

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**  
**ESPECIALIDAD DE ENDODONCIA**



**ESTANDARIZACIÓN DE UN MODELO DE CARIES EN**  
**MOLARES DE RATAS WISTAR**

TESIS QUE PRESENTA:

**CD Irene López Leyva**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
**ESPECIALISTA EN ENDODONCIA**

DIRECTORES DE TESIS:

**Dra. Gloria Yolanda Castro Salazar**

**Dr. José Geovanni Romero Quintana**

Culiacán, Sinaloa. Diciembre de 2017

## DEDICATORIA

A Dios por darme la fortaleza y entereza que necesité para culminar uno de mis objetivos, por prestarme vida y salud para seguir cumpliendo mis sueños.

A mi esposo Raúl e hija Valentina por apoyarme en cada momento a lo largo de este proyecto, por su amor y paciencia, por todos los momentos que no estuve a su lado. Les dedico con todo mi amor el esfuerzo de mi trabajo que también es el de ellos.

A mis padres por darme la vida, educación y los valores que me han formado a lo largo de mi vida y que me han convertido en la mujer, profesionalista, esposa y madre que soy.

A mis suegros por todo el apoyo incondicional que me brindaron en esta etapa de mi vida, por su cariño y consejos.

A mis hermanos y sobrinos por su amor y comprensión.

A todas las personas que creyeron en mí y pensaron que lo lograría les dedico con todo el amor y cariño.

## AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por permitirme llegar hasta aquí, a mi esposo e hija y a toda mi familia por creer en mí.

Agradezco también a todos mis maestros por todo el conocimiento que me brindaron, a la Dra. Gloria Yolanda Castro Salazar por ser la mejor coordinadora que un posgrado pueda tener.

Al Dr. Alfredo del Rosario Ayala Ham por transmitir sus conocimientos, por todos los desvelos que me hizo pasar y que ahora entiendo tenían un propósito.

A la Dra. Erika de Lourdes Silva Benítez y la Dra. Itzel Castro por todo su apoyo en este proyecto, su paciencia y cariño.

Gracias al Dr. José Geovanni Romero Quintana por brindarme parte de su gran conocimiento y por el apoyo incondicional.

Mi más extendido agradecimiento al laboratorio de Química e Inmunología por su colaboración, a la Dra. Maribel Aguilar, Dr. Rosalío Ramos, M. en C. Mariana Avendaño Félix, M. en C. Erik René Lizárraga y CD. Jorge López.

Agradezco también a mis endosisters por cada risa, llanto, euforia, enojo, frustración, estrés, pero sobre todo las alegrías que pasamos juntas. Gracias por hacer este difícil camino algo más fácil, por cada momento que pasamos juntas y por la amistad que perdurará por siempre. Las voy a extrañar.

# ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
1 RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
2 INTRODUCCIÓN .....	3
3 MARCO TEÓRICO .....	5
3.1 CARIES DENTAL.....	5
3.2 FACTORES CAUSANTES DE CARIES DENTAL .....	5
3.2.1 Huésped .....	6
3.2.2 Agente etiológico .....	8
3.2.3 Dieta altamente cariogénica .....	11
3.2.4 Tiempo .....	13
3.3 PROCESO EVOLUTIVO DE LA CARIES DENTAL.....	13
3.3.1 Caries del esmalte.....	14
3.3.2 Caries de dentina .....	15
3.4 DIAGNÓSTICO.....	17
3.4.1 Exploración clínica.....	18
3.4.2 Exploración radiográfica .....	19
3.4.3 Transiluminación .....	20
3.4.4 Fluorescencia inducida por láser.....	21
3.4.5 Otros métodos de diagnóstico.....	21
3.5 MODELOS DE CARIES DENTAL.....	22
3.5.1 CARACTERÍSTICAS DEL MODELO EN RATAS.....	24
3.6 ANTECEDENTES.....	25
4 JUSTIFICACIÓN .....	28
5 OBJETIVOS.....	29
5.1 OBJETIVO GENERAL .....	29
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29

6	MATERIALES Y MÉTODOS .....	30
6.1	LUGAR Y OBTENCIÓN DE LA MUESTRA .....	30
6.2	TIPO DE ESTUDIO .....	30
6.3	MUESTRA .....	30
6.3.1	Tamaño de la muestra.....	30
6.4	METODOLOGÍA .....	31
6.4.1	Grupos de estudio .....	31
6.4.2	Pruebas de confirmación de <i>S. mutans</i> .....	31
6.4.3	Preparación del inóculo de <i>S. mutans</i> .....	32
6.4.4	Preparación de dieta cariogénica .....	33
6.4.5	Inoculación del <i>S. mutans</i> , dieta cariogénica 58% y agua con sacarosa al 10% .....	33
6.4.6	Sacrificio animal .....	34
6.4.7	Evaluación con tinción de caries .....	34
6.4.8	Evaluación histológica .....	35
6.5	LUGAR DE REALIZACIÓN.....	35
6.6	FINANCIAMIENTO .....	35
6.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	35
7	RESULTADOS.....	36
7.1	Comparación de pesos .....	36
7.2	Macroscópicos .....	42
7.3	Microscópicos .....	47
8	DISCUSIÓN .....	52
9	CONCLUSIONES .....	54
10	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	55
11	ANEXOS .....	58
11.1	ANOVA de un factor para la Diferencia de Pesos.....	58
11.2	ANOVA de un factor para el consumo de agua y comida .....	59

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Grafica 1. Promedio de la diferencia de pesos.....	37
Grafica 2. Consumo de agua diario por grupo.....	38
Grafica 3. Consumo de Agua promedio por grupo.....	39
Grafica 4. Consumo de comida diario por grupo.....	40
Grafica 5. Consumo de comida promedio por grupo.....	41

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores de virulencia de <i>S. mutans</i> .....	10
Tabla 2. Pruebas bioquímicas de acuerdo al manual de Bergey .....	32
Tabla 3. Ganancia de peso de las ratas.....	37
Tabla 4. Significancias de ANOVA de un factor para la diferencia de peso .....	38
Tabla 5. Consumos de agua por grupo. ....	39
Tabla 6. Significancias de ANOVA de un factor para el consumo de agua.....	40
Tabla 7. Consumos de comida por grupo. ....	41
Tabla 8. Significancias de ANOVA de un factor para el consumo de alimento. ....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tinciones cariogénicas del grupo 1 .....	43
Figura 2. Tinciones cariogénicas grupo 2.....	44
Figura 3. Tinciones cariogénicas grupo 3.....	45
Figura 4. Tinciones cariogénicas grupo 4.....	46
Figura 5. Imágenes histológicas de tinción de H y E del grupo 1 .....	48
Figura 6. Imágenes histológicas con tinción de H y E del grupo 2 .....	49
Figura 7. Imágenes histológicas con tinción de H y E del grupo 3 .....	50
Figura 8. Imágenes histológicas con tinción de H y E del grupo 4 .....	51

# 1 RESUMEN

**Introducción:** La caries dental es una enfermedad muy común en los seres humanos, de origen multifactorial en la que existe una interacción de cuatro factores principales: el huésped, la microflora, el sustrato y el tiempo. El uso de modelo animal especialmente en ratas ha sido fundamental para el estudio de la caries contribuyendo a su etiología, patogenia y prevención. **Objetivo:** Estandarizar un modelo de caries en dentina en molares de ratas wistar. **Materiales y métodos:** Se utilizaron 20 ratas macho Wistar, divididas en cuatro grupos: Grupo 1: Inoculadas con una concentración de  $8.76 \times 10^9$  de *S. mutans*, dieta cariogénica 58% y agua con sacarosa al 10%. Grupo 2: Inoculadas con *S. mutans*. Grupo 3: Dieta cariogénica 58% y agua con sacarosa al 10%. Grupo 4: Control con comida y agua normal *ad libitum*. Se sacrificaron a las ratas a los 15 días y se evaluó macroscópica y microscópicamente a cada grupo. **Resultados:** En los resultados macroscópicos de los diferentes grupos se observó tejido desmineralizado, siendo menos en el grupo control. En la evaluación microscópica se observó el defecto producido por caries en el grupo 3. **Conclusiones:** En un modelo animal experimental como las ratas tipo Wistar, se puede producir caries más extensas asociado a una ingesta de dieta altamente cariogénica y la infección vía oral por *S. mutans*.

Palabras clave: Modelo de rata, caries dental, dieta cariogénica, inoculación *S. mutans*

## ABSTRACT

**Introduction:** Dental caries is a very common disease in humans, of multifactorial origin in which there is an interaction of four main factors: the host, the microflora, the substrate and time. The use of animal model especially in rats has been fundamental for the study of caries contributing to its etiology, pathogenesis and prevention.

**Objective:** Standardize a caries model in dentine in molars of Wistar rats. **Materials**

**and methods:** Twenty male Wistar rats were divided into four groups: Group 1: Inoculated with a concentration of  $8.76 \times 10^9$  of *S. mutans*, 58% cariogenic diet and water with 10% sucrose. Group 2: Inoculated with *S. mutans*. Group 3: Cariogenic diet 58% and water with 10% sucrose. Group 4: Control with food and normal water ad libitum. The rats were sacrificed at 15 days and each group was evaluated macroscopically and microscopically. **Results:** In the macroscopic results of the different groups demineralized tissue was observed, being less in the control group. In the microscopic evaluation, the defect produced by caries in group 3 was observed. **Conclusions:** An experimental animal model such as Wistar rats can produce more extensive caries associated with a highly cariogenic diet intake and oral infection with *S. mutans*.

**Key words:** Rat model, dental caries, cariogenic diet, *S. mutans* inoculation

## 2 INTRODUCCIÓN

La caries dental es una de las enfermedades más antiguas y comunes en los seres humanos (Lee, 2013). Una extensa investigación sobre la caries dental en los últimos 30 años ha ampliado el conocimiento del proceso carioso. Las primeras investigaciones identificaron a la placa bacteriana y a una fuente dietética de azúcar como los factores causantes más importantes de la caries (Barrancos Mooney, 2006). La caries dental es una enfermedad de origen multifactorial en la que existe interacción de tres factores principales: el huésped (la saliva y los dientes), la microflora (infecciones bacterianas) y el sustrato (dieta cariogénica). Además de estos factores, deberá tenerse en cuenta uno más, el tiempo. Para que se forme una caries es necesario que las condiciones de cada factor sean favorables; es decir, un huésped susceptible, una flora oral cariogénica y un sustrato apropiado que deberá estar presente durante un período determinado de tiempo (Núñez & García Bacallao, 2010). La lesión inicial, denominada mancha blanca, es la primera evidencia visible de actividad cariogénica en la superficie del tejido dentario. Esta evidencia es la consecuencia del acúmulo de numerosos episodios de desmineralización y mineralización (Veitía, Acevedo, & Sánchez, 2011). La caries en dentina ocurre cuando la caries alcanza el límite amelodentinario avanza a un ritmo mayor que en el esmalte, ya que la presencia de los túbulos dentinarios ayuda a que los microorganismos invadan la pulpa con la evolución natural de la enfermedad (Barrancos Mooney, 2006).

El uso del modelo animal en experimentación biomédica ha incluido roedores (ratones, ratas, hámsteres, jerbos, conejillos de indias y conejos). Especialmente el uso de ratas y ratones. El uso del modelo animal en el estudio de la caries dental se remonta a las publicaciones de McCollum, en 1922, en las que se evaluó el papel de la dieta como factor etiológico. La evidencia científica permite concluir que el modelo animal, en especial la rata, ha sido fundamental históricamente en el estudio de la caries dental contribuyendo fundamentalmente a entender su etiología, patogenia, fisiopatología, factores micromedioambientales y a su prevención (Bowen, 2013).

Estos han permitido establecer la relación de la caries con la presencia de microorganismos en la cavidad oral y la dieta, la influencia de las condiciones sistémicas de un individuo en el avance de esta condición, el desarrollo de terapias antimicrobianas y, en el futuro inmediato su contribución especialmente en lo que tiene que ver con el diseño de terapias para su prevención (Jaramillo Gómez, Roa Molina, Chaves, & Durán, 2013).

Los modelos de ratas deben de tener ciertas características como por ejemplo: 1) La selección de animales, los más utilizados son ratas tipo Wistar. 2) La edad a la que se introducen las ratas al estudio de caries deben ser expuestas alrededor de los 21-22 días de edad y no más de 24 días de edad. 3) El sexo del animal, generalmente las ratas macho desarrollan más lesiones que las hembras; esta diferencia se atribuye a que los machos comen con más frecuencia que las hembras y la Dieta NIH 2000 contiene 56% de sacarosa (Bowen, 2013).

En la actualidad existen diferentes modelos de estudio en ratas para provocar caries ya que son de fácil manipulación, tienen un promedio de vida corto y el tamaño dental facilita las observaciones macroscópicas, sin embargo es frecuente que la inducción de la caries requiera manipulaciones experimentales, como la infección por medio de bacterias patogénicas de caries y una dieta altamente cariogénica. Es por ello que surge el interés de estandarizar un modelo de caries en ratas que nos permita determinar un protocolo específico y así provocar lesiones de caries dental que puedan ser utilizadas en un futuro para la evaluación de diferentes tratamientos. El objetivo de este estudio fue estandarizar un modelo de caries en dentina en molares de ratas Wistar.

## **3 MARCO TEÓRICO**

### **3.1 CARIES DENTAL**

La caries dental es una de las enfermedades más antiguas y comunes en los seres humanos. Si bien han sido continuos los esfuerzos para reducir su prevalencia, todavía se encuentra muy extendida, especialmente en las clases socioeconómicas más bajas (Lee, 2013). Los estudios epidemiológicos indican una incidencia diferenciada de la caries en varios países. En los países desarrollados, se observa una disminución de la prevalencia de la enfermedad. La razón para la mejora de las condiciones de salud oral se atribuye a diversos factores, entre ellos la fluoración del agua, el uso de pasta dental con fluoruro, una dieta saludable con sucedáneos de sacarosa y educación para la salud oral (Struzycka, 2014).

La caries dental es una enfermedad multifactorial causada por el huésped, el agente, y los factores ambientales. *S. mutans* es el agente etiológico primario de la caries dental. A través de la adhesión, éste se une a la película dental y descompone azúcares para obtener energía para producir ácido láctico, provocando un ambiente ácido alrededor del diente. Como resultado, aumenta la solubilidad de hidroxiapatita y se produce la desmineralización del esmalte y, posteriormente, la dentina. Los factores que intervienen en el proceso de la caries dental incluyen el diente, las bacterias en la forma de una placa dental y una dieta que contiene azúcar. La cantidad, calidad y la frecuencia de la ingesta de azúcar tienen una influencia definitiva sobre la incidencia y prevalencia de caries (Baptista et al., 2012; Lee, 2013).

