

En la figura 15 representamos la relación existente entre la dieta y la presencia de S. mutans, siendo de 0-10 ufc/ml el valor alcanzado por el control en el mayor número de casos; con la dieta "K2000" es de 10^4 - 10^5 ufc/ml valor más elevado que con la "fibra Gwar" cuya medida más frecuente esta entre 10^2 - 10^3 ufc/ml. Estos valores se incrementan en la segunda toma de ambas dietas mientras que se mantienen aproximadamente igual en el caso del grupo control.

Es decir, S. mutans crece independientemente de las dietas suplementadas con hidratos de carbono, como sucede en el grupo control que fue alimentado sólo con dieta de mantenimiento, aunque el recuento obtenido fue mucho más bajo en relación con las otras dos dietas.

En la figura 16, vemos la relación entre dieta "K2000"-flúor y crecimiento de S. mutans, observándose una clara disminución de éste con los tratamientos

fluorados ya que frente al recuento de 10^4 - 10^5 ufc/ml, valor más frecuentemente obtenido con la dieta "K2000", ésta misma asociada con un tratamiento de agua fluorada disminuye el valor hasta un total de 10^2 - 10^3 ufc/ml y más aún, alcanza valores de 0-10 ufc/ml en el tratamiento con barnices de flúor, es decir prácticamente no se detecta el crecimiento de S. mutans con este último.

En la figura 17, se aprecia la relación existente entre "fibra Gwar"-flúor y la presencia de S. mutans observándose de nuevo una disminución cuando la dieta "Fibra Gwar" se asocia a los tratamientos fluorados; frente a un valor de 10^2 - 10^3 ufc/ml alcanzado en las ratas alimentadas sólo con dieta fibra, se detectó un valor de 0-10 ufc/ml con barnices, así con un valor medio de $x = 1.6 \times 10^3$ ufc/ml en la dieta asociada a agua fluorada, aunque existe un intervalo de valores más amplio.

Hemos visto que las dietas aportadas tanto la dieta "K2000" como la dieta "fibra Gwar", incrementan el recuento de S. mutans; asimismo en el segundo control realizado a los 90 días, los tratamientos fluorados aplicados conjuntamente con ambas dietas, también encontramos que se va produciendo un descenso cada vez mayor en el recuento de esta especie bacteriana.

En la figura 18, representamos la relación entre la dieta y la aparición de Lactobacillus spp. En el caso del control alcanza un valor medio de 3.1×10^3 ufc/ml similar a los encontrados con la dieta "K2000" que es de 5.3×10^3 ufc/ml, y la dieta "fibra Gwar" $x = 7.3 \times 10^3$ ufc/ml existiendo un intervalo de valores mucho más disperso con esta última. A los 90 días, se consiguen valores similares en el control en relación con la primera toma, mientras que en el caso de las dietas se manifiesta un pequeño aumento siendo los valores medios alcanzados con la dieta "fibra Gwar" (2.1×10^4 ufc/ml) y con la dieta "K2000" (1.2×10^4 ufc/ml).

En la figura 19, se representa la relación entre la dieta "K2000"-flúor y el desarrollo de Lactobacillus spp., observándose que con ambos tratamientos de flúor,

en forma tópica (barnices) y en forma general (agua fluorada), a los 45 días empiezan a aparecer casos de ratas con recuentos bajos aunque en general los valores medios de recuento celular son similares respecto del control con dieta "K2000", siendo estos $x = 1.6 \times 10^3$ ufc/ml y 4.6×10^3 ufc/ml, respectivamente. A los 90 días los valores aumentan hasta observarse ratas con valores de 10^4 ufc/ml contrariamente a otros casos de ratas en que se daban valores muy bajos de Lactobacillus spp.

En la figura 20, representamos la relación dieta-flúor y el desarrollo de esta bacteria, en este caso dieta "fibra Gwar"; si comparamos los valores medios recogidos con dicha dieta junto a los tratamientos fluorados, se detecta que frente a $x = 7.2 \times 10^3$ ufc/ml, valor medio de recuento obtenido con la dieta azucarada + "fibra Gwar", en el caso de las aplicaciones con barnices y el tratamiento con agua fluorada el resultado es similar con unos valores de $x = 2.5 \times 10^3$ ufc/ml y $x = 5 \times 10^3$ ufc/ml respectivamente. En este caso, a los 90 días aparecía un recuento menor con ambos tratamientos comparado con la dieta "fibra Gwar" sin flúor.

Para comparar los resultados obtenidos en este estudio se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) que estudia el efecto de un determinado factor cualitativo sobre una variable; mediante la prueba de homogeneidad comparamos la media de los grupos dos a dos y consideramos en todos los casos los siguientes grados de significación estadística frente al control: $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.005$...

Estadísticamente se comprueba que las diferencias halladas en los recuentos de S. mutans con la dieta "K2000" y "fibra Gwar", respecto del control son significativas con una $p < 0.00005$ y $p < 0.01$ respectivamente. Asimismo, entre ambas dietas los valores de S. mutans obtenidos muestran diferencias significativas con una $p < 0.05$.

A los 3 meses, las diferencias encontradas entre la dieta "fibra Gwar" y el

control aumenta su grado de significación, pasando a ser $p < 0.00005$ (tabla 8).

En cuanto a los tratamientos fluorados, la administración conjunta de dieta "K2000" con barnices de flúor y agua fluorada, originan un descenso en el recuento de S. mutans; esta diferencia es altamente significativa, $p < 0.00005$. Cuando la dieta es con "fibra Gwar", existen también diferencias estadísticas respecto del control, pero con una significación menor comparada con la dieta "K2000" ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente). A los 90 días estas diferencias se hacen muy significativas con la dieta "fibra Gwar" ($p < 0.00005$), alcanzando el mismo grado de significación que el obtenido con la dieta "K2000" a los 45 días. Según esto se comprueba que el aporte de ambas dietas al animal provoca un aumento significativo del recuento de S. mutans.

En relación con la otra bacteria estudiada, gen. Lactobacillus si comparamos las dietas con el control, el recuento alcanzado en ambas es similar, no encontrando desde el punto de vista estadístico diferencias significativas respecto del control, o entre ambas dietas. Sin embargo a los 90 días con la "fibra Gwar" se produce un pequeño aumento en el recuento celular estadísticamente significativo, $p < 0.05$.

En las aplicaciones con flúor, sólo se aprecian diferencias significativas entre los recuentos, cuando las ratas reciben dieta "fibra Gwar" y pincelaciones con flúor, $p < 0.01$. A los 90 días, las diferencias estadísticas se hacen más significativas con dicha dieta, tanto para barnices como para agua fluorada, ($p < 0.0005$ y $p < 0.05$ respectivamente) siendo mayor en el caso de aplicaciones tópicas de flúor (tabla 9).

3.3. EXAMEN CLINICO DE CARIES.

Realizamos controles periódicos a los 45 y 90 días en cada uno de los grupos

de experimentación para detectar posibles procesos cariogénicos. Estas revisiones nos permiten observar una serie de modificaciones en el diente tanto desde el punto de vista macroscópico como microscópico.

En un primer estudio macroscópico, se trató de visualizar la existencia de caries cuantificando el número y su distribución en la superficie dental. Respecto a la observación macroscópica de caries, se hizo atendiendo al criterio diagnóstico propuesto por la OMS 1972 (255), que describe la presencia de caries como unas opacidades localizadas en el esmalte de aspecto amarronado, que es la reacción del esmalte a los ácidos producidos por las bacterias en la placa dental como de aprecia en la foto n° 2. Este hecho se comprobó introduciendo una aguja de punta fina, en los orificios irregulares que aparecían en la superficie opaca del esmalte que supuestamente son los que originarán microcavidades.



Foto 2. Lesión cariogena en la cara oclusal del diente.

En la tabla 10 figuran el número de ratas con caries (%) y los recuentos salivares de S. mutans, obtenidos en los distintos tipos de tratamientos respecto del control. Nuestras observaciones manifiestan la existencia de un alto número de ratas con caries en aquellos grupos tratados con ambos tipos de dietas ("K2000" y "fibra Gwar") y que estas opacidades se encuentran generalmente en las caras oclusales de los dientes.

En estas lesiones aparecidas a nivel macroscópico, simplemente observamos la destrucción a nivel del esmalte, aunque no se manifestaron lesiones aparentes en mucosas ni en alveolos. A nivel de incisivos aparecían manchas blancas que podían corresponder con hipoplasias, es decir, estados claramente precoces de una lesión cariogena posterior, en donde empezarían a destruirse los prismas del esmalte y a separarse los espacios interprismáticos.

Comparando ambas dietas, se observó que aparecían más caries con la dieta "K2000" que con "fibra Gwar", y con esta última se originan menos lesiones patológicas aunque se aprecian más lesiones primarias denominadas hipoplasias ó principio de caries. El grupo control que fue alimentado con dieta normal, solo se dió un caso que tuviera caries a los 90 días de tratamiento, mientras que el resto a nivel macroscópico no manifestaron indicios de que estos procesos cariogénos se estuvieran dando. Los tratamientos efectuados con flúor, lograron una disminución de estas lesiones, tanto con dieta "K2000" como con "fibra Gwar"; incluso a los 90 días, en el caso de barnices fluorados con la dieta "K2000", la mayoría de las ratas presentó una ausencia total de caries.

Comparando con los casos anteriores, se vió una respuesta patológica de las mucosas a los tratamientos tópicos con barnices. Aparecieron lesiones en las mucosas de carácter quelante junto a manchas amarillentas, que corresponden a fluorosis, más acentuadas en incisivos como se vé en la foto n° 3 y marcas de recalcificación (según se comprobó en el estudio histológico). Contrariamente a estos

hallazgos, en los tratamientos con agua fluorada no se encontraron lesiones.

Desde un punto de vista microscópico, estudiamos la histología de la lesión para ver si los datos macroscópicos observados con los diferentes tratamientos tenían relación con la lesión histológica y también con el fin de detectar posibles casos de recalcificación, teniendo en cuenta que en los tratamientos con flúor se obtenía una considerable reducción del número de caries.



Foto 3. Lesiones producidas por el uso de barnices fluorados.

Lesiones que no se aprecian macroscópicamente desde el punto de vista microscópico si son valorables mediante la técnica de luz polarizada. Esta técnica permite observar lesiones superficiales no visibles a las técnicas habituales poniendo de manifiesto una birrefringencia en el esmalte donde desaparece la estructura y aumenta la sustancia interprismática.

Realizamos un exámen minucioso de las lesiones por sección perpendicular a la superficie del esmalte y las preparaciones obtenidas, se observaron al microscopio. Estas mostraron en los grupos tratados, la presencia de áreas con pérdida de mineral, especialmente en la superficie, si bien en alguno de los grupos se demostró que las lesiones se extendían a capas más profundas afectando incluso a la pulpa. Con el microscopio de luz polarizada, examinamos las secciones desecadas donde se aprecia la lesión porosa. Esta aparece como un defecto en forma de cuña con base en la superficie del esmalte como se vé en la foto n° 4.

En este trabajo observamos que la pérdida de estructura de los primas esta presente en todos los casos tratados con las dietas cariogénas; si bien, había diferencias entre ambos siendo más evidente y más progresivas estas lesiones en el grupo "K2000". En algunos casos tratados con dieta "K2000" estas lesiones implicaron a la dentina y a la pulpa.



Foto 4. Lesión dental vista con el microscopio de luz polarizada.

Por último hemos de señalar que hemos obtenido capas de remineralización que se extendían de profundidad a superficie en los tratamientos llevados a cabo con agua fluorada y tratamientos tópicos con barnices, según se observa en la foto n° 4, si bien en estos últimos son más evidentes con la ausencia total de la placa bacteriana e incluso desaparición de las lesiones por apósito de calcio en las fisuras de las caras oclusales, que se manifestaban "de visu".

3.4. RELACION MICROORGANISMO-CARIES.

Se compararon los recuentos bacterianos obtenidos en saliva y el número de casos que desarrollaron lesiones cariogénas para ver si existía alguna relación entre ambas variables. En las tablas 10 y 11, figura el número de caries (%) que corresponden al número de ratas que desarrollaron caries en relación con el total de ratas Wistar muestreadas (n=15) a partir de al menos una manifestación cariogénica en alguno de sus dientes y la media de los recuentos bacterianos, tanto de S. mutans como de Lactobacillus sp respectivamente, en cada grupo experimental. En relación con los grupos de dietas "K2000" y "fibra Gwar" coinciden altos recuentos de S. mutans con un elevado número de ratas con caries, acentuándose este incremento en el segundo periodo de muestra como sucede con la dieta "K2000", en que casi el 100% de las ratas poseen dientes con caries. En los grupos tratados con flúor, los valores obtenidos tanto de ratas con lesiones como de recuentos bacterianos en saliva disminuyen considerablemente. Cuando el flúor se administra como barnices junto a la dieta "fibra Gwar" y "K2000", se produce una reducción de la caries del 93%-96% respectivamente.

Respecto al género Lactobacillus y en relación con las dietas administradas, vemos recuentos celulares menores en número que aquellos encontrados con S. mutans aunque también relativamente altos que coinciden con un alto porcentaje de

ratas con caries, aumentando progresivamente ambas variables hasta los 90 días valorados. Curiosamente en los tratamientos fluorados, mientras los casos de caries descienden, los recuentos de Lactobacillus obtenidos en saliva se mantienen; a los 3 meses después de ser tratado el grupo con dieta "K2000" y flúor, el recuento bacteriano aumenta mientras que el número de ratas con lesiones cariogénas disminuye.

Estadísticamente valoramos si había alguna correlación entre número de microorganismos en saliva y la incidencia de caries en ratas; para ello utilizamos dos tests de correlación: test Kendall y test Pearson, que calculan un coeficiente de correlación (r) entre ambos parámetros y un valor de probabilidad (p); en nuestro estudio consideramos como grado de significación en todos los casos $p < 0.05$. Comprobamos que existe un valor de correlación significativo entre S. mutans en saliva y ratas con lesiones cariogénas según ambos coeficientes; en todos los grupos había un grado de significación muy alto siendo débil cuando el aporte de flúor se asocia a la dieta "fibra Gwar" (tabla 12). En el caso de Lactobacillus sp., los dos coeficientes indican correlación entre ambas variables con valores muy altos de significación con dieta "K2000" y "fibra Gwar" ($p < 0.05$). En cambio en los tratamientos con flúor, la "fibra Gwar" muestra grados de significación débiles, $p < 0.03$, $p < 0.01$, mientras que con la dieta "K2000" se observa que la correlación no es significativa.

V. TABLAS Y FIGURAS

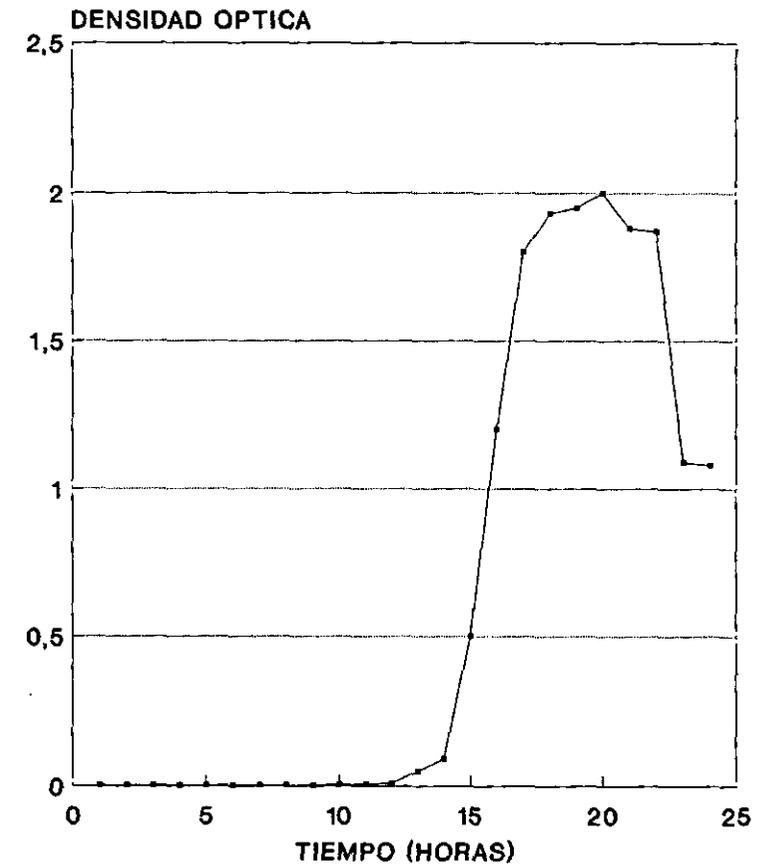
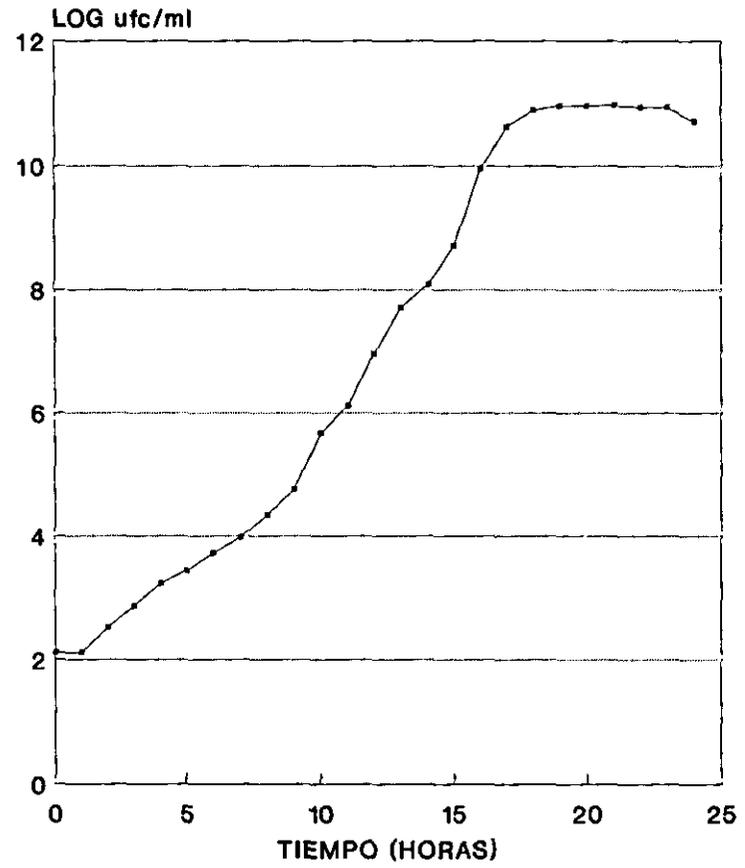


Figura 1. Curva de crecimiento bacteriano de *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

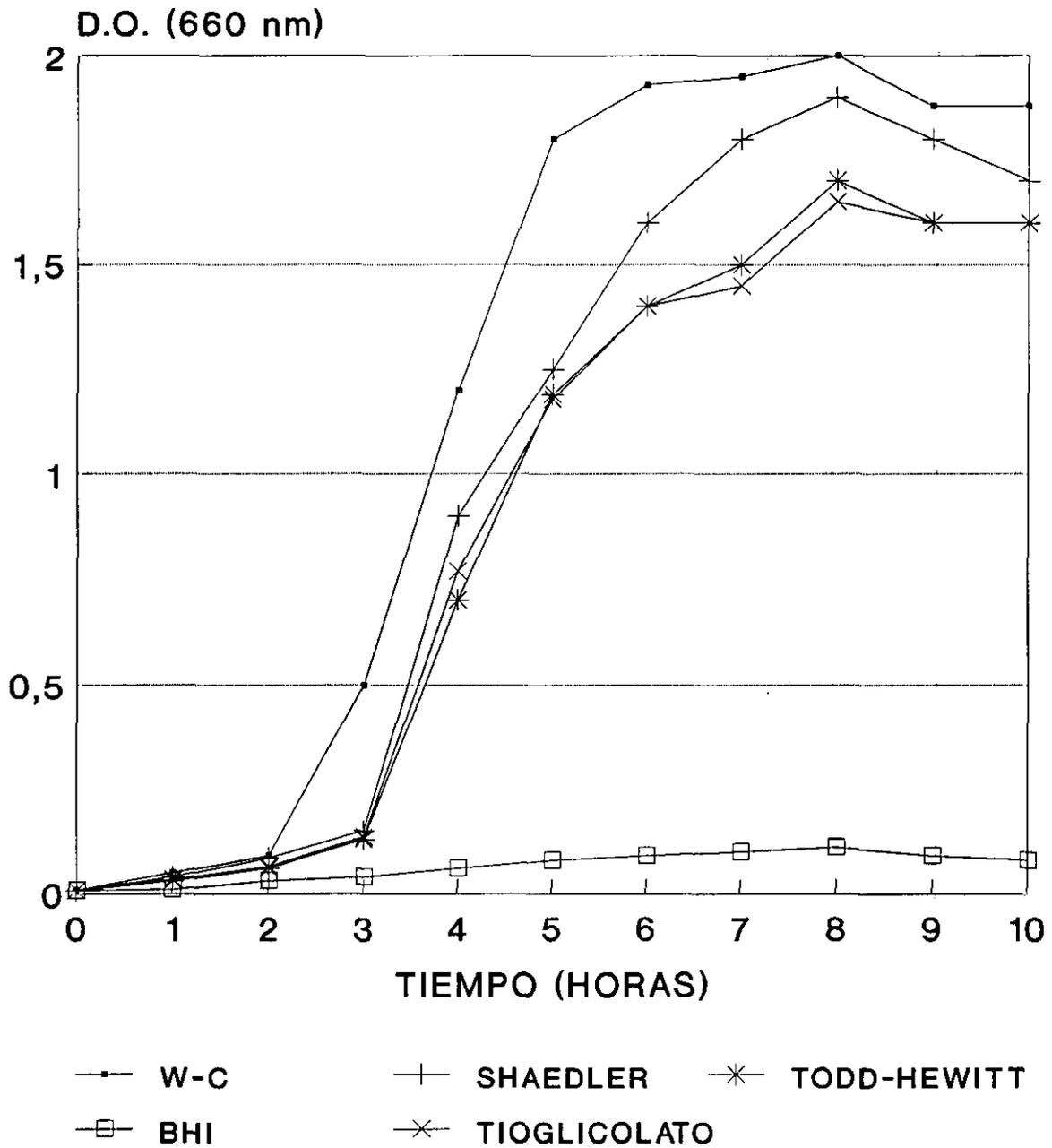


Figura 2. Curva de crecimiento bacteriano de S. mutans ATCC 25175 en cinco caldos de cultivo.

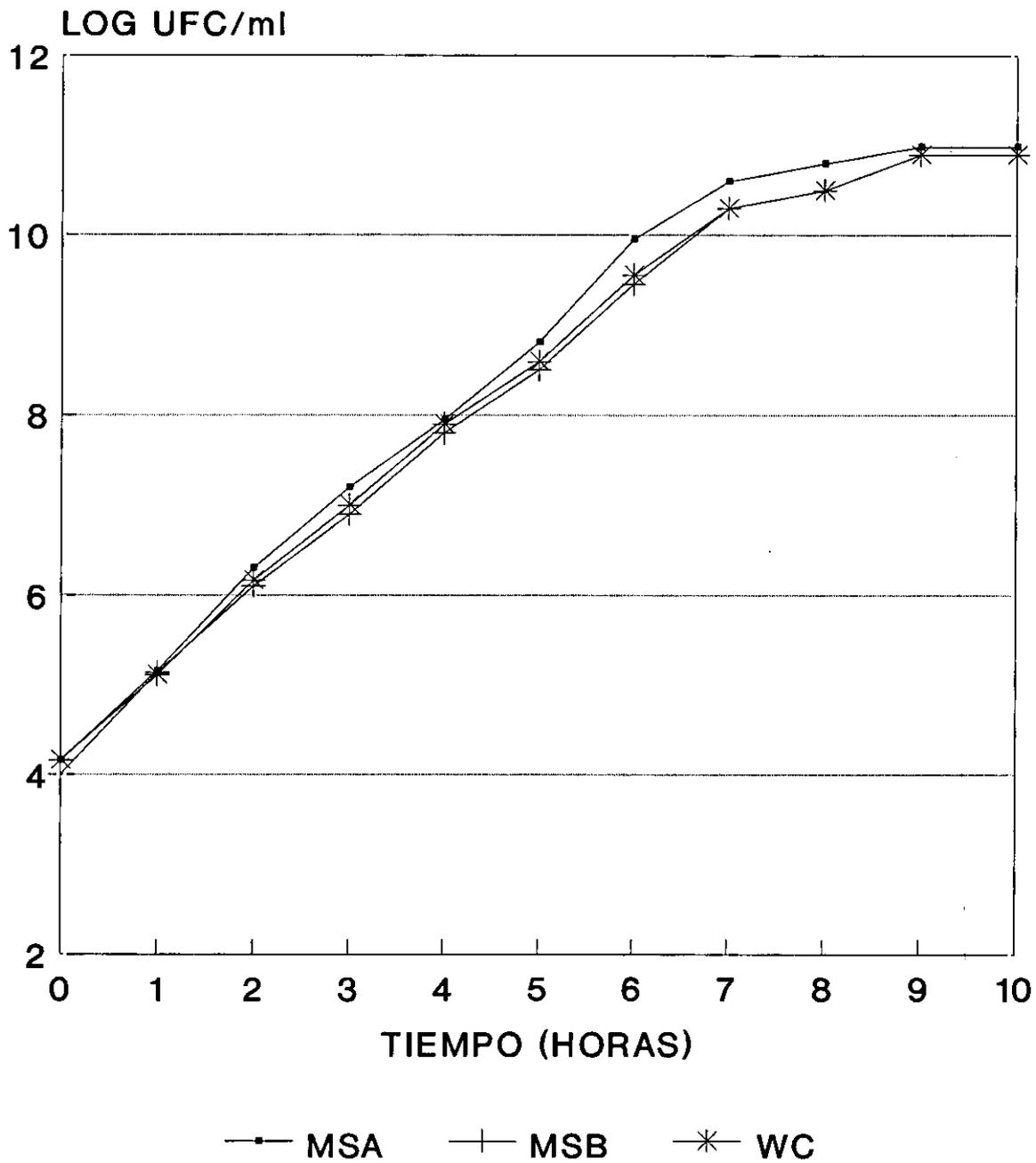


Figura 3. Recuentos celulares de *S. mutans* ATCC 25175 en tres medios de cultivo.

