

# Enfermedades asociadas a biofilm supragingival: Caries

Prof. M. Leyla Gómez C.  
9-10 Agosto de 2010

El biofilm microbiano de las superficies orales establece un equilibrio dinámico con las defensas del hospedero, compatible con la mantención de la integridad de los tejidos.

Enfermedades ocurren cuando la composición y las actividades metabólicas de las comunidades del biofilm son perturbadas.

Esos cambios ecológicos en el biofilm oral resultan en un aumento en la proporción de microorganismos patógenos, que poseen determinantes estructurales y enzimáticos más virulentos que los de microorganismos asociados a salud.

La caries es una enfermedad asociada a biofilm supragingival, este se ubica desde el margen gingival hacia la corona dental.

La caries es producida por la acción de bacterias acidogénicas y acidúricas, las cuales degradan hidratos de carbono de la dieta y producen ácidos como resultado de su metabolismo.

La cariogenicidad del biofilm aumenta con :  
la retención de los nutrientes bacterianos  
la mayor permanencia de los ácidos orgánicos.

La estructura de biofilm permite que estos ácidos  
estén mayor tiempo en contacto con la superficie  
dental, provocando el proceso de desmineralización.

# Caries

Azúcar fermentable + biofilm cariogénico



Ácidos orgánicos, disminución del pH

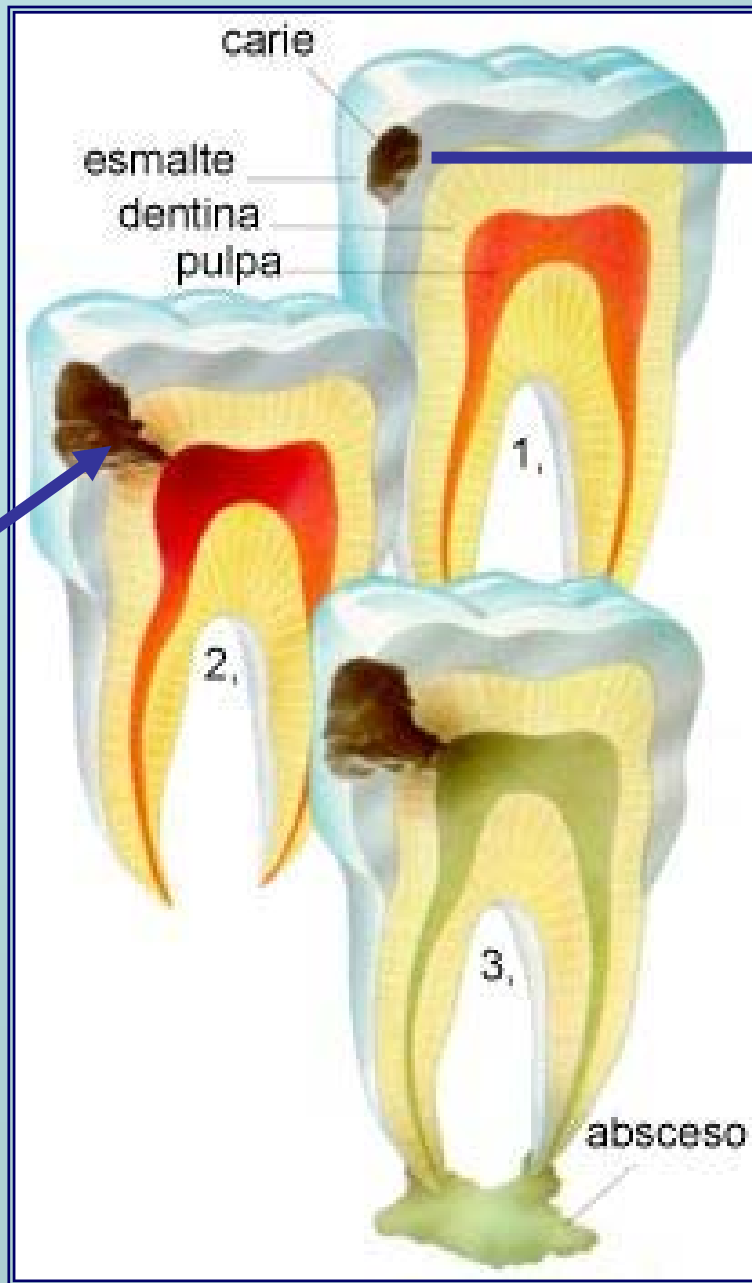


Hidroxiapatita + (H<sup>+</sup>) → Ca<sup>++</sup> + Po<sup>-4</sup>

(pH crítico 5.2-5.5)

# Caries





Caries de  
esmalte

Caries  
de  
dentina



Superficies que pueden ser colonizadas por biofilm supragingival

Puntos y fisuras de superficies oclusales.

Restauraciones y coronas artificiales.

Aparatos ortodónticos removibles.

Dentaduras removibles.

# Caries

"Caries dentaria es una enfermedad infecciosa, crónica, bacteriana, transmisible, que afecta a los tejidos duros del diente y está determinada por múltiples factores."

El origen infeccioso y transmisible de la caries fue comprobado por primera vez por Fitzgerald y Keyes en estudios realizados en hamsters en 1960.



2 grupos de hámster criados en jaulas separadas  
Un grupo recibió dieta rica en sacarosa y desarrolló  
caries.

Al juntar hámster sin caries con hámster con  
caries, los primeros desarrollaron la enfermedad

Penicilina bloqueó la transmisión de la enfermedad  
e inhibió la progresión de la lesión.

La transferencia de heces desde hámster con caries  
a la jaula o a la cavidad bucal de hámster sin caries  
transmite la enfermedad.

La transferencia de placa dental de hámster con caries a cavidad bucal de hámster sin caries transmite la enfermedad

Penicilina bloqueó la transmisión de la enfermedad.

Cultivos puros de un peculiar *Streptococci* aislado desde heces y de placa dental de hámster con caries fueron inoculados en la cavidad bucal de hamsters libres de esa bacteria, la enfermedad se transmite.

Progenie de hamsters con y sin caries se comportó de igual forma que sus padres en relación a la enfermedad.

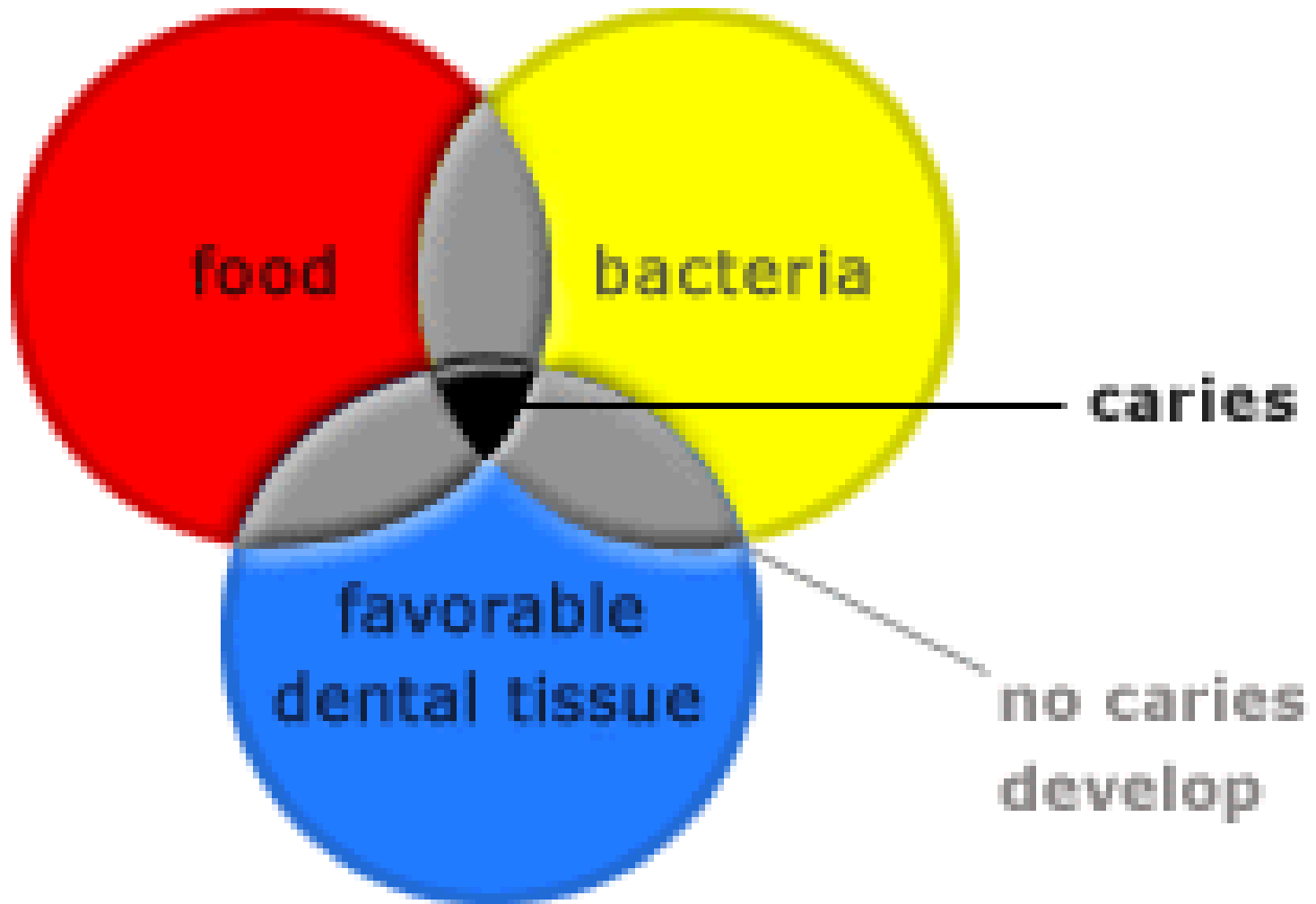
Administración de Penicilina bloqueó la transmisión de la enfermedad entre generaciones.

Hámster nacidos por cesárea con técnicas asépticas fueron amamantados de forma cruzada con madres del grupo opuesto, originando caries en las crías de las hámster sin caries y viceversa.

El tratamiento con antibiótico sugirió que la enfermedad era causada por bacterias y además Gram positivas.

