

## **ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN**

### **TRATAMIENTO ULTRA CONSERVADOR EN LA REMOCIÓN DE CARIES DENTAL: EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA**

Olga Zambrano<sup>1</sup>, María Lozano, Naillet Arraiz<sup>3</sup>, Luis Rivera<sup>1</sup>, Luis Aguilera<sup>4</sup>, Glenis Chourio<sup>3</sup>

1 Facultad de Odontología, Universidad del Zulia, Venezuela

2 Programa de Doctorado en Ciencias Odontológicas, Universidad del Zulia, Venezuela

3 Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Venezuela

4 Unidad Académica de Odontología, Universidad Autónoma de Zacatecas, México

Autor de correspondencia: Olga Zambrano. E-mail: [ozambrano001@gmail.com](mailto:ozambrano001@gmail.com)

**Recibido: 11-02-2002**

**Aceptado: 23-10-2012**

#### **RESUMEN**

El propósito de este estudio fue comparar los cambios de la microbiota cariogénica antes y después de procedimientos de remoción parcial o ultraconservadora y remoción completa de dentina cariada reblandecida. Se realizó un ensayo clínico, aleatorio, doble ciego en trece molares con lesiones oclusales cavitadas aleatoriamente asignados a un grupo experimental: remoción ultraconservadora con @remoción parcial de la dentina reblandecida (n= 6) y un grupo control con remoción total de la dentina reblandecida (n= 7). El procedimiento de remoción se realizó con instrumental manual. Las muestras de dentina antes y después del procedimiento de remoción fueron analizadas mediante reacciones de PCR para identificar las especies *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. rhamnosus* y *L. casei*. Para contrastar las proporciones de las especies entre los grupos de tratamiento se utilizó la prueba de Fisher. No se encontraron diferencias significativas en la proporción de las especies bacterianas entre los grupos de tratamiento; siendo el *S. mutans* y *L. rhamnosus* las especies predominantes antes y después de la remoción en ambos grupos. Este estudio no encontró diferencias en la microbiota cariogénica entre el procedimiento de remoción parcial de dentina reblandecida y la remoción completa de dentina reblandecida.

**DeCS:** Caries dental, remoción ultraconservadora, *S. mutans*, *L. rhamnosus*.

#### **ULTRA CONSERVATIVE TREATMENT IN THE REMOVAL OF DENTAL CARIES: MICROBIOLOGICAL EVALUATION**

#### **ABSTRACT**

The purpose of this study was to compare the variations in the cariogenic microbiota before and after procedures of partial and total removal of dentinal caries. A randomized, double-blind clinical trial was conducted on thirteen molars with occlusal caries. They were randomly assigned to the experimental (ultraconservative removal with partial elimination of soft dentine; n=6) and control (total removal of soft dentine; n=7). The removal procedure was performed with manual instruments. Samples of dentine before and after the removal procedure were analyzed by using the PCR reactions for the identification of *S. mutans*, *S. sobrinus*, *L. rhamnosus*, and *L. casei*. Fisher test was used to compare bacterial species proportions between groups. There were no significant differences in the proportion of species between groups. *S. mutans* and *L. rhamnosus* were the predominant species before and after the removal in both groups. In the present study the authors did not find evidence of differences in the cariogenic microbiota between partial and total softened dentine removal.

**MeSH:** Dental caries, ultraconservative removal, *S. mutans*, *L. rhamnosus*.

## INTRODUCCIÓN

Hoy día la caries dental es definida como un proceso dinámico, localizado en los tejidos duros del diente e inducida por un desequilibrio entre la superficie dental y el fluido de la placa circundante <sup>(1)</sup>. La colonización del tejido dentario es favorecida por la presencia de receptores en la superficie de la célula bacteriana y su capacidad de producir polisacáridos extracelulares. Una vez establecida la microbiota cariogénica, los azúcares disponibles en la placa favorecen la producción de ácidos bacterianos resultantes de la degradación de azúcares de bajo peso molecular que desmineralizan al diente causando cambios estructurales anatómo-patológicos en el tejido dental duro.<sup>(2)</sup> El proceso carioso puede ser reversible o irreversible; activo de progreso rápido o lento, e inactivo o detenido; conducido por la actividad de la placa y por lo tanto la modificación de la placa va a modificar el proceso <sup>(1)</sup>.

Histológicamente, la dentina cariada se presenta en dos capas una interna y otra externa, las cuales deben ser tratadas de manera diferente. La capa superficial externa, denominada dentina infectada, necrótica, reblandecida; en la cual la matriz de colágeno esta irreversiblemente desmineralizada, y una capa más interna, dentina afectada, sensible, vital, donde la matriz de colágeno mantiene su estructura de bandas cruzadas con desnaturalización reversible. En el manejo clínico la primera debe ser removida y la última preservada <sup>(3-5)</sup>.