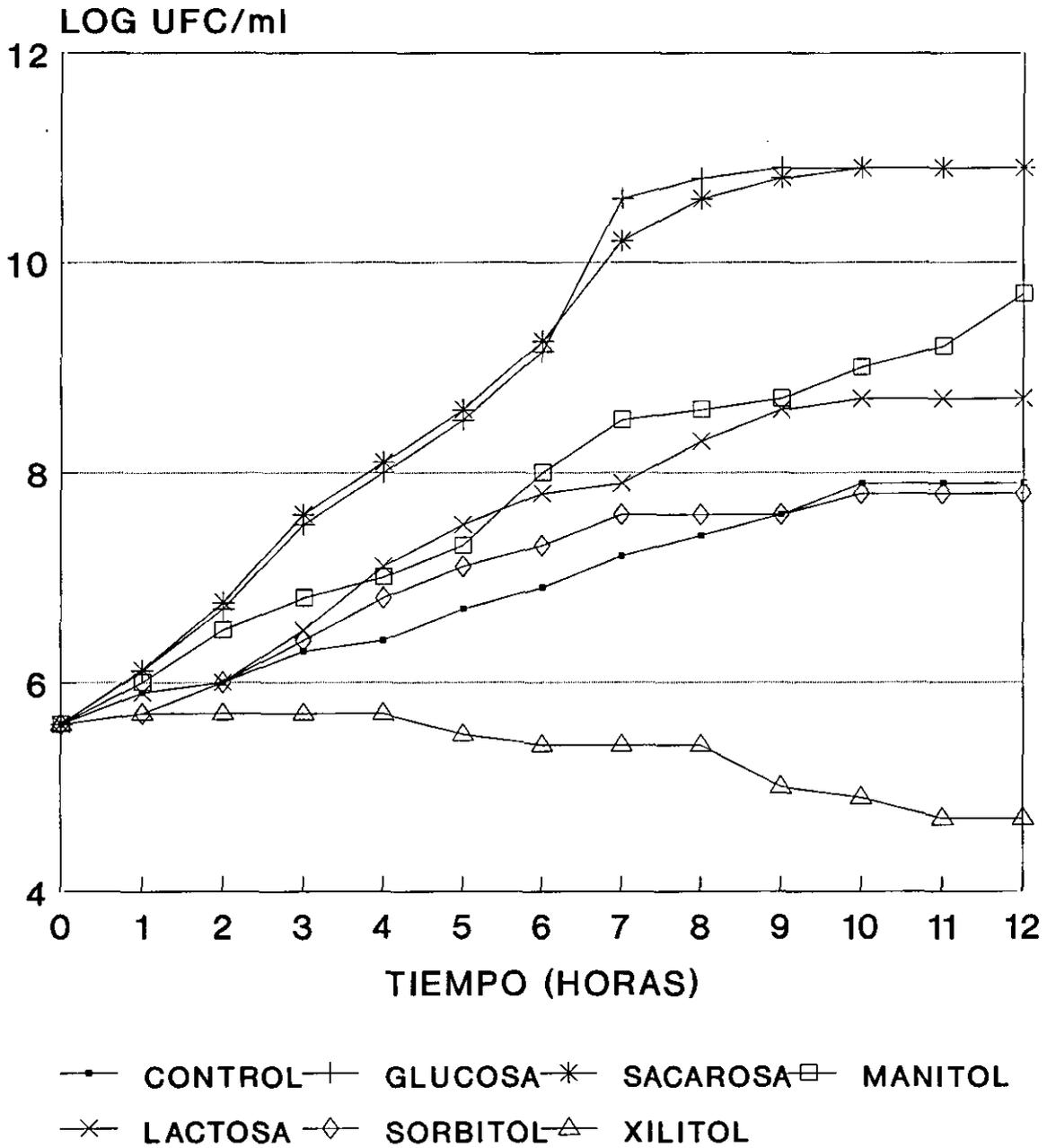


Figura 4. Efecto de seis azúcares (1%) en el crecimiento de *S. mutans* ATCC 25175.

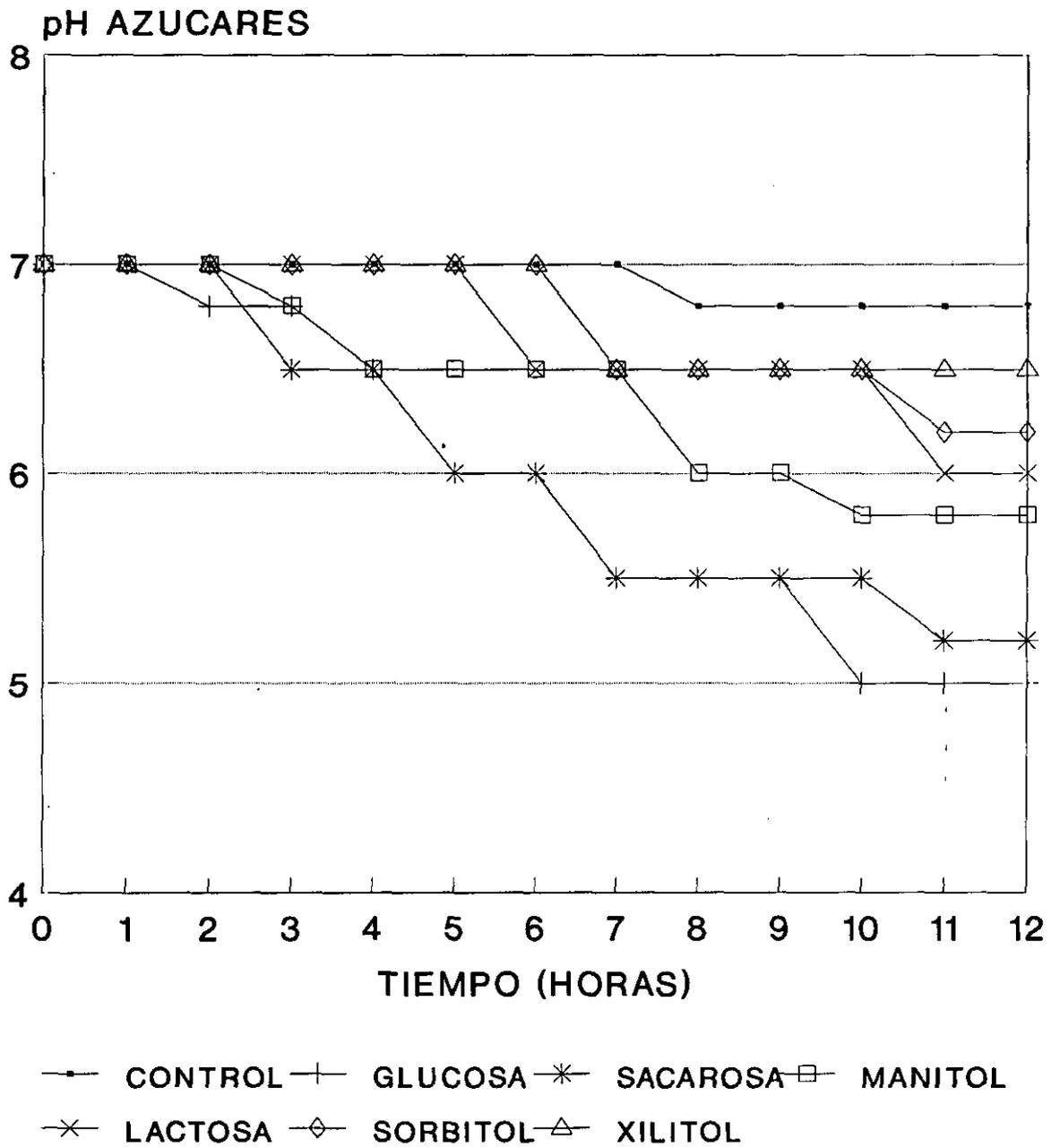


Figura 5. Curva de caída de pH: fermentación de S. mutans ATCC 25175 de varios azúcares.

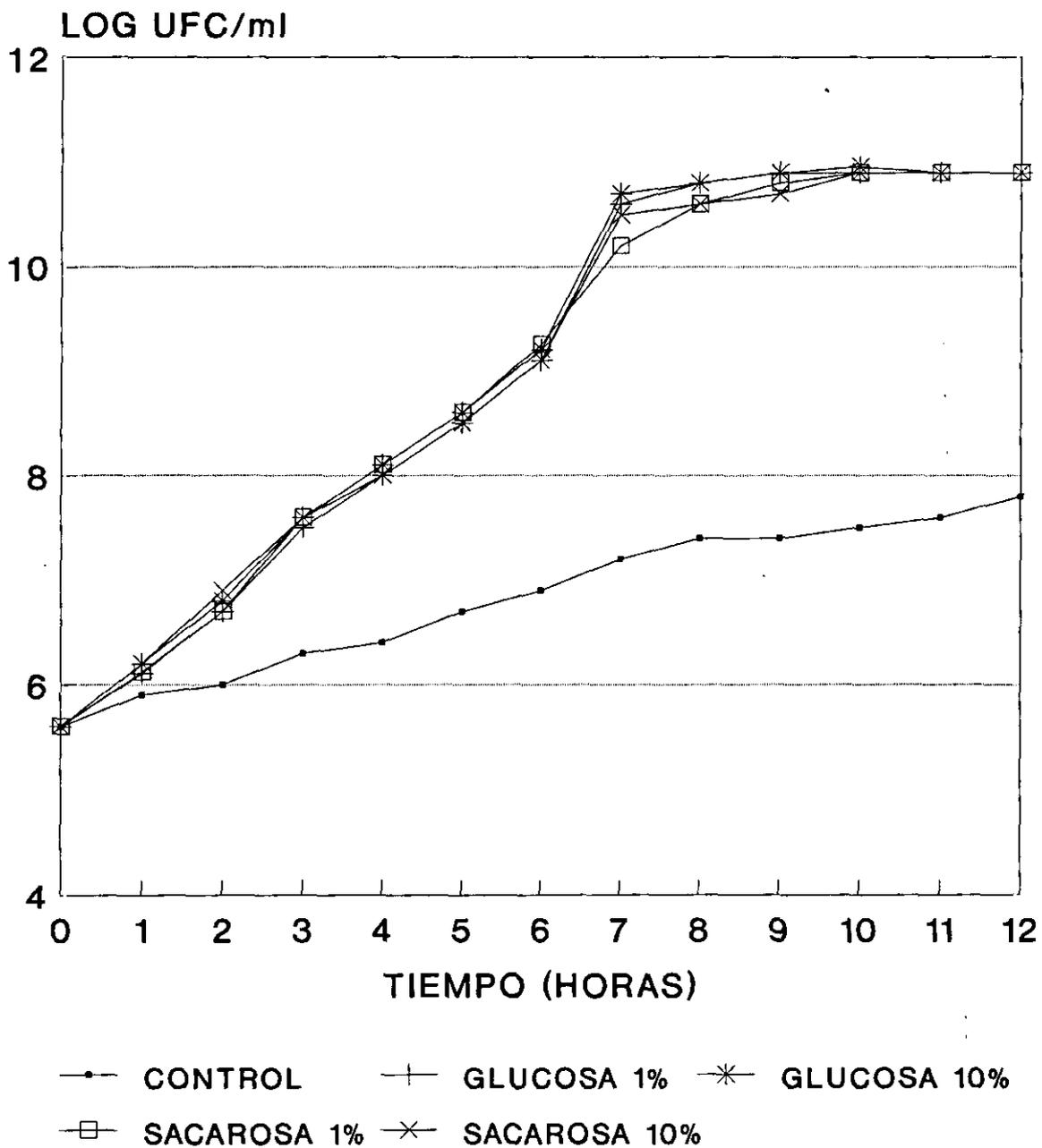


Figura 6. Efecto de diferentes concentraciones de azúcares en el crecimiento de *S. mutans* ATCC 25175.

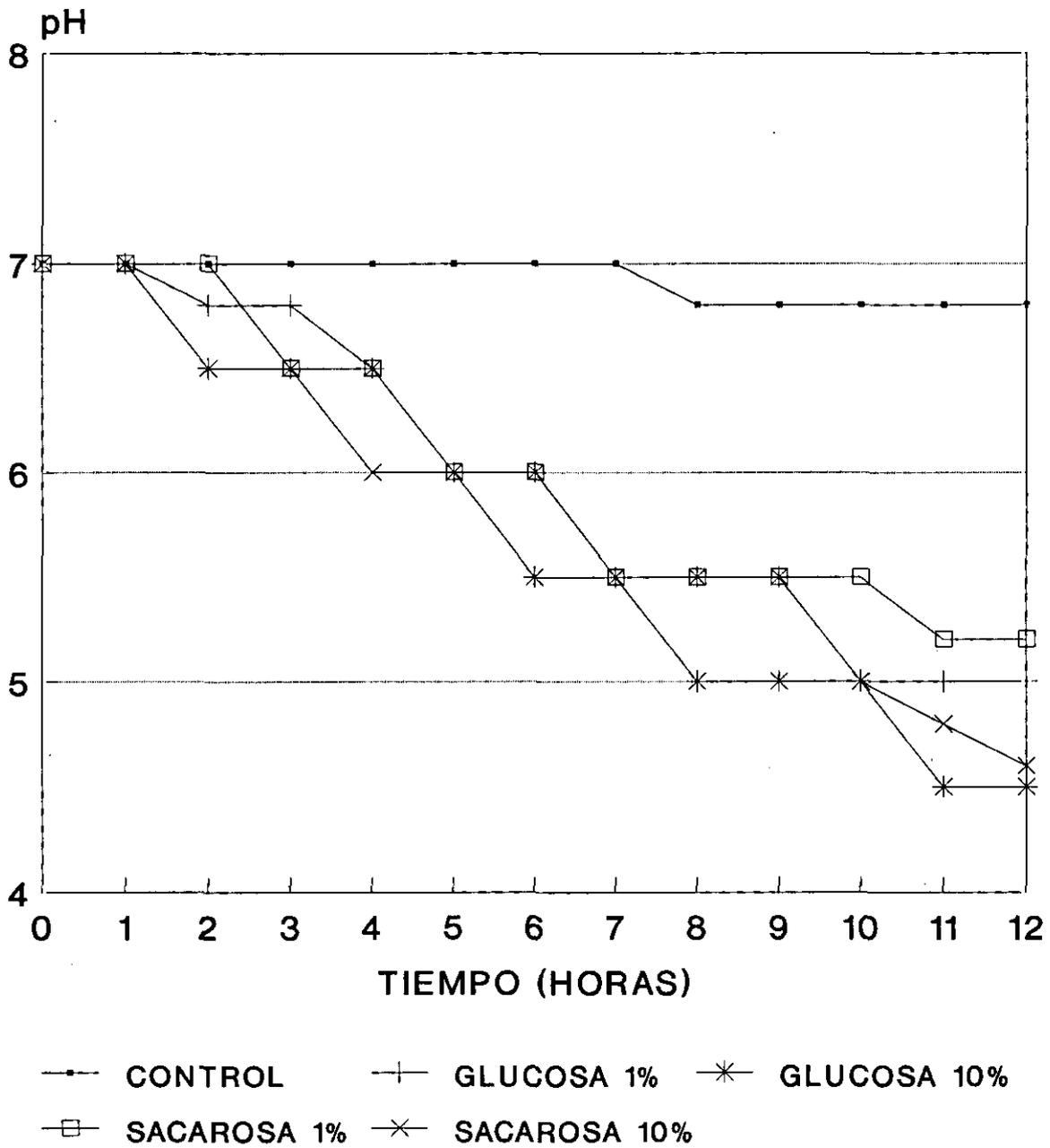


Figura 7. Caída de pH a distinta concentración de azúcar frente a S. mutans ATCC 25175.

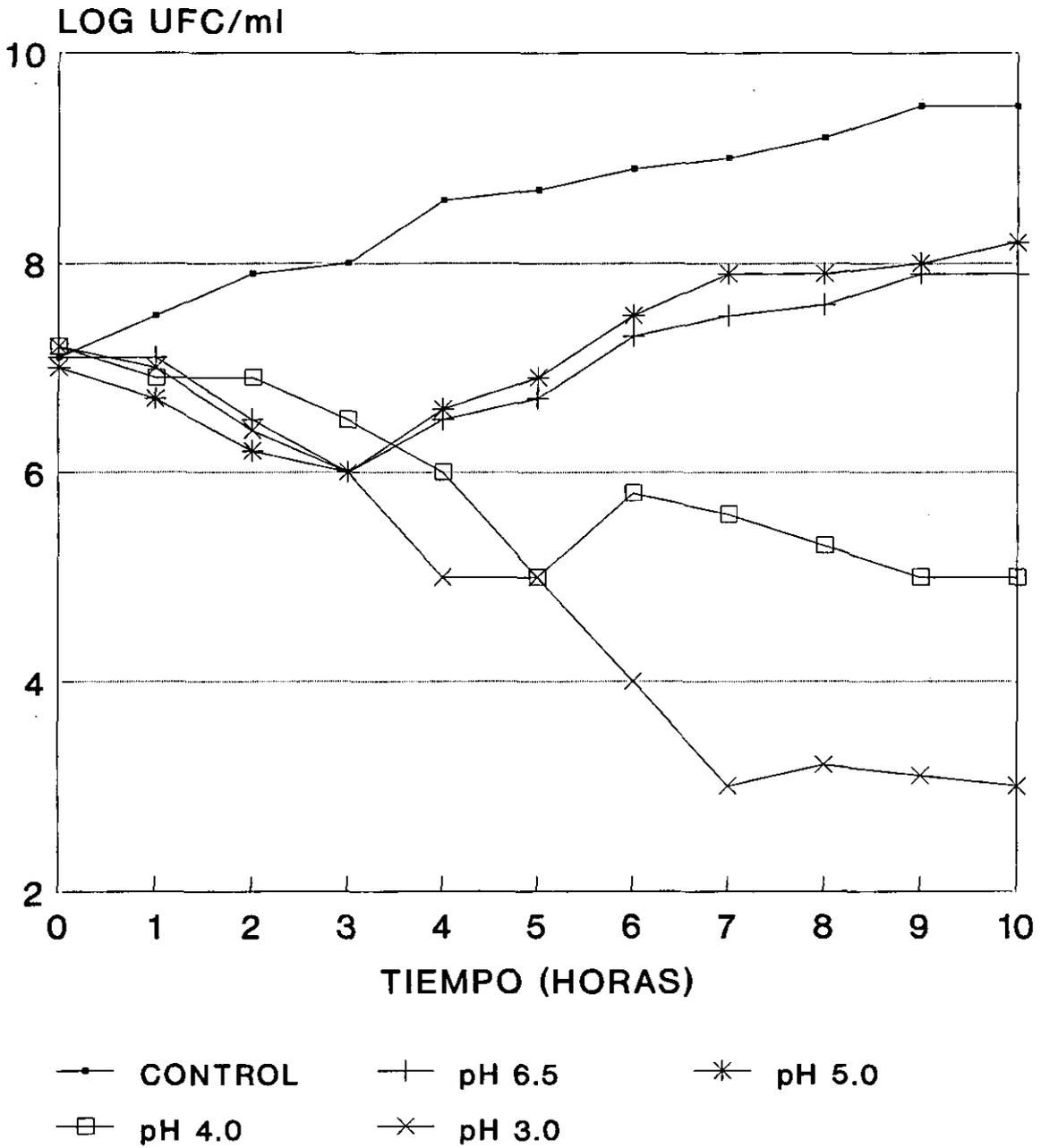


Figura 8. Recuentos celulares de *S. mutans* ATCC 25175 a pH distintos.

Tabla 1. Coagregacion entre S. mutans ATCC 25175 y otras bacterias orales.

GRUPO	ESPECIE BACTERIANA ORAL	COAGREGACION CON <u>S. mutans</u> ATCC 25175	AUTOAGREGACION	Nº CEPAS	AGREGACION
BACILOS GRAM +	<u>A. odontolyticus</u> ATCC 17982	+ +	+	1	100 %
	<u>Lactobacillus spp</u>	—	—	10	0 %
	<u>A. actinomycetemcomitans</u>	—	—	1	0 %
	<u>Fusobacterium nucleatum</u>	+	—	3	100 %
BACILOS GRAM -	<u>P. melaninogenicus</u>	—	—	1	0 %
	<u>P. gingivalis</u>	—	—	1	0 %
	<u>P. loescheii</u>	+ + +	—	1	100 %
	<u>B. intermedius</u>	+ + +	—	3	66.6 %
COCOS GRAM +	<u>S. mitior</u>	—	—	2	0 %
	<u>S. salivarius</u>	—	—	10	0 %
	<u>S. mutans</u>	+/-	-/+	50	90 %
COCOS GRAM -	<u>Veillonella alcalescens</u>	+ + +	—	1	100 %

Tabla 2. Medida de la producción de "slime" de *S. mutans* y *Lactobacillus spp.*, en relación con el tiempo de incubación.

TEST "SLIME"	TIEMPO DE INCUBACION (HORAS)		
	24	48	72
<i>S.mutans</i> ATCC 25175	+ + ⁽¹⁾	+ + +	+

(1) Determinación del grado de producción de "slime".

ESPECIE BACTERIANA	ORIGEN	Nº CEPAS	TIEMPO INCUBACION (HORAS)		
			24	48	72
<i>S. mutans</i>	Grupo Control	10	30 % ⁽¹⁾	60 %	10 %
<i>S. mutans</i>	Grupo "K2000"	10	80 %	20 %	0 %
<i>S. mutans</i>	Grupo "Fibra Gwar"	10	70 %	30 %	0 %
<i>Lactobacillus spp</i>	Grupo Control	10	0 %	10 %	20 %

(1) Recuento porcentual de cepas productoras de "slime".

Tabla 3. Determinación de glucano insoluble producido por *S. mutans* a diferentes concentraciones de sacarosa.

CANTIDAD DE AZUCAR⁽¹⁾	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	
	COD⁽²⁾	PRODUCCION DE GLUCANO
CONTROL	0.01	-
1 %	0.09	+
5 %	0.15	+ +
10 %	0.40	+ +

⁽¹⁾ Sacarosa (%)

⁽²⁾ COD = valor de D.O corregida

CANTIDAD DE SACAROSA	PRODUCCION DE GLUCANO DE <i>S. mutans</i> (n=30)		
	GRUPO I⁽¹⁾	GRUPO II⁽²⁾	GRUPO III⁽³⁾
CONTROL	0 % ⁽⁴⁾	0 %	0 %
1 %	10 %	20 %	20 %
5 %	30 %	60 %	40 %
10 %	70 %	80 %	60 %

⁽¹⁾ Cepas bacterianas procedentes del grupo control de ratas n=10

⁽²⁾ Cepas bacterianas procedentes del grupo de dieta "K2000" n=10

⁽³⁾ Cepas bacterianas del grupo "Fibra Gwar" n=10

⁽⁴⁾ Porcentaje de cepas productores de glucano.

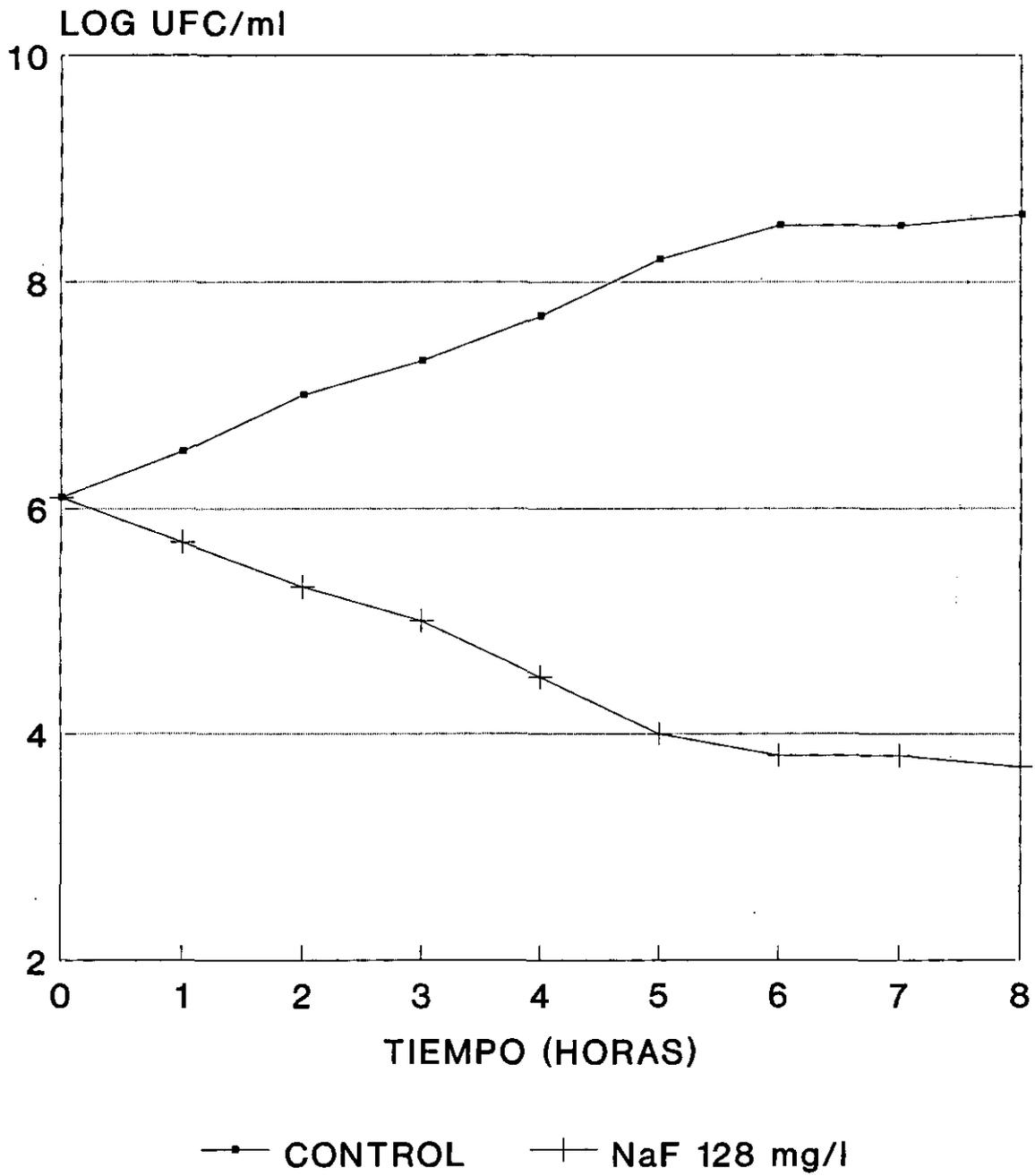


Figura 9. Curva de letalidad de fluoruro sódico (NaF) frente a *S. mutans* ATCC 25175.