### **3.2 FACTORES CAUSANTES DE CARIES DENTAL**

Una extensa investigación sobre la caries dental en los últimos 30 años ha ampliado el conocimiento del proceso carioso. Las primeras investigaciones identificaron a la placa bacteriana y a una fuente dietética de azúcar como los factores causantes más

importantes de la caries (Barrancos Mooney, 2006). La caries dental es una enfermedad de origen multifactorial en la que existe interacción de tres factores principales: el huésped (la saliva y los dientes), la microflora (infecciones bacterianas) y el sustrato (dieta cariogénica). Además de estos factores, deberá tenerse en cuenta uno más, el tiempo. Para que se forme una caries es necesario que las condiciones de cada factor sean favorables; es decir, un huésped susceptible, una flora oral cariogénica y un sustrato apropiado que deberá estar presente durante un período determinado de tiempo (Núñez & García Bacallao, 2010).

### **3.2.1 Huésped**

Con respecto al huésped es necesario analizar las propiedades de la saliva y la resistencia del diente a la acción bacteriana.

#### **3.2.1.1 Saliva**

La saliva es una solución supersaturada en calcio y fosfato que contiene flúor, proteínas, enzimas, agentes buffer, inmunoglobulinas y glicoproteínas, entre otros elementos de gran importancia para evitar la formación de las caries (Núñez & García Bacallao, 2010). Sin embargo, la participación de la saliva en el proceso carioso ha sido corroborada mediante diversos estudios, en los cuales al disminuir el flujo salival se observó un incremento sustancial de los niveles de lesiones de caries. Entre ellos, los realizados en pacientes con xerostomía, es decir, niveles de secreción salival disminuida y el experimento de supresión de saliva en animales, mediante extirpación quirúrgica de sus glándulas (Iguarán Jiménez, 2012).

A medida que disminuye el flujo salival aumenta el número de microorganismos en la cavidad oral, presentándose rápidamente un incremento en la actividad de los microorganismos acidogénicos. Entre ellos, los grupos de: *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* y *Actinomyces* (Duque de Estrada Riverón, Pérez Quiñonez, & Hidalgo-

Gato Fuentes, 2006). Es concluyente que la acción salival promueve el desarrollo de la microflora, mediante dos efectos principales: antimicrobianos (excluyendo microorganismos patógenos y manteniendo la flora normal) y nutricionales (estimulando su crecimiento mediante el aporte de nutrientes para los microorganismos, a través de las glicoproteínas, ya que éstas pueden ser degradadas por los microorganismos (Iguarán Jiménez, 2012).

### 3.2.1.2 Diente

Los dientes presentan tres particularidades fuertemente relacionadas a favorecer el desarrollo de lesiones cariosas. Ciertos dientes presentan una mayor incidencia de caries, asimismo algunas superficies dentarias son más propensas que otras, incluso respecto al mismo diente. Por otro lado, existen sujetos que disponiendo de sustratos y microorganismos cariogénicos no llegan a presentar lesiones de caries. A su vez la posibilidad de acumulación de biofilm dental está relacionada con factores tales como: alineación de dientes, anatomía de la superficie, textura superficial y otros factores de naturaleza hereditaria. Por otra parte, el esmalte puede sufrir anomalías en su constitución, tales como amelogenesis imperfecta, hipoplasia adamantina, fluorosis y dentinogenesis imperfecta que favorecen a desarrollar lesiones cariosas. Asimismo, la disposición irregular de la materia orgánica propicia la acción de causas desencadenantes de la caries dental (Iguarán Jiménez, 2012).

La permeabilidad del esmalte disminuye con la edad asociada a alteraciones en la composición de la capa exterior del esmalte que se producen tras la erupción del diente. En el esmalte se observa un proceso de maduración estructural, que consiste fundamentalmente en la capacidad del esmalte de incorporar moléculas pequeñas que influenciarán sus propiedades físico-químicas. Las diferentes proporciones de los componentes del esmalte determinan la resistencia mayor o menor del esmalte y, con ello, la velocidad de las lesiones. La anatomía, la disposición y la oclusión de los dientes, guardan estrecha relación con la aparición de lesiones cariosas, ya que favorecen la acumulación de placa y alimentos pegajosos, además de dificultar la

higiene bucal. También contribuyen en la formación de lesiones cariosas, las anomalías de los dientes, en cuanto a forma y textura (Iguarán Jiménez, 2012).

### **3.2.2 Agente etiológico**

La hipótesis actual de la etiología de la caries se basa en la ecología de la placa, donde su equilibrio ecológico se considera un factor clave en la determinación de la susceptibilidad a caries. Para ello resulta fundamental el papel de la dieta rica en carbohidratos, los cuales son metabolizados por bacterias que se encuentran en la placa y secretan productos finales ácidos, lo que resulta en una caída ambiental del pH, que cuando se prolonga por debajo de un pH crítico resulta en una red de disolución de los minerales de la estructura del diente. La relación entre las bacterias de la placa dental y la enfermedad es muy compleja y no sigue el modelo de infección exógena clásico (Sim, Dashper, & Reynolds, 2016). La caries dental se produce como resultado de un cambio en la composición de una comunidad específica de biofilm a la superficie de los dientes. La ingesta frecuente de carbohidratos puede alterar la ecología de esta comunidad por la selección de especies tolerantes a ácidos (acidogénicas), estas comunidades acidogénicas son responsables de la aparición de caries (Struzycka, 2014).

La placa dental contiene numerosas bacterias que fermentan carbohidratos y producen diversos ácidos orgánicos, que disuelven los tejidos dentales duros. En periodos alternos esta pérdida de tejido puede ser contrarrestada por una deposición de minerales de la saliva (“remineralización”). La magnitud relativa de estos dos procesos determina si se produce la destrucción (caries) o la reparación. Para interferir con el inicio o la progresión de la caries dental, diversos agentes han sido desarrollados ya sea para cambiar el equilibrio de fosfato de calcio (remineralización), o interferir con el crecimiento y metabolismo microbiano de la placa dental.

En este contexto, es bien sabido que una dieta rica en sacarosa desempeña un papel crucial en la patogénesis de la caries dental (Arthur et al., 2013; Kreth, Zhu, Merritt, Shi, & Qi, 2008) La sacarosa sigue siendo el azúcar en la dieta más común. Curiosamente, el punto clave responsable de la cariogenicidad de la sacarosa es el hecho de que este carbohidrato es el único sustrato para la síntesis de una matriz derivada de bacterias formada principalmente por polímeros insolubles extracelulares, que alteran las propiedades de difusión del biofilm dental. Además de proporcionar un marco para el crecimiento bacteriano continuo, la presencia de tales polímeros insolubles en la matriz del biofilm se ha asociado con el aumento de la actividad de la caries (Arthur et al., 2013).

Las bacterias asociadas con la caries a menudo han sido descritas como patógenos "oportunistas"; sin embargo se ha sugerido que dado que las bacterias implicadas son residentes, deben ser descritos como no patógenos (Sim et al., 2016). Entre las bacterias del biofilm dental, el *Streptococcus mutans* y especies de *Lactobacillus* se han asociado directamente con la caries dental, ya que toleran ambientes con pH bajo, lo que les confiere una ventaja ecológica en relación con otras bacterias de biofilm dental (Arthur et al., 2013).

*Streptococcus mutans* bajo determinadas circunstancias, puede aumentar en número, iniciando la desmineralización, que finalmente conduce a la caries dental. Su capacidad para aumentar en proporción y bloquear el crecimiento o desplazar a otros miembros de la placa se atribuye a la expresión de la densidad por células y sus propiedades de virulencia, sin embargo la mayoría de los factores de virulencia identificados no se han ligado directamente a su potencial cariogénico (Kreth et al., 2008). Los factores de virulencia son aquellas condiciones o características específicas de cada microbio que lo hacen patógeno. En el caso de *Streptococcus mutans*, los más involucrados en la producción de caries son los indicados en la tabla que se muestra a continuación (Duque de Estrada Riverón et al., 2006).

**Tabla 1. Factores de virulencia de *S. mutans***

<b>FACTORES DE VIRULENCIA</b>	<b>EFFECTOS BIOLÓGICOS</b>
<b>Acidogenicidad</b>	Puede fermentar los azúcares de la dieta para producir ácido láctico como producto final del metabolismo. Esto hace que baje el pH y se desmineralice el esmalte dental
<b>Aciduricidad</b>	Es la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo.
<b>Acidofilicidad</b>	<i>S. mutans</i> puede resistir la acidez del medio bombeando protones (H +) fuera de la célula.
<b>Síntesis de glucano y fructanos</b>	Los glucanos insolubles pueden ayudar a la célula a adherirse al diente y ser usados como reserva de nutrientes
<b>Síntesis de polisacáridos intracelulares</b>	Glucógeno sirve como reserva alimenticia y mantienen la producción de ácido durante largos períodos aún en ausencia de consumo de azúcar
<b>Producción de dextranasa</b>	Esta enzima puede regular la actividad de las glucosiltransferasas removiendo productos finales de glucano

Adaptado de Duque de Estrada Riverón et al. (2006).

En particular, se ha dado una mayor atención a *S. mutans*, demostrando que es la principal bacteria responsable de la síntesis de polímeros insolubles extracelulares utilizando sacarosa como sustrato (Arthur et al., 2013). Los microorganismos orales forman comunidades de biofilm estructuradas y organizadas metabólicamente interactuando con especies que son espacialmente heterogéneas debido a los diversos gradientes físico-químicos desarrollados dentro de las comunidades orales de distintos nichos ecológicos. Estas comunidades del biofilm cambian la composición, estructura y distribución espacial en respuesta dinámica al estrés ambiental (Sim et al., 2016). En la caries, la composición microbiana se desplaza

hacia la enfermedad (disbiosis) donde la diversidad bacteriana disminuye a medida que aumenta la gravedad de la enfermedad, sin embargo la caracterización taxonómica, es insuficiente para evaluar la relación entre la microbiota y el estado de enfermedad. La caracterización de las actividades funcionales de la microbiota oral *in vivo* dará una mayor comprensión de la iniciación y progresión de la caries. Las lesiones de caries han demostrado que albergan una amplia gama de combinaciones de bacterias que es muy variable entre los individuos, entre los diferentes tipos de lesión e incluso entre los mismos tipos (Sim et al., 2016).

### **3.2.3 Dieta altamente cariogénica**

Existen pocas dudas de que el cambio en el estilo de vida de la civilización fue lo que determinó un aumento en la prevalencia de la caries dental, refiriéndose principalmente al incremento en la dieta de alimentos blandos que contienen carbohidratos (azúcar blanca). Existe una estrecha relación entre el consumo de azúcar y la formación de caries. Ciertas características de los alimentos azucarados (consistencia, textura, adhesión) y las condiciones en las cuales son ingeridos, son más importantes como determinantes de su potencial cariogénico que la cantidad de azúcar que ellos contengan (Duque de Estrada Riverón et al., 2006). Los factores que establecen la cariogenicidad potencial de los alimentos azucarados son:

- La consistencia física de la dieta: los alimentos adhesivos son mucho más cariogénicos que los no retentivos. Por ejemplo, una bebida azucarada (tomada rápidamente) es menos cariogénica que lo que es una confitura o un dulce, independientemente de la cantidad de azúcar que ellos contengan.
- Momento de la ingestión: los alimentos azucarados son más peligrosos si son consumidos entre comidas que durante ellas (postres, golosinas, etc.) Esto tiene que ver con los mecanismos de defensa naturales de la boca, que funcionan al máximo durante las comidas y tienden a eliminar los restos de alimentos que quedan en ella y a neutralizar los ácidos (capacidad buffer) que puedan haberse

formado. Por esta razón, el peor momento para ingerir un alimento cariogénico es inmediatamente antes de ir a acostarse, porque la boca se halla casi en reposo completo durante el sueño.

- La frecuencia: tras la ingestión de azúcar se produce a los pocos minutos una reducción del pH de la placa dental que facilita la desmineralización del diente y favorece la caries, por lo que cuanto más frecuentes sean, se vuelven más cariogénicos.

La sacarosa, formada por dos monosacáridos simples: la fructosa y la glucosa; se considera el más cariogénico, no sólo porque su metabolismo produce ácidos, sino porque *S. mutans* lo utiliza para producir glucano, polisacárido extracelular, que le permite a la bacteria adherirse firmemente al diente, inhibiendo las propiedades de difusión de la placa (Núñez & García Bacallao, 2010).

### 3.2.3.1 Bebidas Azucaradas

El riesgo de desarrollar caries dental es mayor si los azúcares son consumidos muy frecuentemente y están en una forma de presentación tal que el alimento queda en la boca durante períodos largos. La sacarosa es el azúcar más cariogénico, ya que permite la formación de glucano, una sustancia que permite una mayor adherencia bacteriana a los dientes y condiciona la difusión de ácido y los buffers en la placa. El consumo frecuente y elevado de bebidas con azúcar y la falta de cepillado dental normal son considerados los factores que más se asocian al desarrollo de caries dental. En adolescentes es importante reducir el consumo elevado y/o frecuente de bebidas azucaradas, pues supone un factor particular asociado al desarrollo de caries en los dientes (González Sanz, González Nieto, & González Nieto, 2013)

Una encuesta de la "Australian National Children's Nutrition y Physical Activity" indicó que el 47% de los niños de 2 a 16 años de edad consumen bebidas azucaradas y el 25% consumían bebidas dulces basándose en la dieta. Existen pruebas

considerables de que el consumo de bebidas azucaradas aumenta el riesgo de caries dental. Los factores de riesgo dietético compartido para la caries dental y la obesidad infantil son el consumo frecuente de carbohidratos refinados y otras bebidas endulzadas. El consumo de las bebidas azucaradas causan la caries dental a través de sus altos niveles de azúcar, que son metabolizados por microorganismos que generan ácido, lo que a su vez desmineralizan al diente. Mientras que los ácidos producidos por este proceso pueden ser neutralizados por el flujo de la saliva, el consumo frecuente de bebidas azucaradas con alto contenido de azúcar reduce la capacidad de la saliva para protegerse contra el ácido resultante (Skinner, Byun, & Johnson, 2015).

