



**UNIVERSIDAD DE TALCA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**EFECTO ANTICARIOGÉNICO DE ÁCIDOS GRASOS SATURADOS, INSATURADOS Y  
SUS MEZCLAS EN LA DESMINERALIZACIÓN DEL ESMALTE INDUCIDA POR  
SACAROSA SOBRE UN MODELO BIOLÓGICO DE CARIES *IN VITRO*.**

**PROYECTO MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO  
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ALUMNO: MARÍA JOSÉ FUENTES ABU ABBARAH**

**PROFESOR GUÍA: DR. RODRIGO GIACAMAN SARAH  
PROFESOR CO-GUÍA: NATALIA GARCÍA MANRIQUEZ**

**TALCA-CHILE  
2019**

*Ésta efímera parte de mi vida, se le dedico a mi papá...*

*Desde pequeña me enseñaste a mirar el mundo de forma distinta, tu apoyo trascendió la educación y llegó a la libertad. Desconstruir dogmas y poner a nuestros pies recursos culturales, musicales y literarios, que día a día se reflejan en recuerdos, historias y alegrías.*

*Gracias por hacerme volar con tus postales de ositos a los 5 años, por sentir que estaba en el Louvre y en el Mont Saint Michel a los 8 y por generar esa infinita curiosidad que alberga en mí.*

*Tu humildad, paciencia y sencillez son el fiel reflejo de una vida tranquila y equilibrada, de la cual dejas un gran legado, tu familia.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*En primer lugar, a la persona que más tengo que agradecer por su incondicionalidad, apoyo y compañía desde el primer minuto en este proceso, es a mi pareja David. Por volvernos locos de la risa, ebrios de la nada...*

*A mi familia, hermanos, abuelitas y mamá, que supieron entenderme, animarme y darme las mejores energías durante todo este tiempo en la universidad.*

*A mis amigos. Carolina y Alejandro, que han sido un apoyo trascendental y siempre han encontrado la forma de llegar a la libertad.*

*Finalmente agradezco al Dr. Giacaman y Natalia por darme la oportunidad de probar cosas nuevas e integrarme al laboratorio de cariología.*

## ÍNDICE

1. RESUMEN .....	6
2. ABSTRACT.....	7
3. INTRODUCCIÓN.....	8
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	10
4.1 Caries dental, un problema de salud global.....	10
4.2 Mecanismo molecular de la caries dental.....	11
4.3 Caries dental y nutrición.....	14
4.3.1 Rol anticariogénico de las proteínas .....	18
4.3.2 Lípidos y ácidos grasos en la salud.....	19
5. OBJETIVOS .....	27
5.1 OBJETIVO GENERAL .....	27
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
6. METODOLOGÍA .....	28
6.1 Diseño Experimental .....	28
6.2 Obtención de los bloques de esmalte bovino .....	29
6.3 Formación del biofilm de <i>Streptococcus mutans</i> .....	31
6.4 Exposición de los biofilm a ácidos grasos.....	32
6.5 Acidogenicidad del biofilm .....	33
6.6 Desmineralización de los bloques .....	34
6.7 Análisis de biofilm .....	35
6.8 Microorganismos viables desde el biofilm.....	36

6.9 Análisis estadístico .....	37
7. RESULTADOS.....	38
7.1 Acidogenicidad del biofilm <i>S. mutans</i> .....	38
7.2. Desmineralización del esmalte .....	40
7.3. Microorganismos Viables del biofilm .....	41
8. DISCUSIÓN .....	43
9. CONCLUSIÓN .....	50
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Influencia de los nutrientes en el proceso de caries.....	17
(Fuente: modificado de Giacaman R., Oral Diseases, 2017)	
<b>FIGURA 2.</b> Representación esquemática de posibles objetivos celulares.....	24
y mecanismos de actividad antibacteriana de ácidos grasos libres (AGL). (Fuente: modificado de Desbois, Appl Microbiol Biotechnol, 2010)	
<b>FIGURA 3.</b> Proceso de obtención de bloques de esmalte bovino.....	30
<b>FIGURA 4.</b> Formación de biofilms de <i>S. mutans</i> .....	32
<b>FIGURA 5.</b> Exposición de los bloques a los diferentes tratamientos.....	33
<b>FIGURA 6.</b> Comparación de la desmineralización del esmalte en bloques dentales.....	35
bovinos.	
<b>FIGURA 7.</b> Separación del biofilm para su análisis.....	36
<b>FIGURA 8.</b> Acidogenicidad del biofilm <i>S. mutans</i> al ser sometido a ácidos grasos.....	38
saturados, insaturados y mezclas de ellos.	
<b>FIGURA 9.</b> Pérdida de dureza superficial (%PDS) en esmalte expuesto a ácidos grasos...	40
<b>FIGURA 10.</b> Microorganismos viables de los biofilms de <i>S. mutans</i> formados en.....	41
esmalte	

## 1. RESUMEN

**Introducción:** Se ha reportado un efecto protector de los ácidos grasos insaturados de la dieta, pues inducirían una disminución de la cariogenicidad de los biofilms de *S. mutans* y la inhibición de la desmineralización del esmalte. Sin embargo, se desconoce la anticariogenicidad de ácidos grasos tales como palmítico, esteárico, oleico, linoleico y sus mezclas, en una matriz con agente surfactante (tween 20). Por lo tanto, se evaluará el potencial efecto anticariogénico de ácidos grasos emulsionados en un modelo biológico de caries *in vitro*, preestablecido para el crecimiento de biofilms de *S. mutans* UA159 sobre bloques de esmalte dental bovino.

**Materiales y Métodos:** Una vez maduros los bloques y sus biopelículas, se expusieron 3 veces al día a sacarosa al 10% durante 5 minutos y luego a ácidos grasos. Todos en una concentración final de 10 mM, en un medio con tween 20. Los controles cariogénico, anticariogénico y negativo se expusieron a Sacarosa 10%, NaF al 0.05% y NaCl al 0.9%, respectivamente. El medio de cultivo fue renovado 2 veces al día y se determinó el pH después de cada exposición a ácidos grasos. Los biofilms fueron separados de los bloques de esmalte y se analizó los microorganismos viables y el porcentaje de pérdida de dureza superficial del bloque de esmalte (%PDS). El experimento fue realizado en triplicado, en tres fases diferentes (n=9) por 5 días consecutivos. Para el análisis estadístico se utilizaron ANOVA, prueba de Tukey con un nivel de significación del 95%.