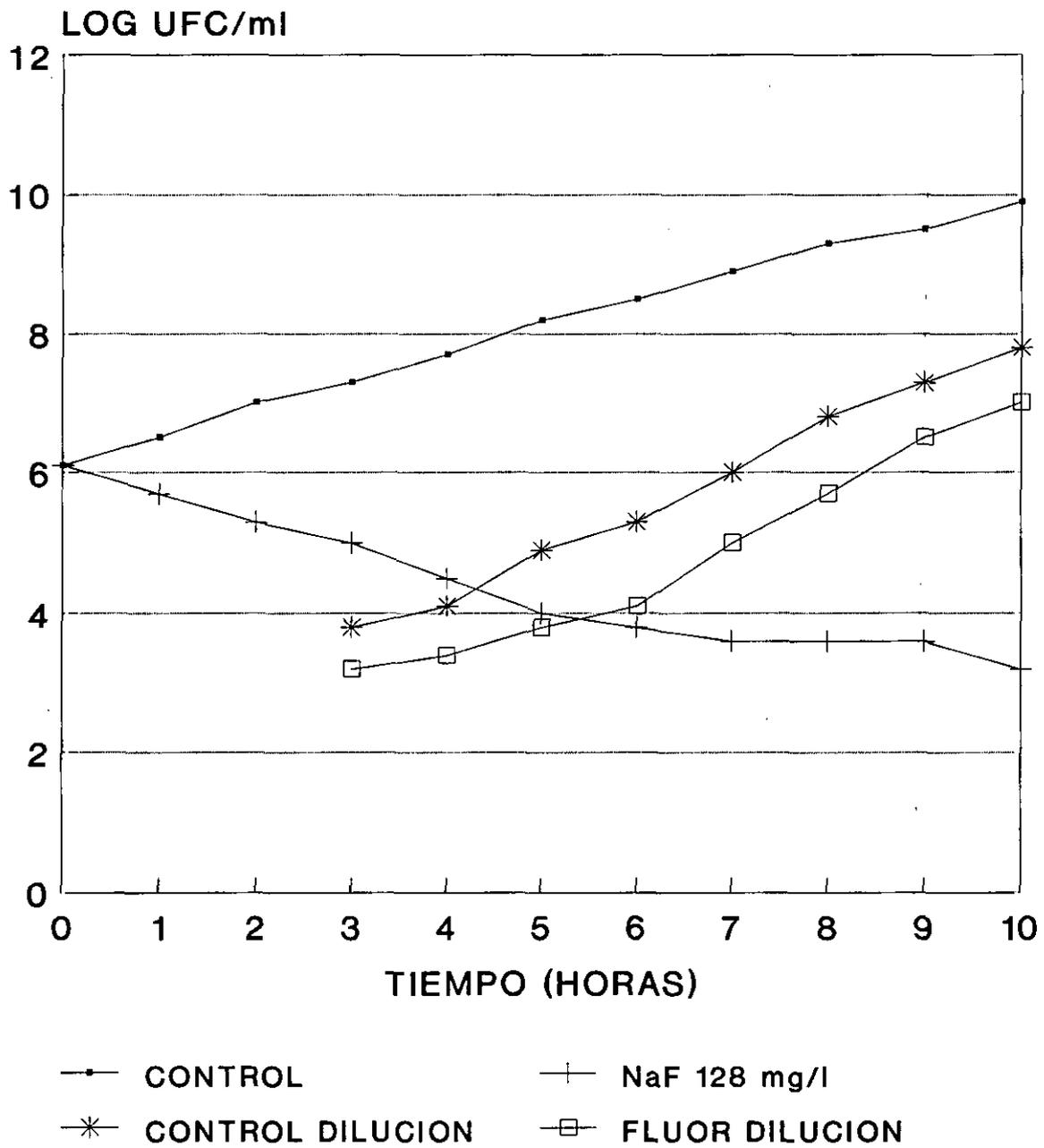


Figura 10. Efecto de la retirada de fluoruro sódico (NaF) sobre S. mutans ATCC 25175.

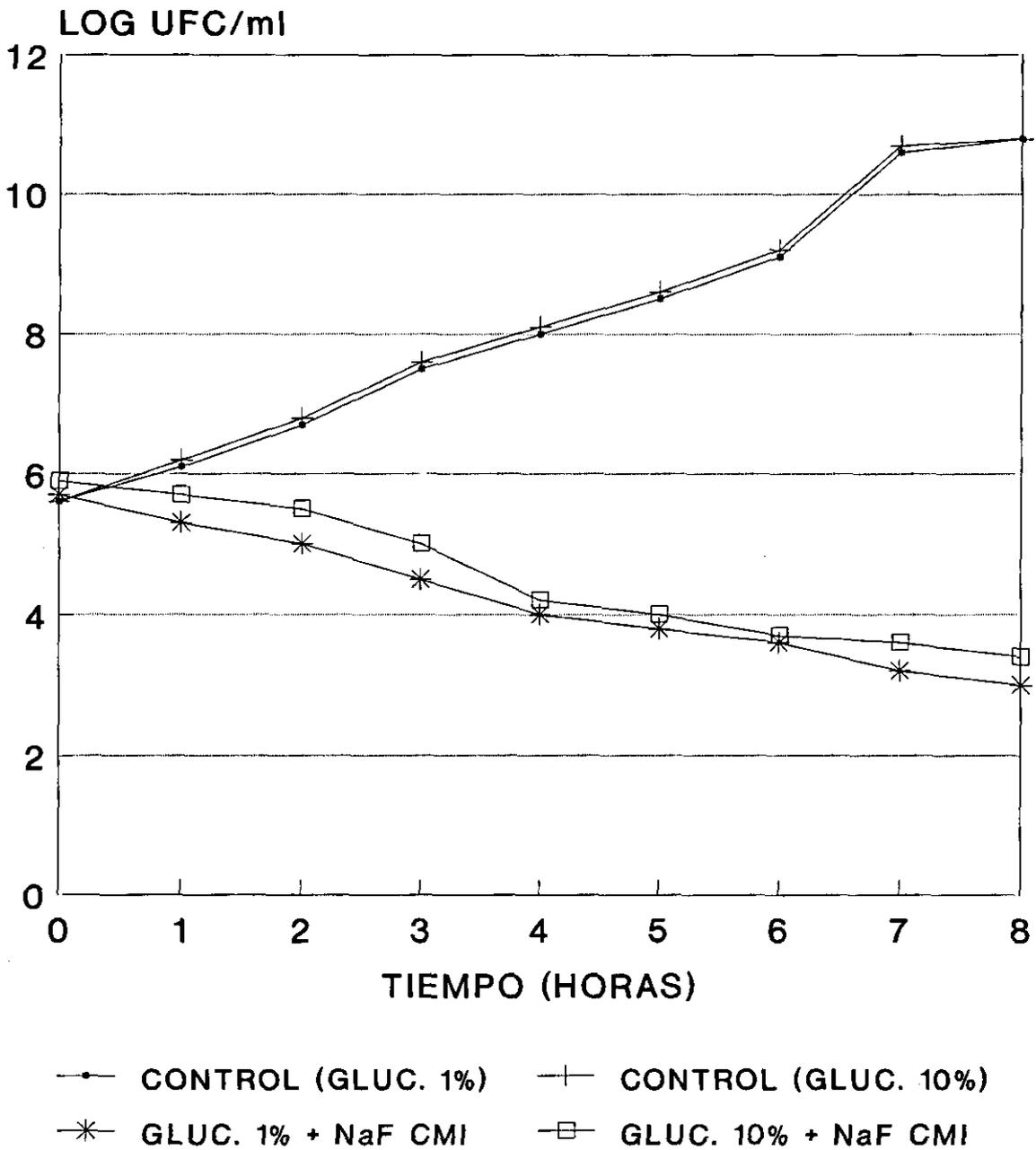


Figura 11. Efecto del fluoruro sódico (NaF) en el crecimiento de S. mutans ATCC 25175 a diferentes concentraciones de azúcar.

Tabla 4. Efecto del fluoruro sódico en la caída de pH de *S. mutans* ATCC 25175 a diferentes concentraciones de azúcar.

AZUCAR	CONCENTRACION DE FLUOR	pH INICIAL	pH FINAL
<i>GLUCOSA 1%</i>	-	7.0	5.0
<i>GLUCOSA 1%</i>	128 mg/L	7.0	6.5
<i>GLUCOSA 10%</i>	-	7.0	4.5
<i>GLUCOSA 10%</i>	128 mg/L	7.0	6.5

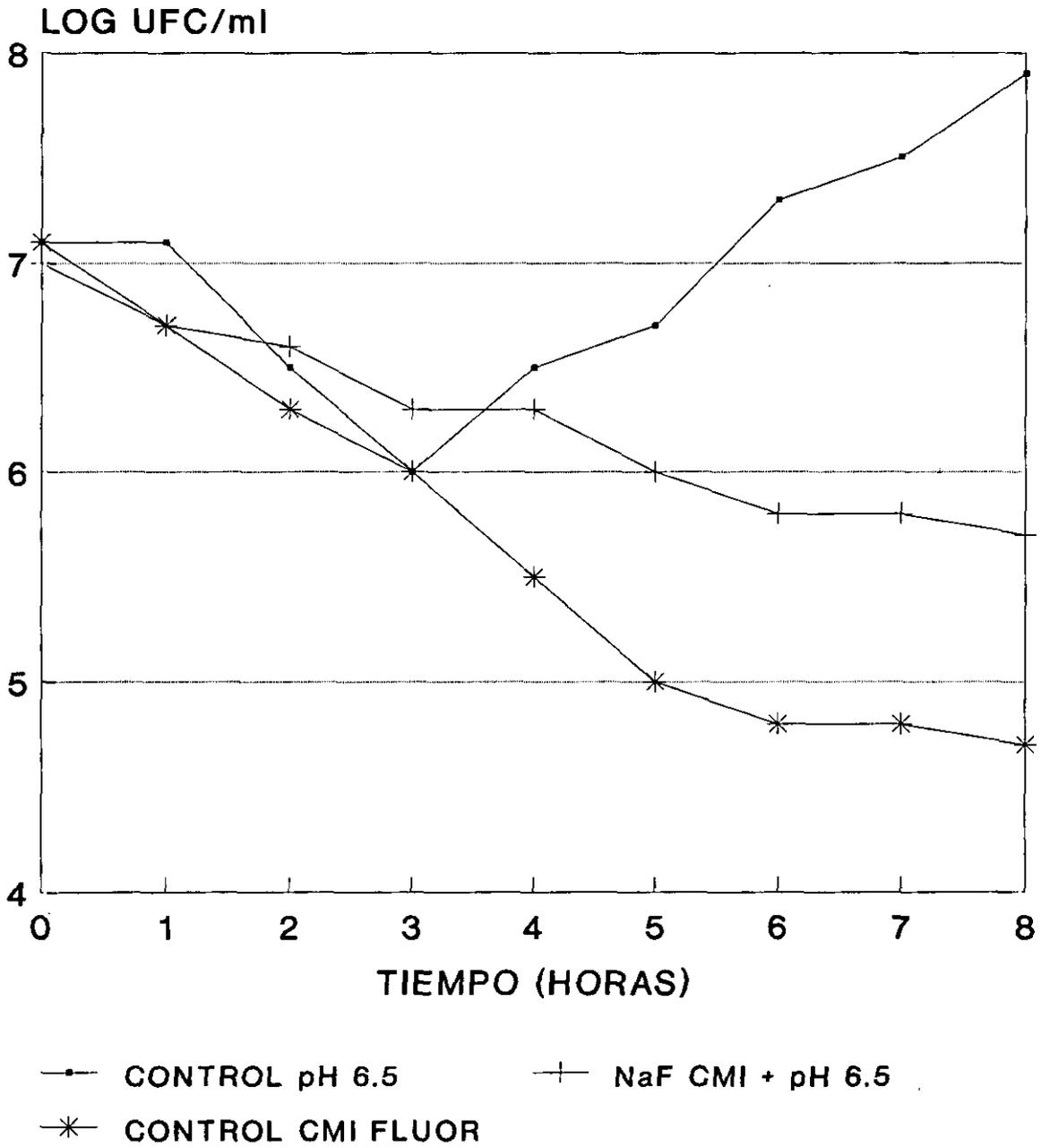


Figura 12. Efecto del fluoruro sódico (NaF) a pH 6.5 en el crecimiento de S. mutans ATCC 25175.

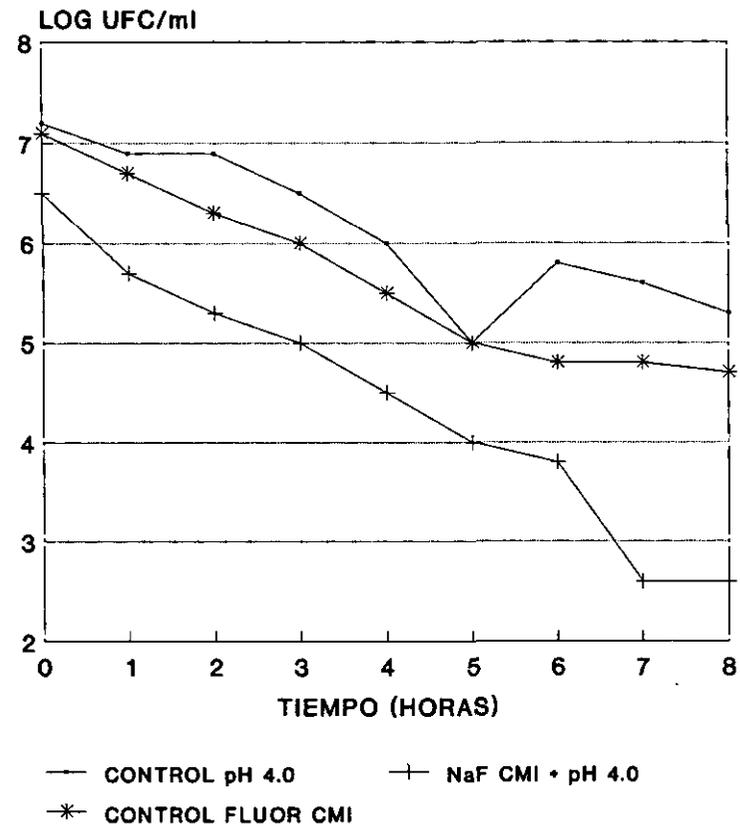
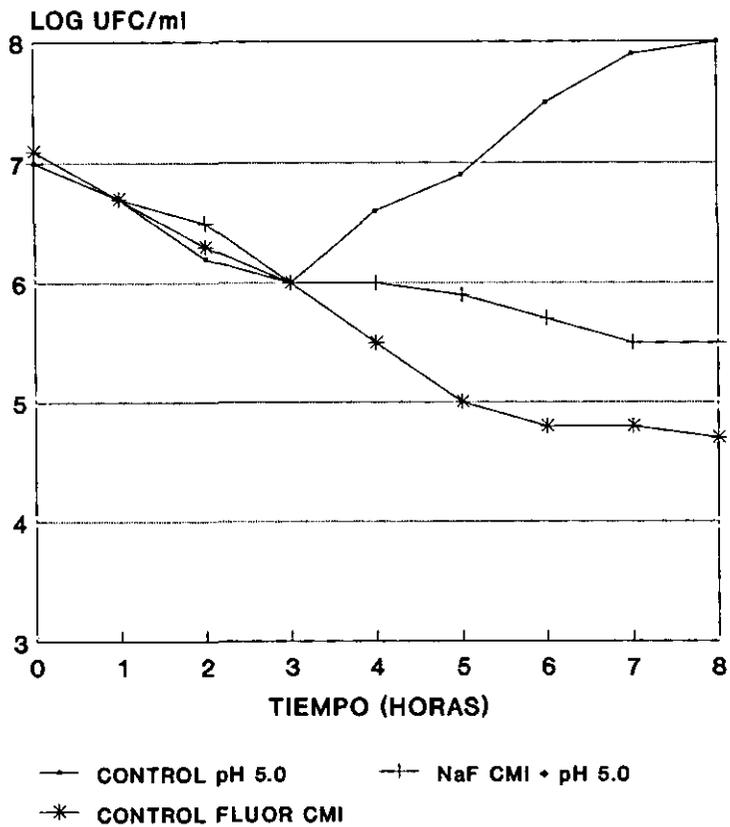


Figura 13. Efecto del fluoruro sódico (NaF) a pH 5.0 y 4.0 en el crecimiento de *S. mutans* ATCC 25175.

Tabla 5. Efecto de concentraciones subinhibitorias del fluoruro sódico (NaF) en la agregación de *S. mutans* ATCC 25175.

CMI (%)	GRADO DE COAGREGACION
100	+ +
50	+ +
25	+ +
12.5	+ +
6.25	+ +

Tabla 6. Efecto de concentraciones subinhibitorias de fluoruro sódico (NaF) en la producción de glucano de *S. mutans* ATCC 25175.

CMI (%)	COD	PRODUCCION GLUCANO
100	0.02	-
50	0.13	+
25	0.15	+ +
12.5	0.29	+ +
6.25	0.44	+ +

Tabla 7. Medida del peso en cada grupo experimental.

GRUPO	TRATAMIENTO	Nº RATAS	PESO (gr)⁽¹⁾	
			45 DIAS	90 DIAS
<i>I</i>	<i>CONTROL</i>	<i>15</i>	<i>231.5 ± 15.3</i>	<i>443 ± 5.5</i>
<i>II</i>	<i>"K2000"</i>	<i>15</i>	<i>298 ± 9.8</i>	<i>405.5 ± 14.6</i>
<i>III</i>	<i>"FIBRA GWAR"</i>	<i>15</i>	<i>271 ± 4.8</i>	<i>377.4 ± 83</i>
<i>IV</i>	<i>"K2000" + AGUA F.</i>	<i>15</i>	<i>227.2 ± 7.16</i>	<i>383.6 ± 10.7</i>
<i>V</i>	<i>"K2000" + BARNICES</i>	<i>15</i>	<i>232.6 ± 5.5</i>	<i>383.2 ± 10.57</i>
<i>VI</i>	<i>"FIBRA" + AGUA F.</i>	<i>15</i>	<i>277 ± 12.5</i>	<i>380.4 ± 13.24</i>
<i>VII</i>	<i>"FIBRA" + BARNICES</i>	<i>15</i>	<i>296.3 ± 3.58</i>	<i>415.7 ± 8.6</i>

⁽¹⁾ $x \pm SEM$

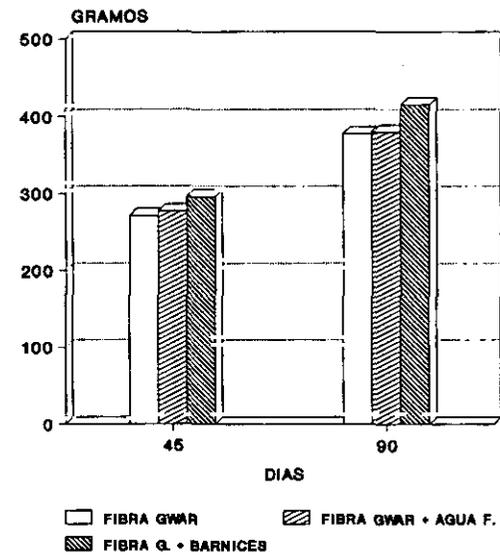
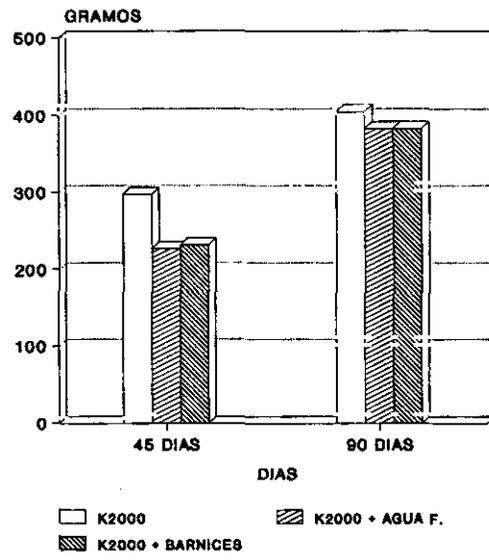
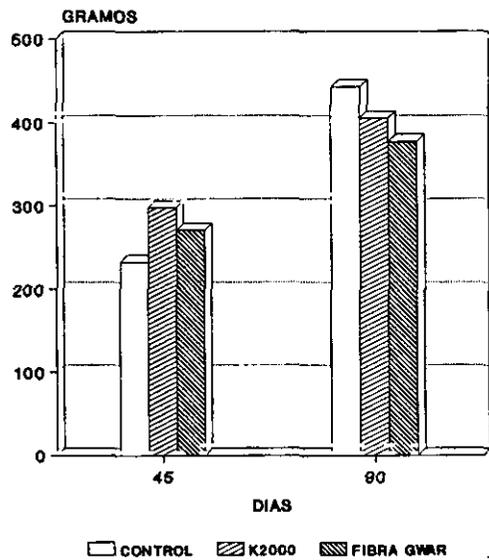
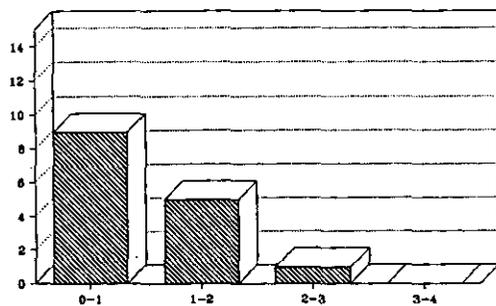


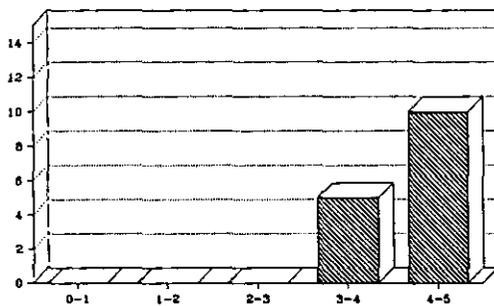
Figura 14. Representación comparativa del peso obtenido en cada control microbiológico. Controles microbiológicos: $C_1 = 45$ días, $C_2 = 90$ días.

45 DIAS

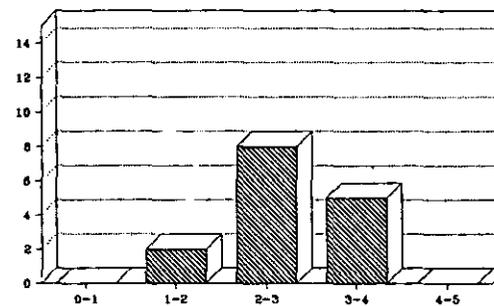
CONTROL



K2000

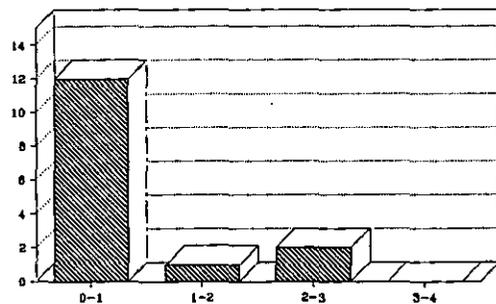


FIBRA GVAR

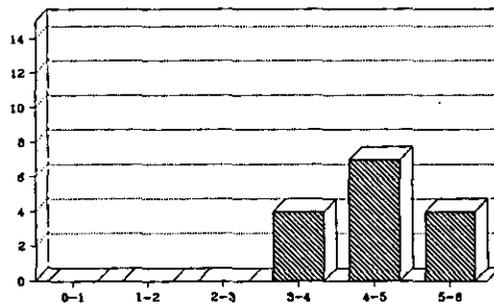


90 DIAS

CONTROL



K2000



FIBRA GVAR

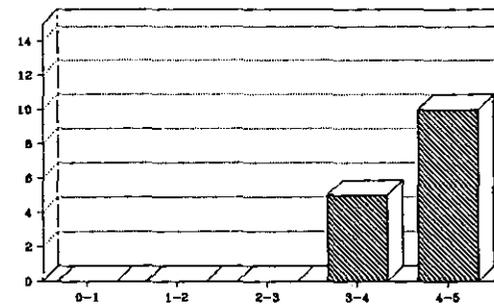
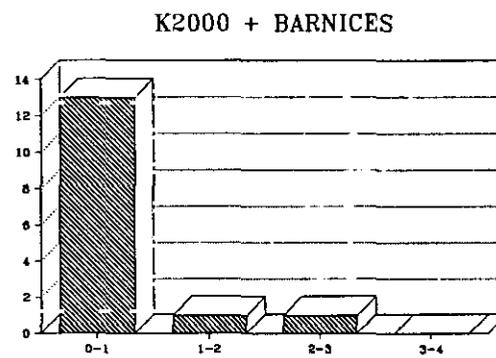
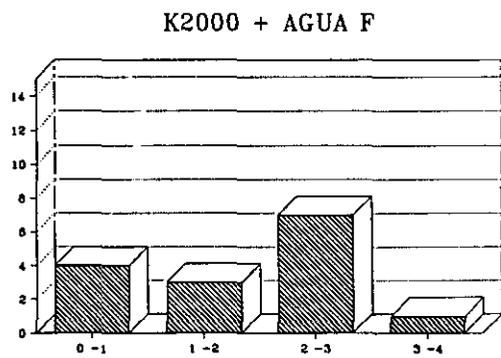
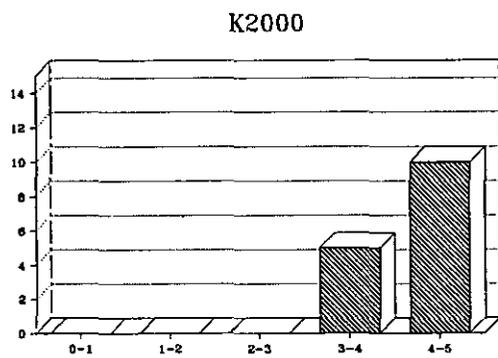


Figura 15. Relación entre la dieta y recuento celular de S. mutans: controles periódicos.