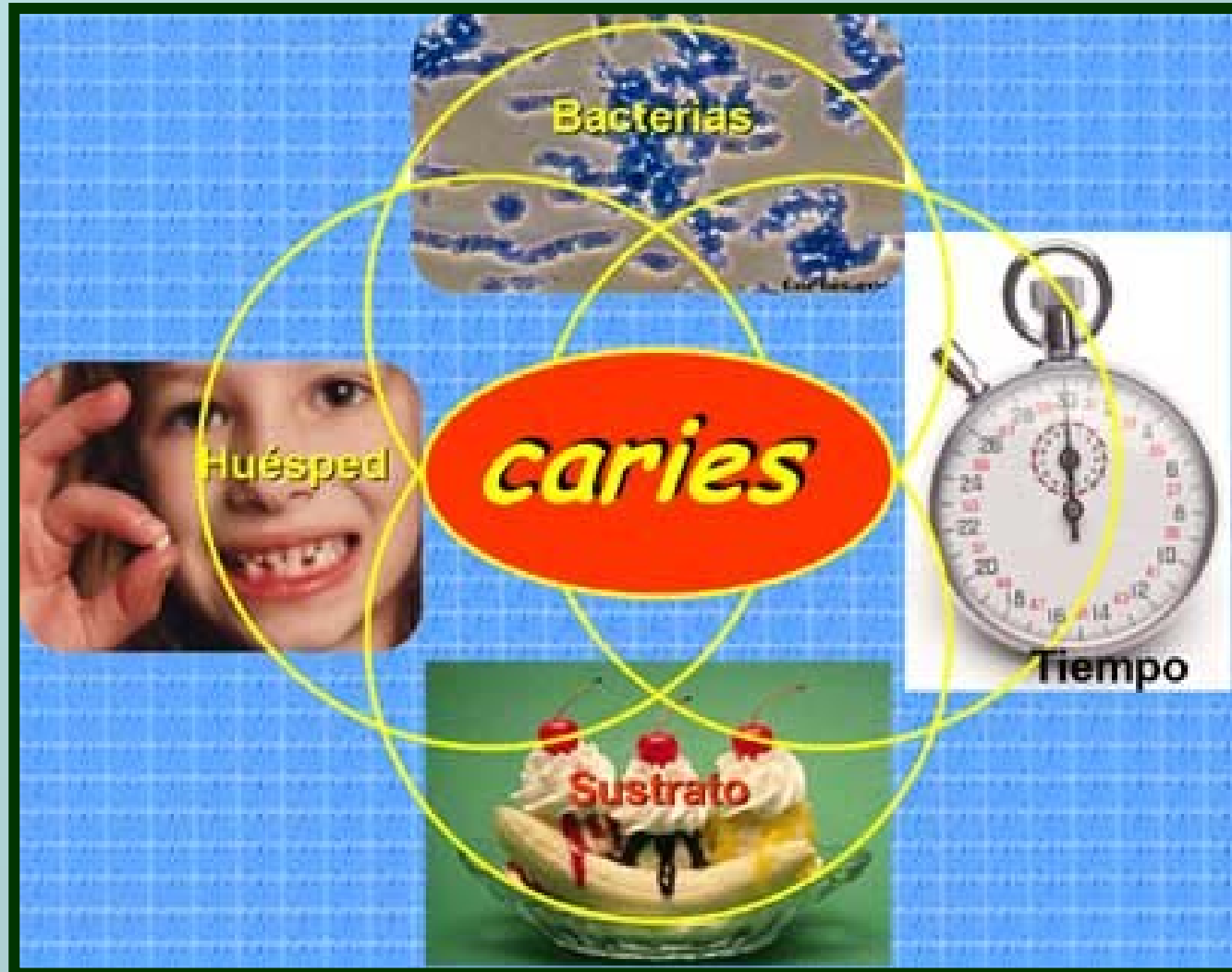
El peculiar *Streptococci* que inducía caries en hámster alimentados con sacarosa no correspondía a ninguna especie de *Streptococci* aceptada por guías taxonómicas.

# Triáda de Keyes:1960

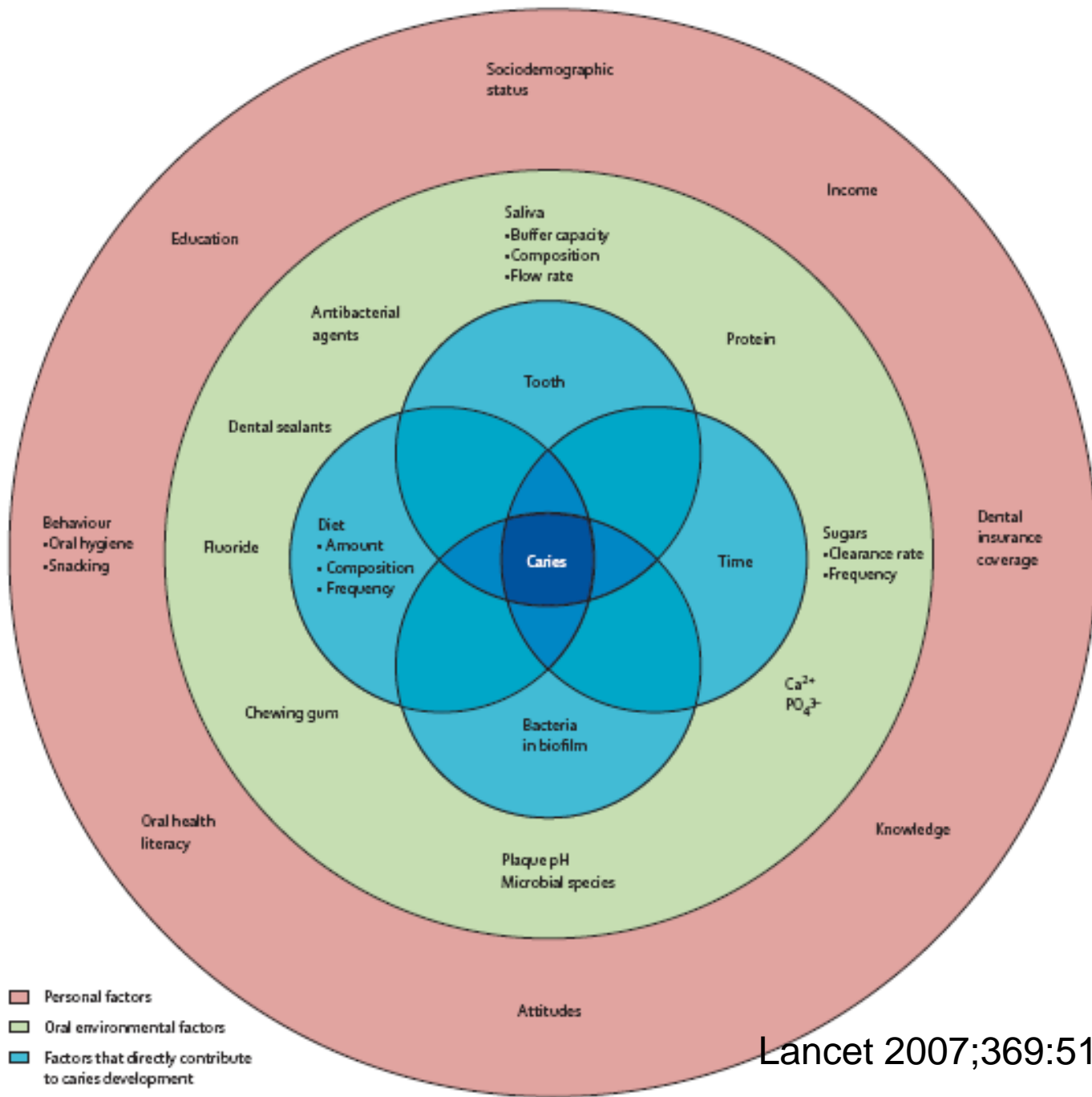




# Tríada de Keyes modificada por Konig:1987



Fejerskov:1990,un amplio grupo de factores biológicos, socio-económicos y culturales interactúan directa o indirectamente en el establecimiento de microorganismos cariogénicos incluidos en la comunidad microbiana de la biopelícula dental.



# Dieta

La dieta es un factor trascendental en la generación de la enfermedad.

Los microorganismos cariogénicos requieren nutrientes necesarios para su metabolismo.

Existe una fuerte asociación entre hidratos de carbono fermentables y el proceso de caries.

La exposición frecuente a H.de fermentables está relacionado con un cambio en el biofilm dental, seleccionando bacterias acidogénicas y acidúricas.

La sacarosa es considerada el H.de C. más cariogénico,entre los diferentes azúcares fermentables de la dieta.

La sacarosa es una azúcar refinada,integrada a la alimentación de la población mundial en el siglo XIX.

Durante la 2º Guerra Mundial los niños de ciudades ocupadas por fuerzas militares, disminuyeron su prevalencia de caries.

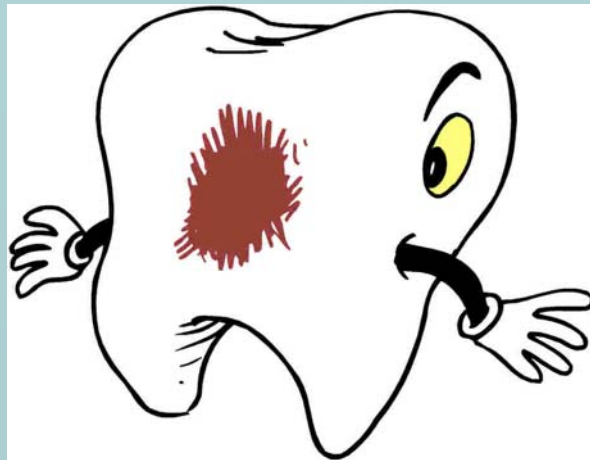
Al finalizar la guerra la prevalencia de caries reascendió en estos niños.

# Hospedero

Factores que favorecen y Factores que inhiben el desarrollo de caries.

## Dientes

Los dientes ofrecen diferentes superficies para los microorganismos, así por ej. los molares presentan fosas y fisuras que permiten el desarrollo de un biofilm de microorganismos cariogénicos.