**Resultados:** Las biopelículas expuestas a ácidos grasos de 18 carbonos con agente surfactante, produjeron una reducción de la desmineralización del esmalte y de los microorganismos viables al ser comparado con su control cariogénico, ( $P < 0,05$ ). El ácido palmítico y todas las mezclas no mostraron reducción en la desmineralización. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la acidogenicidad ( $P > 0,05$ ). En conclusión, se encuentra evidencia que sustenta que los ácidos grasos de 18 carbonos, saturados o insaturados tienen un efecto

anticaries. Al estar emulsionado el ácido esteárico penetra en la biopelícula lo que finalmente resulta en una disminución de la cariogenicidad.

## 2. ABSTRACT

A protective effect of dietary unsaturated fatty acids has been reported, as they would induce a decrease in the cariogenicity of *Streptococcus mutans* biofilms and inhibition of enamel demineralization. However, the effect of other fatty acids or the combination of the already tested stearic, oleic, linoleic in a matrix with surfactant is unclear. Therefore, the aim was to test the anti-cariogenic potential of emulsified fatty acids in a biological model of caries, *in vitro*.

Enamel slabs were used to grow *S. mutans* biofilms. Once mature, biofilms were exposed 3 times per day to 10% sucrose for 5 minutes and then to a panel of different fatty acids or to combinations, at a final 10mM concentration and dissolved with tween 20. Positive and negative controls were included. Spent media were used to measure pH twice per day, after each exposure to fatty acids. After 5 days, biofilms were evaluated for biomass, viable microorganisms and the slabs were assessed for the percentage of surface hardness loss to estimate demineralization. Three independent experiments, each in triplicate, were carried out (n = 9). Outcomes were compared among the fatty acid groups using ANOVA and Tukey with a significance level of 95%.

Biofilms exposed to 18-carbon fatty acids with surfactant agent induced a reduction in the demineralization of enamel and viable microorganisms when compared to a cariogenic control (p <0.05). Palmitic acid and the mixtures failed to show a reduction in demineralization. No statistically significant differences in acidogenicity and biomass were observed across the experimental fatty acids or their combinations (p > 0.05).

In conclusion, a potential anti-caries effect for the 18-carbon fatty acids, either saturated or unsaturated is confirmed. Unlike previous reports, emulsified stearic acid also has a potential anticariogenic properties.



### 3. INTRODUCCIÓN

La salud oral continúa siendo un importante desafío en la salud pública a nivel mundial (1). La caries dental es la condición no transmisible más prevalente en el ser humano (2), afectando a 3.500 millones de personas en el año 2015 (1). A pesar de las grandes mejoras experimentadas en la salud bucal, a nivel mundial sigue habiendo problemas, por lo que el fortalecimiento de los programas de salud pública constituyen una necesidad urgente (3). Esta enfermedad es el resultado de una disbiosis en el biofilm de la superficie del diente (4, 5). Las bacterias que actúan como comensal en condiciones saludables, pueden volverse patógenas (patobiontes) cuando se rompe el equilibrio ecológico (6, 7). La exposición constante de azúcares al biofilm causa interrupción del equilibrio microbiano en el ambiente oral (8). Por lo tanto, los carbohidratos tales como monosacáridos y disacáridos deben ser considerados como el principal factor etiológico para la caries (8). La acción persistente de los ácidos, producidos por fermentación de las bacterias sometidas a azúcares de manera frecuente, originan una desmineralización rápida y la cavitación del esmalte, que da lugar a lesiones cariosas que son la manifestación clínica de la enfermedad (9). La virulencia del proceso depende de la presencia de factores moduladores, tales como: flujo salival, exposición a fluoruros, acumulación de biofilm dental, enfermedades sistémicas, morfología y estructura del diente (10). Estos puedan llegar a fomentar el inicio de la desmineralización, si la exposición ácida es breve, el pH del biofilm aumenta de forma natural, gracias a mecanismos fisiológicos en la boca, siendo capaz de reparar la pérdida de mineral (6, 11).

La comprensión actual de la enfermedad se ha enfatizado en el papel modulador de los nutrientes en la dieta. Componentes de los alimentos, actúan como factores potencialmente protectores que pueden determinar un cambio ambiental que afecta la ecología del microbioma

oral, mitigando parcialmente el efecto de los azúcares (6). Los lípidos, especialmente los ácidos grasos libres, se les han atribuido propiedades antimicrobianas (12), bacteriostáticas (13) e inhibitorias del crecimiento bacteriano (14, 15). Atraen la atención debido a su amplio espectro de actividad y la falta de mecanismos de resistencia clásicos contra estos compuestos (16). Simultáneamente, han sido descritos como elementos potencialmente anticariogénicos (17). Los mecanismos para explicar la actividad antibacteriana se focalizan en la membrana celular, específicamente en la interrupción de la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa(18). Sin embargo, siguen sin estar del todo claro (8).

Dentro de la escasa investigación, se destacan los estudios en los cuales se evalúa la actividad antibacteriana de diferentes tipos de ácidos grasos (19-21) contra diversos microorganismos orales. Sin embargo, estos estudios fueron realizados sobre microorganismos planctónicos, por lo tanto, surgió la necesidad de saber qué es lo que ocurría al exponer un modelo de caries *in vitro*, ante este nutriente. Es por esto, en una nueva línea de investigación, se estudió el posible efecto anticariogénico de ácidos grasos emulsionados, sobre un modelo de caries, biofilm *in vitro*. Los biofilm de *S. mutans* se expusieron a diferentes tipos de ácidos grasos libres en una matriz con agente surfactante (Tween 20), después de desafíos cariogénicos con Sacarosa al 10%. Resultados previos indican que los ácidos grasos oleico y linoleico redujeron significativamente la cariogenicidad del biofilm de *S. mutans*. Este efecto se vio reflejado en la desmineralización del esmalte, acidogenicidad del medio de cultivo y en los microorganismos viables del biofilm (15). Pese a que varios estudios parecen confirmar el papel anticariogénico de los ácidos grasos insaturados de 18 carbonos, aún no está claro, si las mezclas de distintos ácidos grasos potencian el efecto de cada uno por separado. Con esta pregunta en mente, se diseñó la presente investigación que tuvo por objetivo, evaluar el potencial efecto anticariogénico de ácidos grasos saturados, insaturados y mezclas de ellos, en un modelo biológico de caries *in vitro*.