45 DIAS



90 DIAS

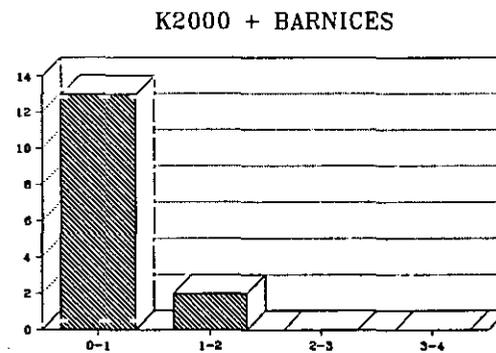
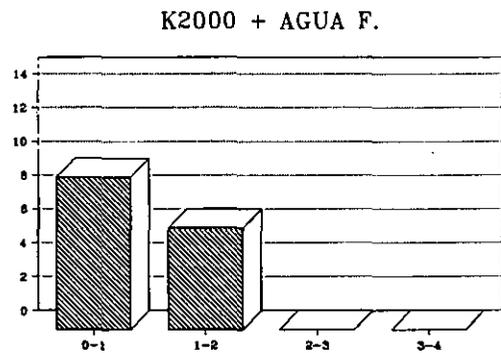
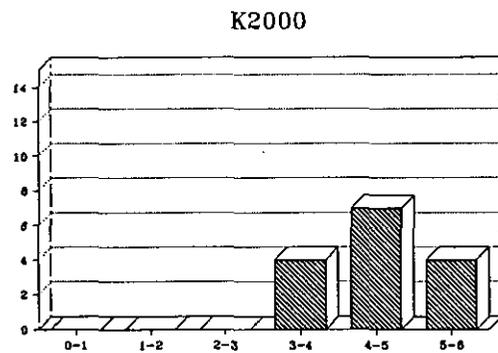
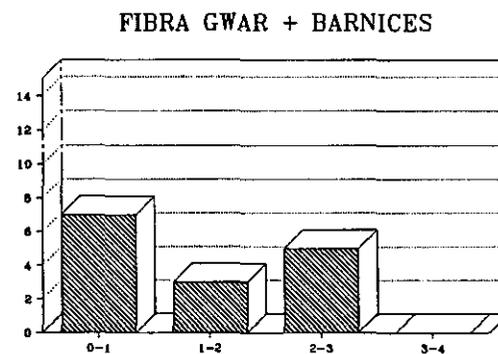
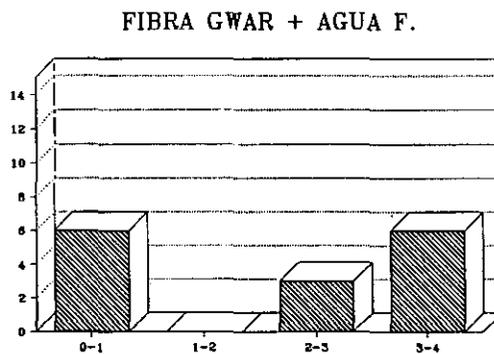
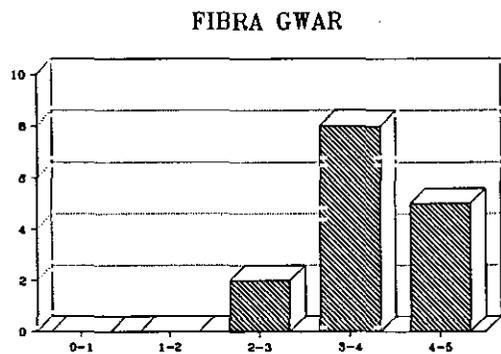


Figura 16. Relación entre dieta "K2000"-flúor y recuento celular de *S. mutans*: controles periódicos.

45 DIAS



90 DIAS

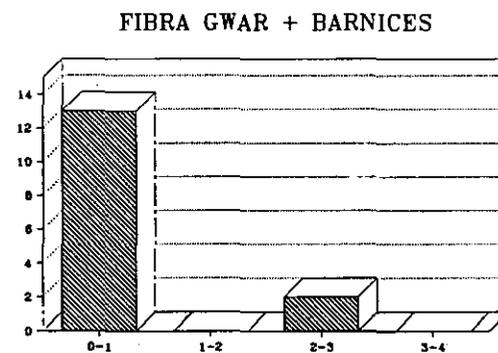
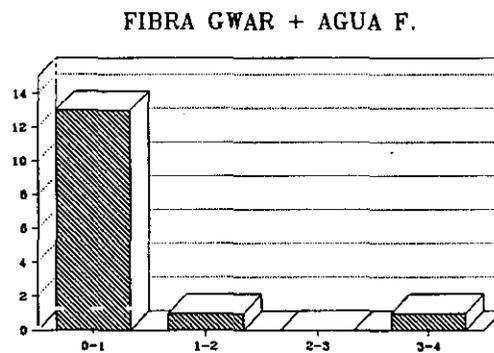
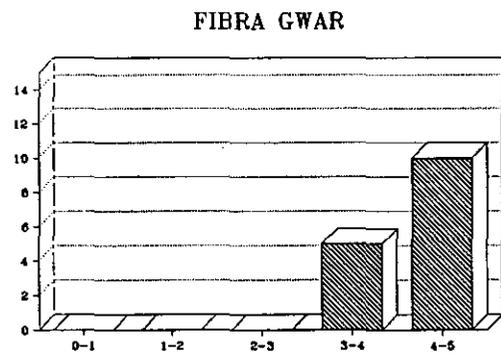
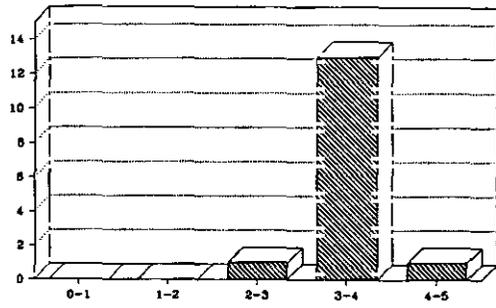


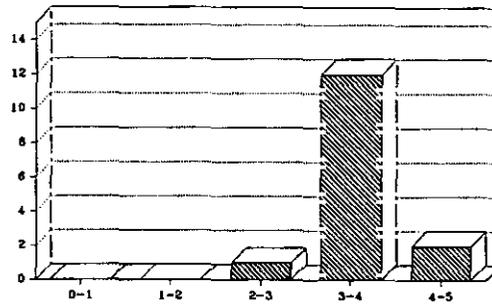
Figura 17. Relación entre dieta "fibra GWAR"-flúor y recuento celular de S. mutans: controles periódicos.

45 DIAS

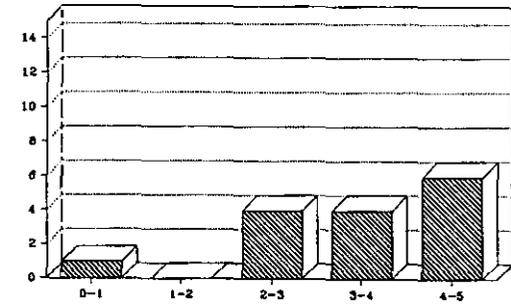
CONTROL



K2000

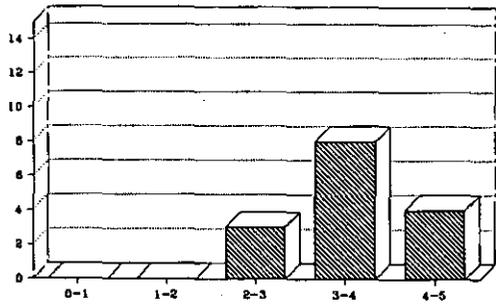


FIBRA GVAR

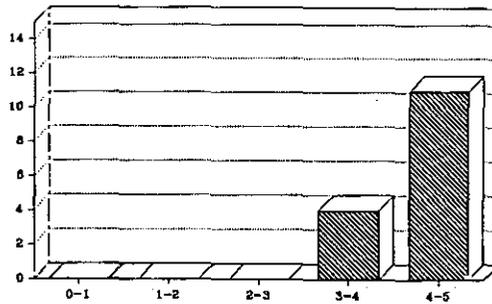


90 DIAS

CONTROL



K2000



FIBRA GVAR

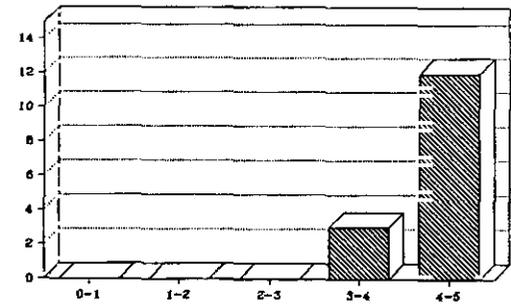
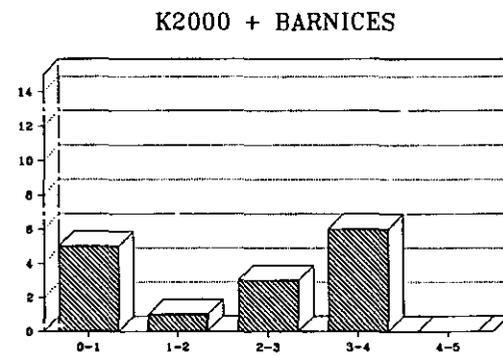
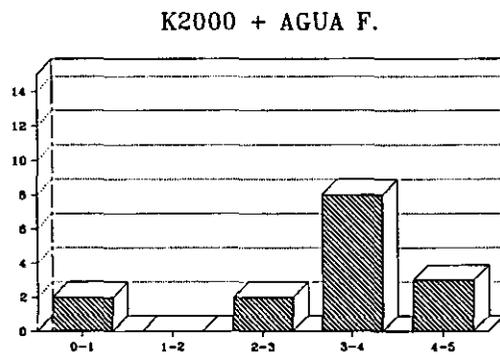
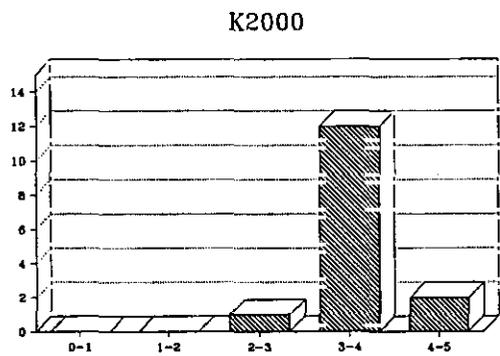


Figura 18. Relación entre la dieta y recuento celular de *Lactobacillus* spp.: controles periódicos.

45 DIAS



90 DIAS

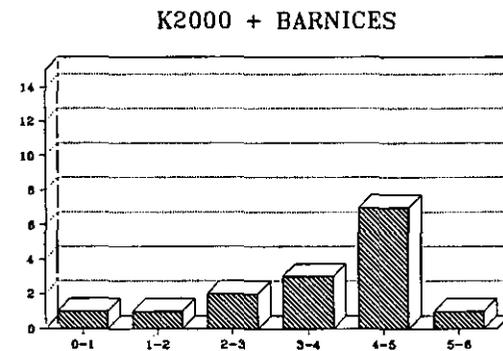
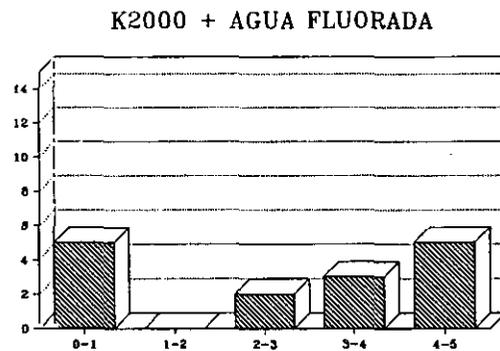
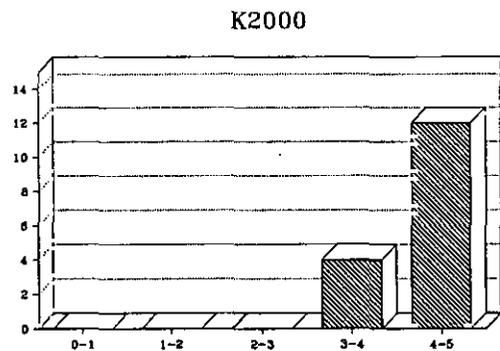
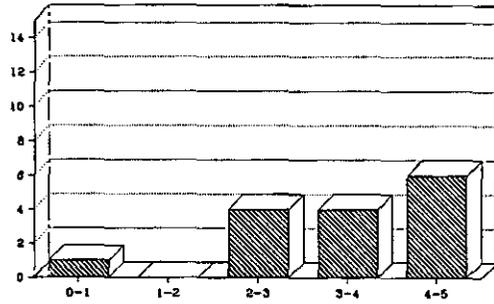


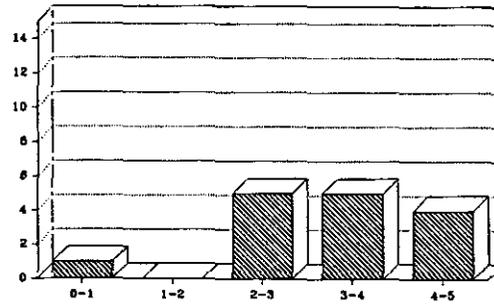
Figura 19. Relación entre la dieta "K2000"-flúor y recuento celular de *Lactobacillus* spp.: controles periódicos.

45 DIAS

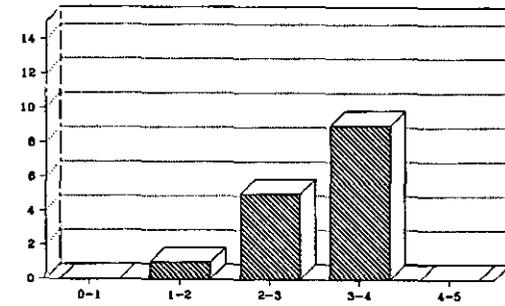
FIBRA GVAR



FIBRA GVAR + AGUA F.

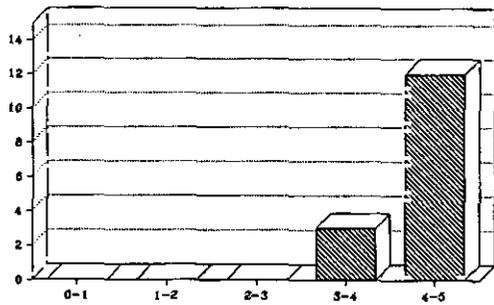


FIBRA GVAR + BARNICES

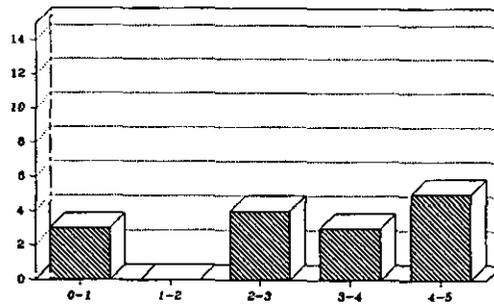


90 DIAS

FIBRA GVAR



FIBRA GVAR + AGUA F.



FIBRA GVAR + BARNICES

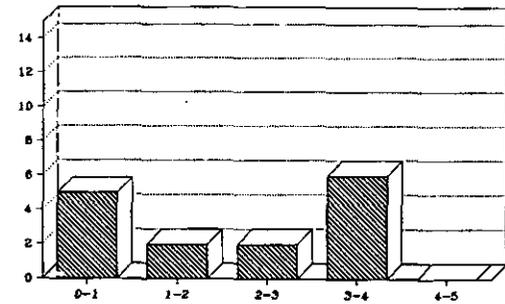


Figura 20. Relación entre la dieta "fibra GVAR"-flúor y recuento celular de *Lactobacillus* spp.: controles periódicos.

Tabla 8. Relaciones estadísticas entre cada grupo experimental y su control para *S. mutans* (valores de $p < 0.05$ se consideran significativos).

<i>S. mutans</i> ⁽¹⁾	"K2000"	"FIBRA GVAR"	"K"+BARNICES	"K"+AGUA F.	"F"+BARNICES	"F"+AGUA F.
CONTROL	$p < 0.00005$	$p < 0.01$	N.S. ⁽²⁾	N.S.	N.S.	$p < 0.05$
DIETA "K2000"	—	$p < 0.05$	$p < 0.00005$	$p < 0.00005$	—	—
"FIBRA GVAR"	—	—	—	—	$p < 0.01$	$p < 0.05$

⁽¹⁾ 45 días

⁽²⁾ no significativo

<i>S. mutans</i> ⁽³⁾	"K2000"	"FIBRA GVAR"	"K"+BARNICES	"K"+AGUA F.	"F"+BARNICES	"F"+AGUA F.
CONTROL	$p < 0.05$	$p < 0.00005$	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
DIETA "K2000"	—	N.S.	$p < 0.05$	$p < 0.05$	—	—
"FIBRA GVAR"	—	—	—	—	$p < 0.00005$	$p < 0.00005$

⁽³⁾ 90 días

Tabla 9. Relaciones estadísticas entre cada grupo experimental y su control para *Lactobacillus* spp. (valores de $p < 0.05$ se consideran significativos).

<i>Lactobacillus</i> ⁽¹⁾	"K2000"	"FIBRA GVAR"	"K"+BARNICES	"K"+AGUA F.	"F"+BARNICES	"F"+AGUA F.
CONTROL	N.S. ⁽²⁾	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
DIETA "K2000"	—	N.S.	N.S.	N.S.	—	—
"FIBRA GVAR"	—	—	—	—	$p < 0.01$	N.S.

⁽¹⁾ 45 días

⁽²⁾ no significativo

<i>Lactobacillus</i> ⁽³⁾	"K2000"	"FIBRA GVAR"	"K"+BARNICES	"K"+AGUA F.	"F"+BARNICES	"F"+AGUA F.
CONTROL	N.S.	$p < 0.05$	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
DIETA "K2000"	—	N.S.	N.S.	N.S.	—	—
"FIBRA GVAR"	—	—	—	—	$p < 0.0005$	$p < 0.05$

⁽³⁾ 90 días

Tabla 10. Relación entre recuentos salivares de *S. mutans* y caries dental.

GRUPOS EXPERIMENTALES	45 DIAS		90 DIAS		REDUCCION
	<i>S. mutans</i>⁽¹⁾	CARIES⁽²⁾	<i>S. mutans</i>⁽¹⁾	CARIES⁽²⁾	CARIES (%)
CONTROL	1.75	0 %	2.07	3.3 %	—
"K2000"	4.65	66.6 %	5.11	99.6 %	—
"FIBRA GVAR"	4.2	40 %	4.66	46.6 %	—
"K2000" + AGUA F.	2.4	16 %	1.10	20.8 %	79.2 %
"K2000" + BARNICES	1.74	13.3 %	0.9	4.1 %	96 %
"FIBRA" + AGUA F.	3.2	26.6 %	2.67	20.8 %	72 %
"FIBRA" + BARNICES	1.89	20 %	1.26	7.6 %	92.4 %

⁽¹⁾ Recuento salivar (log ufc/ml)

⁽²⁾ Porcentaje de lesiones cariosas n = 15

Tabla 11. Relación entre recuentos salivares de *Lactobacillus* spp. y caries dental.

GRUPOS EXPERIMENTALES	45 DIAS		90 DIAS		REDUCCION
	<i>Lactobacillus</i> sp ⁽¹⁾	CARIES ⁽²⁾	<i>Lactobacillus</i> sp ⁽¹⁾	CARIES ⁽²⁾	CARIES(%)
CONTROL	3.5	0 %	3.93	3.3 %	—
"K2000"	3.7	66.6 %	4.11	99.6 %	—
"FIBRA GVAR"	3.86	40 %	4.33	46.6 %	—
"K2000" + AGUA F.	3.66	16 %	4.06	20.8 %	79.2%
"K2000" + BARNICES	3.20	13.3 %	4.88	4.1 %	96 %
"FIBRA" + AGUA F.	3.7	26.6 %	3.93	28 %	72 %
"FIBRA" + BARNICES	3.4	20 %	3.31	7.6 %	92.4%

(1) Recuento salivar (log ufc/ml)

(2) Porcentaje de lesiones cariosas n = 15

Tabla 12. Valores estadísticos de correlación entre recuento de *S. mutans* en saliva y caries dental.

		<i>Streptococcus mutans</i>						
<u>CARIES</u>	<i>r</i>	CONTROL	"K2000"	"FIBRA G"	"K"+AGUA F	"K"+BARNICES	"F"+AGUA F	"F"+BARNICES
		<i>P</i> 0.02	0.17 ⁽¹⁾	0.21	0.16	0.11	0.03	0.01
	<i>K</i> 0.04	0.13	0.16	0.15	0.12	0.10	0.09	
<i>p</i>	<i>P</i> 0.035	0.05	0.05	0.045	0.05	0.032	0.04	
	<i>K</i> 0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.02	0.03	

		<i>Lactobacillus spp.</i>						
<u>CARIES</u>	<i>r</i>	CONTROL	"K2000"	"FIBRA G"	"K"+AGUA F	"K"+BARNICES	"F"+AGUA F	"F"+BARNICES
		<i>P</i> 0.16	0.12 ⁽¹⁾	0.10	0.01	0.03	0.07	0.04
	<i>K</i> 0.11	0.03	0.01	0.04	0.07	0.15	0.03	
<i>p</i>	<i>P</i> 0.96	0.05	0.05	0.092	0.08	0.032	0.01	
	<i>K</i> 0.72	0.48	0.05	0.72	0.69	0.01	0.029	

r = Coeficiente de correlación de Pearson's (') y Kendall ('').

p = Valor de probabilidad.

⁽¹⁾ = Valores de $p < 0.05$ se consideran significativos.

VI. DISCUSSION

6.1. PRUEBAS REALIZADAS CON AZUCARES.

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar la acidogenicidad que provocan en el medio varios azúcares; este fenómeno se calculó, midiendo la caída de pH que origina cada uno de ellos en un medio inoculado con S. mutans y sometido a condiciones límites de azúcar. Esta curva de pH se ha usado en anteriores investigaciones para evaluar el potencial cariogénico de diferentes carbohidratos (17,258), en este caso utilizando una suspensión bacteriana en fase logarítmica de crecimiento.

Los resultados del estudio reflejan el importante papel que desempeñan tanto la glucosa como la sacarosa y fundamentalmente este último en los procesos patológicos de la boca; por un lado, debido a la gran capacidad de este microorganismo para fermentar dichos azúcares, hecho que se muestra con los altos valores de recuento celular alcanzados, indicadores de un buen crecimiento y por otro lado, la fuerte acidificación que provocan en el medio, siendo ellos los que originan el mayor descenso de pH con valores alrededor de 5.0 - 5.2.

Se puede decir que la acidificación del medio responde solamente a la acción de S. mutans sobre estos azúcares, ya que previamente se agotó el posible almacén endógeno de polisacáridos intracelulares, mediante pases sucesivos a medio sin azúcar (258).

Estos valores coinciden con los pH obtenidos por YAMAMOTO y col. 1988 (258), en que tanto un azúcar como el otro daban los pH más bajos en relación con otros carbohidratos y en cuanto que obtuvieron un pH ligeramente menor con glucosa que con sacarosa, empleando una suspensión celular de S. mutans. Dada la gran afinidad que tiene esta especie por la sacarosa, esperamos que dicho

sustrato fuera el azúcar más acidogénico, sin embargo la glucosa provocó una bajada de pH ligeramente mayor.

Otro azúcar usado como fuente de carbono fue la lactosa; sorprendentemente, los resultados obtenidos con este azúcar sugirieron, que se trata de un sustrato considerablemente menos acidogénico que otros de los azúcares ensayados. YAMADA y col. 1980 (256) estudiaron la acidogenicidad que provocaba la lactosa en la placa dental humana usando para tal fin un electrodo de pH; comprobaron que la bajada de pH como consecuencia de la fermentación de la lactosa, es menor que con otros azúcares siendo su pH final 6.2, valor muy similar al obtenido en nuestro ensayo.

Además de los azúcares mencionados, se evaluó como contribuyó a la acidificación del medio, el aporte de dos polioles: xilitol y sorbitol. Según esta investigación, la presencia de 1 % de xilitol en el medio de cultivo, provocó una inhibición del crecimiento de esta bacteria, mientras que con el sorbitol apenas manifestó crecimiento.

La sensibilidad que manifiestan los estreptococos frente al xilitol, se podría explicar de dos formas. Por un lado, esta inhibición se traduce en una demora por alcanzar la fase estacionaria de crecimiento y por otra, se ha visto que algunos de ellos que no pueden alcanzar la fase estacionaria del cultivo control (4,237,214). En este caso, el cultivo puro de S. mutans ATCC 25175, no alcanzó la fase estacionaria del cultivo control durante las 12 horas de estudio en presencia de xilitol; estos datos coinciden con los de SÖDERLING y col., 1989 (215) respecto de un control de células cultivadas en ausencia de glucosa. Su ensayo mostró una inhibición celular de aproximadamente un 50 % respecto del control, aunque se ha visto en otros estudios que en presencia de altas concentraciones de xilitol (5 %) la inhibición es de un 85 % (237).

El mecanismo por el cual se produce este fenómeno tiene lugar, cuando el xilitol se transporta al interior de la célula mediante una fosfoenolpiruvato (PEP) dependiente de un sistema fructosafosfotransferasa (PTS) (8,216). El xilitol-5-P formado, que es tóxico, es el responsable de la inhibición de la bacteria (4,6,233). En cuanto al sorbitol, dada su estructura cíclica de 5 átomos de carbono es extremadamente estable, y la bacteria sólo es capaz de metabolizarlo débilmente. Esto lleva a que se produzca una bajada mínima de pH en el medio, ya que no produce apenas ácidos luego ambos serán potencialmente menos cariogénicos que otros azúcares.

En general, los efectos más importantes que se han demostrado del xilitol en la flora oral, incluyen un descenso en la cantidad y acidogenicidad de la placa, cambios en los componentes químicos de la misma y una reducción en el nivel de S. mutans en placa y saliva (7,217,250), ya que como se ha visto este poliol inhibe el crecimiento de esta bacteria que no puede usarlo como sustrato (5,238). Otros autores han mostrado en estudios llevados a cabo en animales y en el hombre que el xilitol es anticariogénico y que sus efectos dependen de la dosis y frecuencia de administración (10).