#### **3.2.4 Tiempo**

Para que la caries dental se desarrolle necesita la presencia de los factores anteriores y además de un determinado tiempo que puede variar dependiendo de las condiciones bucales del paciente y también de la alimentación a la que el paciente este habituado (Martínez, 2011). La caries se considera una enfermedad crónica debido a que las lesiones se desarrollan durante un largo periodo. El tiempo transcurrido promedio entre el momento en que aparece la caries incipiente y la caries clínica es entre 18 y 6 meses. La placa dental es capaz de producir caries debido a la capacidad ácido génica y acidorresistente de los microorganismos que la colonizan, de tal forma que los carbohidratos fermentables en la dieta no son suficientes, sino que además éstos deben actuar durante un tiempo prolongado para mantener un pH ácido constante a nivel de la interface placa-esmalte (Barrancos Mooney, 2006).

### **3.3 PROCESO EVOLUTIVO DE LA CARIES DENTAL**

La caries dental es una enfermedad infecciosa en la cual los ácidos orgánicos provenientes del metabolismo de los microorganismos orales, empiezan a desmineralizar gradualmente el esmalte dental, seguido por una rápida destrucción

proteolítica de la estructura dental. Esta puede ocurrir en cualquier superficie dental y se presenta en dos fases. En una primera etapa, la materia inorgánica y en una segunda fase se destruirá la matriz orgánica.

### **3.3.1 Caries del esmalte**

El esmalte está constituido por materia inorgánica, agua y materia orgánica (proteínas y lípidos). El esmalte superficial en un espesor de 0.1 a 0.2 mm tiene menos materia orgánica que el esmalte subyacente. Para iniciar el proceso carioso la presencia de carbohidratos fermentables de la dieta no es suficiente, si no que esto deben actuar durante un tiempo bastante prolongado para mantener un pH ácido constante en la interfaz biofilm dental-esmalte. El tiempo de desmineralización del esmalte por la ingesta de carbohidratos se estima aproximadamente que es de unos 20 minutos. Este tiempo es el que requiere para la recuperación de pH por sobre el nivel crítico de la disolución del cristal de apatita. La lesión cariosa es resultado de la desmineralización del esmalte durante la exposición al ácido producido por las bacterias y en esa circunstancia los hidrogeniones del biofilm dental se difunden en el esmalte. El punto crítico para la desmineralización se encuentra en un pH de 5.5 o 5.6. Cuando las bacterias disponen de sustratos adecuados pueden producir este medio ácido mientras prosiguen con su actividad metabólica normal. Si se disminuyen los niveles de carbohidratos ingeridos los microorganismos pueden utilizar polisacáridos de reserva como dextranos y lévanos. Estos son desdoblados por los *Streptococcus* para generar ATP y también producir sustancias ácidas capaces de desmineralizar los cristales de hidroxiapatita y de esta manera comienza el proceso carioso (Loyola Rodríguez, 2012).

#### **3.3.1.1 Mancha Blanca**

La lesión inicial, denominada mancha blanca, es la primera evidencia visible de actividad cariogénica en la superficie del tejido dentario. Esta evidencia es la consecuencia del acúmulo de numerosos episodios de desmineralización y

mineralización. Suele ser observada en fosas y fisuras, superficies proximales cerca del punto de contacto y a lo largo del margen gingival, que son los sitios donde tiende a acumularse la placa dental. Su forma es determinada por la distribución del biofilm y la dirección de los prismas del esmalte. Esta lesión se caracteriza por presentar una superficie de esmalte intacto con un aspecto blanco opaco tras el secado, mostrando al tacto una superficie rugosa y áspera. La evolución de la lesión inicial de caries fue descrita por Chow y Vogel en el 2001, como un mecanismo de desmineralización de los cristales de apatita del diente por difusión de los protones, que va desde los fluidos del biofilm adheridos a la superficie del diente hacia el esmalte interno, provocando un desbalance entre la constante de solubilidad del cristal y la actividad del producto iónico de la solución (Veitía et al., 2011).

La zona de avance de la lesión se encuentra por fuera de la zona oscura con una pérdida de mineral del 1 al 5 %. Si no se prevé un cambio en el medio bucal (higiene, dieta, flúor) que favorezca la remineralización, la dentina se verá más o menos afectada. La morfología dentaria determina las características de la propagación de caries de esmalte, por ejemplo, en las superficies libres se produce una desmineralización en forma de cono truncado con base a la superficie externa.

La difusión de material orgánico a través de los grandes poros característicos de la mancha blanca puede producir un cambio de color y, en este caso, esta lesión se denomina mancha marrón (Barrancos Mooney, 2006).

### **3.3.2 Caries de dentina**

De acuerdo con la localización inicial de la caries de esmalte esta adopta diferentes formas de propagación. Cuando la caries alcanza el límite amelodentinario avanza a un ritmo mayor que en el esmalte. La presencia de los túbulos dentinarios ayuda a que los microorganismos invadan la pulpa con la evolución natural de la enfermedad. Desde el punto de vista clínico las caries dentinarias se pueden presentar como caries dentinaria aguda y caries dentinaria crónica y crónica dentinaria. La primera

tiene un aspecto blanco amarillento y consistencia blanda. La segunda es dura, más resistente y de color amarillo oscuro o marrón (Barrancos Mooney, 2006).

#### 3.3.2.1 Invasión de los conductillos

Luego de extenderse por el límite amelodentinario la caries ataca directamente a los conductillos, en dirección a la pulpa. El proceso se inicia por una desmineralización de la dentina lo que a su vez provoca una reacción de defensa en la parte más alejada del ataque. El avance en dentina tiene lugar a razón de 180 a 200  $\mu\text{m}$  por mes. Mientras no se llegue a una proximidad de la pulpa de 0.75 mm, no se producirán reacciones pulpares importantes. La defensa consiste en una remineralización u obliteración de la luz de los conductos por un precipitado de sales cálcicas. Si el avance hacia la pulpa llega a las cercanías de la cámara pulpar se forma dentina terciaria o de reparación frente al avance de la lesión. Si el ataque continúa sin que los mecanismos de defensa lo afecten, finalmente los ácidos segregados por los microorganismos terminan por desmineralizar toda la sustancia mineral de la dentina primaria, secundaria o terciaria y actúan directamente sobre el tejido pulpar destruyendo los odontoblastos y formando un absceso (Barrancos Mooney, 2006).

#### 3.3.2.2 Zonas de la dentina cariada

En la dentina cariada se encuentran cuatro zonas de degradación basadas en el grado de invasión bacteriana. Estas zonas van del límite amelodentinario hacia la pulpa incluyendo:

- a) Zona superficial, con descalcificación completa, descomposición total de los tubos y la matriz y una alta concentración de microorganismos, especialmente cocos y bacilos.

- b) Zona de descalcificación incipiente, con descomposición parcial y ausencia de túbulos; los microorganismos presentes son bacilos pleomorfos, diplococos y filamentosos.
- c) Zona transparente con obliteración de los túbulos por la calcificación de las fibras. La forma del túbulo cambia de ovoidea a poligonal.
- d) Zona interna con degeneración grasa de las fibras dentinarias con inicio de calcificación.

Además los mismos investigadores, encontraron que en el proceso carioso se suceden: reblandecimiento, cambios de color e invasión bacteriana (Barrancos Mooney, 2006).

### **3.4 DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico comprende la identificación de los signos y síntomas de una enfermedad, el objetivo del diagnóstico de la caries es conocer el grado de avance de la lesión, informar al paciente y establecer las bases del tratamiento (Martínez, 2011). Existen diferencias sustanciales en la forma en que los odontólogos realizan el diagnóstico de las lesiones cariosas. Sin embargo, en los últimos años han comenzado a utilizarse nuevas técnicas que permiten incrementar la posibilidad de detectar las lesiones en estadios más tempranos. Para la detección de la lesión de la caries dental han sido desarrollados diferentes métodos, los cuales difieren en aplicabilidad y precisión de acuerdo a la superficie donde exista la sospecha de lesión, han evolucionado a través del tiempo por la necesidad de ser cada vez más anticipados y eficaces al plantear un posible tratamiento (Veitía et al., 2011).

### 3.4.1 Exploración clínica

Uno de los métodos más utilizados en la profesión ha sido la exploración clínica por su simplicidad y accesibilidad al profesional. Este método es el más convencional se hace con la ayuda de un espejo bucal y un explorador de caries. Los resultados serán diferentes en función del estadio de la enfermedad, pudiendo observarse desde cambios de coloración en las lesiones incipientes (mancha blanca, pigmentaciones pardas, amarillentas etc.) hasta cavidades en esmalte y dentina en lesiones severas (Veitía et al., 2011). El examen podrá incluir:

- Inspección visual: debe realizarse con los dientes limpios y secos. Podrá hacerse directamente o, si se precisa, se podrán utilizar espejos, lentes de aumento e incluso microscopio.
- Inspección visual tras separación dental: se pretende visualizar así las caries interproximales. Es un método muy limitado puesto que en muchas ocasiones la separación que se obtiene no es suficiente y puede resultar molesto para el paciente.
- Exploración táctil con sonda: intenta detectar cavitación o reblandecimiento del esmalte al quedar atrapada la punta del explorador. No es un método muy recomendable porque pueden producirse roturas de esmalte intacto.
- Seda dental: cuando la utilizamos entre dos dientes y se deshilacha es muy probable que exista una cavitación con bordes cortantes. Su uso está indicado para ayudar al diagnóstico de caries cavitadas en las superficies interproximales de los dientes, pero no resulta útil para detectar lesiones incipientes.

### 3.4.2 Exploración radiográfica

Los estudios radiológicos permiten detectar la caries dental debido a que el proceso carioso provoca una desmineralización lo que permite un mayor paso de los rayos X ocasionando una zona más oscura (zona radiolúcida) y puede detectarse en las radiografías (Martínez, 2011). Este es el método auxiliar de diagnóstico el cual efectivamente puede incrementar la sensibilidad del diagnóstico de la caries oclusal. No obstante, la radiografía presenta limitantes en el diagnóstico de caries oclusales, ya que debido a la gran cantidad de esmalte que cubre la dentina de las cúspides vestibulares y linguales, la imagen radiográfica de cualquier desmineralización incipiente es enmascarada disminuyendo la sensibilidad del diagnóstico, debido a esto su uso es recomendado en el caso de lesiones oclusales que hayan llegado a dentina y para verificar o tener una idea de la extensión de la lesión. Puede decirse que, la exploración radiográfica es inexacta para detectar las lesiones incipientes y para determinar la extensión de la caries en profundidad, sin embargo a pesar de sus limitaciones resulta ser muy útil para monitorear las terapias preventivas y para el control de lesiones ya diagnosticadas, contribuyendo a la conservación de la máxima estructura dentaria posible (Veitía et al., 2011).

Existen diferentes tipos de radiografías de acuerdo a las necesidades de diagnóstico que el odontólogo requiera. Las radiografías intraorales permiten identificar lesiones cariosas que de otro modo podrían pasar desapercibidas durante la exploración clínica. A pesar de las limitaciones, la radiografía panorámica y las radiografías periapicales aportan información para el diagnóstico de la caries dental pero el estudio radiológico de elección es la radiografía de aleta de mordida por brindar mayor especificidad, sin embargo al momento de detectar caries oclusal de esmalte y dentina presenta una sensibilidad limitada (Veitía et al., 2011).

#### 3.4.2.1 Radiografía digital

Se realiza con el procesamiento de las imágenes por medios estandarizados, y cuyo uso desde su introducción al mercado por Trophy en 1987, ha aumentado considerablemente. Estas son colocadas en la boca del paciente de manera similar a las convencionales, y se obtiene mediante la captura digital directa de la imagen para convertir los rayos-X directamente a señales electrónicas. Uno de los mayores beneficios que ofrece esta tecnología es el proceso de revelado, ya que, en comparación con la radiografía convencional, las imágenes digitales son obtenidas en fracciones de segundo logrando una diferencia significativa entre la obtención o no de una buena imagen.

#### 3.4.3 Transiluminación

Su uso fue popularizado por Purdell, Lewys y Pot, quienes demostraron en sus estudios de diagnóstico de caries dental con fibra óptica, que la técnica de transiluminación es capaz de identificar lesiones en las superficies proximales posteriores en dentina diagnosticadas radiográficamente, basándose en el hecho de que la lesión cariosa posee la característica de dispersar la luz visible. Este método es especial para la detección de caries interproximales en dientes anteriores, debido a que estos dientes tienen un espesor vestibulo-lingual más reducido. Se lleva a cabo utilizando una luz preferiblemente brillante para iluminar el diente, las caries aparecerán más oscuras ya que la luz es absorbida en mayor cantidad cuando se encuentra una lesión desmineralizada (Veitía et al., 2011).

Este método se realiza con la ayuda de un espejo bucal, a través del tiempo se han ido desarrollando equipos para mejorar la realización de esta técnica, últimamente se ha introducido en la práctica clínica el manejo digitalizado de las imágenes de la Transiluminación con fibra óptica obtenidas mediante una cámara que presenta ventajas sobre la radiología convencional (Martínez, 2011):

- a) No utiliza radiaciones ionizantes permitiendo su uso en pacientes que no deben ser radiados por ejemplo las mujeres embarazadas.
- b) No utiliza películas permitiendo el diagnóstico en tiempo real.
- c) Puede detectar caries incipientes que no pueden ser observadas radiográficamente.

#### **3.4.4 Fluorescencia inducida por láser.**

Fluorescencia es la propiedad de una sustancia para emitir luz cuando es expuesta a radiaciones del tipo ultravioleta, rayos catódicos o rayos X. Este método está basado principalmente en la autofluorescencia del diente dado por el contenido mineral del esmalte, que al ser iluminado con una luz convencional de alta intensidad, (como el neón) o, con luz láser de 488 nm, (que es el método usualmente utilizado), desprende una luz situada en la parte verde del espectro. El principio de este método se basa en el efecto de fluorescencia que ocasiona la incidencia de un rayo de luz con una longitud de onda definida sobre la superficie del diente. La luz que provoca la fluorescencia es generada por un diodo de láser y permite que cualquier lesión pueda ser cuantificada (Hernández Martínez, 2011; Veitía et al., 2011)

#### **3.4.5 Otros métodos de diagnóstico**

Además de los sistemas comercializados y aceptados en la clínica, se han propuesto otros métodos para la detección de la caries, entre ellos se incluyen las técnicas de imagen de multifotón (basada en la microscopía de multifotón, que obtiene imágenes tridimensionales de tejidos vivos), la termografía por infrarrojos (utilizada en otros campos de la medicina), la tomografía óptica de coherencia (OCT) que permite la visualización de las estructuras *in vivo* de una manera similar a los ultrasonidos pero empleando la emisión de ondas de luz en lugar de ondas acústicas; y el proceso de imágenes por impulsos medidos en terahercios (TPI) que detectan cambios de

densidad en los tejidos que no son capaces de detectar los ultrasonidos, los rayos X o la resonancia magnética, y por último la ecodentografía que es la detección de las lesiones mediante ultrasonido (Veitía et al., 2011).