## **4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1 Caries dental, un problema de salud global**

Las enfermedades orales y crónicas son los principales problemas de salud en la mayor parte del mundo. Están estrechamente relacionadas con los estilos de vida cambiantes, que incluyen dietas ricas en azúcares, el uso generalizado del tabaco y un mayor consumo de alcohol. Las enfermedades orales son de una alta prevalencia en la población, ya que están muy relacionadas a estos factores de estilos de vida (22), y poseen un alto impacto en los individuos y en la sociedad, además del costo de su tratamiento (23).

En 2010, la caries no tratada fue la enfermedad oral más prevalente en todo el mundo, afectando al 35% de la población mundial (2). En Chile, las políticas de salud oral se enfocan en la población hasta los veinte años. Por lo tanto, los servicios de salud para adultos son escasos (24). En consecuencia, la mayor carga de enfermedades orales recae sobre las poblaciones desfavorecidas y socialmente marginadas. Se debe considerar el impacto severo en términos de dolor y sufrimiento, el deterioro de la función y el efecto en la calidad de vida. El tratamiento tradicional de las enfermedades dentales es extremadamente costoso en varios países industrializados, y no es factible en la mayoría de los países de bajos y medianos ingresos (22).

A pesar de las grandes mejoras experimentadas en la salud oral de las poblaciones en varios países, a nivel mundial sigue habiendo problemas, por ello el fortalecimiento

mundial de los programas de salud pública mediante la aplicación de medidas eficaces de prevención de las enfermedades orales y la promoción de la salud dental constituye una necesidad urgente (3).

#### **4.2 Mecanismo molecular de la caries dental.**

Es una enfermedad de carácter dinámico que se manifiesta producto de una disbiosis ecológica del biofilm (4), causada por el consumo de azúcares y asociada a patógenos que en un estado de equilibrio ecológico microbiano no poseen potencial para inducir la enfermedad y se comportan como comensales (6, 7, 10, 25). El proceso dinámico consiste en períodos de desmineralización y remineralización de los dientes, si ocurre desmineralización por tiempo suficiente, resulta el inicio de una lesión cariosa en ciertos sitios de predilección anatómica (26). Este equilibrio es mediado por diferentes factores implicados en la etiopatogenia de las lesiones cariosas, que no causan la lesión, sino más bien modulan su ocurrencia. (6).

La placa dental es la comunidad de microorganismos que se encuentra en la superficie de un diente como una biopelícula o biofilm (5, 27), éstos no son capaces de adherirse de forma directa al diente, pero sobre éste se forma una película adquirida, integrada por proteínas salivares como la mucina o el colágeno, que sirven de sustrato para la adhesión específica de ciertos microorganismos (28). La microbiota presente en la superficie del esmalte es clínicamente sólida (29), presenta un estado de homeostasis, donde no se producen sustancias dañinas para los tejidos orales ni se rompe el equilibrio con el sistema inmune del hospedador (28). Cuando el azúcar se suministra con frecuencia, la acidificación se vuelve moderada y frecuente (29), los carbohidratos alimentarios

fermentables son los factores ambientales claves que intervienen en el inicio y desarrollo de la caries. Entre los carbohidratos, la sacarosa se considera la más cariogénica, porque además de ser fermentada por bacterias orales, como *S. mutans*, es un sustrato para la síntesis de polisacáridos extracelulares (PEC) e intracelulares (PIC). Por lo tanto, el pH ácido desencadena un cambio de la microbiota de placa residente a una más cariogénica. Los polisacáridos extracelulares (PEC) promueven cambios en la composición de la matriz de biofilm (30). La mayor clase de polisacáridos extracelulares generados por *S. mutans* son los fructanos, que son homopolímeros de fructosa sintetizados por frucosiltransferasas (FTFs) y los glucanos formados por polimerización de fracciones de glucosa desde sacarosa por las glucosiltransferasas (GTFs), que juegan un rol fundamental en la formación y establecimiento del biofilm oral (31, 32). Los polisacáridos producidos por *S. mutans* contienen enlaces  $\alpha$ -1,3 o  $\alpha$ -1,6 y su grado de ramificación determina su solubilidad (33). La enzima GtfB es la glucosiltransferasa, que produce glucanos insolubles (PECI) denominados mutanos de enlaces  $\alpha$ -1,3 (34). GtfD es la enzima que metaboliza más rápidamente los polisacáridos produciendo glucanos solubles (PECS) denominados dextranos y que contienen enlaces  $\alpha$ -1,6 (35). Por otra parte, en periodos de excesos de sacarosa, *S. mutans* es capaz de generar polisacáridos intracelulares (PIC). Los PIC son muy importantes como reserva nutricional, ya que pueden ser movilizados ante la falta exógena de nutrientes (31). Ante la falta de sacarosa, *S. mutans* es capaz de metabolizar sus PIC y producir ácidos (30).

Aunque los ácidos pueden iniciar la desmineralización, mecanismos fisiológicos en la boca, tales como iones calcio y fosfato presentes en la saliva, pueden restaurar el pH, detener la aparición de las lesiones y remineralizar los tejidos en el nivel de la hidroxiapatita en el esmalte antes de la cavitación (6, 11). El esmalte es uno de los tejidos dentales sobre el cual se desarrolla la enfermedad de caries. Está compuesto por un 96% de matriz inorgánica, 3% de agua y 1% de materia orgánica (36). Estructuralmente está constituido por estructuras reciben el nombre de prismas o varillas del esmalte, y corresponden a agrupaciones en haces de hasta mil cristales de hidroxiapatita. La

hidroxiapatita es un fosfato de calcio cristalino que representa el principal componente inorgánico del esmalte (37). Está compuesta principalmente por iones calcio, fosfato e hidroxilos en una relación estequiométrica 10:6:2 (38). Estos iones permanecen unidos dentro la estructura del cristal mediante enlaces iónicos. Entre los prismas o varillas del esmalte se encuentra el espacio interprismático, zona con gran contenido de agua que permite el flujo constante de iones desde el medio al cristal o viceversa, generando sustituciones iónicas que modifican las propiedades de la hidroxiapatita (39). Sin embargo, la disolución de los cristales de hidroxiapatita depende en gran medida del grado de saturación de minerales existente en el fluido salival. A pH neutro, hay suficiente calcio y fosfato en el fluido salival para evitar la desmineralización y conducir a la remineralización. Sin embargo, a medida que desciende el pH, descienden las concentraciones de calcio y fosfato, y se alcanzará un punto cuando estas concentraciones sean insuficientes para evitar la disolución de los cristales, y se producirá una desmineralización neta (40).