Mal posición de los dientes, textura superficial y calidad del esmalte.

## Saliva

La composición y el flujo salival influyen en la generación de la caries, como también su capacidad buffer.



La saliva es un mecanismo de arrastre mecánico, su cantidad proporciona las condiciones para que los microorganismos de la cavidad bucal mantengan o aumenten su número.

Diferentes factores pueden modificar el flujo salival, entre ellos, medicamentos (antidepresivos, antihipertensivos), enfermedades de las glándulas salivales.

# Etiología de la caries



# Hipótesis de placa inespecífica

W.D.Miller en 1891 propuso su teoría químico-parasitaria que explicaba el origen de la caries:

El resultado de la enfermedad se debe a la actividad conjunta de la microbiota total de la placa.

El ácido producido por las bacteria bucales puede causar caries.

No distingue entre placa asociada a caries, enfermedad periodontal, ni a salud.

# Hipótesis de placa específica

W.J.Loesche en 1987 propone que: aunque la placa dental está formada por una diversa colección de organismos, solo unas pocas especies están involucradas activamente en la enfermedad.

Enfoca el control de la enfermedad con medidas preventivas y tratamientos contra un limitado número de microorganismos.

Estudios de asociación o prevalencia:  
diferencias estadísticas en los niveles de *S. mutans*  
presentes en placas obtenidas de sitios con caries  
activas y sitios libres de caries.

Estudios longitudinales:

Estudios prospectivos realizados en personas  
susceptibles a caries dental, monitoreando niveles  
de *S. mutans* antes ,durante y después de  
desarrollar caries, con un aumento de los recuentos  
al aparecer la lesión.



Estudios de virulencia:  
en modelos animales variando condiciones dietéticas,  
además de estudios " in vitro".

Estudios de respuesta al tratamiento:  
individuos con altos niveles del patógeno son  
tratadas para reducir o eliminar el microorganismo,  
otro grupo no se trata ,comparando la experiencia  
de caries en ambos grupos.

En 1924, Clark, propuso el nombre *Streptococcus mutans* a un microorganismo Gram positivo, agrupado en cadenas, **bacilos cortos, no cocos**, aislado de dientes humanos cariados.

En 1968 al comparar la descripción hecha por Fitzgerald y Keyes "streptococci conductor de caries" aislado desde hámster y ratas con la descripción de Clark, se supo la identidad de la bacteria involucrada en este proceso infeccioso.

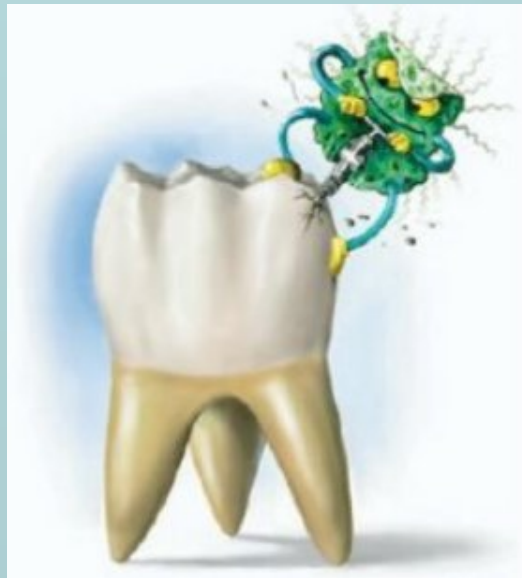


# Principales microorganismos asociadas a caries

*Streptococcus spp.*

*Lactobacillus spp.*

*Actinomyces spp*



Species or phylotype	Healthy	Caries			Total	
		Intact enamel	White spot lesions	Cavitated lesions		Dentin
<i>Streptococcus mutans</i>			11	30	19	60
<i>Veillonella dispar</i> or <i>V. parvula</i>			4	21	7	32
<i>Streptococcus sanguinis</i>	25	1	1			27
<i>Bifidobacterium</i> sp. clone CX010		2		4	11	17
<i>Corynebacterium matruchotii</i>		11				11
<i>Abiotrophia defectiva</i>	7	1				8
<i>Leptotrichia buccalis</i>		7	1			8
<i>Actinomyces</i> sp. clone AP064			3	2	2	7
<i>Fusobacterium animalis</i>			7			7
<i>Streptococcus mitis</i> or <i>S. oralis</i>	1	2		1	2	6
<i>Lactobacillus fermentum</i>				4	2	6
<i>Neisseria mucosa</i>	6					6
<i>Streptococcus salivarius</i>				4	1	5
<i>Selenomonas sputigena</i>			1	4		5
<i>Streptococcus mitis</i> biovar II	2	2				4
<i>Actinomyces gerencseriae</i>			3	1		4
<i>Leptotrichia</i> sp. clone DE081		3	1			4
<i>Leptotrichia</i> sp. strain A39FD		1	3			4
<i>Fusobacterium nucleatum</i> subsp. <i>polymorphum</i>		4				4
<i>Streptococcus anginosus</i>		1	2			3
<i>Gemella haemolysans</i>			3			3
<i>Leptotrichia</i> sp. clone BU064	3					3
<i>Capnocytophaga granulosa</i>	1	2				3
<i>Abiotrophia adiacens</i>			2			2
<i>Gemella</i> sp. strain 933-88			2			2
Additional species or phylotypes <sup>o</sup>	4	17	13	4	6	43
Total no. of species or phylotypes	11	29	27	13	13	68
No. of novel phylotypes	1	7	2	0	1	10
Total no. of clones	50	58	61	74	51	294

# *Streptococcus* orales

Son cocos Gram positivos agrupados en cadenas y en pares, catalasa negativos, anaerobios facultativos.

Crecen muy bien en presencia de 5-10% de Dióxido de Carbono y la temperatura óptima de crecimiento es entre 35-37° Celsius.

Fermentan hidratos de carbono dando origen a diversos ácidos: Acido láctico, acético, fórmico.

La mayoría son comensales y constituyen el mayor componente de la microbiota bucal.

Al cultivarlos en agar sangre dan origen a distintos tipos de hemólisis:  $\alpha$   $\beta$  o  $\gamma$  hemólisis.

Los *Streptococcus* orales en su mayoría son  $\alpha$  hemolíticos, por ello recibieron el nombre de *Streptococcus viridans*.

# Streptococci orales - Clasificación filogenética

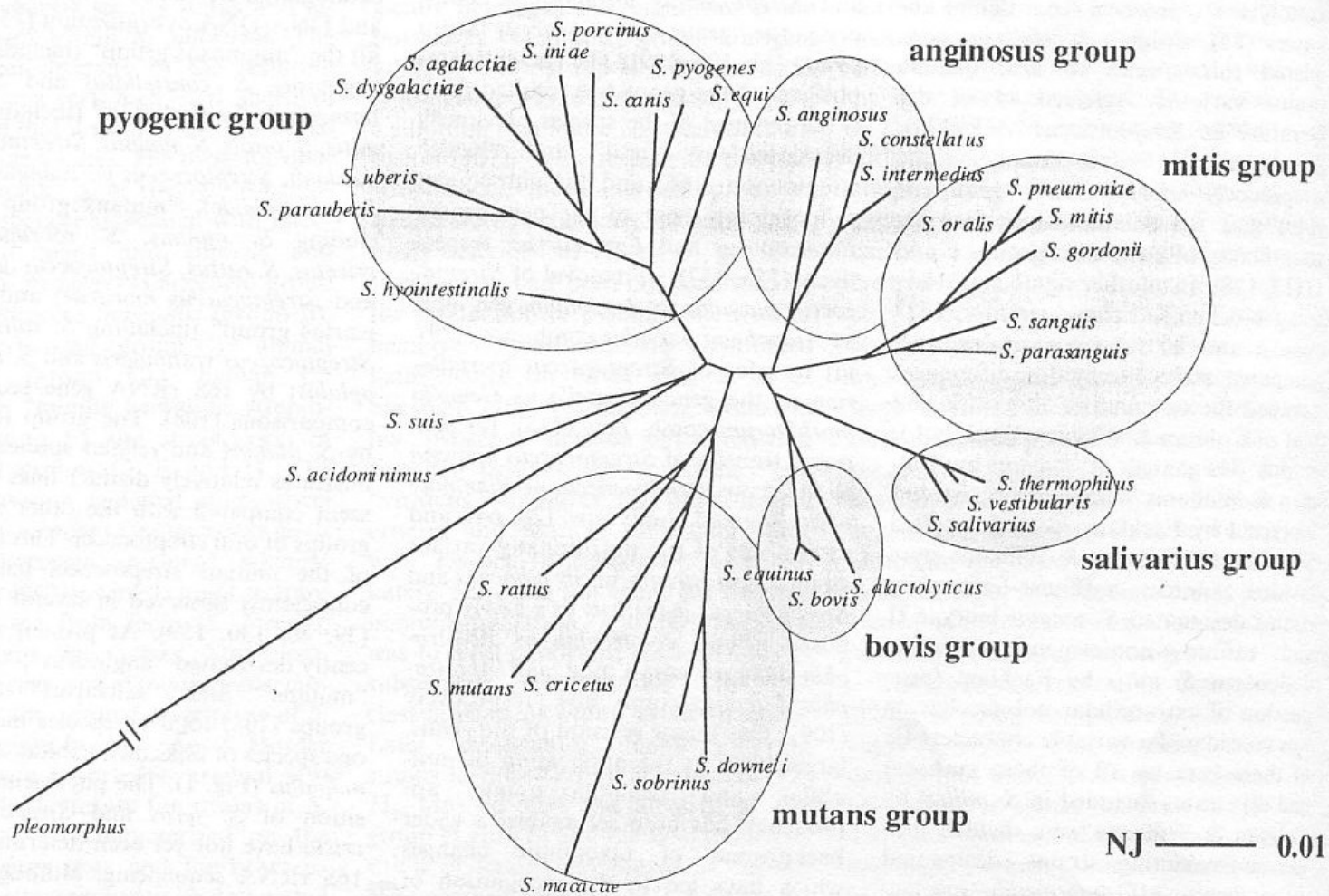


Fig. 1. Phylogenetic relationships among 34 *Streptococcus* species by 16S rRNA gene sequence analysis. Distances were calculated by the neighbor-joining (NJ) method. Source: Kawamura et al. (108) reproduced by permission.