### **3.5 MODELOS DE CARIES DENTAL**

El uso del modelo animal en experimentación biomédica ha incluido roedores (ratones, ratas, hámsteres, jerbos, conejillos de indias y conejos), así como especies filogenéticamente más elevadas (gatos, perros y primates no humanos). Especialmente el uso de ratas y ratones, en el estudio de la caries dental, ha contribuido fundamentalmente a entender su etiología, patogenia, fisiopatología, factores modulantes micromedioambientales, y a su prevención (Bowen, 2013).

La experimentación animal en el estudio de la caries dental se remonta a las publicaciones de McCollum, en 1922, en las que se evaluó el papel de la dieta como factor etiológico. En ese momento no se daba importancia a los microorganismos en su etiología, a pesar de que los resultados de las investigaciones de Kliger y Gies ya la habían sugerido. En sus estudios trata de establecer los grados de fermentación de ciertos carbohidratos, como la glucosa, la lactosa y la sacarosa, como consecuencia de la acción de las bacterias orales sobre esos sustratos, el efecto del mucinato (que él consideraba un componente importante de la saliva) en el crecimiento bacteriano, la acción de las bacterias en este componente y la acción solvente de ciertos microorganismos cuando actúan de manera independiente y conjunta en dientes pulverizados (Jaramillo Gómez et al., 2013).

La relevancia del papel de los microorganismos en el proceso carioso fue definitivamente reafirmada por Orland y sus colaboradores, en 1954, en su artículo “Uso de la técnica de animales abióticos en el estudio experimental de la caries dental”, la importancia que tuvo el modelo animal en sus descubrimientos se refleja en que la flora bacteriana de la boca y más específicamente de la variedad de lesiones es tan compleja que cualquier potencial cariogénico de los microorganismos

está siendo constantemente sometido a influencias modificadoras que se originan en la acción simultánea de algunas o todas las numerosas especies y variedades comúnmente presentes en esta área localizada. La conclusión más importante de este trabajo fue que la caries dental no se genera en ausencia de microorganismos, aun cuando la dieta sea cariogénica. Esta publicación marca un hito en la explicación de la etiología de la caries dental y el uso del modelo animal con un alto grado de refinamiento, responsable en gran parte de los resultados obtenidos. A partir de esta fecha, la investigación en cariología y la utilización del modelo animal ha permitido avances considerables en múltiples áreas, que van desde la evaluación de la importancia de los sustratos bacterianos hasta los últimos avances en inmunización y terapias antimicrobianas (Jaramillo Gómez et al., 2013).

En modelos de animales también se puede realizar un análisis microbiológico de las placas dentobacterianas formadas *in vivo*. Algunos investigadores han desarrollado estrategias para analizar las poblaciones bacterianas viables y la expresión génica a partir del aislamiento del ADN y el ARN de muestras de estas placas, que permiten cuantificar bacterias totales de poblaciones de *S. mutans* y de genes críticos para la virulencia del *S. mutans* como *gtfB* y *gtfC* (glucosiltransferasas B y C). El desarrollo de estas técnicas ha engrandecido el valor del modelo de rata para entender la fisiopatología de la caries dental y abrir el camino para novedosas terapias anticaries. La rata también ha permitido evaluar interrelaciones *in vivo* entre dos especies que colonizan los dientes y su asociación con la caries: el *S. mutans* y el *S. gordonii*.

La evidencia científica permite concluir que el modelo animal, en especial la rata, ha sido fundamental históricamente en el estudio de la caries dental. Estos han permitido establecer la relación de la caries con la presencia de microorganismos en la cavidad oral y la dieta, la influencia de las condiciones sistémicas de un individuo en el avance de esta condición, el desarrollo de terapias antimicrobianas y, en el futuro inmediato su contribución especialmente en lo que tiene que ver con el diseño de terapias para su prevención (Jaramillo Gómez et al., 2013).

### **3.5.1 CARACTERÍSTICAS DEL MODELO EN RATAS**

La rata es uno de los modelos animales más indicados para la investigación en caries, ya que tiene ciertas ventajas como su facilidad de manipulación, un promedio de vida corto y un tamaño dental que facilita las observaciones macroscópicas. Para desarrollar un proceso carioso en estos animales se requieren ciertas características que favorezcan su producción.

#### **3.5.1.1 Selección de los animales**

Las cepas más utilizadas son ratas tipo Wistar, Sprague-Dawley y Osborn Mendel. Aunque cada cepa puede desarrollar distintos niveles de caries (principalmente debido a los diferentes patrones de alimentación), los datos válidos se pueden generar a partir de todas las cepas. Los animales deben estar en buen estado de salud y libre de ectoparásitos (Bowen, 2013).

#### **3.5.1.2 Edad de los animales**

La edad a la que se introducen las ratas al estudio de caries puede tener un efecto profundo en el resultado de cualquier investigación. En general, los animales deben ser expuestos al reto cariogénico alrededor de los 21-22 días de edad, y desde luego no más tarde de 24 días de edad. La susceptibilidad a la infección y el desarrollo de las lesiones de caries disminuye drásticamente con la edad. El número de lesiones y su gravedad disminuye a un nivel que los datos resultantes son difíciles de interpretar. Por ejemplo, la susceptibilidad a la caries dental y de infección disminuye en cerca de un 90% en la edad de 28 días (Bowen, 2013).

#### **3.5.1.3 Género del animal**

En general, las ratas macho desarrollan más lesiones que las hembras; esta diferencia se atribuye a que los machos comen con más frecuencia que las hembras.

#### 3.5.1.4 Dieta

La composición de las dietas cariogénicas han evolucionado a lo largo de décadas muchas dietas a base de maíz (que fracturaron esmalte) contienen niveles elevados de sacarosa. La Dieta NIH de 2000 es probablemente la más comúnmente utilizada en la mayoría de los laboratorios. Contiene 56% de sacarosa y la cantidad de sacarosa se puede reducir para disminuir el reto de caries. Se afirma que las dietas que contienen tan sólo un 5% de sacarosa pueden inducir niveles de caries comparables a los observados en las ratas alimentadas con 56% de sacarosa. Parece que los altos niveles de almidón en estas dietas mejoran la adhesividad de la dieta que sustituye al polisacárido extracelular que se forma a partir de cantidades elevadas de sacarosa. En la gran mayoría de las investigaciones, las dietas son alimentadas *ad libitum*; libre demanda (Bowen, 2013).

### 3.6 ANTECEDENTES

En un estudio se determinó un modelo de caries en ratas y comparó la cariogenicidad de diversos fluidos con que se alimentan frecuentemente bebés y niños pequeños, como la sacarosa, refresco de cola, miel, leche humana, leche de vaca y agua debido a que algunos de éstos se han asociado con el desarrollo de caries de la primera infancia. Los animales recibieron nutrición básica por sonda, y los fluidos que se probaron estaban disponibles a libre demanda. La investigación continuó durante 14 días. Como resultados obtuvieron que el refresco de cola, la sacarosa y miel son los más cariogénicos produciendo una erosión considerable y caries extensas (Bowen & Lawrence, 2005).

Fujinami et al. (2011), elaboraron un diseño experimental de caries en molares superiores de ratas, este consistió en la inoculación vía oral de *Streptococcus mutans* junto con una dieta cariogénica con 58% de sacarosa (Diet 2000) y agua con sacarosa al 10% durante el período experimental. En los días -4 y -2, las ratas fueron

tratadas con tetraciclina (4 mg/g en alimento) y la penicilina G (4000 U/ml en agua), las cuales se administraron para suprimir los organismos de la flora autóctona de las ratas. En los días -1 y 0, las ratas fueron alimentadas con comida y agua libre de antibióticos. Desde el primer día, todas las ratas se infectaron durante 7 días consecutivos con 0.1 ml de una suspensión de células que contiene  $8.7 \times 10^9$  células de *S. mutans* utilizando una pipeta. A los controles se les agregó agua destilada. Se confirmó la existencia y grado de caries, las zonas más afectadas fueron los molares superiores por presencia de caries amplias en comparación con las ratas control.

Baptista et al. (2012), en su estudio desarrollaron un modelo de caries incipiente en ratas para investigar los efectos a corto plazo de la terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDa) sobre la regulación de la microbiota oral y la detención de la desmineralización. Se utilizaron veintinueve ratas machos que fueron sometidas a la inducción de caries. A éstas se les dio una dieta cariogénica (50 g por día) durante el experimento. Para aumentar el reto cariogénico las ratas también recibieron agua con 10% de sacarosa y durante 3 días consecutivos fueron infectados por vía oral con *S. mutans*. Este modelo de caries inducida promovió el desarrollo de lesiones de caries incipientes que fueron confirmados por análisis de tomografía de coherencia óptica.

En el estudio de Metin-Gursoy, Taner, and Akca (2016), se utilizaron doce ratas Wistar macho de 4 meses de edad. Los animales se dividieron al azar en dos grupos de seis ratas cada uno. Todas las ratas se dosificaron mediante alimentación por sonda con amoxicilina (25 mg / kg de rata) durante dos días consecutivos (en los días -4 y -3) a fin de suprimir la flora autóctona de las ratas y que los organismos inoculados pudieran establecerse en la cavidad oral. Después de 2 días, todas las ratas comenzaron a ser alimentados con la galleta suave y agua libre de antibióticos para la inoculación de *S. mutans* (en los días -2 y -1). Además, se realizó una infección vía oral con 0.1 ml de una suspensión con  $6 \times 10^8$  células de *S. mutans* utilizando una micropipeta. Luego se mezcló 1 ml de una suspensión  $6 \times 10^8$  células en la bebida de agua de las ratas en cada jaula y esta bebida mixta era accesible a

las ratas hasta la mañana siguiente. A continuación, esta mezcla de agua se retiró y se sustituyó con agua del grifo. Los animales se encontraban con acceso libre a agua y comida. En los resultados obtenidos en este estudio se mostró mayor lesión de caries en la superficie oclusal de los dientes de las ratas.

En base a lo descrito anteriormente se propuso desarrollar un modelo cuyo objetivo fue estandarizar un modelo de caries en dentina en molares de ratas Wistar

## 4 JUSTIFICACIÓN

La caries dental es una enfermedad infecciosa multifactorial y de carácter crónico de la cavidad bucal, si no se detiene su avance natural puede llegar a afectar los tejidos dentinarios provocando una lesión irreversible. Esta es la enfermedad más común del ser humano pues afecta a la gran mayoría de la población. Debido a la etiología que presenta existen diversos factores que pueden predisponerla tales como la presencia de microorganismos y una dieta alta en carbohidratos.

El uso del modelo animal en su investigación ha permitido profundizar en su entendimiento, impulsar la exploración de nuevas terapias anticaries y establecer políticas de prevención efectivas. En la actualidad existen diferentes modelos de estudio en ratas para provocar caries ya que son de fácil manipulación, tienen un promedio de vida corto y el tamaño dental facilita las observaciones macroscópicas, sin embargo es frecuente que la inducción de la caries requiera manipulaciones experimentales, como la infección por medio de bacterias patogénicas de caries y una dieta altamente cariogénica. Es por ello que surge el interés de estandarizar un modelo de caries en ratas que nos permita determinar un protocolo específico y así provocar lesiones de caries dental que puedan ser utilizadas en un futuro para la evaluación de diferentes tratamientos.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Estandarizar un modelo de caries en dentina en molares de ratas Wistar

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Cultivar y caracterizar bioquímica y molecularmente la cepa de referencia de *S. mutans*.
2. Evaluar de la profundidad del proceso carioso en los diferentes grupos de estudio.
3. Observar histológicamente la presencia del desarrollo de caries dental.
4. Comparar los diferentes grupos de estudio.

## **6 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 LUGAR Y OBTENCIÓN DE LA MUESTRA**

Laboratorios de Inmunología y Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

### **6.2 TIPO DE ESTUDIO**

Estudio experimental *in vivo* comparativo, transversal y prospectivo.

### **6.3 MUESTRA**

#### **6.3.1 Tamaño de la muestra**

Para este estudio se utilizarán 20 ratas macho Wistar de 20 >días de nacidos, divididas en cuatro grupos:

- Grupo 1. Inoculadas con *S. mutans*, dieta cariogénica sacarosa 58% y agua con sacarosa al 10%.
- Grupo 2. Inoculadas con *S. mutans*.
- Grupo 3. Dieta cariogénica 58% y agua con sacarosa al 10%.
- Grupo 4. Grupo control.

## 6.4 METODOLOGÍA

### 6.4.1 Grupos de estudio

Se utilizaron 20 ratas macho tipo wistar las cuales se dividieron en 4 grupos con 5 ratas cada uno. En el grupo 1 se inocularon a las ratas con una concentración de *S. mutans*  $8.76 \times 10^9$ , dieta cariogénica con sacarosa al 58% en comida y 10% en agua durante 7 días. En el grupo 2 solamente se inocularon a las ratas con la concentración de *S. mutans*  $8.76 \times 10^9$  durante 7 días. En el grupo 3 se les colocó una dieta cariogénica con sacarosa al 58% en la comida y sacarosa al 10% en agua durante 15 días. El grupo control solo tuvieron dieta normal *ad libitum* a 15 días.

### 6.4.2 Pruebas de confirmación de *S. mutans*

#### 6.4.2.1 Pruebas bioquímicas

Se recibió una cepa de referencia de *S. mutans* (ATCC 25175) El producto se encontraba en una ampolleta en una consistencia pastosa (liofilizado). Se rasparon las paredes de la ampolleta y se resuspendió en TSB y caldo nutritivo, incubado a 37°C por 48 horas con agitación.

A las 48 horas post-inoculo se hizo una tinción Gram para verificar la especie. En esta tinción se observaron bacterias Gram+ con una morfología de cadenas de cocos

Posteriormente se hicieron las pruebas bioquímicas las cuales coinciden con el Manual de Bergey para *S. mutans*, como descaboxilación (-) de la lisina y ornitina, (+) para glucosa y lactosa; así como (-) a la prueba catalasa, presentándose como un microorganismo anaerobio facultativo (Tabla 2).