El juicio para determinar hasta donde remover, varía de acuerdo al país, la escuela de odontología, la idiosincrasia de cada profesor o a la presunción de la proximidad del tejido reblandecido a la pulpa <sup>(6)</sup>. En la actualidad, la filosofía de la intervención mínimamente invasiva, promueve la remoción del tejido dental cariado estrictamente necesario; preservando el esmalte y la dentina con sus propiedades físicas, biológicas y estéticas que no pueden ser reemplazadas completamente por ninguno de los materiales de restauración que existen hoy día <sup>(6)</sup>.

Los estudios <sup>(7-15)</sup> referentes al sellado de lesiones cariosas de esmalte o dentina no muestran

evidencia, que el dejar tejido dental cariado produzca consecuencias desfavorables o que permita el progreso de la lesión cariosa.

Un estudio realizado por Bjørndal y col <sup>(16)</sup> examinó la microflora cultivable antes y después de la excavación con la técnica de remoción por pasos o *Stepwise* en lesiones cariosas profundas de dientes permanentes. Antes del sellado provisional, las colonias de bacterias Gram positivas alcanzaron un 70% del total de unidades formadoras de colonias, de los cuales, los *Lactobacilos* constituyeron un 50%, predominando la especie *casei subespecie rhamnosus*.

Bönecker y col, <sup>(17)</sup> examinaron la flora microbiana cultivable de la dentina luego de la excavación manual con el tratamiento de restauración atraumático y su correlación con el tamaño de la cavidad, color y consistencia de la dentina. Los resultados mostraron una reducción significativa en la frecuencia y proporción del total de bacterias viables y de *Streptococcus mutans*, pero no de *Lactobacilos spp*. La preparación cavitaria produjo cambios clínicos con relación al color de la dentina desde tonos oscuros a tonos claros y cambios en la consistencia de la dentina de suave a nivel de la unión esmalte-dentina a dentina dura en el piso de la cavidad. Los resultados mostraron que el tamaño de la cavidad, consistencia y color de la dentina no son indicadores de la flora cultivable en las cavidades.

En contraste con los hallazgos de Bönecker y col <sup>(17)</sup>, un estudio realizado por Toi y cols. <sup>(18)</sup> para determinar la efectividad del tratamiento de restauración atraumático, utilizando cultivo microbiológico e identificación genotípica con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con oligonucleótidos arbitrarios (AP-PCR), compararon el número de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus spp*, antes y después de la excavación manual. Los resultados mostraron una disminución significativa del total de bacterias viables tanto de *Streptococcus mutans* como de *Lactobacillus spp*. Del total de cepas aisladas, antes de la excavación manual, el 63% estuvo representado por cepas de *Streptococcus mutans*; luego de la excavación hubo una disminución a

35%, de los cuales el *Streptococcus mutans* fue la especie predominante seguida por una menor proporción de *Streptococcus sobrinus*; asimismo, la presencia de *Streptococcus mutans* sólo fue detectada en el 47,5% de las cavidades evaluadas.

En otro estudio, Ersin y cols.<sup>(19)</sup> reportaron los cambios en la microflora cultivable de la dentina cariada antes e inmediatamente después del tratamiento de restauración atraumático e investigaron el efecto inhibitorio de un desinfectante a base de gluconato de clorhexidina en la microflora de las cavidades. Sus resultados mostraron una disminución significativa del total de bacterias viables, *Streptococcus mutans* entre la primera y segunda muestra microbiológica y, a diferencia de lo reportado por Bönecker y col<sup>(17)</sup>, estos autores observaron una disminución significativa en el número de Lactobacilos.

Paddick y col<sup>(10)</sup> estudiaron la diversidad fenotípica y genotípica de la dentina cariada, reportando que la microbiota del tejido dental cariado esta principalmente constituida por *Lactobacillus spp*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus parasanguinis*, *Actinomyces israeliy* y *Actinomyces gerencseriae*.

El propósito de este estudio fue comparar la microbiota cariogénica antes y después de procedimientos de remoción ultraconservadora y remoción total de dentina cariada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestra

Un total de 13 molares con lesiones oclusales cavitadas activas, con una apertura promedio de 4 ±1,6 mm. y una profundidad promedio de 4 ±0,5 mm fueron seleccionados de 12 pacientes entre 6 y 8 años de edad. Como criterios de inclusión se consideraron: Pacientes colaboradores con segundos molares primarios o primeros molares permanentes inferiores, lesión de caries oclusal código 5 o 6 según el Sistema Internacional de Detección y Evaluación de Caries Dental, con evidencia de tejido reblandecido al pasar suavemente la sonda de WHO a través del piso de la cavidad; radiográficamente la lesión presenta radiolucidez en

el tercio interno de la dentina. Como criterio de exclusión se consideraron: molares con evidencia clínica o radiográfica de compromiso pulpar irreversible, exposición pulpar esperada durante el procedimiento de remoción del tejido cariado, molares primarios con reabsorción fisiológica que involucrara más de 1/3 de la raíz, pacientes con hábito de bruxismo y pacientes con enfermedad sistémica. Si un paciente había recibido terapia local o sistémica con antibacterianos, se esperaba un periodo de 30 días para incluirlo en el estudio. Después de explicar el propósito del estudio, todos los niños incluidos en el estudio aceptaron el tratamiento y sus padres o representantes legales firmaron un informe de consentimiento, luego de explicarle el propósito del estudio, de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki.