Por lo tanto, bajo condiciones ácidas severas y prolongadas, por debajo del valor de pH crítico de esmalte que es de 5,5 (41), predomina el proceso de desmineralización los cristales de hidroxiapatita del esmalte y la degradación proteolítica de la estructura de los tejidos duros del diente (42). El efecto de tales cambios ambientales en la disponibilidad de nutrientes y en el pH cambia la expresión génica de bacterias orales que predominan en la placa dental (43). Por lo tanto, se desarrolla una competencia bacteriana que lleva a la selección de microorganismos comensales altamente tolerantes al ácido, que potencian la virulencia del biofilm (5, 6, 44).

Si bien ciertas bacterias acidúricas como *Lactobacillus* spp. y *Streptococcus mutans* se han correlacionado con una alta actividad cariogénica y se han considerado como el principal culpable de la caries dental, por su capacidad de adaptarse y tolerar un pH bajo (45, 46). Sin embargo, otras especies microbianas también se aislaron de lesiones de caries

y se han relacionado con la enfermedad (47). Resultados de estudios que utilizaron técnicas de identificación molecular, indicaron un vínculo de lesiones cariosas con *Actinomyces* spp y *Bifidobacterium* spp, no dependiendo de la presencia de *Streptococcus mutans* (48, 49). Por lo tanto, hay una falta de asociación entre la experiencia de caries y la cantidad de *Streptococcus mutans* aislado (50).

Se han detectado más de 700 especies o filotipos bacterianos, de los cuales más del 50% no se han cultivado hasta la fecha (51). Si bien la composición de los biofilms dentales está establecida gracias a estudios basados en ADN, la porción activa de la comunidad bacteriana y los patrones de expresión génica in vivo no se han estudiado (52). Usando un enfoque meta-transcriptómico mediante pirosecuenciación del gen 16S, se informó que *S. mutans* sólo comprendía entre 0.02% y 0.73% de toda la comunidad bacteriana aislada de lesiones cariosas de esmalte y dentina (53). Además, utilizando tecnologías de secuenciación de ARN, específicamente un abordaje de lecturas lentas y menor cobertura mediante pirosecuenciación, se informó que las comunidades microbianas son específicas de cada individuo sin una huella digital común y definida durante la formación del biofilm (52). Esto respalda el concepto de que los consorcios formados por múltiples microorganismos actúan colectivamente, probablemente sinérgicamente, para iniciar y expandir la cavidad (7).

### **4.3 Caries dental y nutrición.**

Una nutrición adecuada no es sólo necesaria para tener una buena salud general, también juega un papel importante en el desarrollo y la protección de una adecuada salud oral, siendo un factor ambiental clave en el desarrollo de caries dental (54). En diversos estudios se evidencia una estrecha relación de la ingesta de carbohidratos fermentables con el

desarrollo de la enfermedad de caries (8, 40, 54-58). El consumo frecuente y excesivo de azúcar, especialmente sacarosa, formada por glucosa y fructosa, se le ha atribuido el papel central en la causa de la caries (40, 59). Cuando está en contacto con el biofilm dental, la sacarosa se metaboliza rápidamente por el consorcio bacteriano y se usa como sustrato para la producción de ácidos orgánicos, primordialmente ácido láctico, que a su vez induce una importante caída de pH en el biofilm (30). En estas condiciones ambientales, se espera observar la desmineralización del tejido duro y un cambio en la composición y la virulencia del biofilm dental, incluyendo mayor producción de polisacáridos y de proteínas por las bacterias (29, 43).

Existe una asociación entre la cantidad y la frecuencia de la ingesta de azúcares y la caries dental (60, 61), con una relación dosis-respuesta lineal entre azúcares y caries (62). Por lo tanto, una mayor exposición a la sacarosa aumenta la cariogenicidad, de una manera dependiente de la frecuencia, mediante la modificación de las propiedades bacterianas virulentas (11). Además, la OMS recomienda que los adultos y los niños reduzcan su ingesta diaria de azúcares libres a menos del 10% de su ingesta energética total. Una reducción adicional por debajo del 5% o aproximadamente 25 gramos por día proporcionaría beneficios adicionales para la salud, como disminución de la obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (63, 64).

Los hidratos de carbono son una fuente importante de energía dietética, representando aproximadamente el 50% del consumo total de azúcares (6). A diferencia de la sacarosa, los almidones son carbohidratos complejos, compuestos de dos polisacáridos, amilosa y amilopectina (65). Si bien la relación causal entre el desarrollo de caries dental y sacarosa es indiscutible, la relación entre el almidón alimenticio y la caries dental continúa siendo debatida (66). El Comité del Consejo Científico Británico de Nutrición (SACN, 2012) concluyó que hay falta de evidencia disponible sobre la relación entre ingesta total de almidón y salud oral. Por lo tanto, con el objetivo de actualizar las recomendaciones



globales de carbohidratos, incluido el almidón, la OMS encargó una revisión sistemática sobre este carbohidrato y sus efectos sobre la salud oral como parte de su proceso de desarrollo de la guía 2014 (63, 64, 67). La mejor evidencia disponible sugiere que sólo los almidones rápidamente digeribles afectan negativamente la salud oral, además, sugiere que no hay asociación entre el consumo total de almidón y el riesgo de caries, pero que la ingesta de almidones rápidamente digeribles puede aumentar significativamente el riesgo de caries (67).