Comprobando bioquímicamente que la cepa de *S. mutans* (ATCC 25175) fue la que coincidió con la bacteria a estudiar, por lo que se resuspendió 100 µL de bacteria en

5 ml de medio infusión cerebro corazón, posteriormente se incubó a 37° C por 24 horas con agitación.

**Tabla 2. Pruebas bioquímicas de acuerdo al manual de Bergey**

<b>Prueba</b>	<b>Resultado</b>
Citrato de Simmons	(-)
LIA	(-) descarboxilación lisina (-) ácido
Kliger	(+) glucosa (+) lactosa
MIO	(-) descarboxilación ornitina (-) movimiento
Rojo de metilo	(+)
Malonato	(-)
Rojo de metilo	(+)

(-) Negativo; (+) Positivo.

#### 6.4.2.2 Pruebas moleculares

Se realizó la extracción de DNA de *S. mutans* (ATCC 25175) con sales de litio, se procedió a hacer la cuantificación de DNA para definir concentración y pureza a Abs=260/280. Posteriormente se verificó la integridad del DNA y por último se llevó a cabo la PCR con iniciadores específicos para *S. mutans*.

#### 6.4.3 Preparación del inóculo de *S. mutans*

Se obtuvo una cepa de *S. mutans* (ATCC 25175) la cual fue verificada realizando pruebas bioquímicas y comparando los resultados con el manual de Bergey. Para el

cultivo, la bacteria fue resuspendida en 50 ml de medio de infusión cerebro corazón (BHI) y se incubó a 37° C con agitación durante 24 horas, una vez transcurrido el tiempo, se realizó el ajuste de bacterias a una concentración de  $\sim 1 \times 10^9$ , usando la escala de Macfarland para posteriormente inocular a las ratas.

#### **6.4.4 Preparación de dieta cariogénica**

Se preparó la dieta sólida altamente cariogénica con sacarosa al 58% tomando 420 gramos de comida para rata pulverizada y a esta se le agregó una mezcla de 580 g de azúcar en 200 ml de agua. Se hizo una mezcla pastosa y se llevó a peso seco a 80° C durante 10 horas.

La preparación en el agua con sacarosa al 10% consistió en agregar a 250 ml de agua 25 gramos de azúcar refinada y se calentó hasta que se diluyera completamente, la solución final se colocó en un biberón el cual estaba al alcance de las ratas *ad libitum*.

#### **6.4.5 Inoculación del *S. mutans*, dieta cariogénica 58% y agua con sacarosa al 10%**

Una vez que las ratas cumplieron con la edad adecuada, se dividieron las 20 ratas al azar en cuatro grupos diferentes con 5 ratas cada uno. A los 17 y 18 días de nacidas las ratas fueron tratadas con tetraciclina (4 mg / g como alimento) y la penicilina G (4000 U / ml como agua) para suprimir la flora residente de microorganismos. A los días 19 y 20 de nacidas se les retiró la comida y agua que contenía antibiótico y se colocó agua y comida de su dieta normal (Fujinami et al., 2011).

En el día 21 de nacidas se inició la fase experimental la cual consistió en lo siguiente: En el grupo 1 de la concentración obtenida se tomaron 100  $\mu$ L de la bacteria ajustada para una concentración final de  $8.76 \times 10^9$  de células de *S. mutans* con una pipeta pasando esta e introduciéndola en los dientes de las ratas, este procedimiento se

repitió durante 7 días. Además, a este grupo se le agregó sacarosa al 10% en su agua. Por último, también se le agregó una dieta altamente cariogénica con sacarosa al 58% *ad libitum* y se llevó un control en cuanto al peso de la comida y el agua.

En el grupo 2: se inocularon a las ratas con 100  $\mu\text{L}$  con  $8.76 \times 10^9$  de *S. mutans* durante 7 días.

En el grupo 3: se agregó su dieta con sacarosa al 58% y agua con sacarosa al 10% *ad libitum* durante 15 días.

En el grupo 4: grupo de control se le colocó solo agua y comida normal *ad libitum* durante 15 días (Fujinami et al., 2011)

#### **6.4.6 Sacrificio animal**

Al cumplir el periodo de la fase experimenta se inició el sacrificio de las ratas en una cámara de solventes que contenía cloroformo. Una vez sacrificadas a las ratas se les extrajeron las mandíbulas, se seccionaron por la mitad con una hoja de bisturí y la mitad de la mandíbula se colocó en un tubo falcon que contenía EDTA al 10% para su evaluación histológica con su respectiva identificación, la otra mitad de la mandíbula se colocó en formalina al 10% para su evaluación con tinción de caries y posteriormente se observó en el estereoscopio.

#### **6.4.7 Evaluación con tinción de caries**

Se tomaron las mandíbulas de cada rata y se limpiaron, posteriormente se secaron y se colocaron en el estereoscopio para tomar fotografías antes de la tinción. Luego se les colocó el detector de caries Sable Seek (marca comercial) según las instrucciones del fabricante, se dejó un minuto la tinción en las caras oclusales, posteriormente se lavó abundantemente con agua corriente. Después se secaron

nuevamente y se colocaron en el estereoscopio para su evaluación. Las mandíbulas se conservaron en formalina al 10%.

#### **6.4.8 Evaluación histológica**

Para facilitar la sección del tejido, las muestras fueron sometidas a un proceso de desmineralización utilizando EDTA al 10% por 7 a 15 días (el tiempo dependerá del nivel de descalcificación de la muestra), después se deshidrató la muestra utilizando diferentes concentraciones de etanol hasta llegar al etanol absoluto y xileno al 100% y después fueron incluidas en bloques de parafina y cortadas en secciones de 5  $\mu$ m con ayuda de un micrótopo (Leica RM2125). Las muestras fueron desparafinizadas y teñidas con H&E para evaluar la composición de tejido. Posteriormente se llevaron al microscopio (NIKON Y5100) para observar el proceso carioso.

### **6.5 LUGAR DE REALIZACIÓN**

Laboratorios de Inmunología y Microbiología Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

### **6.6 FINANCIAMIENTO**

Aportaciones de una beca CONACYT

### **6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó el análisis estadístico correspondiente ANOVA de una sola vía de los pesos iniciales y finales de cada grupo tomando como valor de significancia una  $p < 0.05$ , con el paquete estadístico IBM SPSS v20

## 7 RESULTADOS

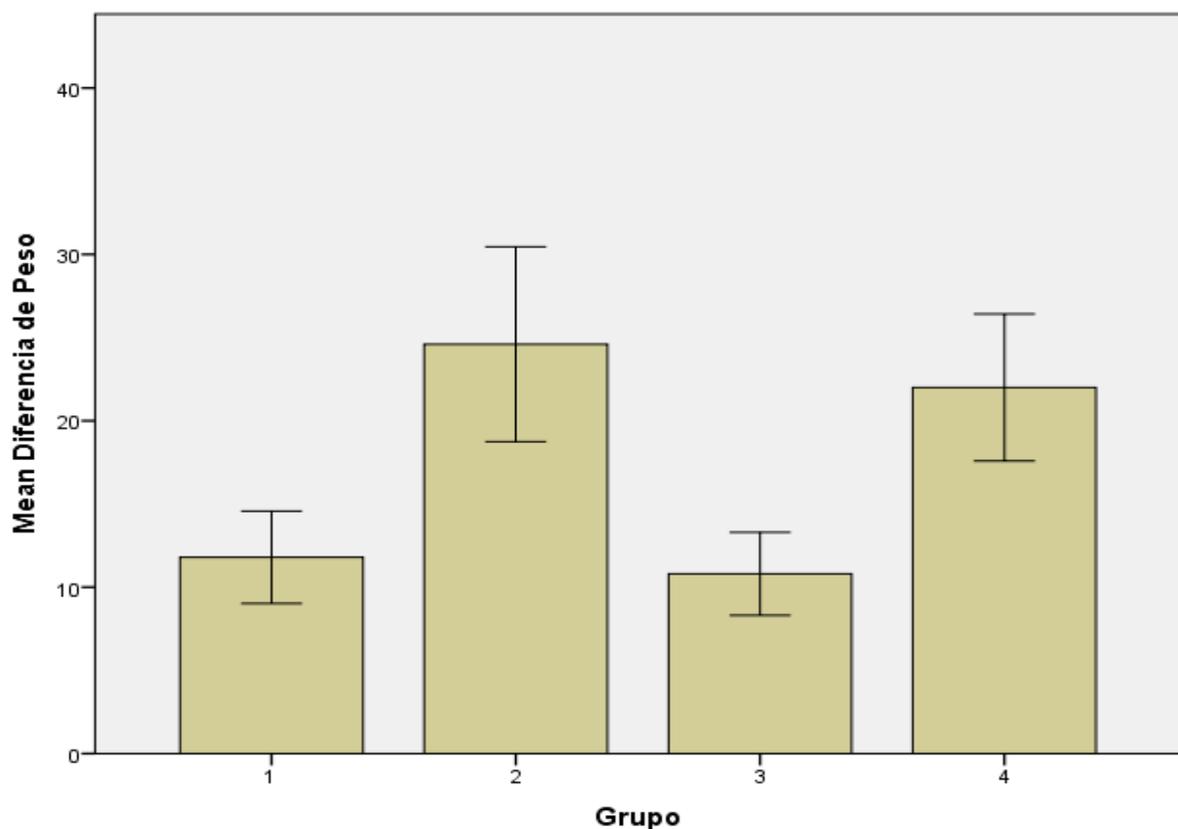
### 7.1 Comparación de pesos

En el análisis estadístico entre los grupos en relación a diferencia de peso, arrojó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo 2 ( $25 \pm 6$  g) con el grupo 1 ( $12 \pm 3$  g) y 3 ( $11 \pm 2$  g). Al igual que hay una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo 4 ( $22 \pm 4$  g) con el grupo 1 ( $12 \pm 3$  g) y 3 ( $11 \pm 2$  g) (Grafica 1) bajo la prueba estadística de t student con un valor de  $p < 0.05$ .

También se analizó el promedio de la ganancia de peso de las ratas bajo la prueba de ANOVA de un factor la cual muestra que fue estadísticamente significativa más alto en el grupo 2 ( $25 \pm 6$  g) en relación con los demás grupos (Tabla 3Tabla 4, Anexo 1).

Por otra parte, en cuanto al consumo de agua el análisis arrojó un consumo de agua considerable entre los diferentes grupos manteniendo un consumo entre los 100 ml para los grupos 1, 3 y 4 y más de 200 ml para el grupo 2 (Grafica 2, Tabla 5). Se puede observar un aumento en el consumo de agua para el grupo 1 y el grupo 3, mientras que los grupos 2 y 4 reducen su consumo con el paso del tiempo. En promedio las ratas que consumieron la menor cantidad de agua corresponden al grupo 3 con  $83 \pm 15$  mL, y siendo el grupo de mayor consumo el 2 con  $220 \pm 26$  mL, con diferencias estadísticas de este frente a los otros grupos (Grafica 3, Tabla 6, Anexo 2)

En el consumo de la comida los datos presentaron un aumento en el consumo de comida en todos los grupos, el grupo 3 fue el que menos alimento consumió y su consumo se mantuvo en los siguientes días (Grafica 4, Tabla 7). El consumo promedio mínimo fue del grupo 3 con  $44 \pm 10$  g y el máximo fue del grupo 2 con  $101 \pm 30$  g, sin diferencias significativas por T student o ANOVA de un factor (Grafica 5, Tabla 8, Anexo 2).



**Grafica 1. Promedio de la diferencia de pesos.**

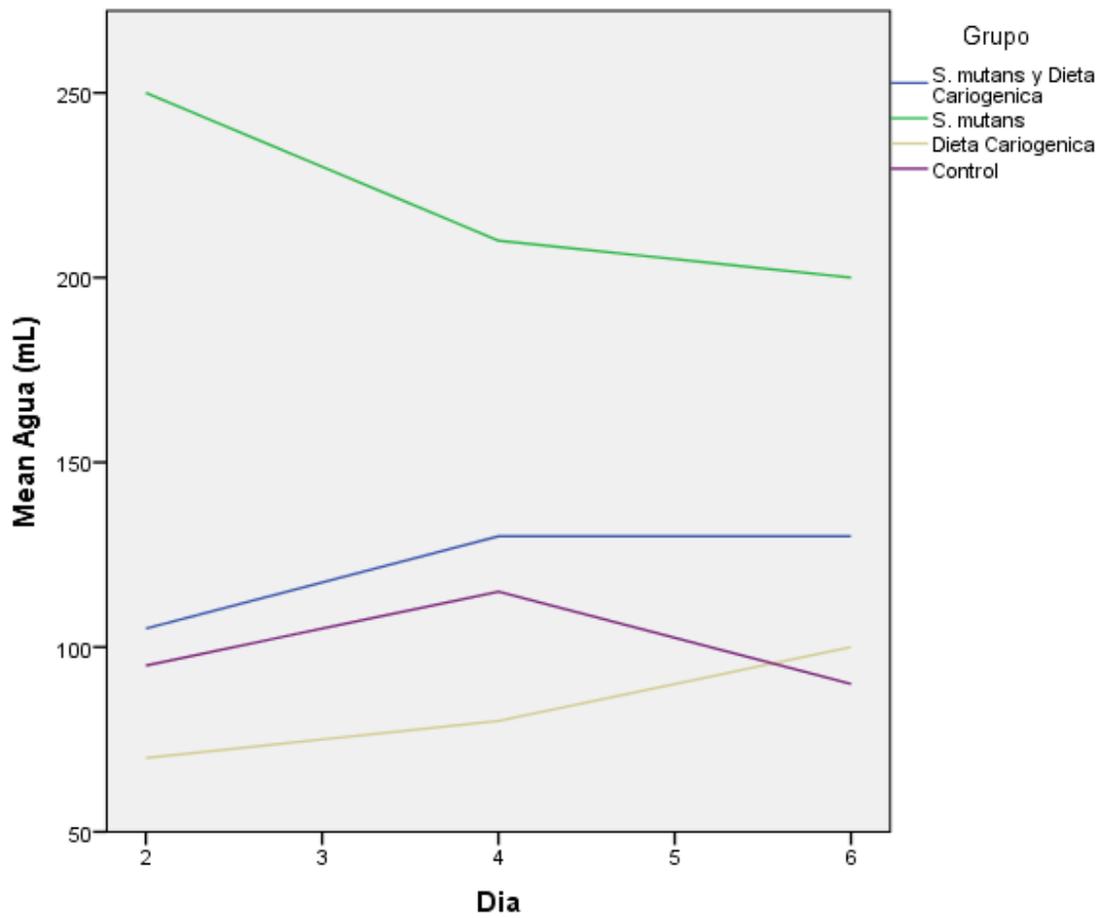
**Tabla 3. Ganancia de peso de las ratas**