### Diseño experimental

Se realizó un ensayo clínico, aleatorio, doble ciego, controlado. Los molares seleccionados fueron divididos aleatoriamente en dos grupos de tratamiento. Grupo experimental ultraconservador: Remoción parcial de dentina reblandecida y Grupo control: Remoción completa de dentina reblandecida. El grupo experimental estuvo conformado por 6 primeros molares permanentes inferiores, mientras que el grupo control lo conformaron 6 primeros molares permanentes inferiores y 1 un segundo molar inferior primario.

Un investigador (LR) que no participó en la fase de intervención realizó la asignación aleatoria del tipo de tratamiento en las unidades de observación utilizando una secuencia de números aleatorios generada por un computador.

### Procedimiento de remoción de caries

En ambos grupos el procedimiento de remoción del tejido dental cariado, fue realizado con instrumental manual, bajo aislamiento absoluto y cepillado dental previo, En el grupo control, se realizó la remoción de toda la dentina reblandecida de la cavidad; toda la dentina de las paredes y piso de la cavidad debía estar dura (el excavador no remueve dentina cuando se usa firmemente). No se consideró la coloración

de la dentina como criterio para determinar la completa o parcial remoción del tejido dental cariado.

En el grupo experimental, se removió de las paredes de la cavidad toda la dentina reblandecida, a nivel del piso de la cavidad se realizó la remoción parcial de la dentina reblandecida (el excavador remueve dentina fácilmente sin ejercer presión, o el excavador remueve dentina si se usa firmemente). Un operador realizó el procedimiento de remoción del tejido cariado según tratamiento asignado. Un confirmador verificó en las unidades de estudio la consistencia de la dentina suave o semidura en el grupo experimental y dura en el grupo control.

### **Evaluación microbiológica**

Para la evaluación microbiológica se tomaron dos muestras de 10 a 20 µg de dentina: una antes y otra inmediatamente después del procedimiento de remoción de caries. Las muestras fueron tomadas del piso de la cavidad, con una cucharita de dentina estéril.

### **Evaluación molecular**

#### *Extracción de ADN a partir de muestras de dentina cariada*

Las muestras de dentina, se colocaron en 1 ml de buffer fosfato salino (0,12 M NaCl, 0,01M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mM KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> pH 7,5), se refrigeraron a 4° C y fueron procesadas dentro de los tres primeros días. Se realizó un procedimiento de extracción de ADN descrito previamente <sup>(21-22)</sup> con algunas modificaciones. La muestra de dentina se disgregó con punta de pipeta y vortex (3 veces), se procedió a centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos, y se hicieron 3 lavados con 500 µl de buffer TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA, pH 8).

Después de la última centrifugación, se resuspendió el sedimento en 250 µl de buffer TE, se agregaron 50 µl de lisozima (10 mg/ml) y se incubó a 37° C durante 2 horas.

Se agregó 10 µl de proteinasa K 10 mg/ml (400 mg), 30 µl de SDS 10% y se incubó durante 3 horas a 45° C. Se hizo extracción con fenol-cloroformo y

luego con cloroformo-álcohol isoamílico. El ADN fue precipitado con 500 µl de etanol 100% frío y se hizo un lavado con etanol 70%. El ADN se resuspendió en 50 µl de buffer TE, se cuantificó la concentración de ADN espectrofotométricamente (260 nm) y se ajustó la concentración final a 50 ng/µl.

### **Investigación molecular de bacterias cariogénicas**

Para la detección de miembros del género *Streptococcus* se incluyeron oligonucleótidos dirigidos a los genes *gtfB* y *gtfT* para *S. mutans* que amplifican una región de 114 pb y 88 pb <sup>(23)</sup>, respectivamente del gen codificante para una enzima glucosiltransferasa en estos microorganismos (Tabla I).

Para investigar miembros del género *Lactobacillus* se utilizaron pares de oligonucleótidos dirigidos a secuencias conservadas del gen 16S rRNA <sup>(23)</sup>, localizadas dentro de las regiones variables V2.1-V2.2 (LactoF) y V2.2-V3 (LactoR). Para diferenciar entre especies *Lactobacillus casei* (incluyendo *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus*), se utilizaron oligonucleótidos antisentido (Lrham y Lcase, respectivamente), dirigidos a la región variable V1 del 16S rRNA <sup>(24)</sup> (Tabla I). Como cebador antisentido se utilizó LactoR, para ambos microorganismos. La presencia del genoma de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus casei*, fue considerada positiva cuando se detectaron productos de PCR de 293 pb y 298 pb, respectivamente. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Maxim Biotech, INC.

### **Ensayos de amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Para la detección de todos los microorganismos se preparó una mezcla de reacción de 50 µl, conteniendo 6 µl de buffer taq DNA polimerasa 10X, 2,5 mM MgCl, 200 µM cada dNTP, 25 picomoles de cada oligonucleótido específico y 1,25 U de Taq DNA polimerasa. Se utilizó 3 µl de ADN para cada reacción.