Respecto a los resultados obtenidos sobre la acidogenicidad del xilitol y sorbitol, se vio que ambos producen un descenso de pH en el medio mínimo, lo que nos permite decir que ambos son poco acidogénicos, en cualquier caso, la caída de pH con sorbitol y xilitol es siempre menor que con glucosa. Estos datos coinciden con los hallazgos de HAVENAAR (108) que trabajó con suspensiones celulares de S. mutans en medios que contenían sorbitol. Son asimismo comparables con los obtenidos por BIRKHED (18), quien posteriormente en 1983 (92), estudió efecto del xilitol y sorbitol sobre la formación de la placa en el hombre, observando que ambos producen un valor de pH mayor y menor producción de ácidos (192).

Un estudio llevado a cabo por KALFAS y col. 1990 (120) pretendió

determinar la producción de ácidos del sorbitol y glucosa en suspensiones celulares de S. mutans. Para ello analizó los productos metabólicos finales obtenidos en los filtros de dicha suspensión; éste reveló en todas las cepas examinadas, la formación de una cantidad total de ácido menor con sorbitol que con glucosa. Así por ejemplo, mientras que la glucosa fermentada daba principalmente ácido láctico, en la degradación del sorbitol sólo se detectaron bajas concentraciones de este ácido. Por consiguiente la composición de productos metabólicos finales formados a partir del polioliol, se caracteriza por presentar una menor cantidad de ácidos orgánicos fuertes: fórmico y láctico.

Finalmente y en relación con los resultados obtenidos se puede destacar la escasa acidogenicidad que presentan en el medio de cultivo y la inhibición que originan en el crecimiento de S. mutans. Esto sugiere la propuesta de considerar a estos azúcares como agentes preventivos de la caries y por tanto podrían servir para administrarlos en dietas como posibles sustitutos de otros azúcares, ya que al ser potencialmente menos cariogénicos, crearían situaciones menos patológicas en relación con el proceso infeccioso de la caries dental.

Se ha visto cuando sometimos el crecimiento de S. mutans a medios enriquecidos con estos dos azúcares, que tanto la sacarosa como la glucosa permiten un crecimiento excelente de esta bacteria. No obstante, las concentraciones de azúcar a que se enfrenta dicha especie en el ambiente oral son muy variadas, dependiendo del consumo de hidratos de carbono; es decir, existen períodos de aportes ricos en carbohidratos (34) y momentos en que el azúcar se encuentra en cantidades muy bajas, como es entre comidas.

Con tal fin se evaluó, que grado de acidificación alcanzaría el medio cuando S. mutans crece en situaciones de alta y baja concentración de azúcar. Nuestros resultados reflejaron cómo el medio que estaba enriquecido con azúcar proporcionaba pH más bajos que cuando éste escaseaba en él.

La explicación que se puede dar a este hecho, es que cuando la bacteria crece en ambientes pobres en azúcar, lo que hace es degradarlo por la ruta glicolítica, formando como principales productos de fermentación ácido fórmico, acético y etanol que son relativamente menos acidogénicos, alcanzando valores de pH de 5.0-5.2; sin embargo no forma ácido láctico a pesar de tener la lactato deshidrogenasa que es una enzima constitutiva. El no funcionamiento de la misma se debe a que depende absolutamente de fructosa 1,6 bifosfato para activarse, ya que con niveles extracelulares bajos de azúcar el depósito intracelular de fructosa 1,6 bifosfato es demasiado escaso para activarse la enzima.

Sin embargo expuesto a altas concentraciones de azúcar los niveles intracelulares de fructosa 1,6 bifosfato aumentan, esto es lo que motiva la activación de la lactato deshidrogenasa obteniéndose en éste caso ácido láctico como principal producto de fermentación de esta bacteria. Por tanto, el ácido láctico elaborado por S. mutans a partir de la glucosa y de la sacarosa provocaría una mayor acidogenicidad del medio, contribuyendo en mayor medida a una acción potencialmente más cariogénica sobre el esmalte dental. Según GEDDES (79) y CARLSSON (33) este fenómeno observado "in vitro", puede ser una de los posibles consecuencias que se dan en el hábitat oral cuando se consumen dietas ricas en hidratos de carbono con cierta frecuencia.

Una característica crucial de las bacterias cariogénicas es ser acidúricas, es decir la capacidad de estos microorganismos para fermentar azúcares, crecer y sobrevivir en un ambiente ácido durante largos períodos de tiempo.

Existen varias situaciones en el hábitat oral que conllevan cambios ambientales de pH. Sabemos que el pH de la placa dental puede alcanzar un valor de 4.0 durante el metabolismo de carbohidratos y permanecer a este nivel durante muchas horas (202), e incluso en fisuras y lesiones cariogénicas puede estar expuesta a valores por debajo de este pH (57). Este descenso del pH ambiental constituye un

factor que afectaría al metabolismo y crecimiento de S. mutans, por ello examinamos la presión selectiva que ejercerían estos cambios de pH.

Vimos anteriormente que este microorganismo es capaz de acidificar el medio una vez que degrada la fuente hidrocarbonada. Esto se traduce en una lenta y progresiva caída de pH que no perturba el crecimiento de la bacteria. Sin embargo en la placa puede suceder, una rápida y drástica reducción de pH como es, seguido de un consumo de azúcar en que el pH cae rápidamente alrededor de un pH: 5.0 (222); luego estudiar la capacidad de fermentar azúcares a bajo pH, sería incluso más importante que la acidificación que provocan en el medio a pH: 7.0.

Por eso determinamos como influye este hecho, por un lado en la capacidad de S. mutans para crecer en medios con glucosa a diferentes valores de pH y por otra analizamos el efecto que causaría una caída rápida de pH en la capacidad de esta bacteria para sobrevivir y desarrollarse.

En el trabajo se empleó un inóculo en fase logarítmica de crecimiento que sometimos a diferentes pH. La elección de los mismos fue en base a los posibles valores de pH que se alcanza en boca: en estado de reposo, en estado metabólico y en caso de una placa dental ácida (115). Según los resultados, el mayor crecimiento de S. mutans se consigue a pH 7.0, seguido del obtenido a pH ácidos como 5.0 y 6.5 y manteniéndose la viabilidad celular en estado latente a pH: 4.0; sólo se produce un descenso progresivo a pH: 3.0. Comparando los valores de recuento celular obtenidos en la primeras horas se observa, que el descenso es progresivo a medida que baja el pH.

Esto nos hizo suponer que el crecimiento de esta especie no parece ajustarse a una rápida reducción de pH, es decir la actividad metabólica para degradar el azúcar se reduce ligeramente en ambientes más ácidos, idea que coincide con los estudios de KALFAS y col.(120). Sin embargo en una situación posterior, aunque

S. mutans disminuye su crecimiento después de ser sometido a un stress tal, como es un cambio brusco a un medio con pH ácido, cuando crece a pH 5.0 y 6.5 rápidamente vuelve a recuperar su crecimiento. Esta recuperación muestra la capacidad de esta especie para adaptarse a estos valores de pH. No sucede así, a pH 4.0 en que la viabilidad celular permanece paralizada, aunque ello nos permite comprobar que aún así es capaz de sobrevivir en un medio sometido a tales presiones.

Se deduce de estos resultados, que dichos cambios en el pH del medio tienen un efecto poco negativo sobre S. mutans, ya que no se produce una eliminación de la bacteria, e incluso, en los casos en que se recupera consigue valores relativamente altos respecto del control, que manifestó el mayor crecimiento.

Por lo tanto los resultados vistos en la figura 8, también observados en estudios de crecimiento continuo con quemostatos (21), se podrían explicar en base a la capacidad que muestra S. mutans para adaptarse a medios donde se producen fuertes caídas de pH y crecer bajo esas condiciones (218). Por consiguiente, esta resistencia a la acidez del medio es una característica que le aportaría grandes ventajas dentro de la comunidad oral frente a aquellas otras bacterias que no fueran acidúricas (20). Esto sugiere que en la placa dental sólo las cepas con esta propiedad serán seleccionadas en ecosistemas ácidos, tales como lesiones cariosas y fisuras, por el contrario fluctuaciones normales de pH que se produzcan en la placa no proporcionarán a este microorganismo una ventaja dentro del hábitat oral.

6.2. CAPACIDAD DE AGREGACION BACTERIANA.

Los mecanismos por los cuales aparece la infección en la boca son múltiples pero quizás uno de los más importantes sea la capacidad que presentan algunas

bacterias de agregar entre ellas (84,86), propiedad que les permite una mayor colonización de las superficies dentales. S. mutans es el principal microorganismo implicado en la patogénesis de la caries dental y el estudio de su posible coagregación con otras especies sería de gran importancia para un mayor conocimiento del origen de dicha infección (50).

Con tal motivo, este estudio evaluó la coagregación que existe entre S. mutans ATCC 25175 y otras bacterias orales. Las especies bacterianas que se ensayamos procedían de individuos con infecciones orales (endodontitis, periodontitis) pertenecientes a varios géneros como: Bacteroides, Fusobacterium, Lactobacillus, Actinomyces, otros estreptococos..., con el fin de observar el comportamiento de asociación bacteriana que manifiesta nuestra especie control en relación con varios de los microorganismos existentes en el ecosistema oral.

En los resultados de este ensayo encontramos que S. mutans coagrega fuertemente con Actinomyces odontolyticus, Veillonella alcalescens, y algunas especies del género Bacteroides. Autores como CISAR y col. (37) establecieron que existía una coagregación positiva entre algunas cepas de S. mutans y Actinomyces spp; posteriormente, KOLENBRANDER y col. 1983 (134) realizando estudios de agregaciones bacterianas entre ambas especies, llegaron a la misma conclusión (136).

Si valoramos las consecuencias que pueden derivar de las agregaciones encontradas entre estas especies, vemos que la posibilidad de S. mutans para coagregar con Veillonella alcalescens podría jugar un importante papel en la etiología de la placa dental y en particular en la etiología de la caries; esta bacteria que se encuentra invariablemente en boca y con frecuencia en gran cantidad, no puede metabolizar los carbohidratos y utiliza como fuente de energía metabolitos intermedios tales con el ácido láctico (167). Autores como MIKX (172) y posteriormente VAN DER HOEVEN en 1978 (240), demostraron en estudios de

cultivos continuos mixtos con ambas bacterias que el ácido láctico generado durante el metabolismo de los carbohidratos por S. mutans (esta especie produce predominantemente lactato cuando está en presencia de un exceso de glucosa) era utilizado por Veillonella alcalescens para formar ácidos débiles tales como acético y propionato. Otros trabajos llevados a cabo por MIKX (172) le permitieron explicar, que mezclas de ambas especies inoculadas en ratas gnotobióticas causaban menos caries que aquellas infectadas sólo por S. mutans.

La unión de algunas especies de Bacteroides a S. mutans, según hemos visto en el ensayo podría favorecer la continuidad de la infección dental, mediante la unión de especies de escasa adhesividad a otras de alta, como es el caso de S. mutans. Así algunas especies bacterianas incluidas en este estudio como Streptococcus spp., Veillonella y Actinomyces, se caracterizan porque colonizan la cavidad oral en estadios tempranos y la unión de Bacteroides a algunos de ellos, podría ser responsable de la retención en la cavidad oral. KOLENBRANDER y col., 1985 (135) sugirió que P. loescheii podía actuar como puente en la coagregación de múltiples especies bacterianas como S. sanguis, S. mitis, Lactobacillus casei, Actinomyces...

En nuestro estudio, dentro del grupo de bacilos gram negativos, dos especies tienen la capacidad de coagregar con S. mutans, que son P. loescheii y B. intermedius. Estos hallazgos con P. loescheii están de acuerdo con los resultados obtenidos en estudios similares de VAN WINHELHOFF y col. 1983 (246) y EKE y col. 1989 (63).

Frente a S. mutans también resultó positiva la coagregación con Fusobacterium nucleatum, aunque en este caso la asociación existente era muy débil, es decir, según el criterio seguido observamos la formación de agregados pequeños y uniformes en suspensión.

6.3. CAPACIDAD DE ADHESION.

La formación de placa bacteriana dental es un requisito indispensable en la aparición de la caries dental y para desarrollarse dicha placa es fundamental el proceso de adhesión microbiana (87). Intervienen en el mecanismo adhesivo diversos elementos bacterianos y de la cavidad oral, aunque el factor etiológico imprescindible es el establecimiento microbiano mediante el proceso de adhesión (176).

Así pues, dada la importancia que supone la producción de polisacáridos extracelulares como posible mecanismo de adherencia en el desarrollo de la placa dental y consecuentemente en el inicio de la caries, se propuso estudiar "in vitro" la capacidad adhesiva de S. mutans mediante la determinación de la producción de "slime" ó capacidad de producir sustancia mucoide y la cantidad de glucano producido, empleando para ello dos técnicas diferentes.

Se han utilizado varias pruebas para estudiar la adhesión bacteriana "in vitro"; la técnica que empleamos en esta investigación fue la de CHRISTENSEN y col. (48) utilizada por este autor para Pseudomonas sp. Modificamos este test en dos aspectos con el fin de obtener mejores resultados. El medio de cultivo normalmente utilizado en este ensayo, lo cambiamos por caldo Wilkins-Chalgren ya que conseguía un mejor crecimiento de la bacteria, así mismo sustituimos el colorante safranina por violeta genciana, ya que teñía mejor y daba una respuesta más evidente.

Normalmente estas técnicas para evaluar capacidad de adherencia, en su mayoría se aplican empleando cepas standard de laboratorio, sin embargo se ha mencionado la posibilidad de que dichas cepas tengan unas propiedades adhesivas diferentes de las que tendrían estas mismas bacterias "in vivo" este fue uno de los

motivos que llevó a estudiar la capacidad adhesiva de este microorganismo S. mutans ATCC 25175 y además examinamos otro grupo de cepas de esta misma especie procedentes de la saliva de ratas Wistar utilizadas en nuestro modelo animal, que se verían afectadas por los tratamientos a que fueron sometidos en sus dietas.

De los resultados obtenidos mediante esta técnica dedujimos por un lado, que el tiempo de incubación óptimo necesario para conseguir una mayor adhesión "in vitro", es de 48 horas en S. mutans y de 24 horas para Lactobacillus sp. CASAS y col. 1989 (36) encontraron datos similares a éstos, al estudiar la adhesión de varios microorganismos orales al esmalte y otros materiales de uso odontológico. Además mediante ambas técnicas comprobamos que S. mutans ATCC 25175 presenta una gran capacidad adhesiva. Según la mayoría de los estudios, el principal mecanismo de adhesión en esta especie es debido a la síntesis de polisacáridos extracelulares del tipo mutanos y dextranos y en menor grado del tipo fructanos (9). Así de las 30 cepas examinadas, la mayoría presentaron una elevada capacidad para producir "slime".

Resulta curioso ver cómo, cuando se pone a incubar el inóculo en un caldo cuyo sustrato azucarado es la sacarosa, la producción de mucopolisacáridos se manifiesta como una capa compacta que se dispone en la base y paredes del matraz, y que no se desprende ni tan siquiera al agitar el medio.

También valoramos esta propiedad, con cepas de Lactobacillus spp. y comprobamos que al contrario de lo que ocurre con S. mutans, la capacidad adhesiva para esta bacteria es menor, ya que en 70% de los casos, no se detectó la presencia de polisacáridos extracelulares. Estos datos concuerdan con los ofrecidos por numerosos autores que consideran que las bacterias del gen. Lactobacillus tienen poco poder de adherencia lo que podría estar en relación con su poca capacidad para producir PSE (87). La baja afinidad de estos microorganismos por las superficies dentales explicaría que su asociación con lesiones cariosas se debe

fundamentalmente a la posibilidad de ser "atrapados" de forma pasiva en la matriz de la placa ó a ser retenidos de forma mecánica en surcos y fisuras (26).

Pese a que algunos trabajos experimentales demuestran el papel de otras cepas, además de S. mutans en el comienzo de la caries (87), probablemente su intervención en estos procesos, esté más en relación con un poder invasivo secundario (150), encontrándose con frecuencia en el frente de avance de lesiones cariogénas y en las infecciones de canales radiculares, como es el caso del gen. Lactobacillus sp.

La formación de glucanos insolubles en agua a partir de sacarosa es el principal factor determinante de la adhesión de S. mutans a las superficies lisas. Para determinar las cepas productoras de glucano, se eligió el ensayo de GHIONE y col. 1985 (83) y descubrimos que la cantidad de glucano que puede sintetizar esta bacteria, iba aumentando a medida que aumentaba la concentración de la sacarosa. Incluso a concentraciones de azúcar tan bajas como es 1% de se detectó fácilmente el glucano sintetizado por la bacteria. Investigaciones realizadas por GHIONE y col. le llevaron a conclusiones similares. En base a esto podemos decir que la producción de glucano depende de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo.

En relación con los estreptococos aislados de las muestras orales de ratas Wistar pertenecientes a S. mutans, también se vio que eran capaces de producir glucano, aumentando éste a medida que lo hacia la concentración de sacarosa. Hay que recordar que algunas de las cepas ensayadas proceden de la saliva de ratas sometidas a dietas ricas en sacarosa, y esto nos hace pensar que el microorganismo dispone de un almacén rico en polisacáridos intracelulares. Al evaluar la producción de polisacáridos, respecto de Lactobacillus sp. vimos que apenas se detectaba glucano, luego al contrario que con S. mutans podemos considerar a este microorganismo como mal productor de glucano.

Los datos obtenidos se consiguieron a partir de cepas que habían sufrido subcultivos repetidos en WC sin sacarosa, llevados a cabo antes del test ya que si las bacterias sufrían subcultivos en medios con sacarosa, los resultados podían modificarse al interferir la posible reserva de polisacaridos intracelulares.

Se ha visto que la capacidad de adherencia, mediada por la producción de PSE representa ventajas para la bacteria, ya que la presencia de sacarosa favorece la colonización de superficies dentales y además podría jugar un papel importante en la microbiología oral, habida cuenta que un alto grado de adherencia permitiría que la bacteria resistiera mejor el efecto de eliminación causado por el fenómeno de aclaramiento salivar. Podemos considerar que en todo este proceso la sacarosa es el principal sustrato promotor del desencadenamiento de estas reacciones.

Finalmente podemos decir que esta característica y la capacidad de coagregación con otras bacterias son dos factores de gran relevancia en la formación de la placa dental ; esto implica que en el proceso cariogénico exista una adhesión directa al diente, además de una de tipo intermicrobiano.

6.4. ACTIVIDAD MICROBIOLÓGICA DEL FLUOR.

El flúor se ha utilizado en numerosas ocasiones como tratamiento preventivo de la caries dental, aunque pocas investigaciones se han realizado acerca del efecto antibacteriano que ejerce sobre algunos microorganismos y en especial su actividad frente a S. mutans como representante etiológico de dicha infección.

Precisamente por ello, uno de los objetivos del estudio fue analizar la acción antimicrobiana del flúor sobre esta bacteria y para ello, primeramente se determinó el valor de la CMI del flúor, en forma de fluoruro sódico frente a un cultivo puro

de S. mutans ATCC 25175. Obtuvimos inhibición del crecimiento en presencia de unos niveles de flúor muy altos, siendo el valor de CMI para esta cepa de 128 mg/l. El valor de CMB es 4096 mg/l., es decir 32 veces mayor que el valor de la CMI, condición que establece DANKKERT y col.(52), para que un estreptococo sea tolerante, es decir que el antimicrobiano inhiba el crecimiento pero no mate a la bacteria.

Estos valores guardan cierta correlación con aquellos encontrados por KAY Y WILSON, 1988 (123), quienes obtuvieron un valor medio de CMI con compuestos de flúor de 260 mg/l frente a cultivo puros de 40 cepas bacterianas, eliminando el 100% de estas con un valor de CMI de 1040 mg/l, mientras que otros autores como BULLOCK, 1989 (26) evaluaron efecto antibacteriano del flúor, frente a cepas procedentes de placa subgingival, encontrando un intervalo de valores de CMI de 130-1040 mg/l, con un valor medio de 260 mg/l que producta un 97.5% de inhibición siendo el valor medio de CMI para S. mutans NCTC 10449 de 512 mg/l.

Estudiada la acción del flúor en función del tiempo los resultados mostraron que a la concentración de CMI se produce una inhibición en el crecimiento de la bacteria, alcanzando a las primeras horas de exposición del flúor un rápido descenso. Sin embargo es evidente, que se produce una supervivencia de S. mutans en el cultivo como consecuencia de que una vez el flúor es eliminado del medio éste se recupera nuevamente alcanzando un elevado valor de recuento que nos indica el efecto bacteriostático que ejerce este antimicrobiano sobre S. mutans.

Algunos autores han comprobado que S. mutans es capaz de adaptar su crecimiento en presencia de flúor, según se ha visto en otros estudios realizados "in vitro" (100,162), e incluso con altos niveles de flúor como es con aplicaciones tópicas en estudios "in vivo" (24). Así mismo se ha demostrado en varias ocasiones una adaptación de la bacteria al flúor en experimentos realizados "in vitro" y que generalmente ésta es fenotípica, es decir la bacteria pierde su resistencia después de

eliminar el flúor de medio (100,223).

Una vez comprobada la actividad antimicrobiana del flúor frente a este microorganismo, se evaluó el efecto que ejercen sobre la acción de este antimicrobiano dos factores que se dan en procesos cariogénicos, como es la bajada de pH del medio y el acúmulo de concentraciones altas de azúcares (257).

Estudiado el efecto del flúor en asociación con altas concentraciones de azúcar (10%), se observó que al medir el pH del medio cuando éste contiene el flúor, apenas experimentaba cambio alguno frente a un pH inicial de 7.0; se produjo una bajada a 6.5 mientras que el control libre de flúor descendió a 4.5, luego el flúor inhibe la producción continua de ácidos a partir de azúcares.

Este descenso de la acidez del medio, lo han explicado algunos autores como la acción del flúor cuyo mecanismo de actuación es inhibir la glicolisis, es decir éste actúa sobre la enzima enolasa, lo cual hace que inhiba el proceso de fermentación de los azúcares y por tanto elimina la capacidad de las células para producir ácidos a partir de glucosa y sacarosa. Otros autores también proponen que la acción del flúor disminuye el crecimiento de esta bacteria como resultado de un descenso en la biosíntesis ó en la captación del sustrato, es decir inhibe indirectamente el transporte de azúcar al reducir la capacidad de PEP por las PTS conductoras de carbohidratos (243).

Podemos decir que cuando se administran azúcares tales como glucosa y sacarosa, aumenta el recuento bacteriano de S. mutans y se provoca una gran bajada del pH, generado por el metabolismo de estos carbohidratos, sin embargo cuando se administra flúor éste reduce el crecimiento celular de S. mutans y cesa la producción de ácidos.

Al enfrentar S. mutans a medios con varios pH ácidos unido a una

concentración de flúor de 128 mg/l se vio, que ambos factores ejercen una acción antimicrobiana sobre esta especie; se comprobó además como hecho interesante que el flúor es un inhibidor más fuerte a pH bajos respecto del control ya que la combinación de ambos factores provoca una inhibición del crecimiento bacteriano y de la acidez del medio mayor que cuando cada una de estas condiciones se evalúan individualmente respecto de sus controles. Estos resultados concuerdan con **IZAGUIRRE 1989, (114)** quién comprobó como el descenso celular se favorecía cuando el flúor se administraba en medios con pH bajo.

Hasta hace poco se creía que PEP-PTS era el único sistema que operaba en las bacterias orales para el transporte de carbohidratos. Sin embargo estudios recientes sugieren que existe un sistema de transporte alternativo que operaría principalmente a valores bajos de pH (247). Además a pH intracelulares bajos podrían inhibirse otras enzimas glicolíticas que disminuyera la bajada de pH de la especie (60).

Consideramos de particular interés que la acción bacteriostática del flúor se vea influida por el pH del medio, idea que concuerda con los resultados de **HAMILTON Y ELLWOOD 1978 (98)** y posteriormente de **IZAGUIRRE 1989 (114)** quienes vieron que la inhibición de la producción de ácidos dependía del pH trabajando con la cepa *S. mutans* Ingbritt (82). El flúor puede actuar como un conductor de protones transmembrana y de esta forma incrementar la sensibilidad celular al ácido (15,61) e inhibir la captación de glucosa(56). La glicolisis parece detenerse a un pH que depende de la habilidad de la célula para mantener el pH intracelular que apoyaría la actividad glicolítica; como se ha visto en los resultados, el flúor puede comprometer esa capacidad (173).

La tolerancia de *S. mutans* a ácidos (100) y su capacidad para adaptar su sistema glicolítico en estas situaciones de pH bajo (100) podría ser un factor ecológico clave para este microorganismo en ciertos hábitat de la superficie del

diente.

Según se ha visto en este trabajo aunque la actividad metabólica de S. mutans se detiene cuando crece en ambientes ácidos con flúor, posteriormente se recupera en medio libre de este agente (24).

En muchos ecosistemas naturales pueden darse bajadas de pH durante cortos períodos de tiempo que proporcionen una fuerte presión selectiva, un ejemplo de una situación así se puede dar en ausencia de saliva (23) ó con el aporte de fuentes exógenas tales como ciertas comidas ricas en hidratos de carbono ó bebidas como (jugo de zumo de frutas cuyo pH es 2.8-3.0, de manzana pH: 2.9-3.3); sin embargo S. mutans frente a estos ambientes ácidos que tienden a eliminar a otras bacterias, ella es capaz de desarrollarse.

Además en este estudio se ha observado que el flúor a concentraciones subinhibitorias aumenta la producción de glucano, luego la adherencia mediada por polímeros extracelulares no es inhibida a estos valores de flúor.

En relación con estos datos, SHIMURA Y ONISI (211), llegaron a la conclusión de que el flúor inhibe la formación de polisacáridos extracelulares insolubles en agua de S. mutans no afectando la síntesis de polímeros solubles en agua. Sin embargo otro autor como TREASURE, 1981 (234) mostró que la formación de "slime" aumentaba en presencia de flúor cuando la concentración de éste es 53 mg/l, produciéndose un aumento tanto de los polímeros solubles en agua como de polímeros de glucano. Esta idea también está de acuerdo con los datos obtenidos por GHIONE y col. 1985 (83).

A la vista de los resultados encontrados, éstos indican que la acción antibacteriana del flúor que a concentraciones subinhibitorias inducen a la bacteria a producir glucano constituye un hecho que tiende a favorecer la adhesión de la

bacteria a la superficie del diente (242).