<b>GRUPO</b>	<b>PROMEDIO (g)</b>	<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>
<b>1</b>	12 <sup>a</sup>	3
<b>2</b>	25 <sup>b</sup>	6
<b>3</b>	11 <sup>a</sup>	2
<b>4</b>	22 <sup>b</sup>	4

Superíndices diferentes indican una diferencia estadística de  $p < 0.05$  entre los grupos

**Tabla 4. Significancias de ANOVA de un factor para la diferencia de peso**

Grupo	1	2	3	4
1		9.24E-04	1.00E+00	7.32E-03
2	9.24E-04		4.28E-04	1.00E+00
3	1.00E+00	4.28E-04		3.27E-03
4	7.32E-03	1.00E+00	3.27E-03	

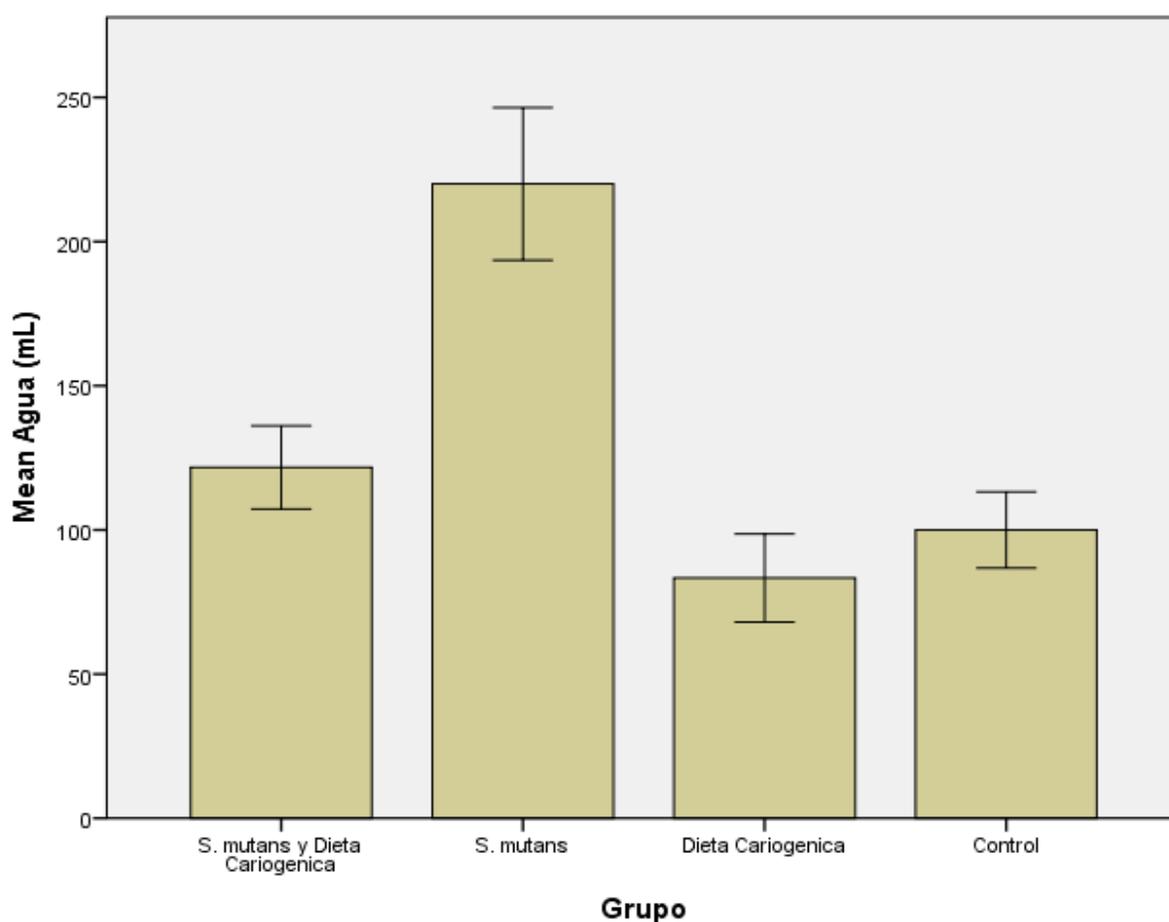


**Grafica 2. Consumo de agua diario por grupo.**

**Tabla 5. Consumos de agua por grupo.**

<b>GRUPO</b>	<b>PROMEDIO (mL)</b>	<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>
<b>1</b>	122 <sup>a</sup>	14
<b>2</b>	220 <sup>b</sup>	26
<b>3</b>	83 <sup>a</sup>	15
<b>4</b>	100 <sup>a</sup>	13

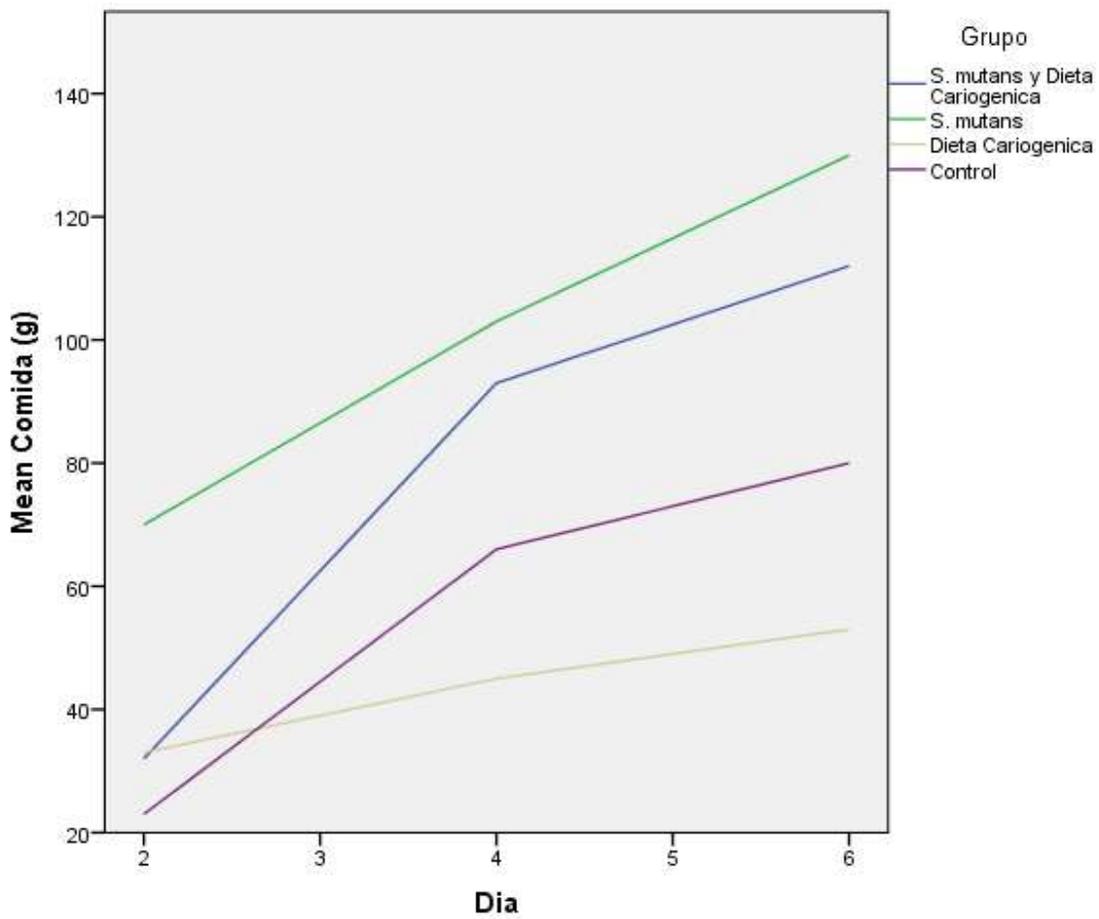
Superíndices diferentes indican una diferencia estadística de  $p < 0.05$  entre los grupos



**Grafica 3. Consumo de Agua promedio por grupo.**

**Tabla 6. Significancias de ANOVA de un factor para el consumo de agua**

Grupo	1	2	3	4
1		9.77E-04	1.93E-01	1.00E+00
2	9.77E-04		9.26E-05	2.39E-04
3	1.93E-01	9.26E-05		1.00E+00
4	1.00E+00	2.39E-04	1.00E+00	

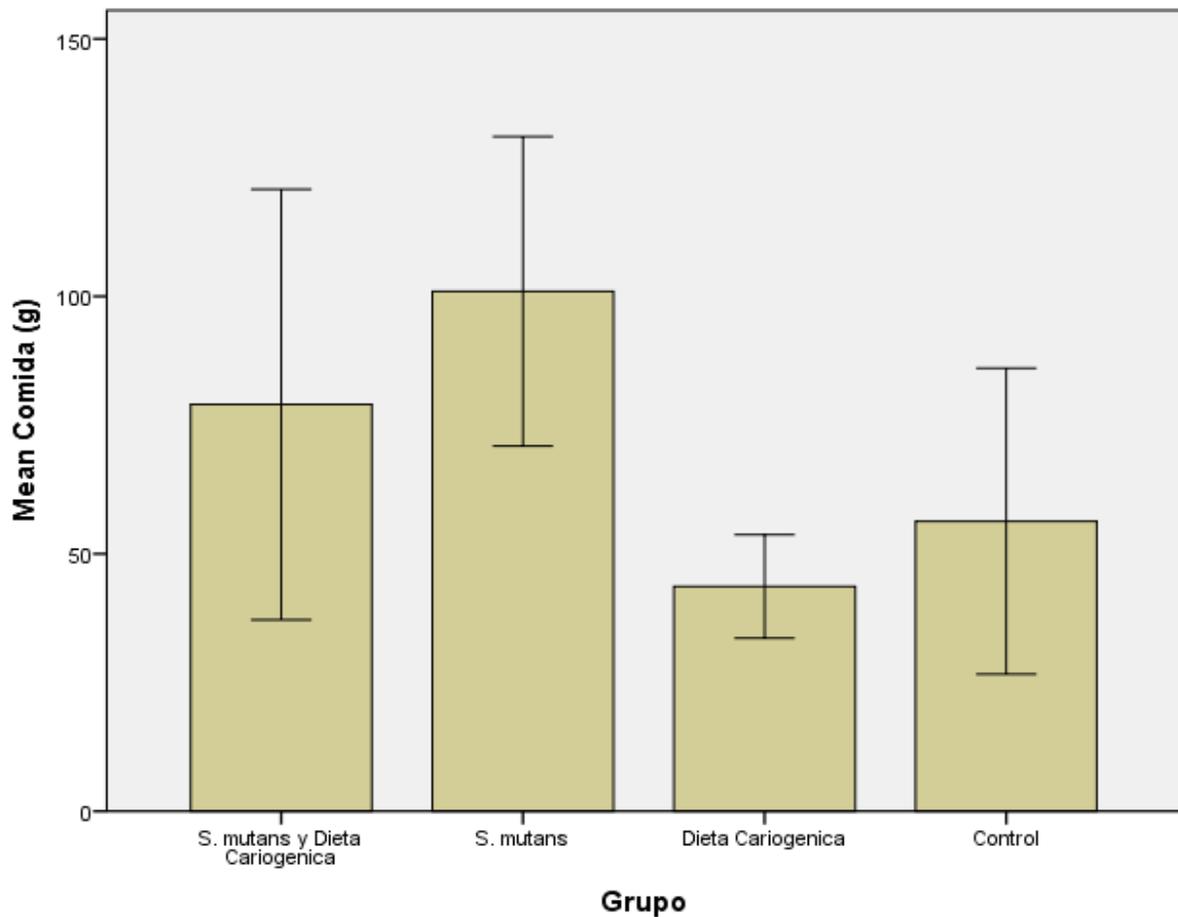


**Grafica 4. Consumo de comida diario por grupo.**

**Tabla 7. Consumos de comida por grupo.**

<b>GRUPO</b>	<b>PROMEDIO (g)</b>	<b>DESVIACIÓN ESTÁNDAR</b>
<b>1</b>	79 <sup>a</sup>	42
<b>2</b>	101 <sup>a</sup>	30
<b>3</b>	44 <sup>a</sup>	10
<b>4</b>	56 <sup>a</sup>	30

Superíndices diferentes indican una diferencia estadística de  $p < 0.05$  entre los grupos



**Grafica 5. Consumo de comida promedio por grupo.**

**Tabla 8. Significancias de ANOVA de un factor para el consumo de alimento.**

<b>Grupo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>1</b>		1.00E+00	1.00E+00	1.00E+00
<b>2</b>	1.00E+00		2.89E-01	6.42E-01
<b>3</b>	1.00E+00	2.89E-01		1.00E+00
<b>4</b>	1.00E+00	6.42E-01	1.00E+00	

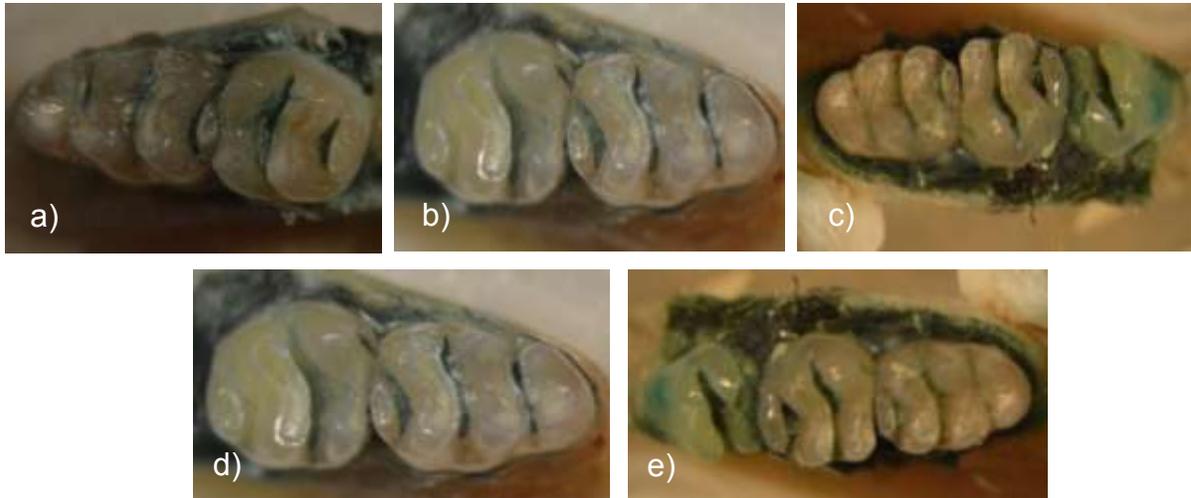
## **7.2 Macroscópicos**

En el grupo 1 inoculado con una concentración de *S. mutans* y dieta cariogénica durante 7 días se puede observar en las diferentes mandíbulas de rata grados de desmineralización del tejido. En las caras oclusales la tinción logró penetrar en algunos de los surcos y teñir el tejido desmineralizado (Figura 1).