Para la detección del genoma de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, en el programa se utilizó una desnaturalización inicial de 8 minutos a 95° C, seguido de 40 ciclos de amplificación de 1 minuto a 95° C, 1 minuto a 55° C y 1 minuto a 72° C, culminando con un paso de extensión final de 10 minutos a 72° C.

Para los ensayos de amplificación por PCR específico del género *Lactobacillus*, el programa de amplificación por PCR consistió en 5 minutos a 95° C y 35 ciclos de amplificación de 1 minuto a 95° C, 1 minuto a 60° C, 1 minuto a 72° C y un paso de extensión final a 72° C por 10 minutos. Para la detección de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus casei*, se utilizó el mismo programa de amplificación, pero la temperatura de alineamiento se disminuyó a 58°C, con la finalidad de incrementar el rendimiento, lo cual no afectó la especificidad de la reacción.

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research PTC-100™, Inc USA.

### Electroforesis en geles de agarosa

Los amplicones (10 µl) fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa en cámaras horizontales (BIORAD). Para análisis de los productos de miembros del género *Lactobacillus* se utilizó una concentración de agarosa de 1,5% y para los productos de menor peso molecular obtenidos en ensayos específicos para miembros del género *Streptococcus*, se utilizó agarosa al 2%. Como buffer de corrida se utilizó TBE (Tris-Borato 89mM, EDTA 2mM pH 8). La corrida se llevó a cabo a 80 voltios por 1,5 horas. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio, visualizados en transiluminador ultravioleta y fotografiados con sistema de foto documentación DigiDoc UVP, USA. Como marcadores de longitud de los fragmentos moleculares se utilizaron 100 pb DNA ladder y pGEM DNA. (Fragmentos de 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 pb) y marcadores (Fragmentos de 2645, 1605, 1198, 676,

517, 460, 396, 350, 222, 179, 126, 75, 65, 51 y 36 pb), ambos de Promega.

### Análisis estadístico

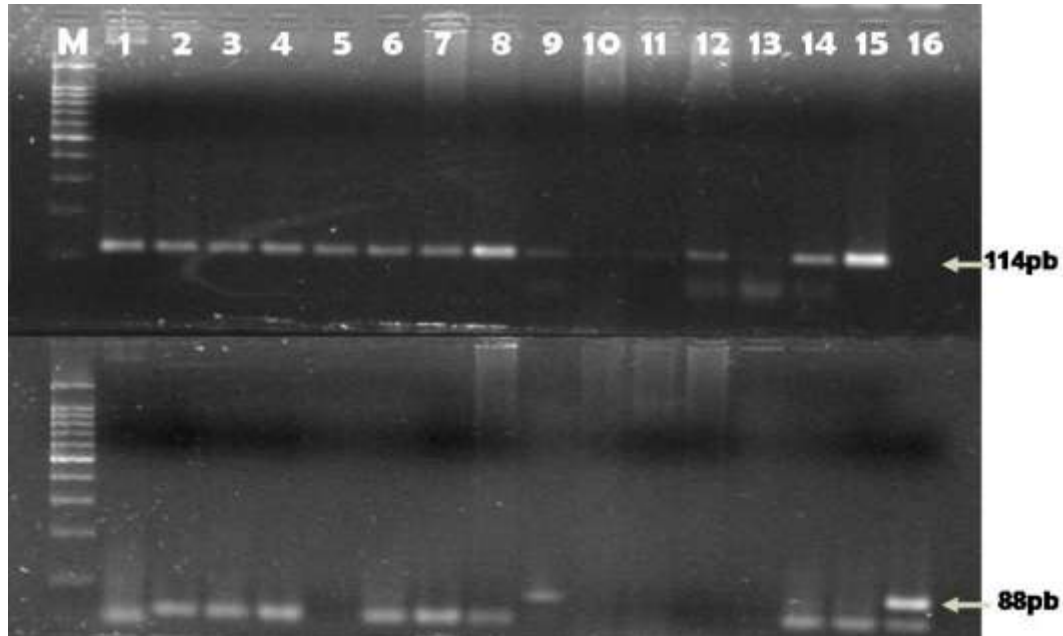
Con base en las características particulares del diseño experimental realizado: datos en escala cualitativas (contajes), limitada cantidad de observaciones disponibles en el periodo establecido de ejecución del ensayo, y poco conocimiento de las características de la distribución probabilidad empíricas del evento estudiado, se seleccionó para el análisis: la variable fragmentos genómicos de especies de *Streptococcus* y *Lactobacillus* en muestras de dentina cariada (screening cualitativo), los procedimientos de distribuciones libres o No Paramétricos<sup>(25)</sup> nombrados a continuación: Prueba exacta de Fisher para comparar entre los grupos los resultados de las pruebas de PCR de cada una de las cinco especies aisladas antes y después de la remoción, y prueba de Mc Nemar para las contrastaciones de antes y después dentro de cada grupo. El procesamiento estadístico se realizó con la aplicación SPSS 14.0 (Inc. Ill, USA), a un nivel de significancia del 5%. ( $\alpha = 0,05$ ) e intervalos de confianza al 95%.