Analizados los resultados obtenidos sobre el efecto del flúor en la agregación de S. mutans con otras especies bacterianas se deduce que concentraciones subinhibitorias de flúor no afectan a la agregación, a diferencia de las observaciones de GHIONE (83) quién averiguó que a estos valores el flúor es capaz de inducir un aumento en la agregación entre especies, aunque especifica que el grado de asociación depende de la cepa y de la concentración de azúcar.

Finalmente podemos decir que después de estudiar "in vitro" el efecto directo que causa este agente antimicrobiano frente a S. mutans como bacteria implicada en la génesis de la caries dental, los resultados obtenidos muestran que el flúor provoca la inhibición de esta especie a altas concentraciones aunque no es bactericida y además, actúa inhibiendo la producción de ácidos.

A pesar de los resultados que se han aportado, hay que tener en cuenta que este tipo de infección de naturaleza polimicrobiana, incluye un enorme y variado número de bacterias muchas de las cuales intervienen como patógenos potenciales; esto hace suponer que investigaciones "in vitro" con cultivos puros no sería del todo suficiente porque no permitiría ver la eficacia real de este agente en las condiciones que se dan "in vivo". Este se vería afectada por una serie de factores como es su degradación por una o más especies en una población mixta, posible neutralización por los componentes bacterianos de la placa ó componentes producidos "in vivo" y no "in vitro"...

El estudio "in vitro" nos aporta conocimientos sobre el modo de actuación de algunos de los parámetros presentes en el ecosistema oral como es la influencia de azúcares de la dieta, acidez del medio, altas concentraciones de azúcares, efecto del flúor en el crecimiento de S. mutans; sin embargo éste tiene sus limitaciones ya que trabajamos con células en suspensión, mientras que la placa dental es un "biofilm"

en crecimiento que interacciona con el esmalte y en consecuencia, el comportamiento de la bacteria dentro de tal filtro puede diferenciarse del que observamos en un cultivo líquido homogéneo. Las bacterias dentro de la placa pueden cesar su metabolismo bajo determinadas condiciones de "stress", aunque pueden permanecer en su hábitat físicamente protegidas por otras células de la comunidad. Todo esto nos llevó a desarrollar un estudio en un modelo animal.

6.5 MODELO ANIMAL.

La creación de este modelo experimental pretendía conseguir un proceso de naturaleza cariogénica en la boca del animal, en el cual se dieran conjuntamente todos los parámetros estudiados individualmente "in vitro" frente a S. mutans. Esto nos exigía la elección de un modelo animal adecuado, así como la administración de unas dietas presumiblemente cariogénicas que indujeran tal proceso.

Como estableció BOWEN (19), para comprender la etiología de la enfermedad y obtener un método efectivo para su prevención, se necesita un modelo animal bien definido. Según esto, elegimos ratas macho variedad Wistar albina por presentar importantes cualidades como es su gran docilidad, fácil manejo, buena tasa de crecimiento puesto que tienen un tiempo de gestación corto (21 días), y además una alta longevidad, que hace de esta rata un modelo interesante para estudios experimentales a largo plazo, en nuestro caso tratamientos que se prolongaron durante 3 meses. Además hay que tener en cuenta que es una de las cepas más antiguas utilizadas en el laboratorio, y que todas las disciplinas de la investigación médica la han incluido en sus protocolos.

Cumple sobre todo, una característica importante relacionada con sus dientes. Estos, como lugar clave en el proceso infeccioso presentan gran similitud con los del

hombre, en cuanto que poseen superficies dentales fisuradas y lisas a diferencia de otros roedores como el hámster, cuyos dientes están esencialmente libres de fisuras (124). En relación con el efecto patológico de la sacarosa y la acción retentiva de S. mutans es importante que el modelo elegido guarde la mayor similitud posible con la situación real y más, si se trata de un experimento implicado en la prevención de la caries. No se incluyeron en el estudio las hembras, debido a las variables que pudieran generarse por influencia hormonal.

Las dietas que suministramos al animal, las elegimos porque contienen un elevado porcentaje de hidratos de carbono. La dieta "K2000" ha sido ampliamente utilizada en la creación de modelos animales para el estudio de caries (127), sin embargo no ha sucedido así con la adición de "fibra Gwar" a dietas azucaradas, la cual seleccionamos por ser un hidrato de carbono no fermentable que es altamente pegajoso cuando se humedece, de esta manera se asemejaría más al efecto producido por la mezcla de sacarosa y de almidones procedentes de diversos tipos de vegetales y que aparecen frecuentemente en la alimentación (72,74).

Basándonos en la efectividad que ejerce la sacarosa frente a S. mutans (datos "in vitro") en comparación con otros azúcares como es mayor adherencia, buen crecimiento y gran bajada del pH del medio, seleccionamos para este modelo dietas en cuya composición estuviera este azúcar en un alto porcentaje. Según varios estudios, los recuentos de esta especie eran más elevados en dietas con sacarosa que aquellas con glucosa en la placa dental. El efecto potente de la sacarosa está relacionado con la síntesis de glucanos que se requiere para la formación tenaz de placa. Estas ventajas colocan a S. mutans en una situación privilegiada para crecer y establecerse en la zona.

La mayoría de los autores no han descrito ninguna alteración en el estado nutricional e inmunológico de los animales tratados con estos tipos de dietas. Sin embargo, se ha sugerido en algunos trabajos, que la dieta "K2000" podía reducir

el crecimiento corporal de los animales debido a un posible estado de subalimentación que influiría en una reducción del peso de las glándulas salivares y en el volumen de la saliva. Esto daría lugar a un incremento en la susceptibilidad a la caries, lo que inhabilitaría esta dieta como modelo para estudios sobre cariogenicidad.

Estas afirmaciones se han basado preferentemente en la comparación del peso de los animales estudiados y parece deberse a la pauta de alimentación que utilizaron (cantidad de alimentos y frecuencia de alimentación) (74), puesto que algunos estudios que han evaluado esta posibilidad han demostrado que los animales alimentados con dieta "K2000", cuando ésta se suministra "ad libitum", no presenta ningún problema nutricional (59,177). Otros autores en experimentos realizados comparando la dieta "K2000" frente a diversas dietas suministradas con sonda gástrica, restan importancia al papel de la dieta en la producción de caries, indicando que la etiología de esta infección es principalmente el resultado de la interacción local entre las bacterias y la dieta sobre una superficie dental susceptible (19).

En este estudio, el aporte de estas dietas "ad libitum" no supuso alteración alguna en el peso del animal, como se comprobó a lo largo de los dos controles periódicos, durante los cuales el peso estaba dentro de unos intervalos fisiológicos normales. Los resultados muestran un aumento de peso, lo cual indica que el animal consume bien la dieta administrada y que estos cambios en la dieta no afectan a su normal crecimiento y desarrollo, ya que todas las ratas gozan de buena salud. Se trata pues, de dietas aptas como aporte alimenticio.

Pese a haber obtenido en nuestros resultados experimentales un crecimiento normal, preferimos realizar un estudio que comparase toda una serie de parámetros bioquímicos relacionados con el estado de salud general del animal (datos no mostrados). Comprobamos no sólo el que las dietas no influyen ostensiblemente en

dicho estado, sino también que los distintos tipos de tratamientos realizados a las concentraciones usadas de flúor, que posteriormente discutiremos, tampoco le afectaban considerablemente.

6.6. EXAMEN MICROBIOLÓGICO Y TÉCNICA DE PROCESAMIENTO.

El llevar a cabo un examen microbiológico en la boca del animal, nos permitió evaluar el efecto que causa el aporte de dietas ricas en hidratos de carbono sobre importantes microorganismos. Las bacterias elegidas en nuestra investigación fueron dos microorganismos estrechamente relacionados con la caries, que son Streptococcus mutans y Lactobacillus spp. Los recuentos obtenidos de S. mutans en las muestras de saliva servirán para evaluar, por un lado la influencia de dietas ricas en hidratos de carbono sobre su desarrollo en el hábitat oral, así como la acción antimicrobiana del flúor, y por otro lado para establecer la posible relación existente con la incidencia de caries, ya que se considera el agente etiológico principal implicado en el desarrollo de caries dental sobre el que hemos centrado nuestra investigación. Además valoramos los recuentos de Lactobacillus spp para comparar la respuesta de ambos microorganismos.

Es de suma importancia conseguir aislar la bacteria de su hábitat, para lo cual elegimos muestras de saliva (147), por dos motivos principalmente: uno porque es el fluido que baña toda la superficie dental, luego es el principal reservorio para detectar estos microorganismos y además porque numerosos autores han utilizado esta muestra para estudios de caries, dado el elevado número de S. mutans y Lactobacillus spp que contiene (78), es más, la saliva se toma como muestra en individuos con factor de riesgo para realizar los tests de control de caries (207).

Otro procedimiento usado a menudo en estimaciones de grado de infección por

S. mutans, es tomar muestra de placa dental que determina la forma localizada según la cual esta bacteria coloniza los dientes, pero esto no formaba parte de nuestro estudio. Las muestras de placa de diferentes dientes pueden mostrar muy diferentes variaciones en sus contenidos bacterianos, mientras que un recuento general nos permite conocer la existencia de S. mutans en boca. No nos interesó tanto en un principio, la localización en el diente como el poder detectar la presencia de S. mutans.

Las muestras de saliva se recogieron a la misma hora, según los días de muestreo para cometer el menor error posible, aunque según MATEE, en un estudio epidemiológico que realizó en humanos dijo que no había diferencias en el recuento de S. mutans a partir de muestras de saliva, entre mañana y tarde (166).

Se considera más fiable la muestra cuando se da a mascar parafina, ya que esto favorece la liberación de bacterias de los dientes, sin embargo fue imposible de realizar en nuestro modelo animal.

Medimos el pH salivar y obtuvimos una media de pH: 8.0 - 8.5, valor que no concuerda con este ambiente que se supone es altamente ácido; probablemente el resultado obtenido se deba a que no se midió el pH en cada diente, sino que se valoró a partir de la saliva, fluido que por sí mismo actúa como tampón neutralizando la bajada de pH (77).

Con el fin de obtener el recuento celular de S. mutans durante el seguimiento de este modelo experimental, necesitamos buscar una técnica de procesamiento de muestra e identificación fiable que diese buenos resultados, considerando como posibles errores del método, las variaciones en el número de bacterias con el tiempo y el medio de cultivo.

Nuestra idea era asegurar la capacidad de recuperación de este

microorganismo, ya que esta especie se caracteriza por precisar de unas condiciones muy específicas para poder desarrollarse. Esto nos planteó graves problemas que nos llevaron a hacer estudios comparativos de medios y ambientes favorables para su crecimiento, como vimos en el estudio "in vitro". Se trata de una bacteria difícil de recuperar de la muestra si no empleamos un medio muy selectivo, y además tiene el inconveniente de que muta con gran facilidad, adquiriendo estados morfológicos muy diversos.

Realizamos los primeros ensayos preliminares con el grupo control y usamos 2 medios selectivos para el aislamiento de S. mutans de las muestras: el agar MSB (89) el cual es usado en la mayoría de los laboratorios y Mitis salivarius. Los resultados que encontramos mostraron que en MS se recuperaban más colonias de S. mutans que en MSB, y que es medianamente selectivo, porque crecen otras especies además de este microorganismo.

Comparando placas de ambos medios, aparecieron algunas de MS con crecimiento y otras de MSB incubadas con la misma muestra, sin él. Es posible que la explicación radique en que algunas ratas tuvieran este microorganismo en un número tan bajo que no eran detectadas en la muestra de saliva si no se empleaba un buen medio de cultivo, o también pudiera ser que algunos animales tuvieran cepas de S. mutans que no crecen óptimamente en el medio MSB. Según LITTLE y col. (149) este medio es más inhibitorio y no permite el crecimiento de determinadas cepas dando por tanto recuentos más bajos.

Otros autores sin embargo, opinan que MSB es un medio altamente selectivo, en el cual crecen pocas o ninguna otra especie, además de S. mutans y que desarrolla colonias más grandes y consistentes, idea que coincide con nuestros resultados. En desacuerdo con todos, DUCHIN y VAN HOUTE (58) encontraron que ambos medios son equivalentes.

Según nuestros experimentos, MS recuperó mayor número de colonias de S. mutans (224), aunque MSB permitió un mejor crecimiento de la bacteria. Este hecho hizo que eligiéramos MS como medio de cultivo para el estudio porque detectaba mejor la presencia de este microorganismo en la muestra, que es lo que fuimos buscando. En cuanto al crecimiento de otras especies en MS se solucionó, al diferenciarlas por estudio morfológico de las colonias bajo microscopio, a pesar de que de esta manera se hizo más costoso.

Aislamos ambos microorganismos en número elevado de la casi totalidad de los animales experimentados. Esta frecuencia tan alta de aislamiento, se puede explicar en parte por el uso de un medio de cultivo que daba buenos resultados, MS y por otra, gracias al uso de una técnica muy sensible, el método de la micropipeta. Se utilizó, ya que según WESTERGRENN y KRASSE (251), este método está diseñado para detectar niveles bajos de S. mutans en saliva (en algún tratamiento obtuvimos entre 40-100 ufc/ml) y es muy eficiente para aislamiento en medios con agar.

Analizados los datos microbiológicos obtenidos con ambas dietas pudimos comprobar que S. mutans crece independientemente de las dietas suplementadas con hidratos de carbono, aunque los niveles alcanzados por esta bacteria en las ratas control son mucho más bajos, de lo cual se deduce que es una especie integrante de la flora natural de la boca; además que las ratas sometidas a dieta "K2000" y "Fibra Gwar" con un alto contenido en sacarosa y en particular la dieta "K2000" con un 56% de este azúcar, soportan recuentos más altos que el control (30).

Estas dietas ricas en hidratos de carbono provocan un considerable aumento de esta especie bacteriana, probablemente por la alta cantidad de sacarosa que tienen. Este azúcar es el principal sustrato de este microorganismo por el que tiene gran afinidad y facilidad para metabolizar, degradándolo por vía glicolítica y produciendo ácidos que libera al medio (163). En el experimento "in vitro" también

mostramos que S. mutans metaboliza fuertemente este sustrato, resultando ser el azúcar que más baja el pH del medio y con el que se obtiene un mayor crecimiento.

La relación obtenida entre dietas ricas en hidratos de carbono y niveles de S. mutans en saliva, viene a estar de acuerdo con el trabajo de KRISTOFFERSON y BIRKED (141), quienes observaron que se producía una disminución de este microorganismo en boca cuando disminuían los azúcares en la dieta, según un estudio que abarcó un período de 6 semanas.

Estadísticamente se comprobó que las diferencias encontradas en el recuento de S. mutans obtenido con la dieta "K2000" y "Fibra Gwar" respecto del control son muy significativas con una $p < 0.00005$ y $p < 0.01$ respectivamente. Así mismo, entre ambas dietas los niveles de S. mutans son también significativamente mayores en la dieta "K2000" con una $p < 0.05$, debiéndose quizás esta pequeña diferencia a que la dieta "K2000" contiene una concentración de sacarosa ligeramente mayor, lo que supondría mayor elaboración de polímeros extracelulares e intracelulares a partir de la sacarosa que utilizaría este microorganismo en su crecimiento y adherencia al esmalte dental.

Se esperaba que la adición de "fibra Gwar" a una dieta rica en sacarosa mostrara mayores recuentos de S. mutans en saliva, ya que según medidas realizadas "in vivo" por otros autores (72) su aporte conduce a una mayor y más duradera disminución del pH de la placa dental que la misma cantidad de sacarosa como control. Además la "fibra Gwar" es muy adherente a nivel de las superficies dentales, lo que permitiría un mayor tiempo de permanencia de la sacarosa en contacto con los dientes. Esta pequeña diferencia entre ambas dietas podría deberse a que la dieta "fibra Gwar" al ser altamente pegajosa cuando se humedece puede que favorezca el flujo salivar aumentando la capacidad buffer de la saliva lo que eliminaría la acidez del medio provocada por la degradación de la sacarosa.

En relación con Lactobacillus sp., según los datos del control vemos que aparecen niveles altos de este género bacteriano en el medio oral; si comparamos ambas dietas con el control, el recuento alcanzado en todos los casos es similar, no encontrándonos desde el punto de vista estadístico diferencias significativas entre ellos o respecto del control. Por ello, deducimos que estas dietas presuntamente cariogénicas no favorecen especialmente el desarrollo de este microorganismo, aunque a los 90 días, si produce un pequeño aumento, estadísticamente significativo con la dieta "Fibra Gwar" ($p < 0.05$). Según varios estudios la intervención de este microorganismo en estos procesos, está más en relación con un poder de invasión secundario, encontrándose con frecuencia en el frente de avance de lesiones cariogénicas dada su capacidad de resistencias a medios ácidos (66).

Generalmente la administración de estas dietas se asocia con la inoculación al animal de bacterias cariogénicas, preferentemente S. mutans, con lo que se consigue una alta producción de caries. El que en este trabajo no procediéramos a inocular ninguna bacteria se debe a que intentamos crear un modelo de caries en sus estados iniciales o intermedios, someterlo a factores presumiblemente cariogénicos, como dietas con alta concentración de azúcar y aplicar entonces tratamientos de flúor, con el fin de estudiar la eficacia de éste sobre el desarrollo de S. mutans y la incidencia de caries cuando lo administramos conjuntamente con la dieta (187); así veríamos el papel que desempeña esta especie, en un modelo "in vivo" que engloba a los principales factores potencialmente cariogénicos. Esto está más de acuerdo con un modelo preventivo que un modelo crónico, que es bastante más irreversible y sobre el que habría que aplicar antimicrobianos. Por otro lado se trata de estudiar momentos todavía reversibles en la aparición del proceso cariogénico, dado que éstos son los casos más frecuentes.

6.7. TRATAMIENTOS FLUORADOS.

Ya que nuestra idea fue encaminada siempre, hacia la búsqueda de un modelo

que se aproximara a una situación lo más real posible, utilizamos dos métodos de aplicación del flúor que corresponden con dos de las formas más habituales de administrar este agente en el hombre.

* En cuanto al flúor presente en agua de bebida, este método fue muy utilizado en campañas realizadas en diversos países. Como indicamos al principio, existen múltiples trabajos realizados tanto en roedores como en humanos, que demuestran el efecto cariostático del flúor cuando se añade al agua de bebida (160).

En las etapas iniciales con este tipo de investigación, existen pocos trabajos que utilizaran concentraciones de flúor inferiores a 10 ppm que fueran capaces de producir una disminución significativa del número de caries (219); se sabe que concentraciones entre 1 y 5 ppm reducen significativamente el número de caries, sin que se produzca una significativa pérdida de peso (231). Por este motivo elegimos para nuestro estudio la concentración de 4 ppm, evitando así utilizar concentraciones más elevadas que pudieran conducir a la presencia constante de concentraciones apreciables de flúor en sangre, ya que por encima de 0.3 ppm puede originar trastornos metabólicos (102,138).

* Por otro lado, el flúor presente en barnices es otro método utilizado frecuentemente a nivel clínico y del cual se ha descrito que produce una significativa disminución del número de caries.

La elección del Duraphat se debe por un lado, a que su utilización en clínica viene produciendo desde hacía varios años (205,131), habiéndose descrito que una aplicación semestral de Duraphat puede incluso producir una reversión de la caries, sobre todo de las iniciales e intermedias, y por otro, a que actualmente sigue siendo ampliamente utilizado en diversos tipos de estudios experimentales (54,128,175,206,208).

La aplicación a las ratas una vez a la semana de Duraphat puede considerarse equivalente con respecto de las pautas de crecimiento del animal, con una aplicación trimestral en un niño.

Cuando se les administró a las ratas los tratamientos fluorados, tanto en el agua de bebida como a modo de barnices, se observó una disminución del peso en la primera fase. Este fenómeno en las etapas más tempranas, sería explicable por el stress a que les somete el uso de tratamientos que exigen una continua manipulación, siendo en etapas más adultas (3 meses) menos vulnerables a cualquier tipo de tratamiento. A pesar de las modificaciones observadas, estos cambios no comprometan la salud general del animal.

Una vez elegimos los tratamientos fluorados, uno de nuestros objetivos fue valorar el efecto que causaban, en el recuento celular de S. mutans.

En cuanto a los tratamientos fluorados, en la dieta "K2000" asociada a barnices de flúor, observamos un descenso significativo en el recuento de S. mutans con una $p < 0.00005$. El efecto inhibitor del flúor como se sabe actúa sobre procesos enzimáticos de las bacterias involucradas en el metabolismo de los azúcares, además ejerce un papel de protección contra la desmineralización del diente y posee la propiedad de inhibir la adherencia al diente. En el tratamiento con agua fluorada, se produce una disminución de S. mutans en relación con la dieta cariógena, aunque no tan efectiva como con barnices ($p < 0.0001$).

Una explicación posible a ésta mayor efectividad de los barnices, se deba a que al ser aplicados éstos directamente sobre el esmalte dental mediante pincelaciones, la concentración alcanzada en flúor es mayor que la obtenida con la del flúor administrado en agua de bebida. Además su acción es más duradera, ya que el tiempo de exposición del diente frente a éste compuesto pasa a ser de varios minutos a varias horas, debido a que aunque la aplicación se realiza durante un

tiempo limitado, el barniz presenta la propiedad de adherirse a la superficie dental durante varias horas. Esto permite que la concentración de flúor no sólo incremente en el esmalte sino también en la dentina, donde se ha descrito que el enriquecimiento en flúor puede llegar hasta una profundidad de 30 μ , alcanzando incluso valores de 1500 ppm (186,236).

Con respecto a la dieta "fibra Gwar", se observó que también había un descenso en el recuento de este microorganismo cuando las ratas eran tratadas con flúor en forma de barnices y en forma de agua fluorada con una disminución significativa de $p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente.

Analizando el efecto que produce el flúor sobre bacterias del género Lactobacillus se observa que no se da una disminución significativa en el recuento bacteriano cuando se administra conjuntamente con la "dieta K2000", solo a los 90 días y cuando se adiciona "fibra Gwar" a la dieta, se manifiesta un descenso en la población. HAMILTON en 1985 (101) estudió el comportamiento de cepas de Lactobacillus spp. frente al flúor, observando que eran menos sensibles a éste que S. mutans. Asimismo comprobó "in vitro" que tanto S. mutans como Lactobacillus son capaces de adaptar su crecimiento en presencia de flúor.

6.8. EXAMEN CLINICO DE LA CARIES.

Desde un punto de vista microscópico, estudiamos la histología de la lesión para ver si los datos macroscópicos observados con los diferentes tratamientos tenían relación con la lesión histológica y así ahondar en si se desarrollaban procesos de recalcificación teniendo en cuenta que en las segundas tomas aparecían menos caries, cuando se administraba flúor conjuntamente con dietas ricas en hidratos de carbono, en particular cuando se daban barnices de flúor con la dieta "K 2000" y

"fibra Gwar", que provocan una reducción de caries del 96% y 92% a los 90 días de tratamiento.

Macroscópicamente vimos una respuesta patológica de las mucosas a los tratamientos tópicos con barnices, según se observa en la fotografía 3, que pueden deberse a una acción quelante del producto, aunque no sabemos si esta patología es por la acción en si misma del producto ó bien sea debido a la frecuencia y dosis administrada en este estudio. Además en los casos tratados con barnices apareció una coloración blanca luminosa en el esmalte, y en los surcos de las superficies oclusales tratadas se encontraron unos depósitos blanquecinos que pueden ser depósitos de calcio, actuando éste a modo de protección del diente al provocar un menor depósito de restos alimenticios y de placa bacteriana en las fisuras y surcos de las piezas dentarias, lo que provocaría una disminución del estímulo cariogénico y consecuentemente una mayor reducción en el número de caries.

Sabemos que las lesiones pueden ser a nivel clínico activas o inactivas, estas últimas posiblemente como resultado de un tratamiento que apunta a la detención de una posterior progresión de la lesión (244). Además, las lesiones inactivas o retenidas, generalmente se observa que son capaces de remineralizar, hecho que podía estar relacionado con algunos de los casos de estas lesiones tratadas. Para comprobar estos hechos y a la vez apreciarlos de una manera más cualitativa utilizamos el microscopio de luz polarizada que examinó las secciones desecadas.

Se apreciaron lesiones porosas que aparecían como un defecto en forma de cuña con la base en la superficie del esmalte. La explicación de la apariencia translúcida de esta zona con las estructuras del esmalte menos evidentes, parece ser, la disolución inicial del esmalte que principalmente se produce a lo largo de las aperturas de los espacios interprismáticos del tejido, dando como resultado una pérdida de estructuración de los prismas (foto nº 4).

6.9. RELACION MICROORGANISMO-CARIES.

Estudiada la relación que existe entre los recuentos bacterianos de S. mutans en saliva con el desarrollo de lesiones cariógenas, comprobamos estadísticamente que existe un valor de correlación significativo, sirviendo estos resultados para considerar a este microorganismo como un indicador de la infección dental cuando se aísla de muestras salivares (140).

Estos resultados coinciden en el caso de bacterias del género Lactobacillus es decir, se encuentran elevados niveles coincidiendo con la presencia de lesiones cariógenas; dada su capacidad para resistir medios ácidos se le atribuye un importante papel en el inicio de las lesiones de caries, sin embargo estudios más recientes indican que no está involucrada en el inicio de la caries, aunque sí son invasores secundarios que contribuyen al avance de lesiones ya existentes (101). Un estudio realizado por VAN HOUTE en 1980 (241) apoyó esta posibilidad al observar que se pueden desarrollar lesiones en dientes que no albergan dichos microorganismos.

VII. CONCLUSIONES

1. El desarrollo de S. mutans a altas concentraciones de sacarosa - sustrato más importante para esta especie, con respecto a su papel como agente etiológico del proceso cariogénico - muestra que:

- * facilita su crecimiento y aislamiento selectivo en medios de cultivo.
- * provoca una fuerte acidez del medio.
- * favorece su capacidad de adherencia al aumentar la producción de "slime", alcanzando el mayor valor a las 48 horas.
- * aumenta la producción de glucano y su valoración cuantitativa puede ser un buen índice de la actividad metabólica de S. mutans.

2. Tanto el xilitol como el sorbitol por sus propiedades de reducir el crecimiento de S. mutans e inhibir la producción de ácido, deben estudiarse como posibles sustitutos de azúcares en la dieta.

3. Evaluada la resistencia que muestra S. mutans frente a medios ácidos, se considera que el pH óptimo para el crecimiento de esta especie se encuentra dentro de un intervalo de 7.0 a 5.0, disminuyendo a partir de éste último.