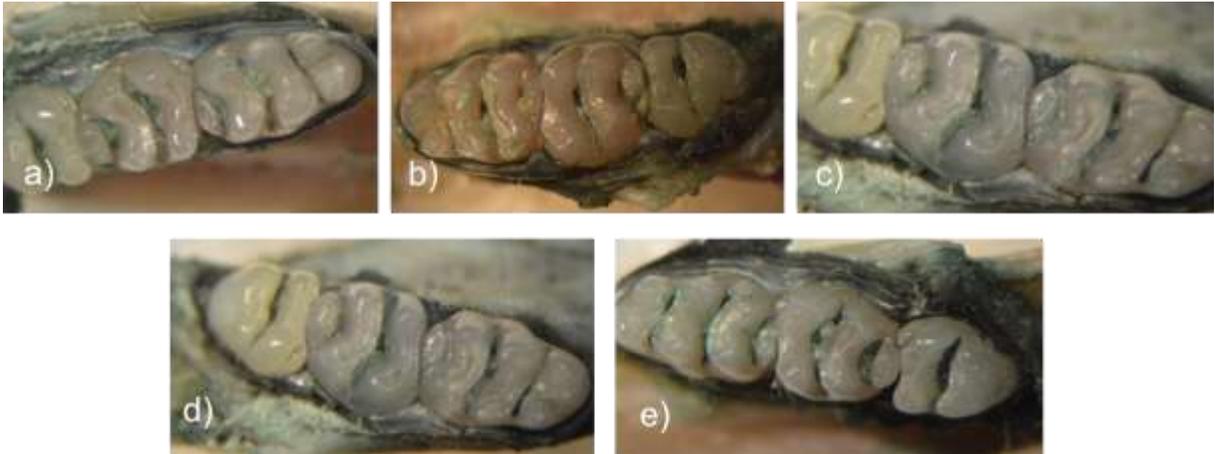
En el grupo 2 a los 7 días, en los dientes de las diferentes mandíbulas se observó tejido desmineralizado pero la tinción no logró penetrar todo lo largo de los surcos y en comparación con el grupo 1 la tinción es menos evidente observándose desmineralizaciones superficiales (Figura 2).

En el grupo 3, en el cual solo se dio la dieta cariogénica a 15 días de fase experimental, se observó en los diferentes dientes del grupo un grado de desmineralización más profundo, haciéndose notar la tinción más oscura a lo largo de los surcos pero también una profundidad más marcada que los grupos anteriores (Figura 3).

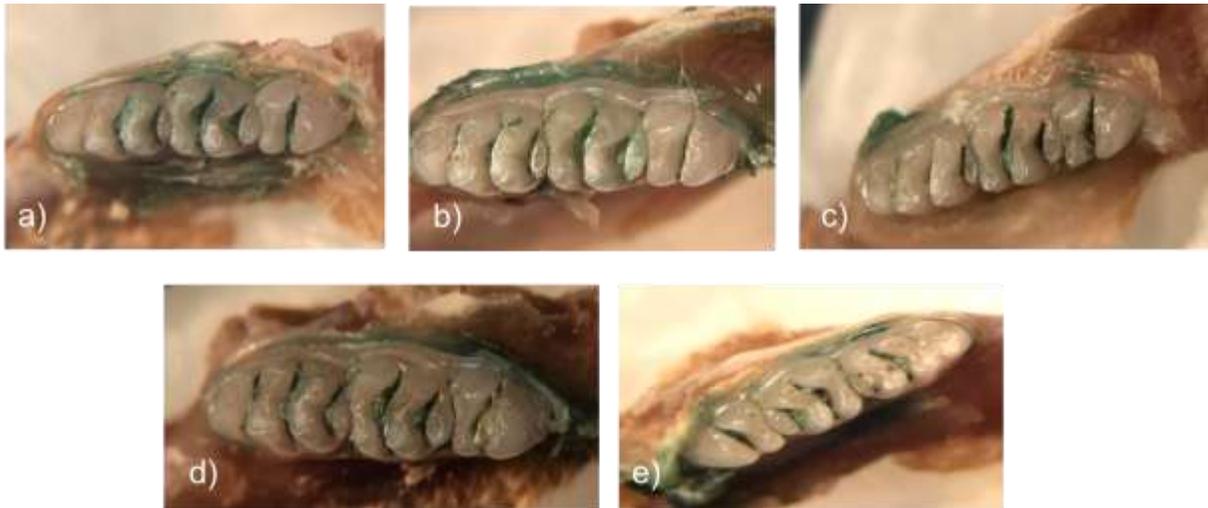
En los dientes de las diferentes mandíbulas del grupo 4, que fue el grupo control a 15 días se alcanza a observar como la tinción se observa más tenue y solo algunas partes de los surcos se logran teñir apreciando un diente más íntegro en comparación de los demás grupos, solo se observan desmineralizaciones superficiales (Figura 4).



**Figura 1. Tinciones cariogénicas del grupo 1.** a) Se observa los surcos con la tinción. b) md en donde se observa en un surco de la cara oclusal. c) Tinción de un solo surco de 3molar. d) No se observa tinción oscura. e) Se observa la tinción en solo dos molares.



**Figura 2. Tinciones cariogénicas grupo 2.** a) no se observa la tinción en este md. b) solo se observan un punto de tinción c) no se observa tinción oscura. d) solo se observa puntos de tinción en los surcos del primer molar e) se observa tinción profunda en el surco del tercer molar.



**Figura 3. Tinciones cariogénicas grupo 3.** a) Se observa la tinción a lo largo de los surcos b) solo se pigmento el surco del segundo molar c) se alcanza a observar en el segundo y tercer molar profundidad del surco producto de la tinción Sable Seek. d) se observa la tinción a lo largo de los surcos de la mandíbula. e) Se observa tinción y profundidad del surco.



**Figura 4. Tinciones cariogénicas grupo 4.** a) Se observa tinción en un surco del segundo molar b) no se observa tinción oscura en los surcos de la mandíbula. c) no se observa la tinción en la mandíbula. d) se observa la tinción en el surco del segundo molar e) se alcanza a distinguir un tono más oscuro a la mitad del surco del segundo molar.

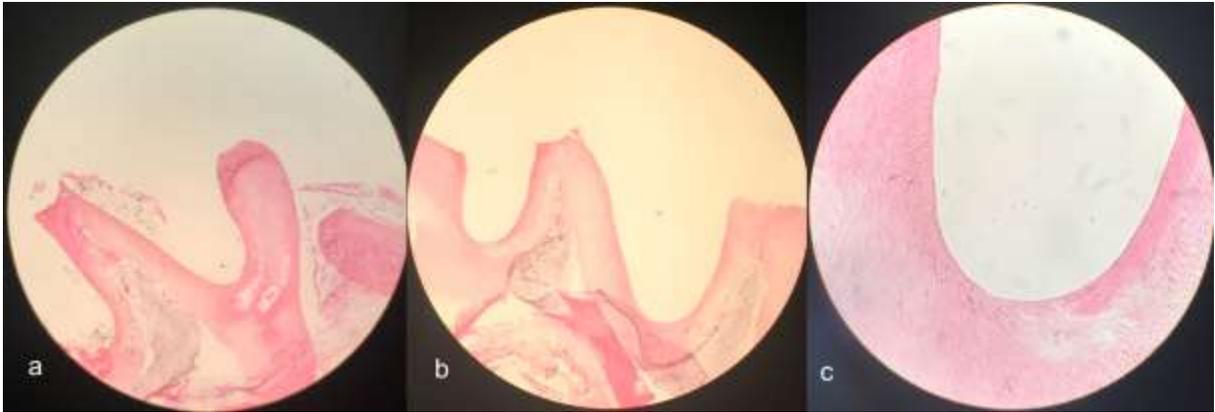
### 7.3 Microscópicos

En los resultados histológicos del grupo 1 a los 7 días, las imágenes microscópicas a una amplificación de 4x muestran la anatomía del molar íntegra en sus surcos y solo un poco de desgaste en las cúspides. A una magnificación de 10X, se observa el surco sin cambios aparentes. A 40X se observa la continuidad de la dentina a lo largo del surco (Figura 5).

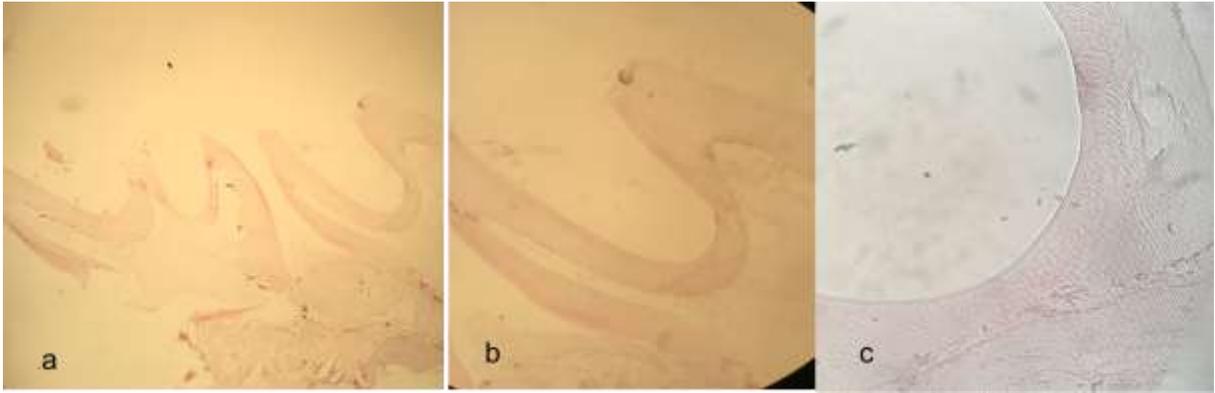
Los resultados del grupo 2 a los 7 días, a una magnificación de 4X muestran una vista panorámica de los molares seccionados, se alcanzan a apreciar los surcos intactos sin deficiencias en la dentina. A 10X se observa el surco íntegro sin ningún proceso de desmineralización. A una magnificación de 40X fue evidente la continuidad del surco por lo que no se puede asociar a tejido desmineralizado (Figura 6).

En el grupo 3 que fue a base de dieta cariogénica en un periodo de 15 días, en la magnificación de 4X se logró observar como hay una depresión a nivel de un surco del segundo molar. En una visualización con mayor aumento a 10X se puede apreciar más el defecto y la pérdida de continuidad del surco. En la magnificación a 40X se observa el defecto en la dentina con la pérdida de continuidad del surco producto del tejido desmineralizado por caries (Figura 7).

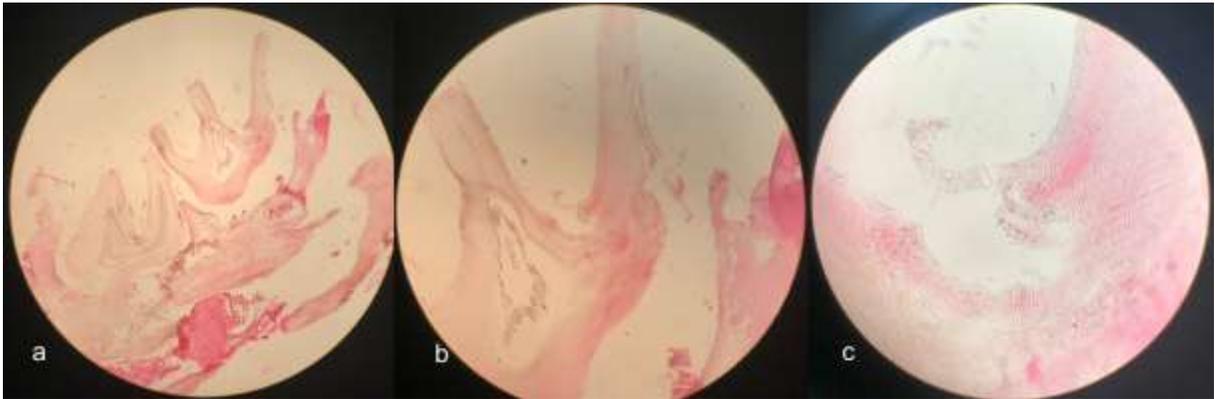
Por último, el grupo control en un periodo de 15 días, mostró una anatomía normal aparentemente sin daños en la dentina a una magnificación de 4X. En una ampliación de 10X se puede apreciar más la anatomía del surco sin defecto en la dentina. Y en una ampliación mayor a 40x se observa como los túbulos dentinarios están intactos conservando la integridad del surco de los molares de las ratas (Figura 8).