## RESULTADOS

### Identificación molecular

En la Figura 1, se ilustran los resultados obtenidos del análisis por PCR de las muestras de dentina, en las cuales se detectó el fragmento de 114 pb correspondiente al genoma de *S. mutans* y de 88 pb correspondientes al genoma *Streptococcus sobrinus*. En la Figura 2 se muestra el patrón de amplificación obtenido en los ensayos para la detección de miembros del género *Lactobacillus spp.*, el cual fue identificado en todas las muestras antes y después del procedimiento de remoción de dentina cariada.

En la Tabla II, se resumen resultados obtenidos de los ensayos moleculares, especificando el número de casos positivos de fragmentos genómicos para cada una de las especies investigadas antes y después del procedimiento de remoción, para ambos grupos de estudio.



**Figura 1. Identificación *S. mutans* y *S. sobrinus* utilizando oligonucleótidos dirigidos a secuencias especie-específicas del gen codificante de la enzima glucosiltransferasa. Los carriles identificados con números impares son muestras obtenidas antes del tratamiento y con números pares se señalan ensayos después del tratamiento. Arriba: análisis de amplificación especie-específico para detectar *S. mutans*. Abajo: las mismas muestras analizadas arriba aplicando ensayo especie-específico para *S. sobrinus*. M. Marcador de longitud molecular 100 pb ladder DNA markers (Promega).**

**Tabla I. Oligonucleótidos utilizados.**

Nombre del oligoNT	Secuencia de nucleótidos	Descripción	Tamaño del producto de PCR	REF
<b>Smut3368F</b>	5' GCCTACAGCTCAGAGATGCTATTCT 3'	Gen <i>gtB</i> (codificante de glicosiltransferasa)		
<b>Smut3481R</b>	5' GCCATACACCACTCATGAATTGA 3'	Especie específico <i>S. mutans</i>	<b>114 pb</b>	<b>23</b>
<b>Ssob287F</b>	5' TCCAAAGCCAAGACCAAGCTAGT 3'	Gen <i>gtf</i> (codificante de glicosiltransferasa)	<b>88 pb</b>	<b>23</b>
<b>Ssob374R</b>	5' CCAGCCTGAGATTCAGCTTGT 3'	Especie específico <i>S. sobrinus</i>		
<b>LrhamF<sup>a</sup></b>	5' TGGAACAGRTGCTAATACCG 3'	Gen rDNA 16S (Región V2.1 hasta V3)	<b>233 pb</b>	<b>24</b>
<b>LactoR:</b>	5' GTCCATTGTGGAAGATTCCC 3'	Género <i>Lactobacillus</i>		
<b>LcaseF<sup>b</sup></b>	5' GCACCGAGATTCAACATGG 3'	Gen rDNA 16S (Región variable V1) <i>L. casei</i>	<b>298 pb</b>	<b>24</b>
<b>LrhamF<sup>b</sup></b>	5' TGCTTGCATCTTGATTTAATTTTG 3'	Gen rDNA 16S (Región variable V1) Especie específico <i>L. rhamnosus</i>	<b>293pb</b>	<b>24</b>

a. En la secuencia del oligonucleótido Lacto F, se incluye la degeneración R = A o G

b. Se utilizó con oligonucleótido antisentido LactoR, común a ambas especies

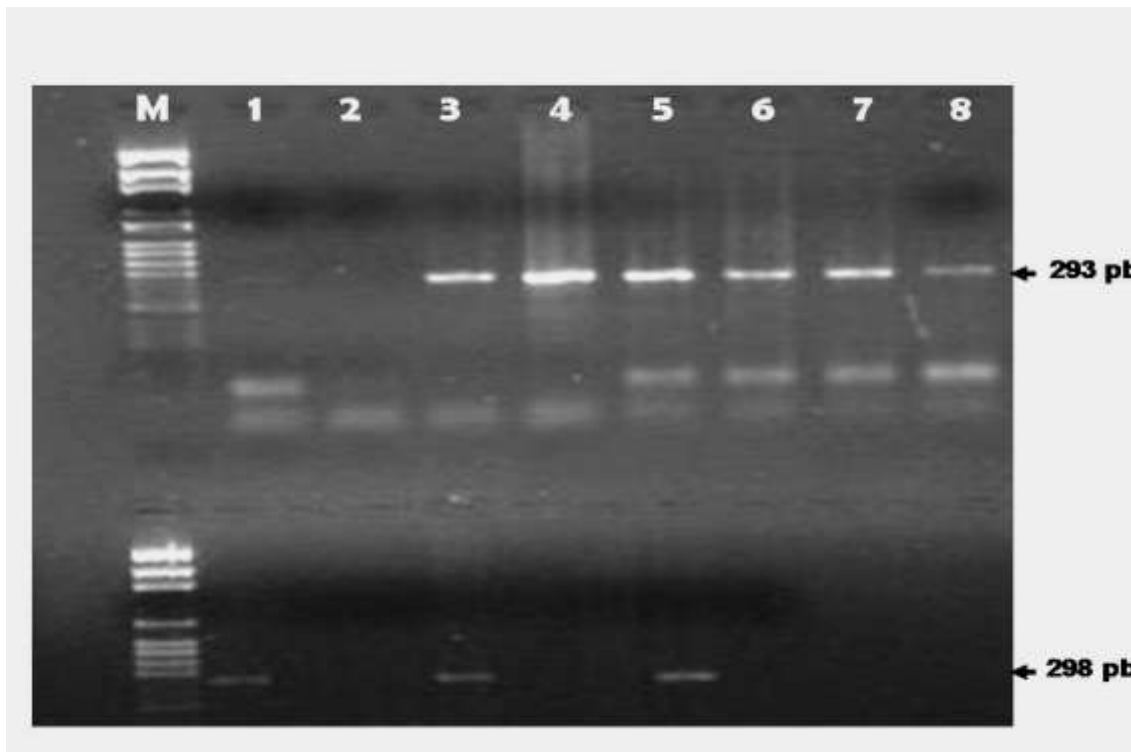
REF: referencias bibliográficas utilizadas para la selección de las secuencias de oligonucleótidos.