# *Streptococcus* orales

- Grupo pyogénico
- Grupo anginosus
- Grupo mitis
- Grupo salivarius
- Grupo bovis
- Grupo mutans

## Grupo mutans

- *S. mutans*
- *S. sobrinus*
- *S. cricetus*
- *S. rattus*
- *S. macacae*
- *S. downei*
- *S. ferus*

Reservorio/habitat de las especies del grupo mutans.

*S. mutans* y *S. sobrinus* :cavidad oral de seres humanos.

*S. cricetus* :cavidad oral de ratas, hamsters y ocasionalmente en humanos.

*S. rattus*:cavidad oral de ratas y ocasionalmente en humanos

*S. downei* y *S. macacae* : placa dental de monos

*S. ferus* :cavidad oral de ratas



# Streptococcus fuertemente asociados a caries

Género: *Streptococcus*.

Grupo: *Streptococci mutans*.

Especies: *Streptococcus mutans*, biotipo I

serotipos: c, e, f.

*Streptococcus sobrinus*, biotipo IV,

serotipos: d, g, h.



Mecanismos de virulencia de  
*Streptococcus mutans*

# 1.-Microorganismos acidogénicos,generan ácido a partir de sacarosa.

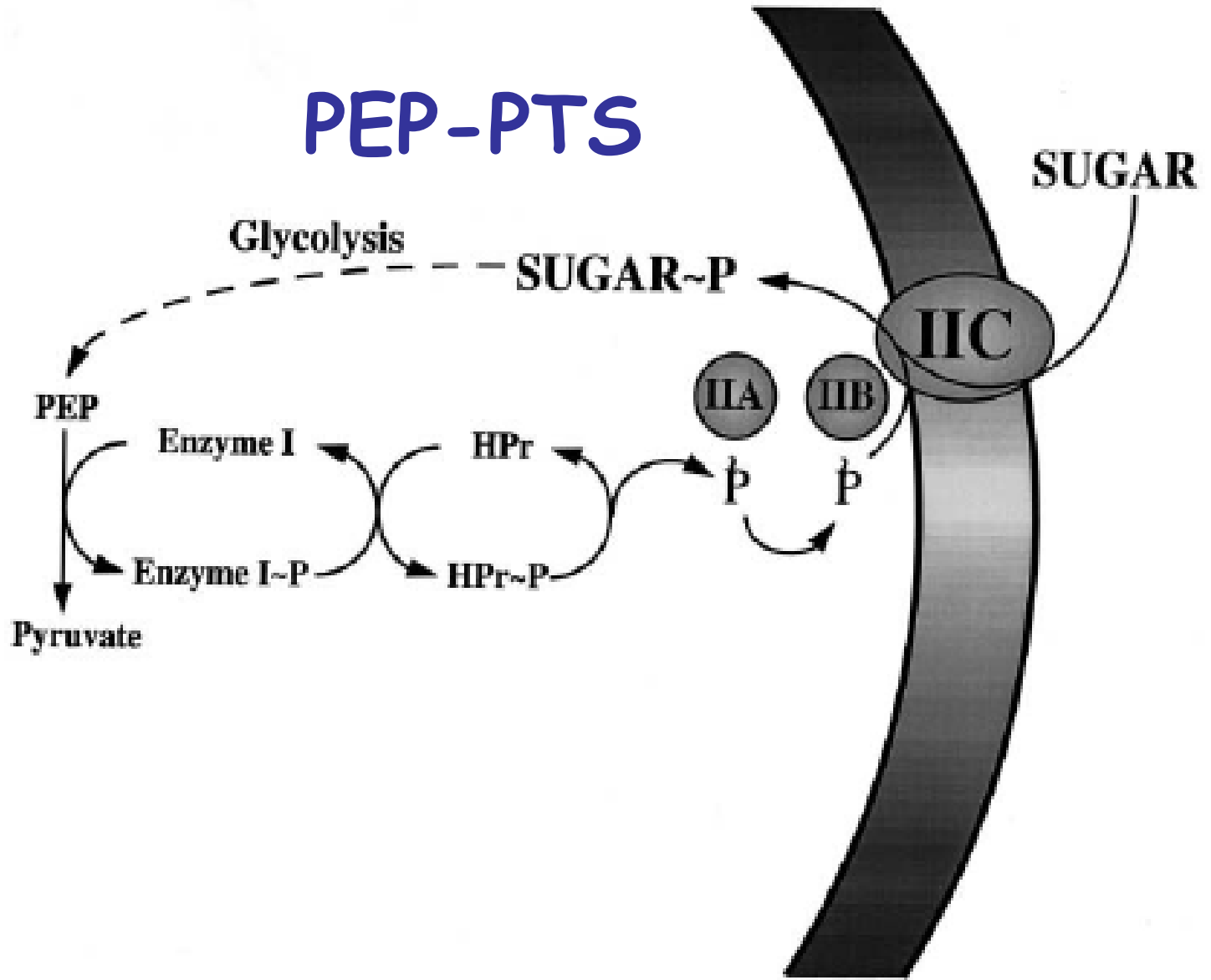
La sacarosa es desdoblada por acción enzimática en glucosa y fructosa, estas ingresan a la célula gracias a un complejo sistema de transporte:  
Fosfoenolpiruvato-fosfotransferasa(PEP-PTS)

PEP-PTS también es capaz de ingresar sacarosa a la célula.

PEP-PTS cataliza la fosforilación y translocación de mono y disacáridos en una cadena de reacciones enzimáticas que transfieren fosfato desde fosfoenolpiruvato al azúcar que ingresa.

Glucosa y fructosa ingresan a la vía glicolítica, generando ácido láctico como producto final.

# PEP-PTS



## 2.- Síntesis de polisacáridos intracelulares

Cuando hay alta concentración de azúcar, *S.mutans* sintetiza polisacáridos intracelulares que se tiñen con yodo(IPS).

IPS es un glucano tipo-glicógeno con uniones alfa 1-4 y alfa 1-6.

Reserva de IPS puede ser una fuente de ácido cuando disminuye o falta azúcar exógena.

### 3.-Toleran ácido-Acidúricos

*S. mutans* y *S.sobrinus* pueden crecer y continuar con el proceso de glicólisis a un pH inferior a 5 y seguir disminuyendo el pH a valores menores de 4.

La capacidad de tolerar ambiente ácido se atribuye a una F-ATPasa ,que expulsa protones, *S.mutans* expresa mayor cantidad de esta enzima que otras bacterias bucales.

La expulsión de protones via F-ATPasa otorga un Ph interno más básico que el ambiental, dando protección a enzimas glicolíticas sensibles al ácido.

S.mutans posee una vía de reparación de DNA inducible por Ph bajo.



Además *S.mutans* es capaz de montar una respuesta adaptativa de tolerancia al ácido(ATR).

ATR involucra proteínas de novo, importantes para la adaptación a un ambiente ácido.

ATR confiere protección cruzada para otros stress ambientales, como stress oxidativo ,alta osmolaridad,UV.

Cuando a *S.mutans* se le hace crecer a Ph ácido es más resistente a la muerte por ácido.

4.- Sintetizan polisacáridos extracelulares(PEC) o exopolisacáridos(EPS) a partir de sacarosa:

El microorganismo produce glucosyl-transferasas(GTFs) y fructosyl-transferasas(FTFs) enzimas extracelulares que hidrolizan sacarosa en glucosa y fructosa.

Crit.Rev.Oral.Biol.Med. 14(2):89-99(2003)

Microbiology and Molecular Biology Reviews, Mar. 2006, 157-176

Estas enzimas sintetizan polisacáridos formados por residuos de glucosa(Glucanos) o polisacáridos de residuos de fructosa(Fructanos

Las enzimas reciben el nombre genérico de glucansucrasas y fructansucrasas.

# GTFs

GTF-S sintetiza glucanos solubles en agua, también llamados dextranos, en los cuales predominan las uniones lineares alfa 1,6.

GTF-I y GTF-SI sintetizan glucanos insolubles en agua en los que predominan las uniones alfa 1,3 con diversos grados de ramificación.

Estos últimos reciben el nombre de mutanos y están asociados con la fuerte adhesión a la superficie dental y con el desarrollo del biofilm.

*S. mutans* produce GTF-I, GTF-SI y GTF-S, por su parte *S. sobrinus* produce GTF-S y GTF-I

*S. sanguis*, *S. oralis*, y *S. gordonii* tienen una sola GTF.

Glucanos tendrían un rol central en la adherencia mediada por sacarosa.

## Fructansucrasas o FTFs

Inulinsucrasas sintetizan Inulina y Levansucrasas sintetizan Levanos.

Levanos consisten de residuos de fructosa con uniones beta 2-6, Inulina consiste de residuos de fructosa con uniones beta 2-1.

Se reporta producción de levanos por *Streptococci* y la producción de inulina por algunas cepas de *Streptococcus mutans*.

Tanto glucanos como fructanos están involucrados en la adherencia entre bacterias y en la adherencia a la superficie dental, modulando la difusión de sustancias a través de la placa.

Además sirven como reserva de energía, pueden proteger a los microorganismos de la desecación, fagocitosis, de los antibióticos o compuestos tóxicos.

## 6.- Sintetizan proteínas que unen glucanos(GBP):

GBPs son un grupo heterogéneo de proteínas, diferentes unas de otras y tienen afinidad por diferentes formas de glucanos.