Como los seres humanos son omnívoros y las dietas comunes en cualquier parte del mundo contienen mezclas de alimentos y rara vez comprenden solo azúcares libres, es necesaria una discusión sobre la posible contribución de otros componentes alimentarios a la caries. Los mecanismos anticariogénicos de algunos componentes de los alimentos, no se han aclarado. Sin embargo, un efecto estimulante del flujo salival, mecanismos inhibitorios bacterianos, incluyendo interferencia con la fermentación de azúcares, inducción de competencia bacteriana dentro de la biofilm dental o cambios en el pH de la biopelícula por la liberación de álcali, entre otras variables potenciales, podría explicar este efecto protector. El efecto de los alimentos específicos o de algunos componentes de los alimentos, diferentes de los azúcares libres, sobre los rasgos virulentos de las bacterias cariogénicas permanece mínimamente investigado. La exposición de la biopelícula a moléculas contenidas en ciertos alimentos puede proporcionar ventajas competitivas de ciertas especies de bacterias sobre las demás (6).



**Figura 1: Influencia de los nutrientes en el proceso de caries.** Fuente: Azúcares y más allá. El papel de los azúcares y otros nutrientes y su posible impacto en la caries (6).

Un diente saludable, (izquierda) es colonizado por un biofilm comensal manteniendo un estado de simbiosis dentro del consorcio bacteriano. Bajo una frecuente y sostenida fermentación producto a exposición a carbohidratos (abajo), el biofilm sufre un cambio ecológico que conduce a un estado de disbiosis (derecha), caracterizado por el predominio de especies acidogénicas, El aumento de la acidogenicidad en el biofilm puede conducir a una pérdida neta de mineral y el inicio de lesiones (derecha). La exposición concomitante de azúcares con otros nutrientes y sustancias dietéticas puede reducir el potencial cariogénico de los azúcares (arriba), restaurando el equilibrio ecológico en el biofilm convirtiendo la desmineralización hacia una red ganancia mineral, remineralización (izquierda), o al menos para atenuar los efectos nocivos de los azúcares en la biopelícula dental y en los tejidos mineralizados.

### 4.3.1 Rol anticariogénico de las proteínas

Dentro de los factores protectores de la dieta se encuentran las proteínas, las cuales son sustancias orgánicas, compuestas por aminoácidos puestos en una cadena lineal y unidos entre sí por enlaces peptídicos, éstas se encuentran en células animales y vegetales (68). Las proteínas dietéticas pueden actuar como sustrato anticaries cuando se presentan desde la comida al biofilms dental. Un mayor consumo de proteínas en la dieta ha sido asociado con una menor incidencia de caries y con un efecto microbiológico favorable (6). Éstas actúan formando parte del biofilm oral, absorbiéndose en la superficie de los cristales de hidroxiapatita formando una barrera semipermeable y afectando en el pH a través de la vía urea/arginina (69, 70). La fosfoproteína más importante de la leche, la caseína y la principal proteína de la clara del huevo, la ovoalbúmina son las más estudiadas dentro de éste concepto (71). En estudios *in vitro* se postula que la ovoalbúmina de huevo posee un efecto inhibitor de la cariogenicidad del biofilm de *S. mutans* en condiciones altamente cariogénicas (72). Conjuntamente existe otro estudio *in situ*, en el cual se llevó a cabo un desafío cariogénico de sacarosa con diferentes concentraciones de ovoalbúmina, dando como resultado una reducción en la formación de lesiones en el esmalte (73).

Junto a lo ya mencionado, se ha especulado la función moduladora de otros nutrientes dietéticos, ubicuos a las dietas normales, los cuales podrían ser claves para explicar la asociación aparente entre la ingesta de sacarosa y la caries. El efecto antibacteriano y anticariogénico de los ácidos grasos ha sido propuesto en la literatura desde hace mucho tiempo. Sin embargo, su mecanismo de acción aún no está determinado. En los siguientes capítulos se abordará el objetivo principal de esta investigación; los ácidos grasos y su capacidad anticariogénica.

### 4.3.2 Lípidos y ácidos grasos en la salud

Los lípidos son macronutrientes omnipresentes en la mayoría de las dietas normales. Son un extenso grupo de moléculas que incluyen ácidos grasos y sus derivados. La cantidad de lípidos recomendados que se debe consumir, debe ser del 15% al 30% del contenido de energía en la dieta humana (74). Aunque el término lípido se usa como sinónimo de grasas, estas sustancias son un subgrupo de lípidos llamados triglicéridos. Un triglicérido es un éster derivado de glicerol y tres ácidos grasos. Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con una cola alifática larga. La mayoría de los ácidos grasos de origen natural tienen una cadena de un número par de átomos de carbono, de 4 a 30, que pueden presentar sus enlaces saturados o insaturados. Un ácido graso saturado tiene todos los carbonos de su cadena unidos a hidrógeno, mientras que las moléculas insaturadas tienen dobles enlaces ( $C = C$ ) entre átomos de carbono. Si contiene más de un doble enlace se llama poliinsaturado. El punto de fusión de los ácidos grasos aumenta con la longitud de la cadena de hidrocarburo, y disminuye con el número de dobles enlaces. En casi todos los ácidos grasos insaturados de origen natural, el doble enlace está en la configuración cis y normalmente se posicionan en el tercero, sexto o noveno átomo de carbono del grupo metilo terminal. En estos casos reciben la denominación de ácidos grasos omega-3, omega-6 y omega-9, respectivamente. Una configuración cis significa que los átomos de hidrógeno unidos a los dobles enlaces están en el mismo lado. Si los átomos de hidrógeno están en lados opuestos, la configuración se llama trans. Cuando los ácidos grasos no están unidos a otras moléculas, se conocen como ácidos grasos "libres" o "no esterificados" (6, 75, 76). Por otra parte, los ácidos grasos también se pueden sintetizar en el cuerpo humano, ya sea a partir de precursores no lipídicos como la glucosa o de otros ácidos grasos; las excepciones a esto son los llamados ácidos grasos esenciales, se definen como esenciales a los ácidos grasos omega-3 (ácido  $\alpha$ -linoleico) y omega-6 (ácido linoleico). Su denominación de esenciales se debe a que los mamíferos no son capaces de sintetizarlos, debido a la ausencia de la enzima desaturasa. Por ende, deben provenir obligatoriamente de la dieta (77).