4. La capacidad de agregación que tiene S. mutans - principal microorganismo implicado en la génesis de la caries dental - con otras bacterias orales, permite un mayor conocimiento del origen y continuidad de dicha infección.

5. La actividad que ejerce el flúor frente a S. mutans es una acción bacteriostática que actúa inhibiendo el crecimiento y la producción de ácidos, siendo el valor de CMI = 128 mg/l y la CMB = 4096 mg/l.

6. El estudio de diferentes parámetros sobre la actividad del flúor, tomando como patrón las valoraciones obtenidas por el método de macrodilución en caldo, muestra

que:

* *actúa independientemente de la concentración de azúcar existente en el medio.*

* *aumenta su actividad a medida que disminuye el pH.*

* *a concentraciones subinhibitorias no influye en el fenómeno de autoagregación de S. mutans aunque si favorece la capacidad de adherencia al aumentar la producción de glucano.*

7. *El modelo experimental diseñado reproduce el desarrollo de un proceso cariogénico a nivel de la superficie dental mediante el uso de dietas ricas en hidratos de carbono (sacarosa) y responde a las aplicaciones de flúor en sus dos modalidades.*

8. *Los recuentos de S. mutans se incrementan significativamente con el consumo de dietas ricas en hidratos de carbono, alcanzando con la dieta "K2000" valores más elevados que con la dieta "Fibra Gwar".*

9. *Estudiada la relación que existe entre los recuentos bacterianos de S. mutans en saliva con el desarrollo de lesiones cariogénicas, comprobamos que existe un valor de correlación significativo, sirviendo estos resultados para considerar a este microorganismo como indicador de la infección dental cuando se aísla de muestras salivares.*

10. *El flúor confirma su acción preventiva y de tratamiento de caries ya que produce un descenso significativo en el recuento celular de S. mutans y en la caries tanto a nivel de lesiones como en la disminución de éstas por aumento de la remineralización de estas áreas, siendo más eficiente el flúor aplicado como barnices que como agua fluorada.*

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. ACUNA V., VON BEETZEN M., CARACATSANIS M., SUNDSTROM F. "In vitro fluoride uptake by enamel and dentine. A comparative study of two varnishes". *Acta Odontol. Scand.* 1990. 48, 2: 89-92.
2. AFSETH J., AMSBAUGH S M., MONELL-FORRENS E., BOWEN W H , TOLLA G., BRUNELLE J., LI S., DAHL E. " Effect of topical application of copper in combination with fluoride in drinking water on experimental caries in rat". *Caries res.* 1984, 18: 134-140.
3. ALALUUSUA S., SAVOLAINEN J., TUOMPO H., GRONROOS L. "Slide-scoring method for estimation of S. mutans levels in saliva". *Scand. J. Dent. Res.* 1984, 92: 1127-133.
4. ASSEV S., VEGARUD G., RÖLLA G. "Growth inhibition of S. mutans strain OMZ 176 by xylitol". *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 1980, sect. B, 88: 61-3.
5. ASSEV S., WALER S M., RÖLLA G. "Further studies on the growth inhibition of some oral bacteria by xylitol". *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 1983, sect. B, 91: 261-5.
6. ASSEV S., RÖLLA G. "Evidence for the presence of a xylitol phosphotransferase system in S. mutans OMZ 176". *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 1984., Sect. B, 92: 89-92.
7. BANOCZY J., BÄR A., ORSOS M., SZÖKE J., ZIMMERMAN P. "Reduction of salivary levels of S. mutans by consumption of xylitol beetwen meals". *J. Dent. Res.* 1986. *Spec Iss.* 65: 818.
8. BAREIL M., TRAHAN L. "Intracelular xylitol-phosphate: Effect on glucose

transport and degradation by S. mutans". *J. Dent. Res.* 1985, 64: 194.

9. BEACHEY TM. "Bacterial adherence: adhesive-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces". *J. Dent. Res.* 1981, 143: 325-345.

10. BECKERS HJA. "Influence of xylitol on growth, establishment and cariogenicity of Streptococcus mutans in dental plaque of rats". *Caries res.* 1988, 22: 166-173.

11. BEIGHTON D., and HAYDAY H. "The effects of fluoride on the growth of Oral Streptococci". *J. Gen. Microbiol.* 1980. 27: 117-124.

12. BEIGHTON D., RUSSELL RRB., HAYDAY H. "The isolation and characterization of S. mutans serotype "h" from dental plaque of monkeys (*Macaca fascicularis*)". *J. Gen. Microbiol.* 1981, 124: 271-279.

13. BEIGHTON D., RUSSELL RPB., WHILEY RA. " A simple biochemical scheme for the differentiation of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus ". *Caries res.* 1991, 25: 167-174.

14. BEIRAGHI S., SPULLER R., ROSEN S., WILSON S., BECK F. "Effect of low-level fluoride and caries incidence in rats". *Caries res.* 1989, 23: 168-171.

15. BENDER GR., SUTTON SVW., MARQUIS RE. " Acid tolerance, protom permeabilities and membrane ATPase of oral streptococci". *Infect. Inmun.* 1986, 53: 331-338.

16. BENNETT V., CRAIG W. " Kinetics of antimicrobial activity". *J. Pediatr.* 1986. 835-840.

17. BIBBY BG. and FU J. "Changes in plaque pH in vitro by sweeteners". *J. Dent.*

Res. 1985, 64 (9): 1130-1133.

18. BIRKHED D., EDWARDSSON S., SVENSSON B., MOSKOWITH F., FROSTELL G. " Acid production from sorbitol in human dental plaque". Arch. Oral Biol. 1978, 23: 971-975.

19. BOWDEN WH., AMSBAUGH SM., MONELL-TORRENS S., BRUNELLE JA. "Influence of various diets administered by gastric gavage on cariogenicity of foods". Caries res. 1983, 17: 525-53.

20. BOWDEN GHV., HAMILTON JR. " Environmental pH as a factor in the competition between strains of the Oral Streptococci: S. mutans, S. sanguis and S. mitior growing in continuous culture". Can J. Microbiol. 1987, 33: 824-827.

21. BOWDEN GHV., HAMILTON JR. " Competition between S. mutans and Lactobacillus casei mixed continuous culture". Oral Microb. Immun. 1989, 4: 57-64.

22. BOWDEN GHV. " Effects of fluoride on the microbial ecology of dental plaque". J. Dent. Res. 1990, 65 (Spec Iss): 653-659.

23. BROWN LR., DREIZEN S., HARDER. " Effect of selected caries preventive regimens on microbial changes following radiation-induce xerostomia in cancer patients". In STILES HM., LOESCHE WJ., O'BRIEN TC. Ed. Microbial aspects of dental caries. Microbial Abst. 1976, Spec. Suppl. 1: 275-290.

24. BROWN LR., WHITE JO., JORTON IM., DREIZEN S., STRECKFUSS JL. "Effect of continuous fluoride gel use on plaque fluoride retention and microbial activity". J. Dent. Res. 1983, 62: 746-751.

25. BROWN AT., BEST GM. " A proposed mechanism for the effects of saccharin

on glucose metabolism by *S. mutans*". *Caries res.* 1986, 20: 406-418.

26. BULLOCK S., NEWMAN HN. and WILSON M. "The in vitro effect of an amine fluoride gel on subgingival plaque bacteria". *J. Antimicrob. Chem.* 1989, 23: 59-67.

27. BURNETT GW., SCHERP HW and SCHUSTER GS. "Microbiología y enfermedades infecciosas de la boca". Ed. Limusa, México, 1986, 942.

29. BURT SA., LOESCHE WJ., ELUND SA., BARNEST RW. "Stability of *S. mutans* and its relationship to caries in a child population over 2 years". *Caries res.* 1983, 17: 532-542.

30. CABRONERO MJ., MINGUEZ F., LOSCOS A., LOPEZ R., ANDRE J., GOMEZ-LUS ML. "Experimental animal model of caries applied to fluor prophylaxis". 7th Mediterranean congress of chemotherapy. Barcelona. 1990, p. 211.

31. CARLSSON J. "A medium for isolation of *S. mutans*." *Arch. Oral Biol.* 1967, 12: 1657-1658.

32. CARLSSON J. "A numerical taxonomic study of human Oral Streptococci". *Odontol. Revy.* 1968, 19: 137-60.

33. CARLSSON J. "Regulation of sugar metabolism in relation to the feast and famine existence of plaque". In: GUGGENHEIM B, ed. *Cariology Today*. Basel. Karger. 1984, 205-11.

34. CARLSSON J. "Microbial aspects of frequent intake of products with high sugar concentrations". *Scand. J. Dent. Res.* 1989, 97: 110-4.

35. CARLSSON P. "Distribution of mutans streptococci in populations with different

levels of sugar consumption". *Scand. J. Dent. Res.* 1989, 97: 120-5.

36. CASAS I., BACA P., LIEBANA J., MARIN A., NAVAJAS J.M. "Evaluación de la adhesión in vitro de microorganismos cariogénicos en esmalte y materiales de obturación dental". *Avances en odontoestomatología.* 1989, 5: 695-699.

37. CISAR J.O., KOLENBRANDER P.E., and McINTIRE F.C. "Specificity of coaggregation reactions between human oral streptococci and strains of Actinomyces viscosus or Actinomyces naeslundii". *Infect. Immun.* 1979, 24: 742-752.

38. CLARKE JKK. "On the bacterial factor in the aetiology of dental caries". *Br. J. Exp. Pathol.* 1924, 5: 141-147.

39. CLARKSON BH., RELL D., WEFEL JS., CRALL J., FEAGIN F. "In vitro caries-like lesion production by S. mutans and A. viscosus using sucrose and starch". *J. Dent. Res.* 1987, 66: 795-798.

40. COLEMAN G., and WILLIAMS RAD. "Taxonomy of some human viridans streptococci". In: *Streptococci and Streptococcal diseases.* Wannamaker LW. and Matsen JM. Eds: New York, Academic Press. 1972, 281-299.

41. COLLINS CH. *Métodos microbiológicos.* Edit. Acribia. Zaragoza. 1969.

42. COLMAN G., LYN CB. "Identification of streptococci in a medical laboratory". *J. of Applied Bacteriol.* 1984, 57: 1-14.

43. COWAN S.T, STEEL KJ. "Manual for the identification of medical bacteria". 2ª edc., Cambridge, edit. Cambridge University press. 1974.

44. COYKENDALL AL. "Genetic heterogenicity in S. mutans". *J. Bacteriol.* 1971,

106: 192-196.

45. COYKENDALL AL. "Four types of S. mutans based on their genetic, antigenic and biochemical characteristics". *J. Gen. Microbiol.* 1974, 83: 327-338.

46. COYKENDALL AL., BRATTHALL D., O'CONNOR K., DVARSKAS RA. "Serological and genetic examination of some non typical S. mutans strains". *Infect. Immun.* 1976, 14: 667-670.

47. COYKENDALL AL. "Classification and Identification of the Viridans Streptococci". *Clinical Microbiolgy Rewiews.* 1989, 315-328.

48. CHRISTENSEN G., SIMPSON WA., BISNO AL. and BEACHEY EH. "Adherence of Slime-producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surfaces". *Infect. Immun.* 1982, p: 318-326.

49. CROSSNER C., CLAESSION R., JOHANSSON T. "Presence of mutans streptococci and various types of lactobacilli in interdental spaces related to development of proximal carious lesions". *Scand. Journal Dental Res.* 1989, vol 97, 4: 307-315.

50. CROWLEY PJ., FISCHLSCHWEIGER W., COLEMAN SE. and BLEIWEIS. "Intergeneric bacterial coaggregations involving mutans Streptococci and Oral Actinomyces". *Infect. Immun.* 1987, 2695-2700.

51. CURTISS R. "Genetic analysis of S. mutans virulence and prospects for an anticaries vaccine". *J. Dent. Res.* 1986, 65: 1034-1045.

52. DANKERT J., HOLLOWAY Y., JOLDERSMA W., HESS J. "Screening for penicillin tolerance in viridans streptococci by a simple disk method". *J. Clin.*

Microbiol. 1982, 16: 744-746.

53. DAWES C. and WEATHERELL JA. "Kinetics of fluoride in the Oral fluids". *J. Dent. Res.* 1990, 69 (Spec Iss): 638-644.

54. DE BRUYN H., VAN RIJN L., PURDEL-LEWIS D., ARENDS J. "Influence of various fluoride varnishes on mineral loss under plaque". *Caries res.* 1988, 22: 76-83.

55. DEL RIO GOMEZ., BRATTHALL D. "Sample, count, identity and store the mutans streptococci". *Scand. J. Dental Res.* 1990, vol 98, 2: 106-12.

56. DILLON HC., CASSELL GH. Streptococci. Ob cit. Mcghee JR., Michalek SM., Cassell GH. *Dental Microbiology.* 1982, 388.

57. DIRKSEN T., LITTLE MF., BIBBY BG., CUMP SL. "The pH of carious cavities. Effect of glucose and phosphate buffer on cavity pH". 1962. *Arch. Oral Biol.* 7: 49-58.

58. DUCHIN S. "Relationship of S. mutans and Lactobacilli to incipient smooth surface dental caries in man". *Arch. Oral Biol.* 1978, 23: 779-786.

59. EDGAR WM., BOWEN W., AMSBOUGH S., MONELL-TORRENS R. "Effects of different eating patterns on dental caries in the rat". *Caries res.* 1982, 16: 384-389.

60. EISENBERG A.D., BENDER GR., MARQUIS RE. "Reduction in the aciduric properties of the oral bacterium S. mutans GS5 by fluoride". *Archs Oral Biol.* 1980, 25: 133-135.

61. EISENBERG AD., MARQUIS RE. "Uptake of fluoride by cells of S. mutans in dense suspensions". *J. Dent. Res.* 1980, 59: 1187-1191.
62. EISENBERG AD., OLDERSHAW MD., CURZON MEJ., HANDELMAN SL. "Effects of fluoride, lithium and strontium on growth and acid production of mutans streptococci and Actinomyces viscosus". *Caries res.* 1991, 25, 3: 174-179.
63. EKE PI., ROTIMI VO. and LAUGHON BE. "Coaggregation of black-pigmented Bacteroides species with other oral bacteria". *J. Med. Microbiol.* 1989, 28: 1-4.
64. EKSTRAND J., SPAK CJ. and VOGEL G. "Pharmacokinetics of fluoride in man and its clinical relevance". *J. Dent. Res.* 1990, 69 (Spec Iss): 550-555.
65. ELLEN RP., FILLERY ED., BANTIG DW. "Comparison of selective broth and plating methods for isolation of S. mutans from root surface dental plaques". *J. Clin. Microbiol.* 1980, 11: 205-208.
66. ELLEN RP., BANTING DW and FILLERY ED. "S. mutans and Lactobacillus detection in the assessment of dental root surface caries risk". *J. Dent. Res.* 1985, 64: 1245-1249.
67. EMILSON .G., BRATTHALL D. "Growth of S. mutans on various selective media". *J. Clin. Microbiol.* 1976, 4: 95-98.
68. FACKLAM. *Streptococci and aerococci.* p: 88-110. In: Lennette EH., Balows A., Hauster WJ., and Truant JP. *Manual of clinical microbiology.* 3^a ed. American Society for Microbiology. Washington, DC. 1980.
69. FEATHERSTONE J. "Fluoride and caries process". *J. Dent. Res.* 1990, 634-637.

70. FEJERSOV O., THYLSTUP A., LARSEN MJ. "Rational use fluorides in caries prevention". *Acta Odontol. Scand.* 1981, 39: 241-249.
71. FELGENHAUER B., TRAUTNER K. "A comparative study of extracellular glucanhydrolase and glucosyltransferase enzyme activities at five different serotypes of oral S. mutans". *Arch. Oral Biol.* 1982, 27: 455-461.
72. FIRESTONE AR. "Effect of increasing contact time of sucrose or powdered sucrose on plaque pH in vivo". *J Dent. Res.* 1982, 61: 1243-44.
73. FIRESTONE AR., SCHMID R., MUHLEMMANN HR. "Cariogenic effects of cooked wheat starch alone or with sucrose and frequency controlled feeding in rats". *Arch. Oral Biol.* 1982, 27: 759-763.
74. FIRESTONE AR., SCHMID R., MUHLEMMANN HR. "Effect of the length and number of intervals between meals on caries in rats". *Caries res.* 1984, 18: 128-133.
75. FLACKLAM RR. "Physiological differentiation of viridans Streptococci". *J. Clin. Microbiol.* 1977, 5: 184-201.
76. FREEDMAN ML., TANZER JM. "Dissociation of plaque formation from glucan induced agglutination in mutant of S. mutans". *Infect. Immun.* 1974, 10: 189-196.
77. FROSTELL G. "A colourimetric screening test for evaluation of the buffer capacity of saliva". *Swed. Dent. J.* 1980, 4: 81-86.
78. FURE S., ROMANIEC M., EMILSON CG. and KRASSE B. "Proportions of Streptococcus mutans, Lactobacilli and Actinomyces spp in root surface plaque". *Scand. J. Dent. Res.* 1987, 95: 119-23.

79. GEDDES DAM. "Acids produced by human dental plaque metabolism in situ". *Caries res.* 1975, 9: 98-109.
80. GEDDES DAM. and BOWDEN WH. "Fluoride in saliva and Dental Plaque". *J. Dent. Res.* 1990: 637.
81. GERHARDT, MURRAY, COSTILOW, NESTER, WOOD, KRIEG and PHILLIPS. "Manual of methods for general bacteriology". American Society for Microbiol. Washington. 1981.
82. GERMAINE G., TELLEFSON L. "The role of the cell membrane in pH-dependent fluoride inhibition of glucose uptake by S. mutans". *Antimicrob. Agents Chemother.* 1986, 29: 58-61.
83. GHIONE M., MIXELSPREGER G., PELIZZONI G., GLIOZZI T. "Influence of subinhibitory concentrations of antibiotics on aggregation and adherence of S. mutans". *The influence of antibiotics on the Host-Parasite. Relationship.* 2^aed. by D. Adam, H. Hahn, Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg 1985. 209-219.
84. GIBBONS RJ., and NYGAARD M. "Interbacterial aggregation of plaque bacteria". *Arch. Oral Biol.* 1970, 15: 1397-1400.
85. GIBBONS RJ., PAOLA PF., SPINELL DM., SKOBE Z. "Interdental localization of S. mutans as related to dental caries experience". *Infect. Immun.* 1974, 9: 481-488.
86. GIBBONS RJ., VAN HOUTE J. "Bacterial in oral microbial ecology". *Ann. Rev. Microbiol.* 1975, 29: 19-44.
87. GIBBONS RJ., VAN HOUTE J. "Bacterial adherence in oral microbial ecology".

Annu. Rev. Microbiol. 1975, 29: 19-44.

88. GIBBONS. *Dental Caries. Annu. Rev. Med.* 1975, 26: 121-136.

89. GOLD OG., JORDAN HV. and VAN HOUTE J. "A selective medium for *S. mutans*". *Arch. Oral Biol.* 1973, 18: 1357-1364.

90. GRAIG WA., GUDMUNDSSON S. "The postantibiotic effect". In: "Antibiotics in laboratory medicine" 2^a Ed. Eds: William and Wilkins. Baltimore, 1986, 515-536.

91. GRON P., CASLAVSKA V., TAMURA T., KENT R. "The caries inhibitory effect of repeated topical applications of NaF or NH₄F in rodents". *Caries res.* 1987, 21: 346-352.

92. GUGGENHEIM B. "Enzymatic hydrolysis and structure of water insoluble glucan produced by glucosyltransferases from a strain of *S. mutans*". *Helv. Odontol. Acta.* 1970, 14: 89-108.

93. HAMADA S., MASUDA N., KOTANI S. "Isolation and serotyping of *S. mutans* from teeth and feces of children". *J. Clin. Microbiol.* 1980, 11: 314-318.

94. HAMADA S., SLADE H. "Biology, immunology and cariogenicity of *S. mutans*." *Microbiol. Rev.* 1980, 44: 331-384.

95. HAMADA S., KOGA T., OOSHIMA T. "Virulence factors of *S. mutans* and dental caries prevention". *J. Dent. Res.* 1984, 63: 407-411.

96. HAMADA S., MICHAELEK SV., KIYONO H., MENAKER L., MCGHEE JR., eds. *Molecular microbiology and immunology of *S. mutans**. Amsterdam: Elsevier, 1986: 255-262.

97. HAMADA N., TAKERHARA T., SAEKI E. "Purification and characterization of a third glucosyltransferase from S. mutans serotype "g". *J. Gen. Microbiol.* 1987, 133: 1353-1358.

98. HAMILTON JR., ELLWOOD DC. "Effects of fluoride on carbohydrate metabolism by washed cells of S. mutans Ingbritt grown at various pH values in a chemostast". *Infect. Immun.* 1978, 19: 434-442.

99. HAMILTON IR., MARTIN EJS. "Evidence for the involvement of proton motive force in the transport of glucose by a mutant of S. mutans strain DROOO1 defective in glucose-phosphoenol-pyruvate phosphotransferase activity". *Infect. Immun.* 1982, 36: 567-575.

100. HAMILTON IR., BOWDEN GH. "Response of freshly isolated strains of S. mutans and S. mitior to change in pH in the presence and absence of fluoride during growth in continuous culture". *Infect. Immun.* 1982, 36: 255-262.

101. HAMILTON IR., BOYAR RM., BOWDEN GH. "Influence of pH and fluoride on properties of an oral strain of Lactobacillus casei grown in continuous culture". *Infect. Immun.* 1985, 48: 664-670.

102. HAMILTON IR. and BOWDEN GH. "Effect of fluoride on Oral Microorganism. In: *Fluoride in Dentistry*. J. Ekstrand, O. Fejerskov and L.M. Silverstone, Eds. Copenhagen: Munksgaard. 1988, pp: 77-103.

103. HAMILTON IR. " Biochemical effects of fluoride on Oral bacteria". *J. Dent. Res.* 1990, 69(Spec Iss): 660-667.

104. HARPER DS., OSBORN JC., HEFFERSEN JJ., CLAYTON R. " Cariostatic evaluation of cheeses with diverse physical and compositional characteristic". *Caries*

res. 1986, 20: 123-130.

105. HATTAB F. "Effect of topical application of alginate containing fluoride or fluoride and chlorhexidine on dental caries in rats". *Caries res.* 1984, 18: 367-374.

106. HAVENAAR R., HUIS IN'T VELD JHJ., BACKER DIRKS O., DE STOPPELAAR JD. "Some bacteriological aspects of sugar substitutes, in Guggenheim B(ed): *Health and sugar substitutes*. Karger, Baesl. 1979, pp: 192-198.

107. HAVENAAR R., HUIS IN'T VELD JH., DE STOPPELAAR JD., BAECKER DIRKS O. "A purified cariogenic diet for rats to test sugar substitutes with special emphasis on general health". 1983, 17: 340-352.

108. HAVENAAR R., DROST JS., DE STOPPELAAR JD., HUIS IN'T VELD JHJ., BACKER DIRKS O. "Potencial cariogenicity of Lycasin 80/55 in comparison to starch, sucrose, xylitol, sorbitol and L-sorbose in rats". *Caries Res.* 1984, 18: 375-384.

109. HUIZINGA ED., RUBEN J., ARENDS J. "Effect of an antimicrobial-containing varnish on root demineralisation in situ". *Caries res.* 1990, 24: 130-132.

110. IKEDA T., SANDHA HJ. "A high sucrose medium for the identification of S. mutans". *Arch. Oral Biol.* 1972, 17: 781-783.

111. IKEDA T., SANDHAM HJ. "A medium for the recognition and enumeration of S. mutans". *Arch. Oral Biol.*, 1972, 27: 279-281.

112. IKEDA T., OCHIAI K., SHIOTA T. "Taxonomy of the oral S. mutans based on colonial characteristics and serological, biochemical and ganetic features". *Arch. Oral Biol.* 1979, 24: 863-867.

113. ISOKANGAS P., ALANEN P., TICKSO J., et al. "Xylitol chewing gum in caries prevention. A field study in children at caries-active ages". *J. Am. Dent. Assoc.* 1988, 117: 315-320.
114. IZAGUIRRE-FDEZ EJ., EISENBERG AD., CURZON MEJ. "Interactions of zinc with fluoride on growth, glycolysis and survival of S. mutans GS-5. *Caries Res* 1989, 23: 18-25.
115. JENSEN ME., POLANSKY PJ., SCHACHTELE CF. "Plaque sampling and telemetry for monitoring acid production on bucal tooth surfaces ". *Arch. Oral Biol.* 1982, 27: 24-34.
116. JENSEN B. and BRATTHALL D. "A new method for the estimation of Mutans Streptococci in human saliva". *J. Dental Res.* 1989, 68, 3: 468-471.
117. JONG MH., VAN DEN KIEBOOM CWA., LUKASSEN JAM. and VAN DER HOEVEN JS. "Effects of dietary carbohydrates on the numbers of Streptococcus mutans and Actinomyces viscosus in dental plaque of mono-infected gnotobiotic rats". *J. Dent. Res.* 1985, 64(9): 1134-1137.
118. JORDAN HV. "Cultural methods for the identification and quantitation of Streptococcus mutans and Lactobacilli in oral samples". *Oral Microbiol Immun.* 1986, 1: 23-27.
119. JORDAN HV., LARAWAY R., SNIRCH R. and MARMEL M. "A simplified diagnostic system for cultural detecation and enumeration of Streptococcus mutans". *J. Dent. Res.* 1987, 66 (1): 57-61.
120. KALFAS S., MAI Y., BIRHED D., EDWARSSON S. "Effect of pH on acid production from Sorbitol in washed cell suspensions of oral bacteria". *Caries Res.*

1990, 24: 107-112.

121. KASHKET S., YASKELL T. and LOPEZ LR. "Prevention of sucrose induced demineralization of tooth enamel by chewing sorbitol gum". *J. Dental Res.* 1989, 68 (3): 460-62.

122. KATZ S., Mc DONALD J., STOOKEY G. "Odontología preventiva en acción". 3ª edic. Buenos Aires, edit. Panamericana 1982: 179-194.

123. KAY H.M., WILSON M. "The in vitro effects of amine fluorides on plaque bacteria". *J. of Periodontology.* 1988, 59: 266-9.

124. KEYES PD. "Dental caries in the molar teeth of rats. I. Distribution of lesions induced by high-carbohydrate low-fat diets". *J. Dent. Res.* 1958, 37: 1077-1087.