Las funciones de GBPs incluyen:

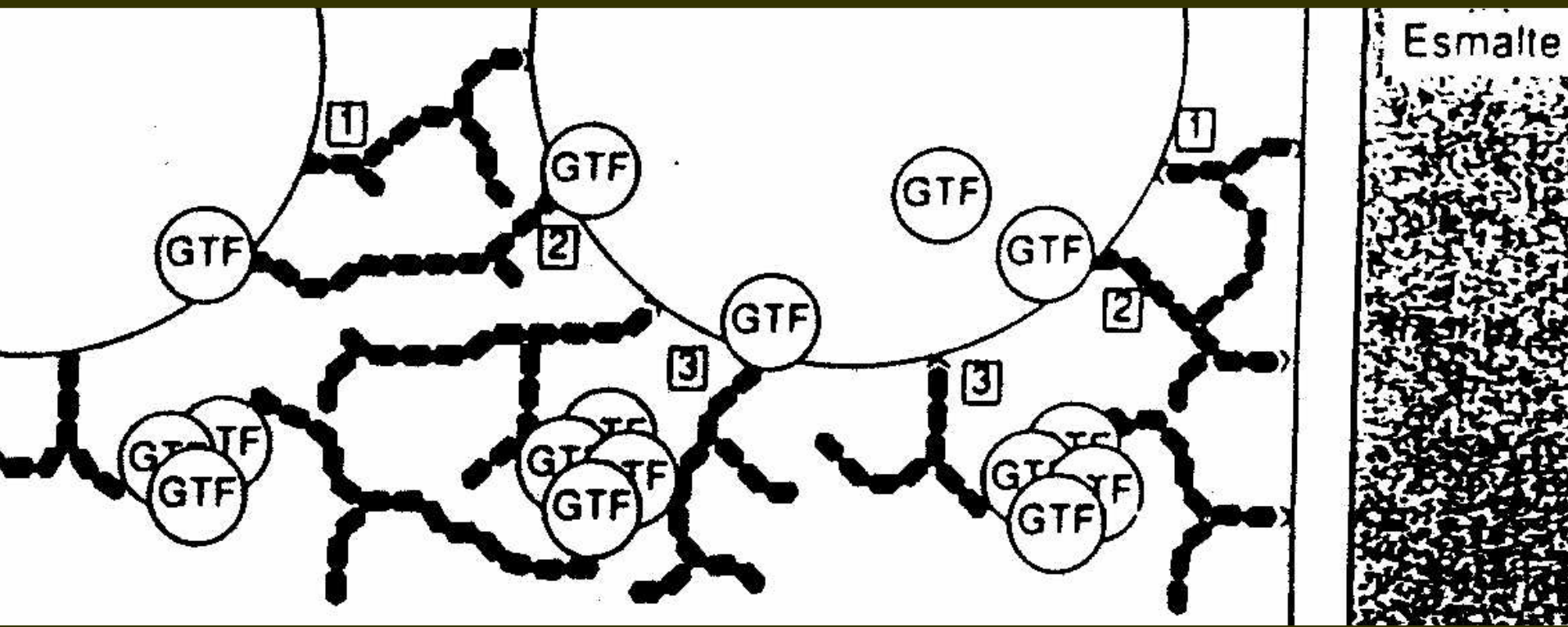
Agregación dependiente de dextrano, inhibición de dextranasa, cohesión de la placa y posiblemente síntesis de pared.



Pueden contribuir a la colonización, promoviendo la agregación y la posterior adherencia a la superficie de la placa.

*S.mutans* sintetiza GBPs A,B C y D,por su parte *S.sobrinus* sintetiza GBP-1,2,3,4,y 5,que cumplen diferentes funciones.

# Adherencia dependiente de sacarosa



## 7.-Sintetiza mutacinas

Son péptidos o proteínas antibióticas, bactericidas para otras bacterias de la misma especie o especies relacionadas, así como para otros microorganismos Gram positivos.

La actividad antimicrobiana de las mutacinas puede conferir una ventaja ecológica para el establecimiento y la multiplicación en comunidades bacterianas como el biofilm dental.

# Adherencia independiente de sacarosa

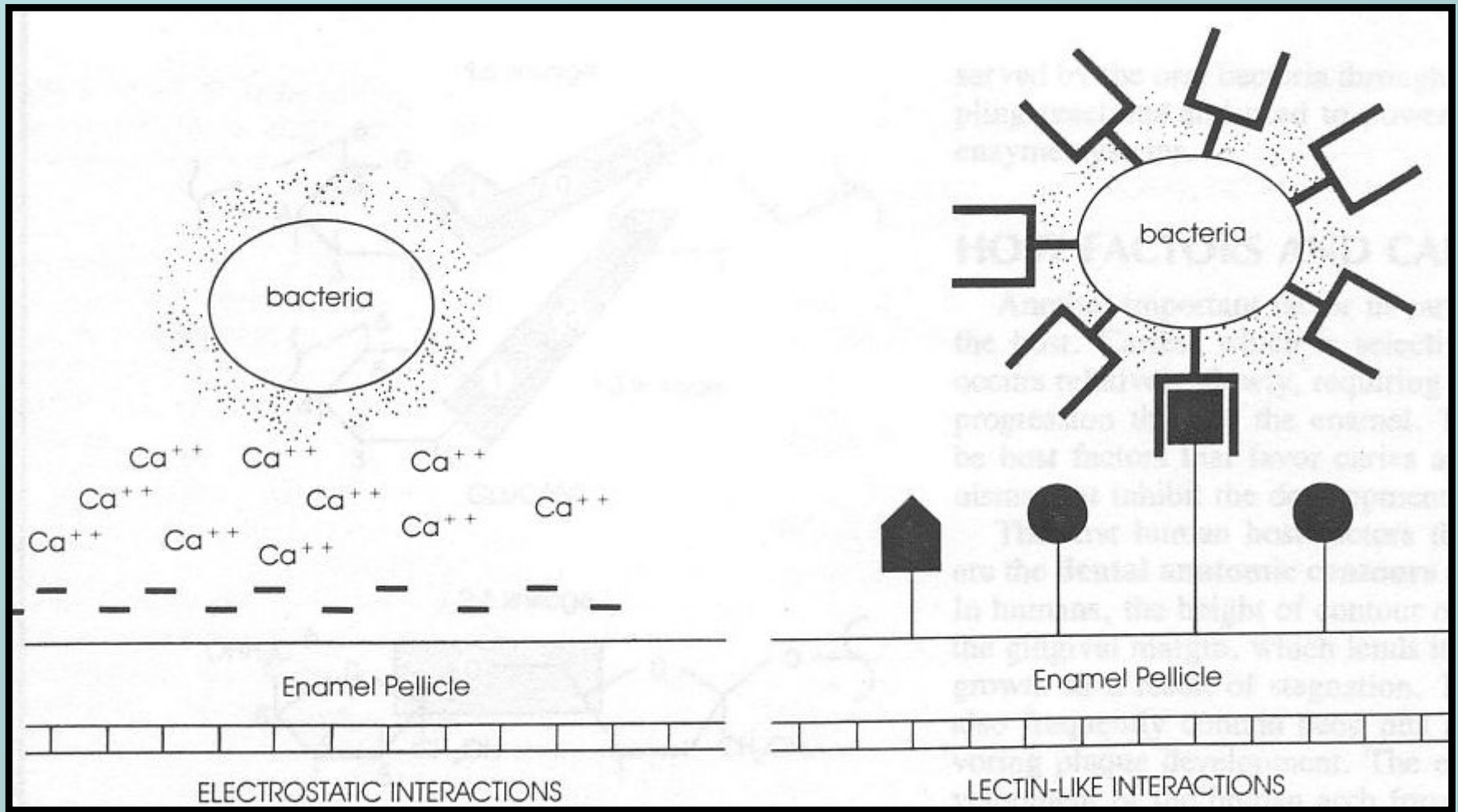
*S.mutans* puede adherirse a la película dental del esmalte en ausencia de sacarosa, gracias a la síntesis de proteínas específicas de superficie llamadas Spa,PI,o Ag I/II.

Cationes divalentes, como  $\text{Ca}^{++}$  permiten la unión a la película cargada negativamente.