Una de las principales funciones metabólicas de los ácidos grasos, es que son fuente de energía como resultado de su oxidación. Esta fuente energética puede ser utilizada por la mayoría de los tejidos aeróbicos, pero no el cerebro, proporcionando una alternativa a la glucosa. La oxidación de ácidos grasos se vuelve importante en tiempos de disponibilidad limitada de este carbohidrato. Otro papel funcional importante, son componentes de los fosfolípidos de la membrana celular. Los cuales están constituidos por diferentes tipos de ácidos grasos. Esta composición influye en la naturaleza física de la membrana "fluidez", que a su vez afecta en la función de las proteínas de membrana y el movimiento de éstas dentro de ella. Además, los lípidos de membrana son precursores de moléculas implicadas en procesos de señalización celular como diacilgliceroles, ceramidas, lisofosfolípidos y endocannabinoides. Por lo tanto, los ácidos grasos tienen funciones de señalización específicas. Por último, el ácido graso poliinsaturado ácido araquidónico ( $20:4\Delta^{5,8,11,14}$ ) es el precursor principal para la producción de eicosanoides, como prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (77), moléculas intervienen en la regulación y control de la inflamación (78). Varios ácidos grasos son capaces de regular la expresión y actividad de factores de transcripción, lo que significa que estos juegan un papel en el control de la expresión génica y la producción de proteínas. En consecuencia, es evidente que los ácidos grasos, influyen en la salud, el bienestar y el riesgo de enfermedad (77).

En la clasificación según su estructura, se encuentran los ácidos grasos saturados, los cuales se pueden dividir en subgrupos según su longitud de la cadena.

- Ácidos grasos de cadena corta: poseen entre 2 y 4 átomos de carbono. Ácido acético (2:0), propiónico (3:0) y butírico (4:0).
- Ácidos grasos de cadena mediana: poseen entre 6 y 12 átomos de carbonos. Ácido caproico (6:0), caprílico (8:0), cáprico (10:0) y laurico (12:0). Ácidos, que son reabsorbidos directamente y transportados por la vena porta.

- Ácidos grasos de cadena larga: disponen entre 14 a 18 átomos de carbono. Incluyen el ácido mirístico (14: 0), palmítico (16: 0), esteárico (18: 0). Son originados principalmente en aceite de coco, palmiste, manteca de cacao y manteca de karité. Representan el 80-90%, de la ingesta de ácidos grasos saturados. Las fuentes animales son mantequilla, manteca de cerdo y sebo de vaca.
- Los ácidos grasos de cadena muy larga: aquellos con 20 o más átomos carbono. Incluye al ácido araquídico (20: 0), behénico (22: 0), lignocérico (24: 0).(75)

Los estudios observacionales han demostrado que la ingesta alta (más del 15% de la ingesta de energía diaria) de ácidos grasos saturados se asocian con mayores niveles de colesterol total y LDL (75), aumentan la coagulación, inducen resistencia a la insulina y promueven la inflamación. Se espera que una mayor ingesta de ácidos grasos saturados se asocie con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Sin embargo, cuando se proporciona en niveles moderados, no hay evidencia de efectos nocivos de estos ácidos grasos saturados (77). Por otra parte, la asociación de un suministro moderado de ácido mirístico (1.8% de energía diaria) con un nivel recomendado de ácido  $\alpha$ -linolénico (0.9% de energía diaria) conlleva una mejora la actividad de lecitina colesterol aciltransferasas (LCAT) en humanos. Por lo tanto niveles moderados de ácidos grasos saturados no necesariamente puede tener consecuencias nocivas para la salud (79).

El principal ácido graso monoinsaturados en configuración cis es el ácido oleico (18:1 $\Delta^9$ ), quien tiene propiedades antiaterogénicas y antitrombóticas, aumenta la relación HDL/ LDL-colesterol y disminución la agregación de trombocitos. El aceite de oliva (*Olea europaea*) es la principal fuente dietética de ácido oleico, sin embargo, también se puede

encontrar en aceite de canola, cártamo híbrido, colza cultivado, maní, avellana, almendras y aceite de aguacate o palta (75).

El ácido linoleico ( $18:2\Delta^9, 12$ ) es el ácido graso poliinsaturado omega-6 más prevalente en la dieta humana. Es un ácido graso esencial, debido a que los humanos no pueden incorporar un doble enlace más allá del noveno carbono de un ácido graso. Las principales fuentes dietéticas de éste ácido son aceites vegetales, nueces, semillas, carnes y huevos. Por ejemplo, de todos los ácidos grasos poliinsaturados, la contribución del ácido linoleico es de entre 70 y 85% en las carnes y mayor de un 80% en los huevos. Es conocido que la mayoría de los aceites vegetales son a base de este ácido graso, sin embargo, alimentos con muy bajo contenido de grasa, verduras, frutas y granos, son predominantemente ricos en ácido linoleico como ácidos grasos poliinsaturados principales (80).