Antes de la remoción, el *Streptococcus mutans* fue identificado en todas las muestras del grupo experimental y control; después de la remoción; sólo en dos casos del grupo control no se identificó esta especie. En contraste, *Streptococcus sobrinus* fue identificado en el 23% de las muestras. Los

resultados no indican diferencias significativas ( $p=0.56$  y  $p=0.26$ ) entre los grupos antes y después de la remoción con respecto a la presencia del *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*. Las especies *Lactobacillus casei/Lactobacillus paracasei*, fueron positivas en 3/6 (50%) muestras

del grupo experimental y 4/7 (57%) del grupo control antes de la remoción; estos resultados no variaron en el grupo experimental mientras que en el grupo control la presencia de estas especies disminuyó a 2/5 (40%) luego de la remoción. No obstante, estas diferencias no mostraron evidencia

de ser estadísticamente significativas ( $p=1.00$  y  $p=0.59$  respectivamente). La presencia de *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* se identificó en casi la totalidad de las muestras, antes y después del procedimiento de remoción.



**Figura 2. Identificación por PCR de especies de *Lactobacillus*, con oligonucleótidos dirigidos a región variable del gen *16s rRNA*. Los carriles 1, 3, 5, 7 son productos de PCR obtenidos a partir de dentina de pacientes antes del tratamiento de remoción y carriles 2, 4, 6, 8 corresponden al análisis después del tratamiento. Arriba: análisis de amplificación especie-específico para detectar *L. rhamnosus*. Abajo: las mismas muestras analizadas con ensayo especie-específico de *L. casei/paracasei*. M. Marcador de longitud molecular pGEM DNA markers (Promega).**



**Tabla II. Casos positivos de fragmentos genómicos de especies de *streptococcus* y *lactobacillus* en muestras de dentina cariada (screening cualitativo)**

Microorganismo	Antes de la Remoción		Después de la remoción	
	Experimental	Control	Experimental	Control
	n=6	n=7	n=6	n=7
<i>Streptococcus. mutans</i>				
Primers gen <i>gtBSmut</i> 3368F/Smut3481R (114 pb)	6	7	6	5
<i>Streptococcus. Sobrinus</i>				
Primers <i>gengtf</i> Ssob287F/Ssob374R(88 pb)	2	1	3	1
Lactobacillus				
LactoF:V2.1-V2.2 LactR: V2.2-V3 Género específico (231 a 233 pb)	6	7	6	6
<i>Lactobacillus casei</i> , (incluye <i>L. paracasei</i> )	3	4	3	2
Primers : 16S rRNALcase F: V1 LactR: V2.2-V3 (298 pb)				
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	6	6	5	6
Primers: 16S rRNALrham F: V1 LactR: V2.2-V3 (293 pb)				

**Entre los grupos**

Antes de la remoción: *S. sobrinus*, Fisher p=0,56, IC95% 0.104----2.976\*  
 Después de la remoción: *S. sobrinus*, Fisher p=0.26, IC95% 0.065---2.178\*  
 Antes de la remoción: *L casei/ paracasei* Fisher p=0.59, IC95% 0.410---3.187\*  
 Después de la remoción: *L casei/ paracasei* Fisher p=1.00, IC95% 0.193---2.125\*.

Procedimiento de McNemar: Dentro del grupo Antes y Después de la remoción

G. Experimental: *S. sobrinus*, p=1.00 (ns)

*L casei/ paracasei*, p= 1.00 (ns).

G. Control *S. sobrinus*, p=0.13 (ns)

*L casei/ paracasei*= 1.00 (ns).

## DISCUSIÓN

La microflora patógena de las lesiones cariosas dentinales existe en un complejo ecosistema que se encuentra en constante cambio, y puede ser clasificado en dos hábitats: La dentina suave, necrótica, y altamente infectada e irreversiblemente desmineralizada zona superficial, y una zona más profunda, menos infectada, con daño reversible <sup>(26)</sup>.

La microflora en las lesiones cariosas dentinales es predominantemente Gram positiva, particularmente de los géneros *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* y *Streptococcus* <sup>(27)</sup>.