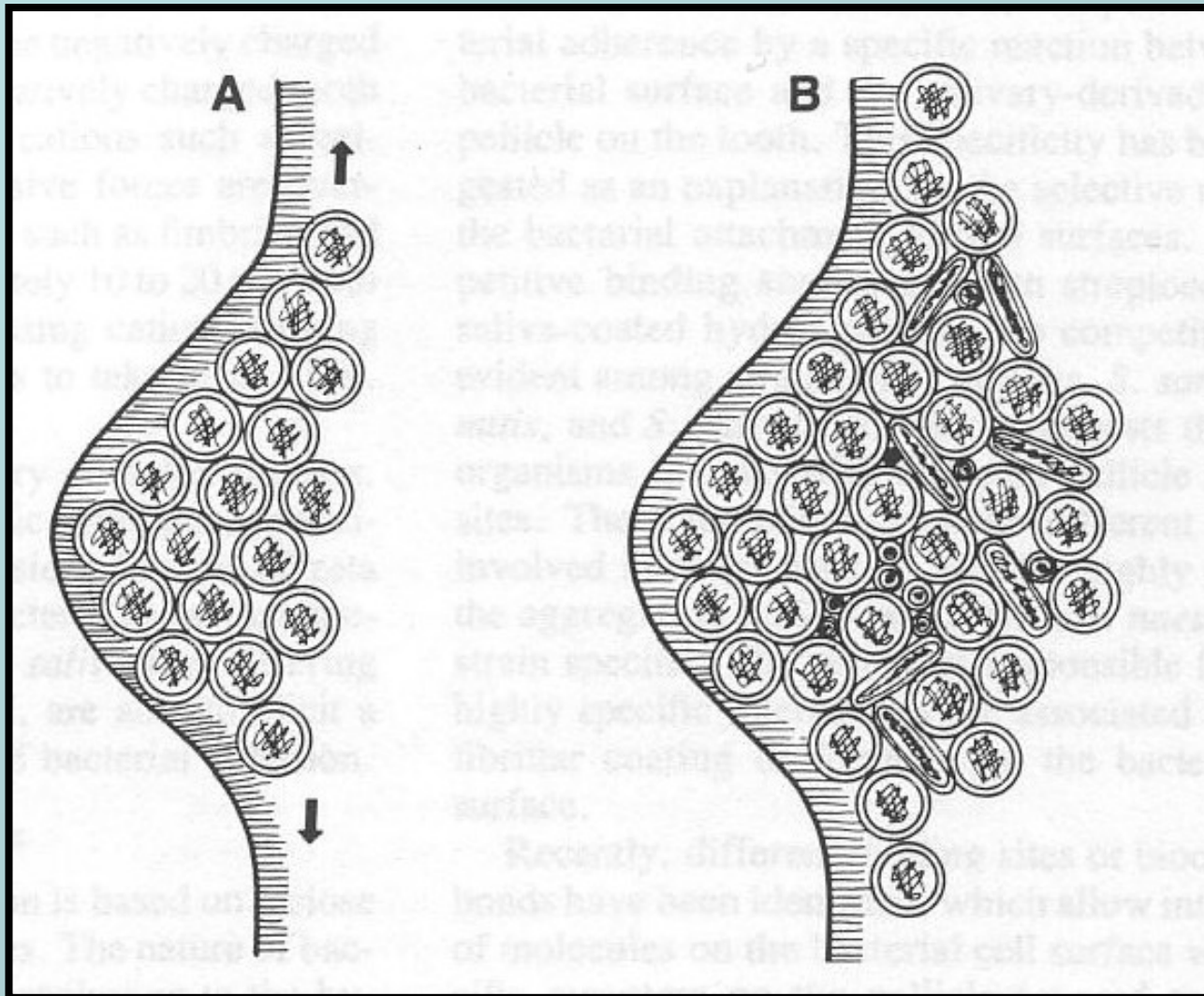
Microbiology 2010,10:111

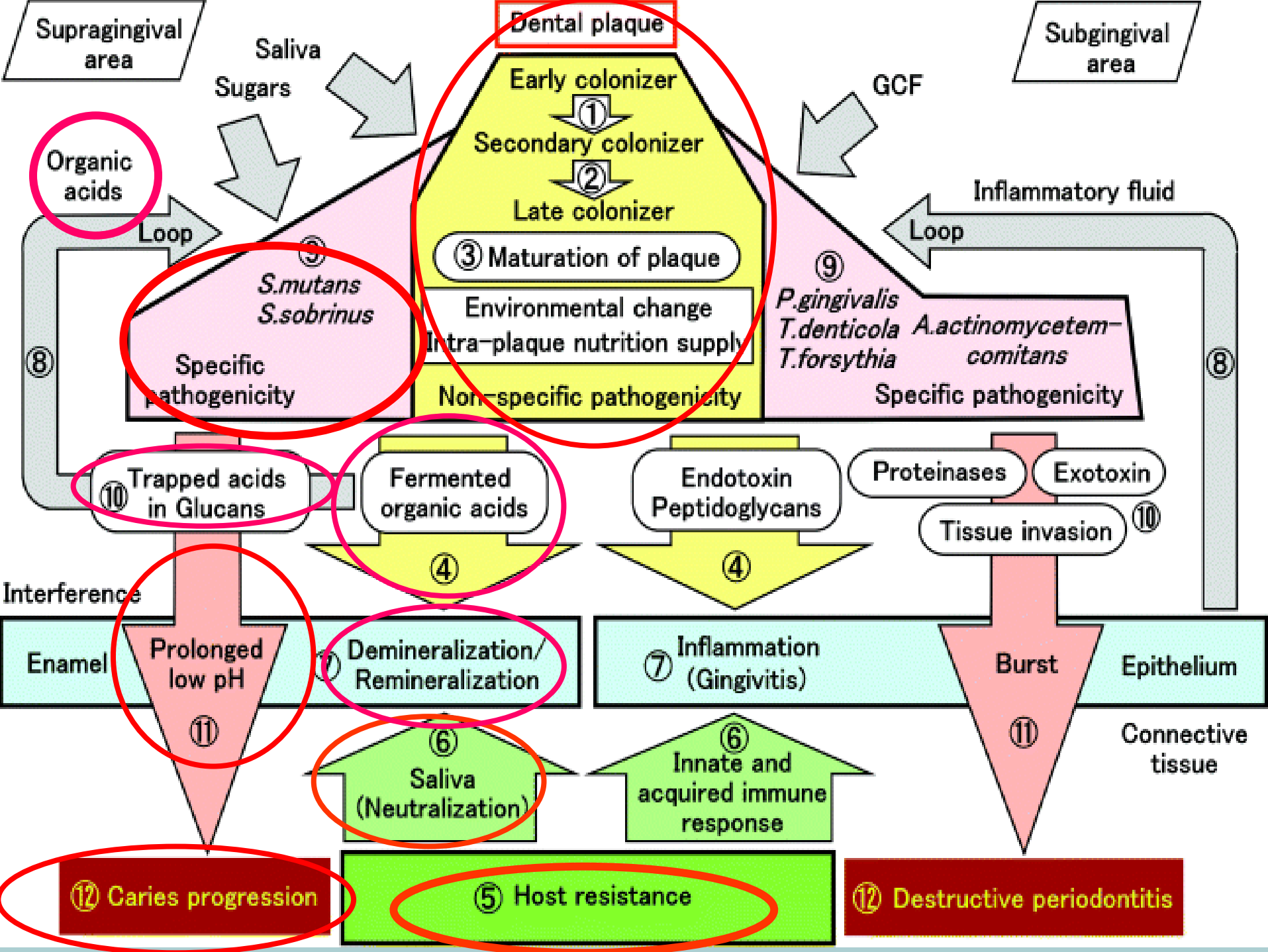
Infection and Immunity,1991,4606-4609

# Adherencia bacteriana a la película dental



# Colonización bacteriana de la superficie dental





# Hipótesis de placa ecológica ( Philip D. Marsh año 1991,1994, Marsh y Bradshaw 1997)

Es semejante a la hipótesis de placa específica, considerando además principios ecológicos.

A pH neutro, con una dieta convencional, las bacterias potencialmente cariogénicas son débilmente competitivas, están presentes en baja proporción.



El proceso de remineralización y demineralización está en equilibrio.

Si aumenta la frecuencia de ingesta de carbohidratos fermentables, el biofilm permanece mas tiempo bajo el pH crítico (pH 5.5)

Condiciones de pH bajo favorece la proliferación de bacterias acidúricas y acidogénicas: *Mutans streptococci* y *Lactobacilli*

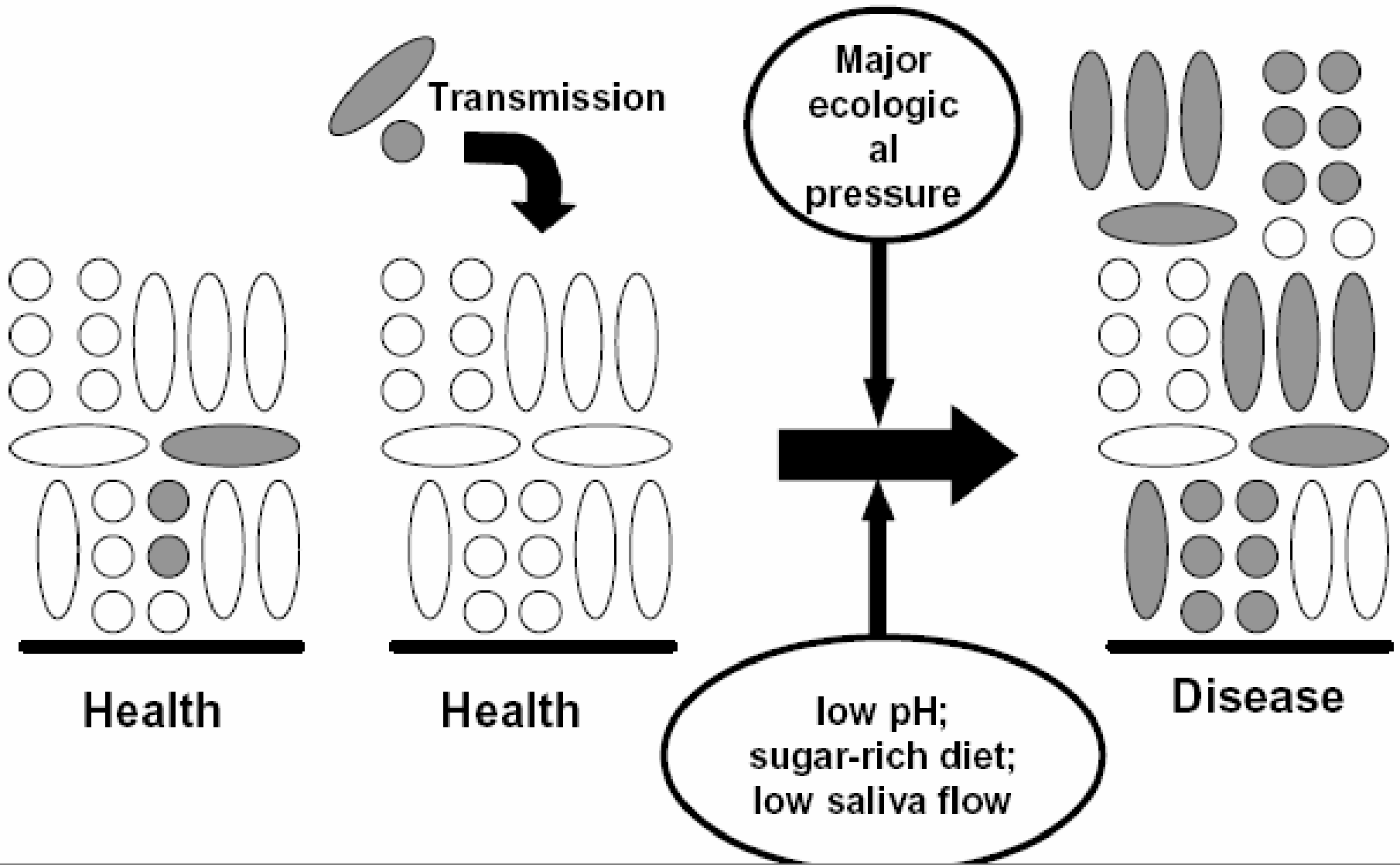
Cepas de otras especies, miembros del grupo *S. mitis* también podrían producir ácido en condiciones similares, pero en bajas cantidades.

Bacterias *no Streptococci mutans* pueden ser responsables de algunos de los estados iniciales de la desmineralización o causar lesiones en ausencia de especies cariogénicas en un hospedero susceptible.

Esta secuencia de eventos dan cuenta de la falta de especificidad en la etiología microbiológica de la caries y explica el patrón de sucesiones bacterianas observadas en diversos estudios.

La selección de bacterias patógenas está directamente relacionado con cambios ambientales: pH, potencial redox, dieta, presencia y calidad de los nutrientes de la cavidad oral.