#### **4.3.2.1 Ácidos grasos y caries**

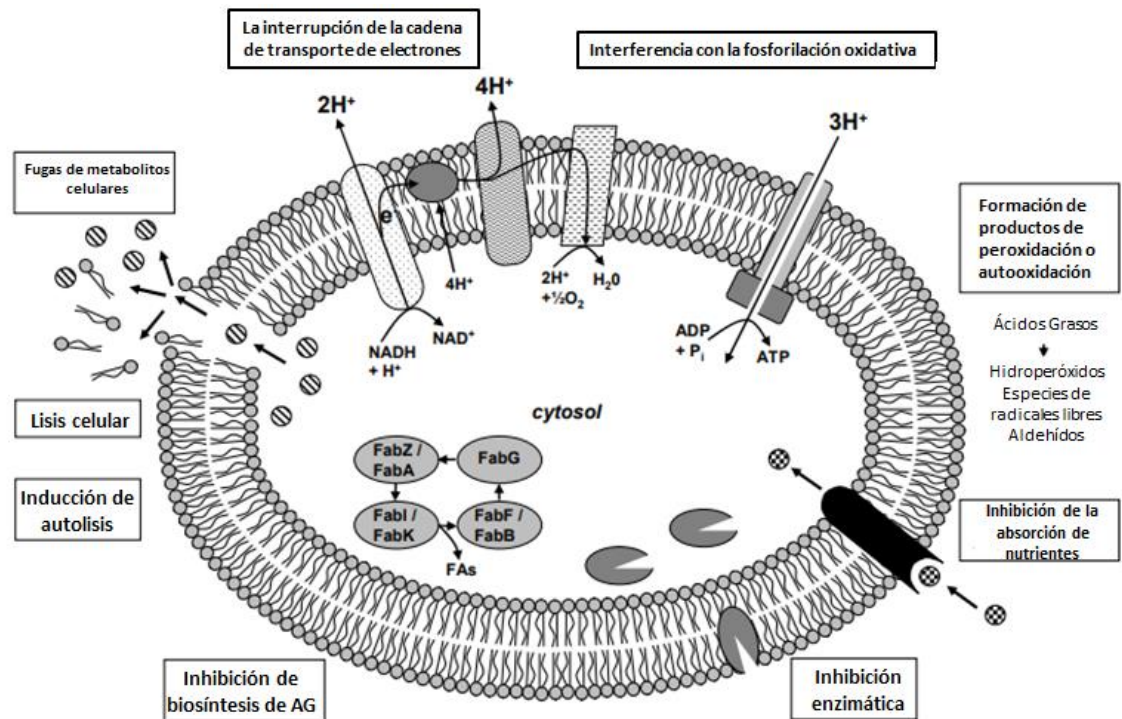
Por décadas los ácidos grasos han sido descritos como alimentos potencialmente anticariogénicos (14, 17). Sin embargo, el foco principal, si no exclusivo, de la investigación en los constituyentes de la dieta asociada a la caries ha sido restringido a los azúcares, sacarosa en particular (81). No obstante, los primeros estudios se basaron en las relaciones estructurales de diversos ácidos grasos frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas, reconociendo su actividad antimicrobiana (12). La mayoría de las pruebas sobre el efecto de los ácidos grasos en la caries se han recogido en estudios en animales (82, 83). Por ejemplo, el estudio de ratas Weanling tratadas con dietas ricas en sacarosa que a su vez

contenían ácidos grasos, indicaron un menor número de lesiones cariosas al ser comparadas con ratas alimentadas con la misma dieta pero sin éstos lípidos, por lo tanto indica una actividad cariostática significativa en estos animales (82). Por otro lado, Hayes, evaluó los efectos de los ácidos grasos sobre el metabolismo bacteriano de la placa. Los ácidos grasos con una longitud de cadena de 8-15 carbonos inhibieron *Streptococcus mutans* y la placa dental *in vitro* (13).

En estudios más recientes, se han evaluado la actividad antibacteriana de diferentes tipos de ácidos grasos, como por ejemplo, los omega-3 (19), omega-6, -7, -9 (20), y ácidos grasos de cadena corta, media y larga (21), incluyendo el ácido linoleico y oleico contra diversos microorganismos orales tales como: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*, *Candida albicans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis*. Los resultados demostraron que los diferentes tipos de ácidos grasos exhibieron una fuerte actividad antimicrobiana contra estos microorganismos orales. Por último, también se ha visto que los ácidos grasos libres son más activos que los ácidos grasos ligados a sus esteres y que al ser insaturados y de cadena larga, tienen un mayor efecto sobre los patógenos orales (18), lo que en consecuencia podría influir en la ecología microbiana en la cavidad oral (19-21).

Los mecanismos para explicar la actividad antibacteriana de los ácidos grasos, se focalizan en la membrana celular, interrupción de la cadena de transporte de electrones y de la fosforilación oxidativa. Además, la acción antibacteriana también puede ser el resultado de la inhibición de la actividad enzimática, el deterioro de la absorción de nutrientes, la generación de productos de degradación por peroxidación y autooxidación o la lisis directa de células bacterianas (18). Sin embargo, el mecanismo preciso sigue sin estar claro (6).





**Figura 2: Representación esquemática de posibles objetivos celulares y mecanismos de actividad antibacteriana de ácidos grasos libres (AGL).** Fuente: Modificado de Ácidos grasos libres antibacterianos: actividades, mecanismos de acción y potencial biotecnológico (18).

Pueden afectar la producción de energía bacteriana al alterar la cadena de transporte de electrones y / o interferir con la fosforilación oxidativa. Los ácidos grasos pueden provocar la fuga de los metabolitos celulares de la célula, completar la lisis celular y la autólisis. Inhibir la biosíntesis de ácidos grasos afectando a las enzimas citosólicas, y de membranas. Pueden perjudicar la absorción activa de nutrientes al actuar directamente sobre la proteína de transporte o como un resultado indirecto de la incapacidad de la célula para producir ATP. Los productos de peroxidación y autooxidación de los ácidos grasos libres también pueden tener efectos nocivos sobre la célula bacteriana y desempeñar un papel en la destrucción celular.

Entre la escasa investigación en este campo, se destaca los estudios en que utilizando un modelo de biofilms-caries, las biopelículas de *S. mutans* se expusieron a diferentes tipos de ácidos grasos libres después de desafíos cariogénicos con sacarosa. Los resultados de estos estudios indican que los biofilms de *S. mutans* expuestos primero a sacarosa y luego a los ácidos grasos libres insaturados, redujeron significativamente la cariogenicidad inducida por la sacarosa. Este efecto no fue solo en la acidogenicidad y la desmineralización del esmalte, sino también en las propiedades del biofilm (15). Del mismo modo, para verificar la actividad anticaries de los ácidos grasos libres, pero ahora con toda la biopelícula dental, la investigación llevó a cabo un estudio *in situ*, con un diseño cruzado, de boca dividida y doble ciego. Once jóvenes voluntarios sanos adultos tomaron un dispositivo palatino de acrílico con placas de esmalte durante 15 días. El biofilm formado en cada losa se sometió a una exposición altamente cariogénica por exposición al 20% de sacarosa ocho veces al día durante 5 minutos. En cuatro de los ocho desafíos, la exposición a la sacarosa fue seguida inmediatamente por la exposición al tratamiento experimental con ácidos grasos libres durante cinco minutos adicionales, incluyendo ácidos oleico, esteárico y linoleico, preparados a una concentración de 10 mM, dentro de los rangos de las concentraciones utilizadas previamente *in vitro* (84). Aunque en el estudio *in vitro* los ácidos monoinsaturados (oleico,  $\omega$ -6) y poliinsaturados (linoleico) redujeron la desmineralización, el ácido linoleico mostró una menor desmineralización del esmalte en el estudio *in vivo* (15). El ácido esteárico no mostró reducción en la desmineralización ni un efecto en las propiedades de la biopelícula (15), lo cual puede haber ocurrido gracias a su capacidad de insolubilidad en la matriz de naturaleza polar con la cual se realizó el desafío cariogénico. Es acá donde se enfocará la presente investigación, en evaluar el biofilms de *S. mutans* en un modelo biológico de caries *in vitro* frente a la exposición de ácidos grasos saturados e insaturados en una matriz con un agente surfactante.