125. KEYES PH. " The infections and transmissible nature of experimental dental caries". *Arch. Oral Biol.* 1960, 1: 304-320.

126. KEYES PH. " Recent advances in dental caries research. Bacteriological findings and biological implications". *Int. Dent. J.* 1962, 12: 443.

127. KEYES PH. " Periodontal lesions in the syrian hamster. III. Findings related to ann infections and transmissible component". *Arch. Oral Biol.* 1964, 9: 337-400.

128. KIRKEGAARD E., PETERSEN G., PAULSEN S., HOLM SA. "Caries preventive effect of Duraphat varnish applications versus fluoride mouthrinses: 5-year data". *Caries res.* 1986, 20: 548-555.

129. KLOCK B., KRASSE B. " A comparison between different methods for prediction of caries activity". *Scand. J. Dent. Res.* 1979, 87: 129-139.

130. KOCK G. and PETERSSON LG. "Fluoride content of enamel surface treated with a varnish containing sodium fluoride". *Odont. Revy.* 1972, 23: 437-445.
131. KOCK K., PETERSSON LG. "Caries preventive effect of a fluoride containing varnish (Duraphat) after 1 year's study". *Community Dent. Oral Epidemiol.* 1975, 3: 262-266.
132. KOHLER B., PATERSSON BM., BRATTHALL D. "S. mutans in plaque and saliva and development of caries". *Scand. J. Dent. Res.* 1981, 89:19-25.
133. KOHLER B. and EMILSON CG. "Comparison between a micromethod and a conventional method for estimation of salivary Streptococcus mutans". *Scand. J. Dent. Res.* 1987, 95: 132-5.
134. KOLENBRANDER PE., INOUYE Y., HOLDEMAN LV. "New Actinomyces and Streptococcus coaggregation groups among human oral isolates from the same site". *Infect. Immun.* 1983, 41: 501-506.
135. KOLENBRANDER PE., ANDERSEN RN., HOLDEMAN LV. "Coaggregation of oral Bacteroides spp with other bacteria, central role in coaggregation bridges and competitions". *Infect. Immun.* 1985, 48: 741-746.
136. KOLENBRANDER PE., and ANDERSEN RS. "Multigeneric aggregations among oral bacteria: a network of independent cell-to-cell interactions". *J. Bacteriol.* 1986, 168: 851-859.
137. KONIG KG., SCHMID P. "An apparatus for frequency controlled feeding of small rodents and its use in dental caries experiments" *Arch. Oral biol.* 1968, 13: 13-26.

138. KORTELAINE S. and LARMAS M. "Effects of low and high fluoride levels on rat dental caries and simultaneous dentine apposition". *Arch. Oral Biol.* 1990, 3: 229-234.
139. KOZAI K., MIYAKE Y., KOHDA H., KAMETAKA S., YAMASAKI K., SUGINAKA H. "Inhibition of glucosyltransferase from S. mutans by oleanolic acid and ursolic acid". *Caries Res.* 1987, 21: 104-108.
140. KRASSE B. "Human Streptococci and experimental caries in hamster". *Arch. Oral Biol.* 1966, 11: 429-436.
141. KRISTOFFERSSON K., BIRKHED D. "Effects of partial sugar restriction for 6 weeks on numbers of S. mutans in saliva and interdental plaque in man". *Caries Res.* 1987, 21: 79-86.
142. KRZEMINSKI. "A review of methods of isolation and identification of S. mutans from dental plaque". *Czas. Stomat.* 1976,20: 301-380.
143. KUMADA H., UMEMOTO T., ONISI M., TSUMORI M., SHIMAMURA A. and MUKASA H. "Purification and characterization of extracellular glucosyltransferase from S. mutans serotype b (subspecies *rattus*). *J. Gen. Microbiol.* 1987, 133: 1435-1441.
144. KURAMITSU HK. "Characterization of invertase activity from cariogenic S. mutans". *J. Bacteriol.* 1973, 20: 406-418.
145. KURAMITSU HK. "Characterization of extracellular glucosyltransferase activity of S. mutans". *Infect. Immun.* 1975, 12: 738-749.
146. LENNETTE EH., BALLOWS A., WILLIAM J., HAUSLER JR., SHADOMYH.

Manual de microbiología clínica. 4ª edic. American Society for Microbiology. Washington. 1985.

147. LINDQUIST B., EMILSON CG., WENNERHOLM K. "Relationship between *mutans streptococci* in saliva and their colonization of the tooth surfaces". *Oral Microbiol. Immun.* 1989, 4: 71-76.

148. LINKE HAB. "New medium for the isolation of *S. mutans* and its differentiation from other oral Streptococci". *J. Clin. Microbiol.* 1977, 5: 604-609.

149. LITTLE WA. "Comparative recovery of *S. mutans* in ten isolation media". *J. Clin. Microb.* 1977, 5: 578-583.

150. LOESCHE W. and SYED SA. "The predominant cultivable flora of carious plaque and carious dentine". *Caries Res.* 1973, 7: 201-206.

151. LOESCHE WJ., ROWAN J., STRAFFON LH., LOOS PJ. "Association of S. mutans with human dental decay". *Infect. Immun.* 1975, 11: 1252-1260.

152. LOESCHE WJ., STRAFFON LH. "Longitudinal investigation of the role of S. mutans in human fissure decay". *Infect. Immun.* 1979, 26: 498-507.

153. LOESCHE WJ., EARNEST R., GROSSMAN NS., CORPRON R. "The effect of chewing xylitol gum on the plaque and saliva levels of S. mutans". *JADA* 1984, 108: 587-92.

154. LOESCHE WJ. "Role of Streptococcus mutans in human dental decay" *Microbil. Rev.* 1986, 353-380.

155. LORMEE P., WEILL R., SEPTIER D. "Morphological and histochemical

- aspects of carious dentine in Osborne-Mendel rats". *Caries res.* 1986, 20: 251-262.
156. LUOMA H., SEPPA L., SPETS-HAPPONEN S., TULLA M., PELKONEN K. "Early penetration of Streptococcus mutans into fissure enamel of gnotobiotic rats". *Oral Microbiol. Immunol.* 1987, 2: 30-34.
157. MACFARLANE TW. "Plaque-related infections". *J. Med. Microbiol.* 1989, 29: 161-170.
158. MAKINEN KK., ISOKANGAS P. "Relationship between carbohydrates sweeteners and oral diseases". *Prog. Food Nutr. Sci.* 1988, 12: 73-109.
159. MANSSON-RAHEMTULLA B., BALDONE DC., PRUIT KM. "Effect of variations in pH and hypothiocyanite concentrations on S. mutans glucose metabolism". *J. Dent. Res.* 1987, 66:486-491.
160. MARGOLIS HC. and MORENO EC. "Physicochemical perspectives on the cariostatic mechanisms of systemic and topical fluorides". *J. Dent. Res.* 1990, 69 (Spec Iss): 606-613.
161. MARKHAM JL., KNOX KW., WICKEN AJ., HEWETT MJ. "Formation of extracellular lipoteichoic acid by oral Streptococci and Lactobacilli". *Infect. Immun.* 1975, 12: 378-386.
162. MARQUIS RE. "Disminuished acid tolerance of plaque bacteria caused by fluoride". *J. Dent. Res.* 1990, 69(Spec Iss): 672-675.
163. MARSH PD., MARTIN M. *Oral Microbiology*. 2^a edic. Washington, D.C., ed. by Amer. Soc. Microb. 1984.

164. MARSH PD. and BRADSHAW DJ. "The effect of fluoride on the stability of Oral Bacterial Communities in vitro". *J. Dent. Res.* 1990, 69 (Spec. Iss.): 668-671.

165. MARTHALER TM. "Changes in the prevalence of Dental Caries: How much can be attributed to changes in diet?". *Caries Res.* 1989, 9-11: 2

166. MATEE MI., MIKS FHM., FRENCKEN JEFN., TRUIN GJ., RUIKEN HM. "Selection of a micromethod and its use in the estimation of salivary Streptococcus mutans and Lactobacillus counts in relation to dental caries in Tanzanian children". *Caries Res* 1985, 497-506.

167. McBRIDE BC, and VAN DER HOEVEN JS. "Role of interbacterial adherence in colonization of the oral cavities of gnotobiotic rats infected with S. mutans and Veillonella alcalescens". *Infect. Immun.* 1981; 33: 467-472.

168. McCLURE FF., HEWITT WL. "The relation of penicillin to induced dental caries and oral Lactobacillus acidophilus." *J. Dent. Res.* 1946, 441-443.

169. McGHEE JR., MICHALEK SM., CASSELL GH. *Dental Microbiology*. Philadelphia, edt. Harper and Row. 1982.

170. MENAKER L., NAVIA JM. " Effect of undernutrition during the perinatal period on caries development in the rat". *J. Dental res.* 1974, 53: 592-597.

171. MICHALEK SM., McGHEE JR., NAVIA JM. "Virulence of Streptococcus mutans. A sensitive method for evaluating cariogenicity in young gnotobiotic rats". *Infect. Immun.* 1975, 12: 69-75.

172. MIKX FH., VAN DER HOEVEN JS. "Symbiosis of Streptococcus mutans and Veillonella alcalescens in mixed continuous cultures". *Arch. Oral Biol.* 1975, 20:

407-410.

173. MILNES AR., BOWDEN GH., HAMILTON IR. "Effect of NaF and pH on the growth and glycolytic rate of recently isolated strains of oral Lactobacillus species". *J. Dent. Res.* 1985, 64: 401-404.

174. MINAH GE., LOESCHE WJ. "Sucrose metabolism in resting cell suspensions of caries associated and non-caries associated dental plaque". *Infect. Immun.* 1977, 17: 43-54.

175. MODEER T., TWETMAN S. and BERGSTRAND F. "Three-year of effect of fluoride varnish (Duraphat) on proximal caries progression in teenagers". *Scand. J. Dent. Res.* 1984, 92: 400-7.

176. MUKASA H., SLADE HD. "Mechanism of adherence of Streptococcus mutans to smooth surfaces. III Purification and properties of the enzyme complex responsible for adherence". *Infect. Immun.* 1974, 10: 1135-1145.

177. MUNDORFF SA., CURZON MEJ., EISEMBERG AD. "Comparison of essential nutrient supplement effects on rat growth and dental caries". *Caries Res.* 1984, 18: 527-535.

178. MURRAY RGE. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 10^a edic. Vol. 2, Baltimore, ed. Williams and Wilkins. 1990. 10055-1061.

179. NAVIA JM., LOPEZ H. "Rats caries assay of reference foods and sugar-containing sancks". *J. Dental res.* 1983, 62: 893-898.

180. NEWBRUN E. "Frequent sugar intake then and now: interpretation of the main results". *Scand. J. Dent. Res.* 1989, 97: 103-9.

181. NIKIFORUK G. *Caries Dental. Aspectos básicos y clínicos. 1ª edic., Buenos Aires, edt. Mundi. 1986.*
182. NIVEN CF., SMILEY KL., SHERMAN JM. "The hydrolisis of arginine by Streptococci". *J. Bact.* 1942, 43: 651-660.
183. NIZEL DE. *Nutrition in preventive dentistry. WB Saunders. Filadelfia. 1981.*
184. NOLTE WA. *Microbiologia odontológica. 4ª edic. Mexico, edt. Interamericana. 1986.*
185. NOORDA WD., VAN MONTFORT AMAP., PURDELL-LEWIS DJ., WEEKAMP AH. "Developmental and metabolic aspects of a monobacterial plaque of Streptococcus mutans C 67-1 grown on human enamel slabs in an artificial mouth model". *Caries res.* 1986, 20: 300-314.
186. ÖGAARD B., RÖLLA G and HELGELAND K. " Fluoride retention in sound and demineralized enamel in vivo after treatment with a fluoride varnish (Duraphat)". *Scand. J. Dent. Res.* 1984, 92:190-7.
187. ÖGAARD B., ARENDS J., RÖLLA G. " Action of fluoride on iniciation of early root surface caries in vivo". *Caries res.* 1990, 24: 142-144.
188. OKUDA K., FROSTELL G. "Effect of invert sugar on accumulation of Streptococcus mutans E 49 on the teeth of rats". *Caries res.* 1981, 15: 515-518.
189. OLDERSHAW WD., EISNBERG AD., CURZON MEJ. "A biochemical micromethod to characteriza Streptococcus mutans". *Caries res.* 1982, 16: 96-102.
190. PERCH B., KJEMS E., RAUN T. " Biochemical and serological proprieties of

S. mutans from various human and animal source". *Acta Path. Microbiol. Scand. Sec. B.* 1974, 82: 357-370.

191. PENDRYS DG. and STAMM JW. "Relationship of total fluoride intake to beneficial effects and enamel fluorosis". *J. Dent. Res.* 1990, 69 (Spec Iss): 529-538.

192. PIHLANTO-LEPPÄLÄ A., SÖDERLING E., MÄKINEN KK. "Expulsion mechanism of xylitol-5-phosphate in *S. mutans*". *Scand. J. Dental Res.* 1990, 98 (2): 112-120.

193. REYNOLDS RC., DEL RIO A. "Effect of casein and whey-protein solutions on caries experience and feeling patterns of the rat". *Arch. Oral biol.* 1984, 29: 927-933.

194. REYNOLDS RC., BLACK CL. "Confectionary composition and rat caries". *Caries res.* 1987, 21: 538-545.

195. RODRIGUEZ G. "Informe sobre el flúor". *Rev. Europea de Odontostomatología.* 1989, 1 (1): 53-60.

196. ROGERS AH. "The source of infection in the intrafamilial transfer of *Streptococcus mutans*". *Caries res.* 1981, 15: 26-31.

197. ROGOSA M., MITCHELL JA. and WISEMAN RF. "A selective medium for isolation and enumeration of oral *Lactobacilli*". *J. Dent. Res.* 1951, 30: 682-689.

198. ROLLA G. "On the role of calcium fluoride in the cariostatic mechanism of fluoride". *Acta Odontol. Scand.* 1988, 46: 341-345.

199. ROLLA G. "Why is sucrose so cariogenic ?. The role of glucosyltransferase and

polysaccharides". *Scand. J. Dent. Res.* 1989, 97: 115-9.

200. SAXEGAARD E. and ROLLA G. "Fluoride acquisition on and in human enamel during topical application in vitro". *Scand. J. Dent. Res.* 1988, 96: 523-35.

201. SCHACHTELE CF., GERMAINE GR., HARLANDER SK. "Production of elevated levels of dextran sucrose by a mutant of Streptococcus mutans". *Infect. Immun.* 1975, 12: 934-937.

202. SCHACHTELE CF., HARLANDER SK. "Will diets of the future be less cariogenic" *J. Can. Dent. Ass.* 1984, 50: 213-219.

203. SCHAEKEN MJM., VAN DER HOEVEN JS., FRANKEN HCM. "Comparative recovery of Streptococcus mutans on five isolation media including a new simple selective medium". *J. Dent. Res.* 1986, 65: 906-908.

204. SHERSLTHA BM., KREWTLER PA. "A comparative rat caries study on cariogenicity of foods using the intubation and gel methods". *Abstratc.* 1983, 318. IARD. Australia.

205. SCHMIDT HFM. "Aplicación de un barniz de flúor como aspecto parcial de la profilaxis dental". *Quintessence.* 1990, 3 (1): 3-8.

206. SEPPÄ L., FORSS H., SORMUNEN P. "Prevention of rat fissure caries by sodium fluoride varnish (Duraphat) with different fluoride concentrations". *Caries res.* 1989, 23: 365-367.

207. SEPPÄ L., LUOMA H., FORSS H., SPETS-HAPPONEN S., MARKKANEN S., PELKONEN K. "Invasion of S. mutans and Lactobacillus salivarius in early caries lesions of gnotobiotic rats". *Caries res.* 1989. 23: 365-367.

208. SEPPÄ L., TOLONEN T. "Caries preventive effect of fluoride varnish applications performed two or four times a year". *Scand. J. Dental Res.* 1990, 98 (2): 102-106.
209. SHAH HN., COLLINS DM. "Proposal for reclassification of Bacteroides asaccharolyticus, Bacteroides gingivalis and Bacteroides endodontalis in a new genus: Phorphyromonas". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1988, 38: 128-131.
210. SHAH HN., COLLINS DM. "Prevotella, a new genus to include Bacteroides melaninogenicus and related species formerly classified in the genus Bacteroides". *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1990, 40: 205-8.
211. SHIMURA N, and ONISI M. "The effect of NaF on the bacterial production of polysaccharide and subsequent adsorption on hydroxyapatite". *J. Dent. Res.* 1978, 57: 928-931.
212. SHKLAIR I. "Distribution and frequency of S. mutans in caries-active individuals". *J. Dent. Res.* 1972, 51: 882.
213. SLEE AM., TANZER JM. " Phosphoenolpyruvate-dependent sucrose phosphotransferase activity in S. mutans NCTC 1044". *Infect. Immun.* 1979, 24: 821.
214. SÖDERLING E., ALARAIANEN L., SCHEININA., MAKINEN KK. "Effect of xylitol and sorbitol on polisaccharide production by and adhesive properties of Streptococcus mutans". *Caries res.* 1987, 21: 109-116.
215. SÖDERLING E., MAKINEN KK., CHEN C-Y., PAPE Jr HR., LOESCHE W., MAKINEN P-L. "Effect of sorbitol, xylitol and xylitol/sorbitol chewing gums on dental plaque". *Caries res.* 1989, 23: 378-384.

216. SÖDERLING E. and PIHLANTO-LEPPALAA. "Uptake and expulsion of C-xylitol by xylitol-cultured S. mutans ATCC 25175 "in vitro". *Scand. J. Dent. Res.* 1989, 97: 511-9.
217. SÖDERLING E., ISOKANGAS P., TENOVUO J., MUSTAKALLIO S., MAKINEN KK. "Long-term xylitol consumption and mutans streptococci in plaque and saliva". *Caries res.* 1991. 25, 2: 153-157.
218. SOET JJ., TOORS FA., GRAAF J. "Acidogenesis by Oral Streptococci at different pH values". *Caries res.* 1989, 23: 14-17.
219. SPULLER RL., BEIRAGHI S., ROSE S., BEC FM. "The effect of low levels of sodium fluoride in drinking water on the incidence of dental caries in rat". *Caries Res.* 1986, 20: 556-558.
220. STAAT RH. "Inhibition of S. mutans strains by different Mitis salivarius agar preparations". *J. Clin. Microbiol.* 1976, 3 : 378-380.
221. STECKSEN-BLICKS C. "Salivary counts of Lactobacilli and S. mutans in caries prediction". *Scand. J. Dent. Res.* 1985, 93: 204-12.
222. STEPHAN RM. "Changes in hydrogen ion concentration on tooth surfaces and on carious lesions". *J. Am. Dent. Assoc.* 1940, 27: 718-723.
223. STRECKFUSS JL., PERKINS D., HORTON IM., BROWN LR., DREIZEN S. and GRAVES L. "Fluoride resistance and adherence of selected strains of S. mutans to smooth surfaces after exposure to fluoride". *J. Dent. Res.* 1980, 59: 151-158.
224. SVANBERG M., KRASSE B. "Comparative recovery of mutans streptococci on two selective media". *Caries. Res.* 1990, 24: 36-38.

225. TAKADA K., FUKUSHIMA K. "Effects of certain salts on glucosyltransferase synthesis by Streptococcus mutans strain PS-14". *J. Dent. Res.* 1986, 65: 452-455.

226. TANZER JM., FREEDMAN ML., FIRZGERAL RJ., LARSON RH. "Disminuished virulence of glucan synthesis defective mutants of Streptococcus mutans". *Infect. Immun.* 1974, 10: 197-203.

227. TANZER JM. "Altered virulence of mutants of S. mutans defective in polysaccharide synthesis". *Infect. Immun.* 1974, 10: 197-203.

228. TANZER JM. "Essential dependence of smooth surface caries on and augmentation of fissure caries by sucrose and Streptococcus mutans infection". *Infect. Immun.* 1979, 25: 526-531.

229. TANZER JM., BORJESSON AC., LASKOWKI L., KURASZ AB., TESTA M. "Glucose-sucrose-potassium-tellurite-bacitracin agar, an alternative to *Mitis salivarius* bacitracin agar for enumeration of Streptococcus mutans". *J. Clin. Microbiol.* 1984, 20: 653-659.

230. TATEVOSSIAN A. "Fluoride in dental plaque and its effects". *J. Dent. Res.* 1990, 69 (Spec Iss): 645-652.

231. TAVES DR. "New approach to the treatment of bone disease with fluoride". *Ed. Proc.* 1970, 29: 1185-87.

232. THOMAS JL., PERA KA., SMITH KW., CHWANG AK. "Inhibition of Streptococcus mutans by the lactoperoxidase antimicrobial system". *Infect. Immun.* 1983, 39: 767-778.

233. TRAHAN L., BAREIL M., GAUTHIER L., VADEBONCOEUR C. "Transport

and phosphorylation of xylitol by a fructose phosphotransferase system in *S. mutans*". *Caries res.* 1985 ,19: 53-63.

234. TREASURE P. "Effect of fluoride, lithium and strontium on extracellular polysaccharide production by *S. mutans* and *Actinomyces viscosus*". *J. Dent. Res.* 1981, 60: 1601-1610.

235. TSUMORI H., SHIMAMURA A. and MUKASA H. "Comparative study of *S. mutans* extracellular glucosyltransferases by isoelectric focusing". *J. Gen. Microbiol.* 1983, 129: 3261-3262.

236. TVEIT AB. "Fluoride uptake by enamel surface, root surfaces and cavity walls following application of a fluoride varnish in vitro". *Caries res.* 1980, 14: 315-323.

237. VADEBONCOEUR C., TRAHAN L., MOUTON C., MAYRAND D. "Effect of xylitol on the growth and glycolysis of acidogenic oral bacteria". *J. Dent. Res.* 1983, 62: 882-4.

238. VADEBONCOEUR C., TRAHAN L., MOUTON C., et al. "Effect of xylitol on the growth and glycolysis of acidogenic oral bacteria". *J. Dent. Res.* 1984, 63: 246.

239. VAN DER HOEVEN JS. "Carbohydrate metabolism of *Streptococcus mutans* in dental plaque in gnotobiotic rats". *Arch. Oral Biol.* 1976, 21: 431-433.

240. VAN DER HOEVEN JS., TOOROP AI., MIKX FHM. "Symbiotic relationship of *Veillonella alcalescens* and *S. mutans* in dental plaque in gnotobiotic rats". *Caries res.* 1978, 12: 142-148.

241. VAN HOUTE J. GIBBONS RJ. and PULKINEN AJ. "Ecology of oral *Lactobacilli*". *Infect. Immun.* 1972, 6: 723-729.

242. VAN HOUTE J., RUSSO J. and PROSTAK KS. "Increased pH-lowering ability of S. mutans cell masses associated with extracellular glucan-rich matrix material and the mechanisms involved". *J. Dental res.* 1989, 68 (3): 451-460.
243. VAN LOVEREN C., LAMMENS AJ., TEN CATE JM. "In vitro induced fluoride resistance of S. mutans and dental caries in rats". *Caries res.* 1989, 23: 358-364.
244. VAN LOVEREN C. "The antimicrobial action of fluoride and its role in caries inhibition". *J. Dent. Res.* 1990, 69 (Spec Iss): 676-681.
245. VAN PALENSTEIN HELDERMAN WH., IJSSELDIJK M., HUIS IN'T VELD IHJ. "A selective medium for two major subgroups of the bacterium S. mutans isolated from human plaques and saliva". *Arch. Oral Biol.* 1983, 28: 599-603.
246. VAN WINKELHOFF AJ., VAN STEENBERGEN TJM., DE GRAAFF J. "The role of oral Bacteroides in mixed infections. Antoine Van Leeuwenhoek". 1983, 49: 606-611.
247. WALER SH., ROLLA G. "Effect of xylitol on dental plaque in vivo during carbohydrate challenge". *Scand. J. Dent. Res.* 1983, 91: 256-9.
248. WEFEL JS. "Effects of fluoride on caries development and progression using intra-oral models". *J. Dent. Res.* 1990, 69 (Spec Iss): 626-633.
249. WEINBERGER SJ., WRIGHT GZ. "Correlation S. mutans with dental caries in young children using a clinically applicable microbiological method". *Caries res.* 1989, 23: 385-388.
250. WENNERHOLM K., EMILSON CG. "Effect of a sorbitol and xylitol containing chewing gum on salivary microflora, saliva and oral sugar clearance". *Scand. J.*

Dent. Res. 1989, 97 (3): 257.

251. WESTERGREN G. and KRASSE B. "Evaluation of a micromethod for determination of S. mutans and Lactobacillus infection". *J. Clin. Microbiol.* 1978, 7 (1): 82-83.

252. WHITFORD GM. "The physiological and toxicological characteristics of fluoride". *J. Dent. Res.* 1990, 69 (Spec Iss): 539-549.

253. WHITFORD GM. and EKSTRAND J. "Metabolism of fluoride". *J. Dent. Res.* 1990, 69 (Spec Iss): 556-558.

254. WOLTJES J., LEGDEUR-VELTHUIS H., EGGINK CO., GRAFF J. "Beta hemolysis and pigment production by oral bacterium S. mutans". *Arch. Oral Biol.* 1982, 27: 279-281.

255. WORLD HEALTH ORGANIZATION: *Oral Health Surveys. Basic. Methods.* 2th ed. Geneva. 1977.

256. YAMADA T., IGARASHI K. and MITSUTOMI T. "Evaluation of cariogenicity of glycosylsucrose by a new method to measure pH under human dental plaque in situ". *J. Dent. Res.* 1980, 59: 2157-2162.

257. YAMAMOTO H., MATSUKUBO T., MAKI Y., TAKAESU H. "Effect of fluoride on glucose metabolism of S. mutans in Chemostat". *IADR/AADR Abstracts* 1985. n° 672.

258. YAMAMOTO H., SHINTANI Y., MAKI Y., MATSUKUBA T. and TAKAESU Y. "Evaluation of acidogenicity of various sugars and sugar substitutes using resting cell suspensions of S. mutans". *Bull. Tokyo dent. Coll.* 1988, 29 (4): 175-180.

259. ZICKERT I., EMILSON CG. and KRASSE B. "Correlation of level and duration of *Streptococcus mutans* infection with incidence of dental caries". *Infect. Immun.* 1983, 982-985.