Las enfermedades no requieren de una etiología específica, cualquier especie con características relevantes puede contribuir al proceso de la enfermedad.



# Diagnóstico microbiológico



*S. mutans* :Indicador biológico de riesgo cariogénico

Riesgo de caries:

Recuento de *S.mutans* igual o superior a:

$1 \times 10^5$  UFC *S.mutans*/ml de saliva.

## Recuento viable de *S.mutans*

Paciente en ayunas, sin cepillado dental

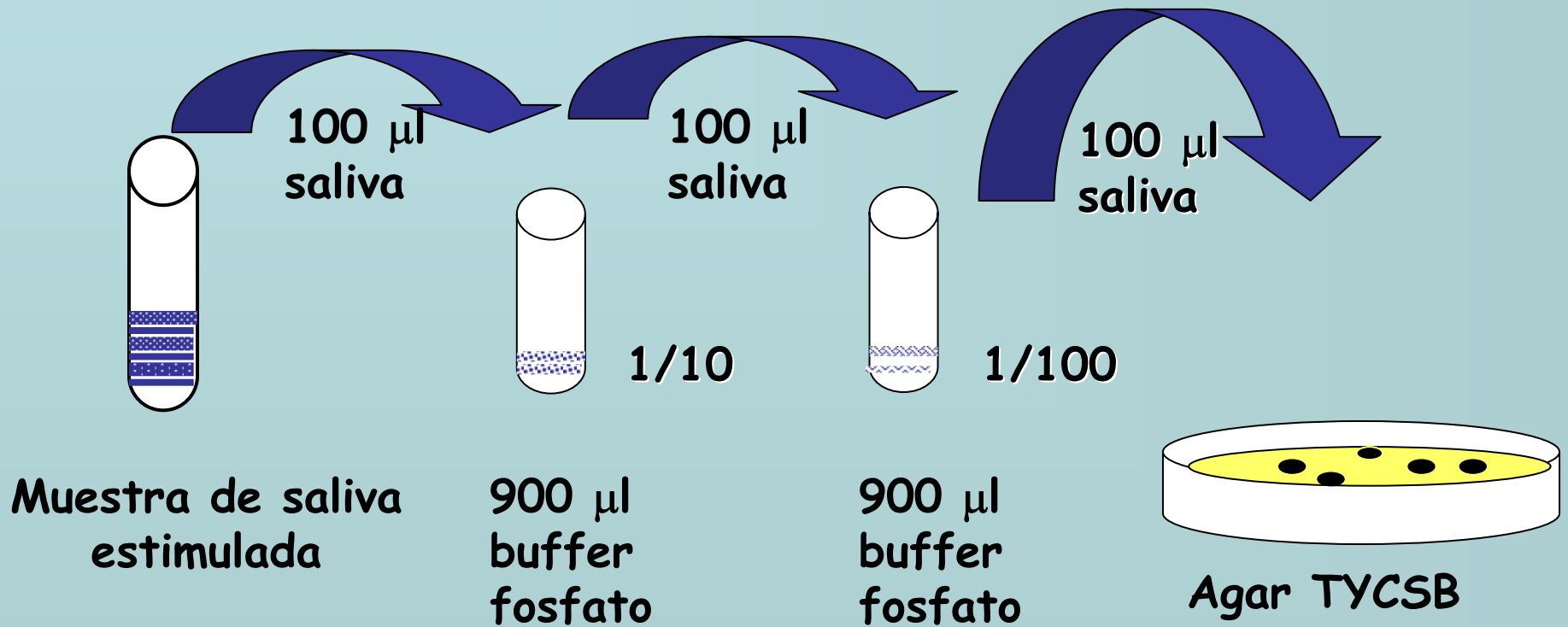
La muestra mas apropiada es saliva estimulada, recolectada en tubo de ensayo estéril.

La muestra se envía al laboratorio dentro de un recipiente tapado y refrigerado.

Si no puede ser enviada de inmediato al laboratorio, refrigerar a 4° C.



Recuento viable :  
*Streptococcus mutans*  
1.-Diluciones y siembra





## 2.-Cultivo:

Incubar a 37°C. en Jarra de anaerobiosis o en Jarra con vela por 48 hrs.