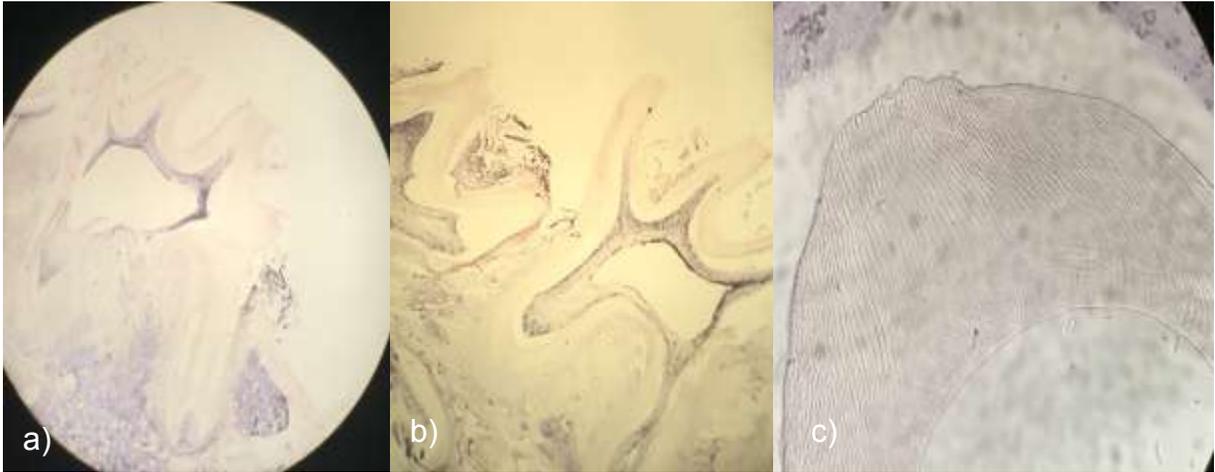
**Figura 5. Imágenes histológicas de tinción de H y E del grupo 1. a) A una magnificación 4X, b) 10X y c) 40X**



**Figura 6. Imágenes histológicas con tinción de H y E del grupo 2. a)** Magnificación a 4x, b) Magnificación a 10X y c) Magnificación a 40X.



**Figura 7. Imágenes histológicas con tinción de H y E del grupo 3. a) Vista panorámica de los dientes 4X, b) Defecto en el surco del segundo molar a magnificación de 10X, c) Pérdida de la continuidad del surco y defecto de la dentina provocado por caries.**



**Figura 8. Imágenes histológicas con tinción de H y E del grupo 4.** a) Visualización a 4x, b) muestra una ampliación a 10X con una anatomía aparentemente normal del molar de la rata, c) se observa como el surco se encuentra íntegro, sin defectos en la dentina a 40X.

## 8 DISCUSIÓN

Al analizar los resultados del modelo experimental que llevamos a cabo y evaluar los resultados macroscópicos de las muestras de cada una de las ratas de los diferentes grupos de estudio, tuvimos dificultades para determinar la profundidad exacta de las caries, ya que los molares de las ratas tienen dimensiones minúsculas por lo que su visualización a simple vista requería de una tinción que nos permitiera observar el tejido desmineralizado junto con la ayuda de magnificación. En estos resultados macroscópicos observamos que existe una relación de caries en diferentes niveles, observándose más tejido desmineralizado en los dientes de los grupos asociados a la inoculación de *S. mutans* como también a los grupos que contenían una dieta altamente cariogénica. La evaluación macroscópica del grupo control, mostró que los molares de las ratas se encontraban íntegros por lo que podemos asociar que donde se produjo más tejido desmineralizado fue en los grupos con bacteria y dieta cariogénica.

En los resultados microscópicos, donde solo un grupo presentó un defecto de la dentina producto de la caries fue en el grupo 3, quedando los demás grupos con la anatomía intacta de los surcos solo presentaban un poco de desgaste en las cúspides de los molares pudiendo asociar que es un desgaste normal de las ratas por la fricción. Es importante hacer notar que en el grupo 1, que también recibió una dieta cariogénica e inoculación de *S. mutans* y donde se esperaba la presencia de caries, no fue así y lo asociamos a un factor muy importante el tiempo, ya que el tiempo del grupo 1 fue 7 días y mientras que el grupo 3 a 15 días de fase experimental. Confirmándose que existe una correlación entre los factores más importantes para que se desarrolle un proceso de caries como tal, el huésped, el agente, el sustrato y el tiempo.

Nuestros resultados concuerdan con los expuestos por Fujinami et al. (2011), quienes elaboraron un diseño experimental de caries en molares superiores de ratas, éste consistió en la inoculación vía oral de *S. mutans* junto con una dieta cariogénica

con 58% de sacarosa (dieta 2000) y agua con sacarosa al 10% durante 7 días. A los controles se les agregó agua y comida normal. Se confirmó la existencia de caries y las zonas más afectadas fueron los molares superiores por presencia de caries más amplias en comparación con las ratas del grupo control.

Al igual que Baptista et al. (2012), reafirmamos que es difícil poder medir a simple vista una descalcificación del tejido producto de la caries por lo que es importante tener medidas auxiliares de diagnóstico que nos permitan distinguir el tejido mineralizado del no mineralizado. En su estudio desarrollaron un modelo de caries incipiente en ratas para investigar la detención de la desmineralización. Este modelo de caries promovió el desarrollo de lesiones de caries incipientes que fueron confirmados por análisis de tomografía de coherencia ya que a simple vista era difícil observar caries incipiente o mancha blanca.

Nuestros resultados son contrarios a lo observado por Yoko Fukuzato (2009), quienes diseñaron un modelo experimental en ratas WBN en el cual describen que existen ciertos tipos de cepa animal que no necesitan una dieta cariogénica ni la infección bacteriana para provocar caries en un modelo animal. Ellos utilizaron ratas de dos cepas diferentes y les proporcionaron una dieta normal de laboratorio con la cantidad de azúcar normal, aun así, lograron provocar tejido desmineralizado solo en surcos de los molares pero a la edad de 3 meses y medio. Nosotros consideramos que se requiere de esos dos factores importantes para poder potencializar el proceso de caries y sin relación a ellos es demasiado tiempo para la fase experimental de una rata y el estudio podría tener otras variables.

## 9 CONCLUSIONES

Se lograron generar grados de desmineralización del esmalte como una caries inicial en ratas Wistar macho a los 7 días, inoculando *S. mutans* y una dieta cariogénica.

Se desarrolló un modelo de caries en dentina en ratas macho wistar a los 15 días, solo con dieta cariogénica.

Estos modelos de estudio permiten evaluar técnicas para futuros tratamientos que nos ayuden a eliminar la caries en ratas.

## 10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arthur, R. A., Waeiss, R. A., Hara, A. T., Lippert, F., Eckert, G. J., & Zero, D. T. (2013). A Defined-Multispecies Microbial Model for Studying Enamel Caries Development. *Caries Res.* doi: 10.1159/000347050
- Baptista, A., Kato, I. T., Prates, R. A., Suzuki, L. C., Raele, M. P., Freitas, A. Z., & Ribeiro, M. S. (2012). Antimicrobial Photodynamic Therapy as a Strategy to Arrest Enamel Demineralization: A Short-Term Study on Incipient Caries in a Rat Model. *Photochemistry and Photobiology*, 88(3), 584-589. doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.01059.x
- Barrancos Mooney, J. (2006). *Operatoria dental : integración clínica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamerica.
- Bowen, W. H. (2013). Rodent model in caries research. *Odontology*, 101(1), 9-14. doi: 10.1007/s10266-012-0091-0
- Bowen, W. H., & Lawrence, R. A. (2005). Comparison of the cariogenicity of cola, honey, cow milk, human milk, and sucrose. *Pediatrics*, 116(4), 921-926. doi: 10.1542/peds.2004-2462
- Duque de Estrada Riverón, J., Pérez Quiñonez, J. A., & Hidalgo-Gato Fuentes, I. (2006). Caries dental y ecología bucal, aspectos importantes a considerar. *Revista cubana de estomatología*, 43(1), 0-0.
- Fujinami, Y., Nakano, K., Ueda, O., Ara, T., Hattori, T., Kawakami, T., & Wang, P.-L. (2011). Dental caries area of rat molar expanded by cigarette smoke exposure. *Caries Research*, 45(6), 561-567.

- González Sanz, A. n. M., González Nieto, B. A., & González Nieto, E. (2013). Salud dental: relación entre la caries dental y el consumo de alimentos. *NUTRICION HOSPITALARIA*, 28, 64-71.
- Hernández Martínez, M. (2011). *Aislamiento y cuantificación de streptococcus mutans en saliva en niños de la escuela primaria federal "Ignacio Ramírez"*. Universidad Veracruzana.
- Iguarán Jiménez, I. I. (2012). *Factores Biologicos Asociados a la Caries Dental*. Universidad de Guayaquil, Guayaquil.
- Jaramillo Gómez, L. M., Roa Molina, N. S., Chaves, M., & Durán, C. (2013). Use of Rats and Mice for the Study of Dental Caries. *Univ Odonto*.
- Kreth, J., Zhu, L., Merritt, J., Shi, W., & Qi, F. (2008). Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiology Immunology*.
- Lee, Y. (2013). Diagnosis and Prevention Strategies for Dental Caries. *Journal of Lifestyle Medicine*, vol. 3.
- Loyola Rodríguez, J. P. (2012). *Caries Dental*
- Martínez, M. H. (2011). *Aislamiento y cuantificación de streptococcus mutans en saliva en niños de la escuela primaria federal "Ignacio Ramírez"*. Universidad Veracruzana.
- Metin-Gursoy, G., Taner, L., & Akca, G. (2016). Nanosilver coated orthodontic brackets: in vivo antibacterial properties and ion release. *Eur J Orthod*. doi: 10.1093/ejo/cjv097
- Núñez, D. P., & García Bacallao, L. (2010). Bioquímica de la caries dental. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*.

- Sim, C. P., Dashper, S. G., & Reynolds, E. C. (2016). Oral microbial biofilm models and their application to the testing of anticariogenic agents. *J Dent.* doi: 10.1016/j.jdent.2016.04.010
- Skinner, J., Byun, R., & Johnson, G. (2015). Sugary drink consumption and dental caries in New South Wales teenagers. *Australian dental journal*, 60(2), 169-175.
- Struzycka, I. (2014). the oral microbiome in dental caries. *Polish Journal of Microbiology*, 63.
- Veitía, L. D., Acevedo, A. M., & Sánchez, F. R. (2011). Métodos convencionales y no convencionales para la detección de lesión inicial de caries. Revisión bibliográfica. *Acta Odontológica Venezolana*, 49.
- Yoko Fukuzato, T. M., Kiyokazu Ozaki, Masahiro Matsuura, Tomoya Sano, Yutaka Nakahara, Yasushi Kodama, Akihito Nakagawa, Sumie Okamura, Hirohisa Suido, Kayo Torii, Taketoshi Makino and Isao Narama. (2009). Morphological study on dental caries induced in WBN/KobSlc rats (*Rattus norvegicus*) fed a standard laboratory diet. *Laboratory Animals*, 43, 376–381. doi: 10.1258

## 11 ANEXOS

### 11.1 ANOVA de un factor para la Diferencia de Pesos

	Suma de Cuadrado	GL	Media de Cuadrado	F	Sig.
<b>Intragrupos</b>	739.400	3	246.467	14.562	.000
<b>Intergrupo</b>	270.800	16	16.925		
<b>Total</b>	1010.200	19			

GL: Grados de Libertas; F: Valor de F de la Prueba; Sig.: Significancia.

#### Prueba Post Hoc "Bonferroni"

(I) Grupo		Diferencia Promedio (I-J)	Error Estandar	Significancia	Intervalo de Confianza 95%	
					Límite Inferior	Límite Superior
1	2	-12.800*	2.602	9.24E-04	-20.63	-4.97
	3	1.000	2.602	1.00E+00	-6.83	8.83
	4	-10.200*	2.602	7.32E-03	-18.03	-2.37
2	1	12.800*	2.602	9.24E-04	4.97	20.63
	3	13.800*	2.602	4.28E-04	5.97	21.63
	4	2.600	2.602	1.00E+00	-5.23	10.43
3	1	-1.000	2.602	1.00E+00	-8.83	6.83
	2	-13.800*	2.602	4.28E-04	-21.63	-5.97
	4	-11.200*	2.602	3.27E-03	-19.03	-3.37
4	1	10.200*	2.602	7.32E-03	2.37	18.03
	2	-2.600	2.602	1.00E+00	-10.43	5.23
	3	11.200*	2.602	3.27E-03	3.37	19.03

\* La diferencia promedio es significativa a un nivel de 0.05

## 11.2 ANOVA de un factor para el consumo de agua y comida

		Suma de Cuadrado	GL	Media de Cuadrado	F	Sig.
<b>Agua (mL)</b>	Intragrupos	33722.917	3	11240.972	34.150	0.000
	Intergrupo	2633.333	8	329.167		
	Total	36356.250	11			
<b>Comida (g)</b>	Intragrupos	5766.667	3	1922.222	2.116	0.176
	Intergrupo	7267.333	8	908.417		
	Total	13034.000	11			

GL: Grados de Libertas; F: Valor de F de la Prueba; Sig.: Significancia.

### Prueba Post Hoc "Bonferroni"

Variable Dependiente	Dif. Med (I-J)	Error Std	Sig.	Intervalo de Confianza 95%			
				Límite Mínimo	Límite Máximo		
Agua (mL)	1	2	-98.333*	14.814	9.77E-04	-149.87	-46.80
		3	38.333	14.814	1.93E-01	-13.20	89.87
		4	21.667	14.814	1.00E+00	-29.87	73.20
	2	1	98.333*	14.814	9.77E-04	46.80	149.87
		3	136.667*	14.814	9.26E-05	85.13	188.20
		4	120.000*	14.814	2.39E-04	68.47	171.53
	3	1	-38.333	14.814	1.93E-01	-89.87	13.20
		2	-136.667*	14.814	9.26E-05	-188.20	-85.13
		4	-16.667	14.814	1.00E+00	-68.20	34.87
	4	1	-21.667	14.814	1.00E+00	-73.20	29.87
		2	-120.000*	14.814	2.39E-04	-171.53	-68.47
		3	16.667	14.814	1.00E+00	-34.87	68.20

Variable Dependiente			Dif. Med (I-J)	Error Std	Sig.	Intervalo de Confianza 95%	
						Límite Mínimo	Límite Máximo
Comida (g)	1	2	-22.000	24.609	1.00E+00	-107.61	63.61
		3	35.333	24.609	1.00E+00	-50.28	120.95
		4	22.667	24.609	1.00E+00	-62.95	108.28
	2	1	22.000	24.609	1.00E+00	-63.61	107.61
		3	57.333	24.609	2.89E-01	-28.28	142.95
		4	44.667	24.609	6.42E-01	-40.95	130.28
	3	1	-35.333	24.609	1.00E+00	-120.95	50.28
		2	-57.333	24.609	2.89E-01	-142.95	28.28
		4	-12.667	24.609	1.00E+00	-98.28	72.95
	4	1	-22.667	24.609	1.00E+00	-108.28	62.95
		2	-44.667	24.609	6.42E-01	-130.28	40.95
		3	12.667	24.609	1.00E+00	-72.95	98.28

Dif. Med: Diferencia de Medias; Error Std: Error Estándar; Sig: Significancia. \* La diferencia promedio es significativa a un nivel de 0.05