BjØrndal y Larsen <sup>(16)</sup>, en su estudio sobre cambios en la flora cultivable de lesiones cariosas profundas en procedimientos de "Stepwise", antes e inmediatamente después de la remoción parcial de dentina cariada, al reportar una disminución en el total de unidades formadoras de colonia en el 97% de los casos. BjØrndal y Larsen <sup>(16)</sup> (mediana=  $561 \times 10^3$  y mediana=  $5.1 \times 10^5$  respectivamente), pero no en los valores obtenidos después de la remoción, los cuales difieren de  $0.1 \times 10^3$  en nuestro estudio a  $1.6 \times 10^4$ .

Hoy día para el análisis microbiológico existen además de los métodos de cultivo convencionales, una variedad de pruebas, tales como: bioquímicas, inmunológicas, genotípicas, microscopia de fluorescencia. Las técnicas de amplificación de ácidos nucleídos por PCR se están utilizando en la detección e identificación de las bacterias cariogénicas en el humano, ya que representa una estrategia sensible, específica y de fácil ejecución <sup>(22, 23, 27, 28)</sup> que permite superar algunas limitaciones de los medios de cultivos convencionales; debido a que se estima que el 50% de la microflora oral no crece en condiciones de laboratorio <sup>(29)</sup>. Asimismo, la susceptibilidad de contaminación externa es otra limitación importante,

Munson y col <sup>(27)</sup> señalaron que por PCR algunas trazas de *S. mutans* fueron identificadas más frecuentemente, que por medios de cultivo. Si bien en la lesión puede haber disminución constante de las células bacterianas, es posible que la técnica molecular detecte bacterias no viables; y si ese fuera

el caso esas bacterias muertas estuvieron viables en algún momento por lo que esto no varía mayormente la significancia de su detección, por lo que es importante tener esta idea en mente en caso de que se utilice la identificación molecular con fines de tomar decisiones acerca de un tratamiento.

La microbiota identificada de las muestras antes y después de la remoción fue similar a la microbiota normalmente identificada en lesiones cariosas profundas <sup>(27)</sup>. En este estudio, el *Streptococcus mutans* fue identificado en todas las muestras antes del procedimiento de remoción y con poca variación luego de la remoción sin diferencias entre los procedimientos de remoción; en tanto que el *Streptococcus sobrinus* se identificó en una menor proporción antes de la remoción y luego de la remoción, este aumento correspondió a un solo caso en el grupo experimental y posiblemente debido a la contaminación de la cavidad bucal al momento de la toma de la muestra, tal como lo refieren Toi y col <sup>(18)</sup>.

Al comparar nuestros hallazgos con la prevalencia de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* reportada por Toi y col <sup>(18)</sup> antes y después del procedimiento de excavación manual con el TRA una menor proporción del *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* fue identificada por estos autores. En este sentido Yoo y col <sup>(29)</sup> argumentan que las diferencias en las proporciones de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus* reportadas en diversos estudios podrían ser explicadas por factores tales como: edad, dieta, método de identificación, y factores geográficos, entre otros.

Cabe señalar que dentro del género *Streptococcus*, el *S. mutans*, y el *S. sobrinus* tienen la mayor velocidad de producción de ácidos <sup>(30)</sup>. En lesiones cavitadas profundas, significativamente valores mayores de *S. mutans* son reportados, posiblemente a expensas de la especie de *Actinomyces* <sup>(31)</sup>; mientras que el *Lactobacillus* es más común en los sitios con dentina necrótica y suave <sup>(16, 22, 31)</sup> coincidiendo esto con nuestros hallazgos.

En nuestro estudio, la subespecie *Lactobacillus rhamnosus* mostró una mayor prevalencia al compararla con la subespecie *Lactobacillus casei*.

Por su parte, Byun y cols. <sup>(24)</sup> reportan una prevalencia de un 54% para el *Lactobacillus rhamnosus* y 40 % para el *Lactobacillus casei*.

En conclusión, los hallazgos en este estudio sugieren que las especies cariogénica no difieren en los molares con remoción parcial y en los molares con remoción total de la dentina reblandecida; siendo el *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus rhamnosus* las especies predominantes antes y después de la remoción en ambos grupos.

### **Agradecimiento**

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia, por el aporte Financiero para el desarrollo de esta investigación. A la Unidad Clínica del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Odontología de la Universidad del Zulia. Al Laboratorio de Referencia Bacteriológica del Hospital de Universitario de Maracaibo y al Centro de Investigaciones Endocrino-metabólicas de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia.