Anaerobiosis



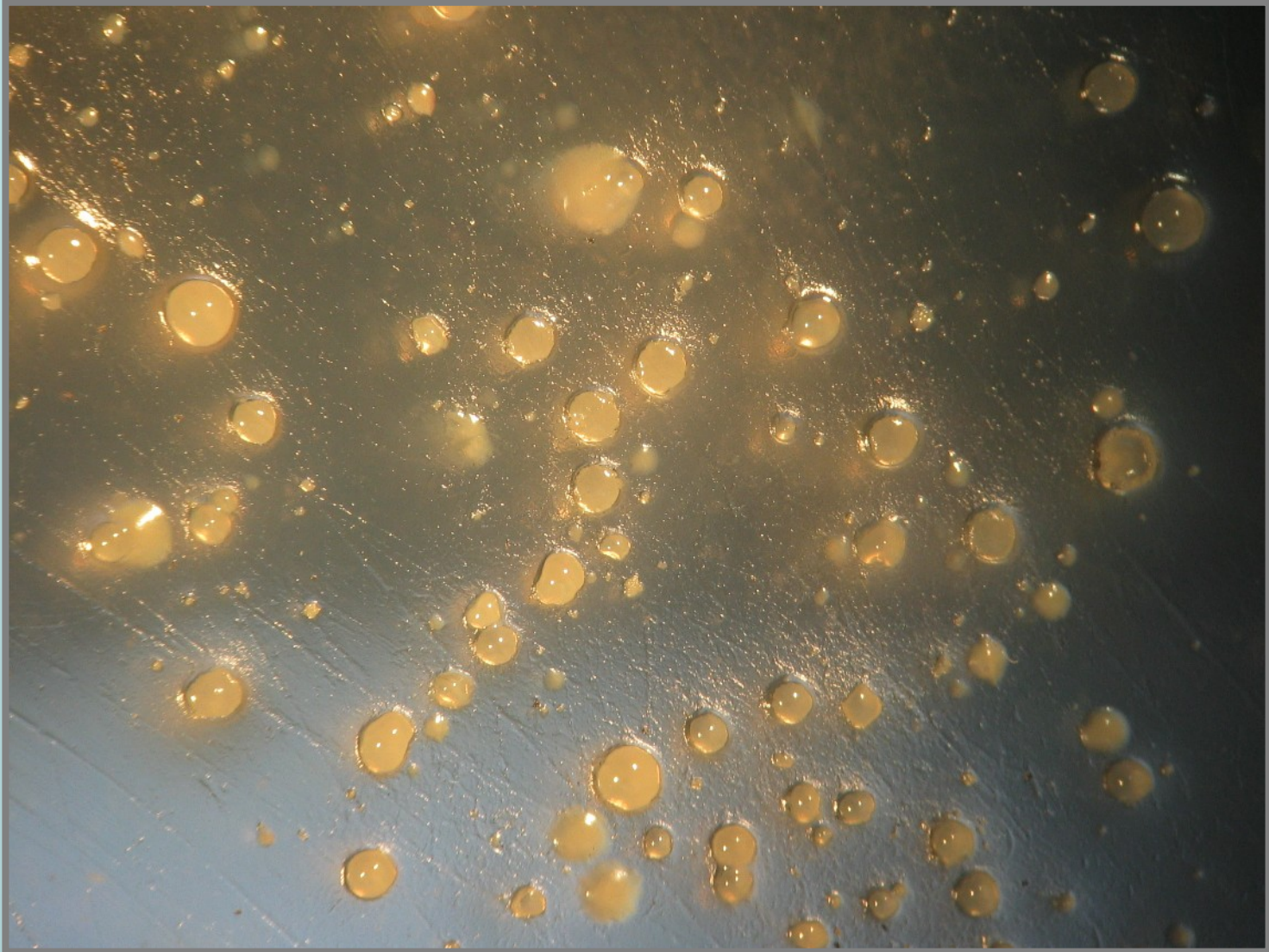
Capnofilia

### 3.-Recuento de colonias en lupa estereoscópica

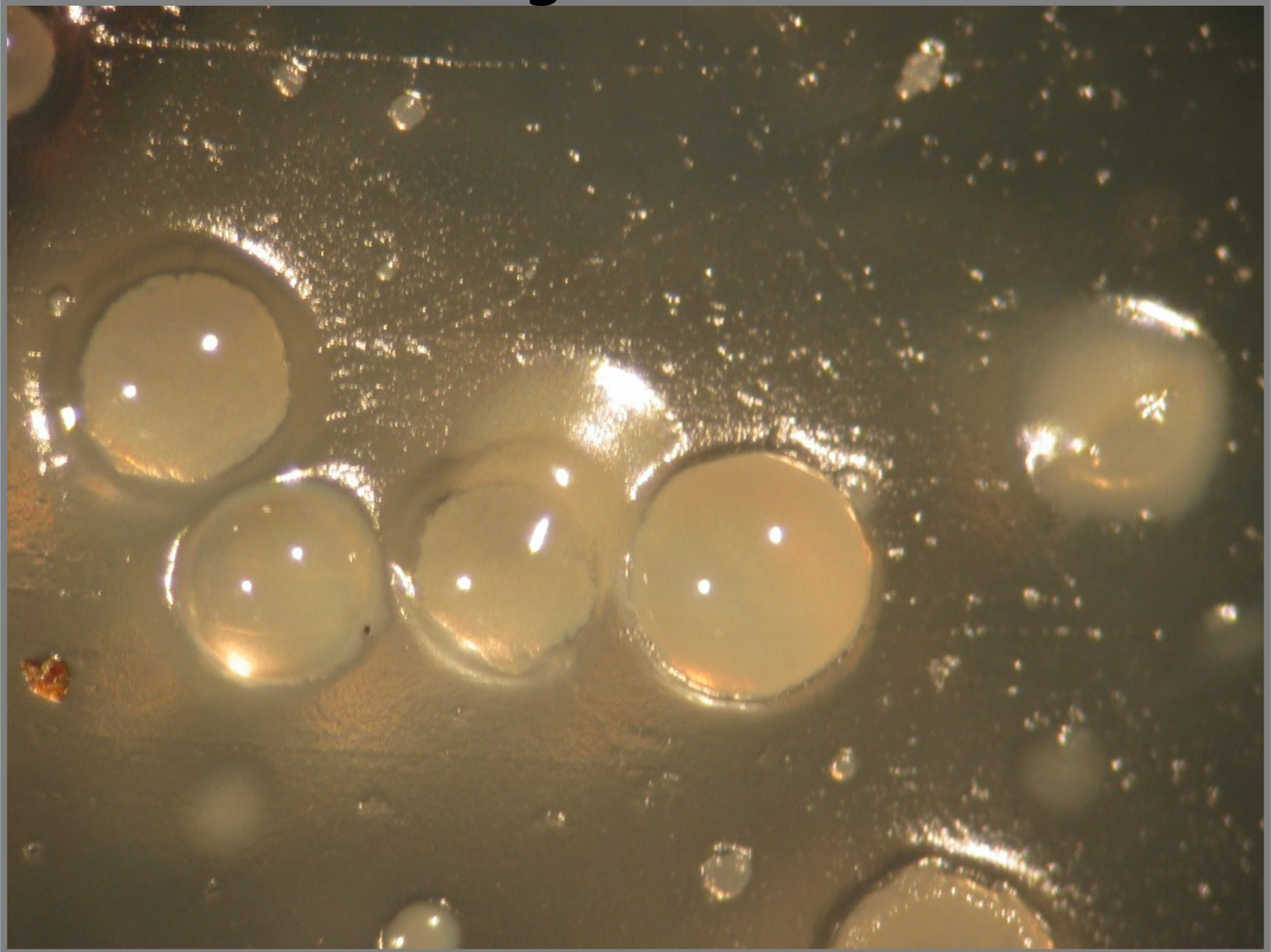


5.-Informe:UFC *S.mutans*/ml de saliva.

# Colonias de *Streptococcus mutans* en agar TYCSB



Colonias de *Streptococcus mutans*  
en agar TYCSB



colonias adherentes,  
transparentes  
y difíciles de disgregar.

Colonias de  
*S. mutans* en agar  
TYCSB



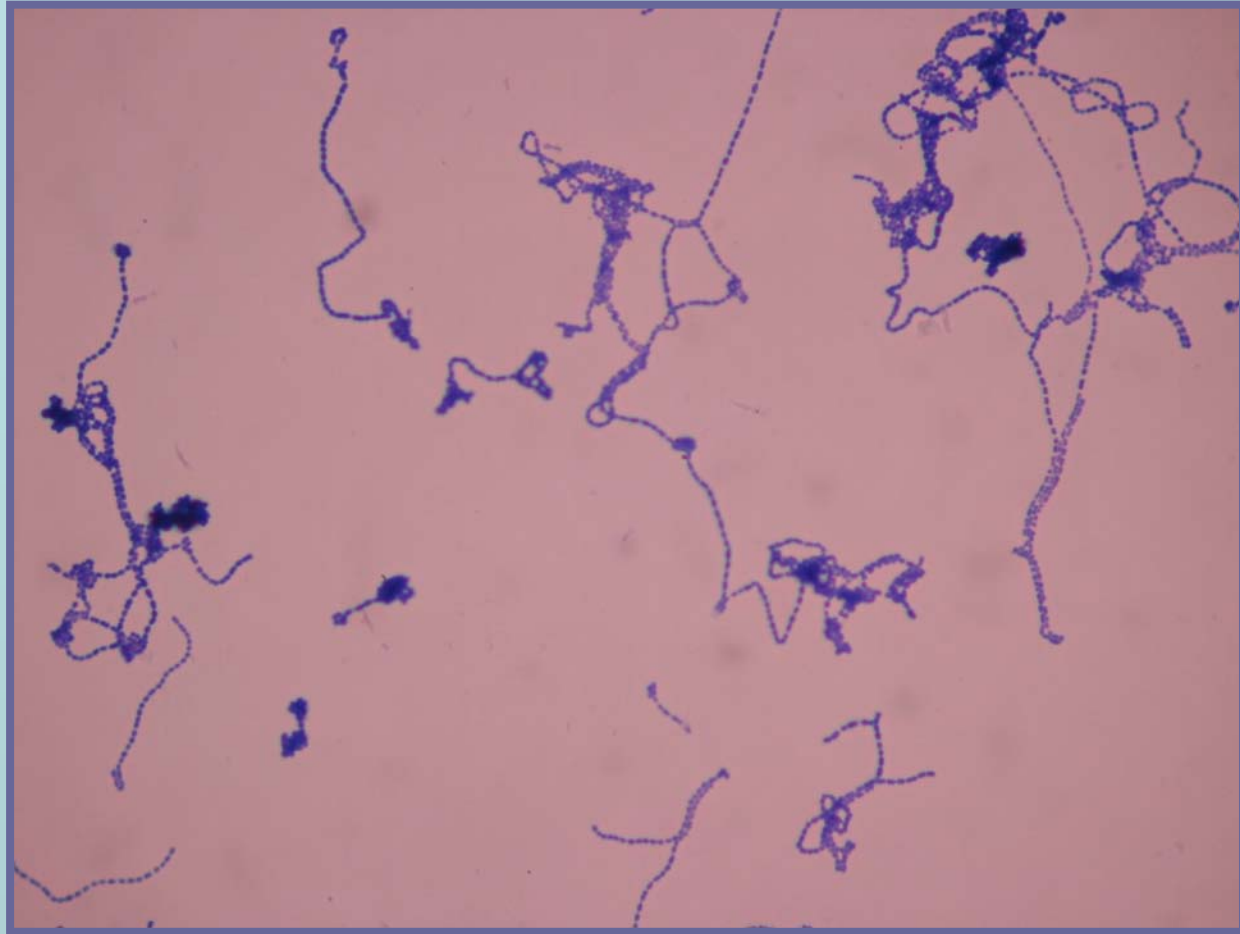
Colonias de *S.mutans* en  
agar TYCSB



colonias adherentes,  
transparentes  
y difíciles de disgregar.



# *Streptococcus mutans*-tinción de Gram



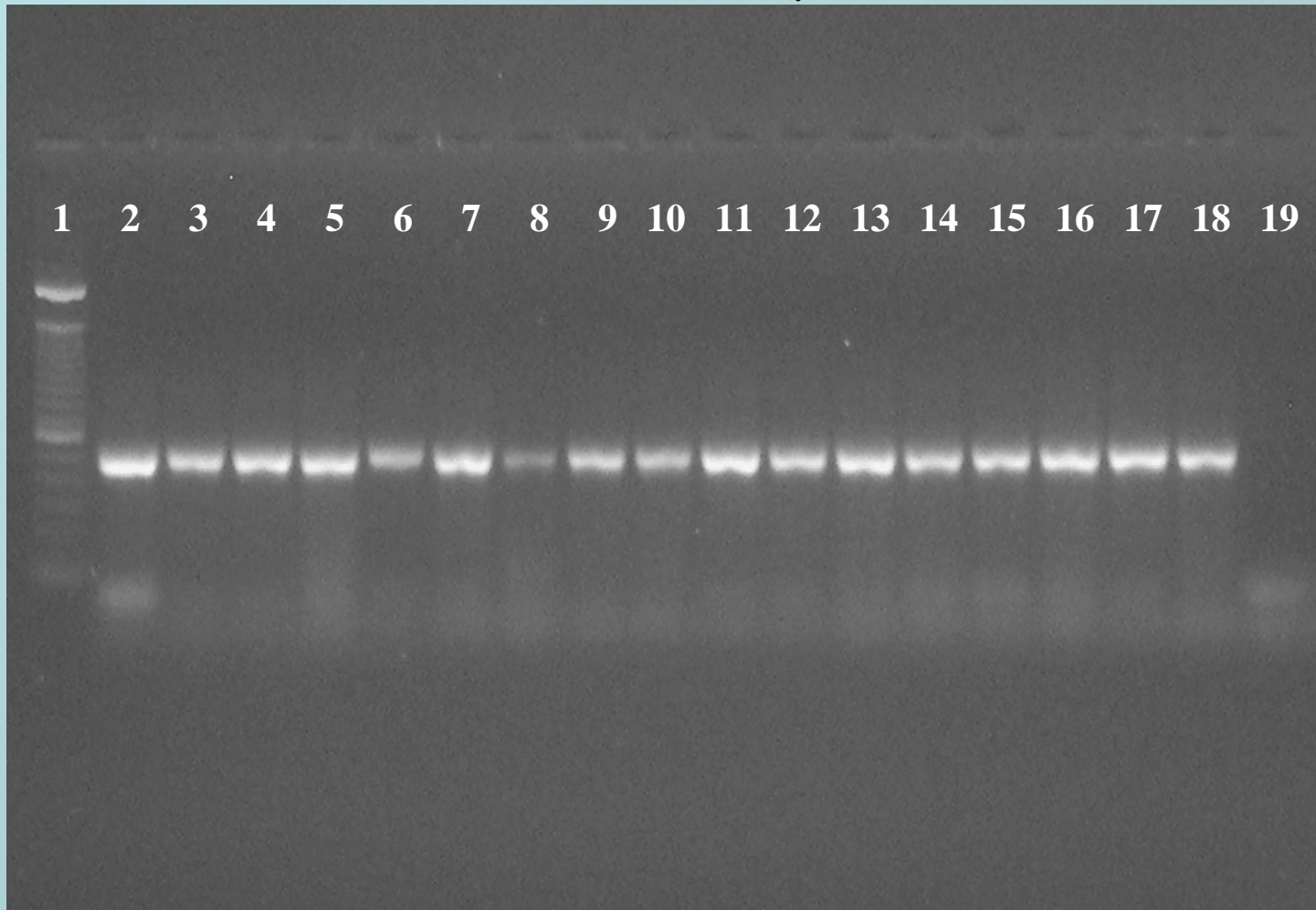
Microscopio óptico

## 4.-Identificación y Diagnóstico diferencial entre *S.mutans* y *S.sobrinus* en base a pruebas bioquímicas



Esculina, Rafinosa y Melobiosa

# Identificación en base a ensayos moleculares: PCR



PCR con primer GTFB (517bp) de *S.mutans*

Fin de la clase