### **REFERENCIAS**

1. Ekstrand K. Improving Clinical Visual Detection—Potential for Caries Clinical Trials. J Dent Res. 2004; C: C67-71.
2. Law V, Seow WK, Townsend G. Factors influencing oral colonization of mutans streptococci in young children. Aust Dent J. 2007 Jun;52(2):93-100.
3. Kidd E, Fejerskov O, Mjör I. Caries removal and the pulpodentinal complex. In: Fejerskov O, Kidd E (eds). Dental Caries. The Disease and its Clinical management, 2nd edn. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2004: pp 71-97.
4. Pandit IK, Srivastava N, Gugnani N, Gupta M, Verma L. Various methods of caries removal in children: A comparative clinical study. J Indian SocPedodPrev Dent 2007;25:93-6
5. Mjor IA, Odont. D. Pulp- Dentin biology in restorative dentistry: Part 2: Inicial reactions to preparation of teeth for restorative procedures. Quintessence Int. 2001; 32:537-551.
6. Lozano, M. Zambrano, O. Clinical randomized controlled trial of chemomechanical caries removal (Carisolv™) Int. J. Paediatric Dent. 2006;16:161–167
7. Ribeiro C, Baratieri L, Perdigao J, Baratieri N, Ritter A. A clinical, radiographic, and scanning electron microscopic evaluation of adhesive restorations on carious dentin in primary teeth. Quintessence Int. 1999; 30:591-599.
8. Maltz M, de Oliveira E, Fontanella V, Bianchi. A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. Quintessence Int. 2002; 33: 151-159.
9. Shimada Y, Kawashima M, Higashi T, Foxton RM, Tagami J. Histologic evaluation of adhesive restorations on dentin caries in rat molar teeth. Quintessence Int. 2004; 35: 200-205.

10. Paddick J, Brailsford S, Kidd E, Beighton D. Phenotypic and genotypic selection of microbiota surviving under dental restorations. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71: 2467-2472.
11. Oliveira E, Carminatti G, Fontanella V, Maltz M. The monitoring of deep caries lesions after incomplete dentine caries removal: results after 14-18 months. *Clin Oral Investig.* 2006; 10:134-139.
12. Handelman S, Buonocuore M, Schoute P. Progress report on the effect of a fissure sealant on bacteria in dental caries. *JADA.* 1973; 87: 1189-1191.
13. Hadelman S, Washburn F, Wopperer P. Two-year report of sealant effect on bacteria in dental caries. *JADA.* 1976; 93: 967-970.
14. Going R, Loesche W, Grainger D, Syed S. The viability of microorganisms in carious lesions five years after covering with fissure sealant. *JADA* 1978; 97: 455-462.
15. Jensen O, Handelman S. Effect of an autopolymerizing sealant on viability of microflora in occlusal dental caries. *Scand J Dent Res.* 1980; 88: 382-388.
16. Bjórndal L, Larsen T. Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. *Caries Res.* 2000; 34: 502-508.
17. Bönecker M, Toi C, Cleaton-Jones P. *Mutans streptococci* and *Lactobacilli* in carious dentine before and after Atraumatic Restorative Treatment. *J Dent.* 2003; 3:423-428.
18. Toi C, Bönecker M, Cleaton-Jones P. Mutans streptococci strains prevalence before and after cavity preparation during Atraumatic Restorative Treatment. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18:160-164.
19. Ersin N, Uzel A, Aykut A, Candan U, Eronat C. Inhibition of cultivable bacteria by chlorhexidine treatment of dentin lesions treated with the ART technique. *Caries Res.* 2006; 40:172-177.
20. Kidd E, Joyston-Bechal S, Beighton D. The use of a caries detector dye during cavity preparation: a microbiological assessment. *Br Dent J.* 1993; 174:245-248.
21. Ausubel E, Editor M. *Short Protocols in Molecular Biology.* Chapter 2. 2nd Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA, 680 pp. 1992.
22. Martin F, Nadkarni MA, Jacques N, Hunter N. Quantitative Microbiological Study of human carious dentine by culture and real-time PCR: Association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J. Clin Microbiol* 2002; 40: 1698-1704.
23. Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Kawada M, Oho T, Koga T. Development of a 5' nuclease-based real-time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4438-4441.

24. Byun R, Nadkarni, M, Chhour, K, Martin F, Jacques N, Hunter N. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* Species Present in advances dental caries. J Clin Microbiol 2004; 42: 3128 -3136.
25. Sidney Siegel, NonParametric Statistic for the behavioral sciences. McGraw-Hill Kogakusha.1976 pp 31-34.
26. Fusayama T. Two layers of carious dentin; diagnosis and treatment. Oper Dent. 1979; 4(2):63-70.
27. Munson M, Banerjee A, Watson T, Wade W. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. J ClinMicrobiol. 2004; 42: 3023-3029.
28. Wilson M, Weightman A, and Wade W. Applications of molecular ecology in the characterization of uncultured microorganisms associated with human disease. Rev Med Microbiol. 1997; 8: 91-101.
29. Yoo S, Park S, Jeong D, Kim K, Lim S, Lee S, Choe S, Chang Y, Park I, Kook J. Isolation and characterization of the mutans streptococci from the dental plaques in Koreans. J Microbiol. 2007; 45:246-255.
30. deSoet J, Nyvad B, Kilian M. Strain-related acid production by oral streptococci. Caries Res. 2000; 34:486-490.
31. Schüpbach P, Neeser J, Golliard M, Rouvet M, Guggenheim B. Incorporation of caseinoglycomacropptide and caseinophosphopeptide into the salivary pellicle inhibits adherence of mutans streptococci. J Dent Res. 1996; 75: 1779-1788.