A futuro, estos lípidos, pueden convertirse en una nueva estrategia anticaries. No es posible descartar que, aumentando el consumo de ácidos grasos, exista la posibilidad de un efecto

inhibidor de las caries, y también se derive en una disminución concomitante de carbohidratos en la dieta. Como herramientas terapéuticas, éstos podrían ser dirigidos como agentes farmacológicos que incluyan cierta concentración de ácidos grasos dentro de su composición.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el potencial efecto anticariogénico de la emulsión de ácidos grasos saturados, insaturados y mezclas de ellos, en un modelo biológico de caries *in vitro*.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar el efecto anticariogénico de la emulsión de ácidos grasos saturados, insaturados y mezclas de ellos, tras la exposición de sacarosa, en la desmineralización del esmalte.
- Determinar el efecto anticariogénico de la emulsión de ácidos grasos saturados, insaturados y mezclas de ellos, tras la exposición de sacarosa, sobre las propiedades de biofilms de *S. mutans*, expresadas en acidogenicidad, y microorganismos viables.

## 6. METODOLOGÍA

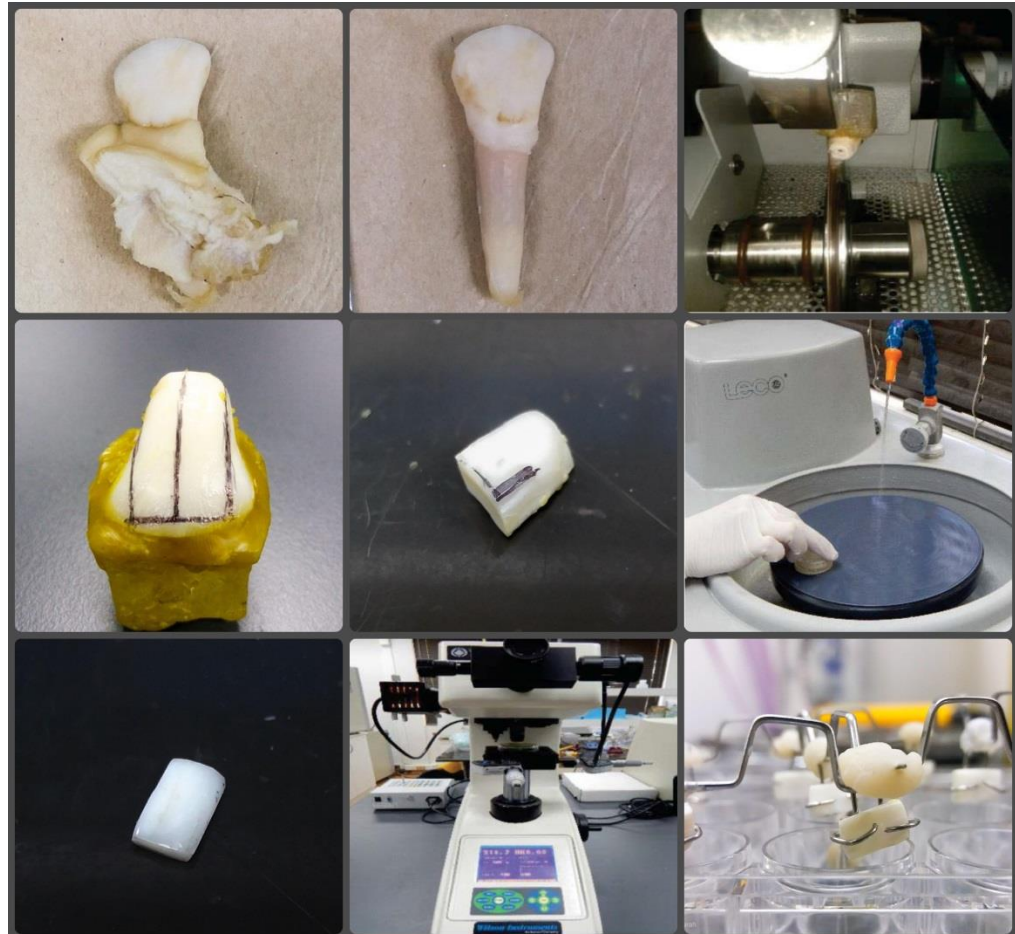
### 6.1 Diseño Experimental

El siguiente estudio utilizó un modelo biológico de caries *in vitro* (previamente estandarizado) (85), empleando bloques de esmalte bovino con biofilms de *S. mutans* UA 159 (85). Al comenzar el experimento, se midió la dureza superficial inicial de los bloques de esmalte. Luego los bloques fueron tratados para la formación del biofilm y asignados aleatoriamente en cada grupo de tratamientos control y experimental. Al finalizar el experimento, se midió la dureza superficial final de los bloques de esmalte, y se analizaron otras variables relacionadas con el biofilm. Los tratamientos controles fueron: i) 10% de sacarosa (control cariogénico) ii) fluoruro de sodio (NaF) al 0,05% (control anticariogénico), iii) cloruro de sodio (NaCl) al 0,9% (control negativo), iv) Tween 20 al 4% (control Tween). Los tratamientos experimentales fueron ácidos grasos de 16 y 18 carbonos: v) ácido palmítico (16:00), vi) esteárico (18:00), vii) ácido oleico (18:1 $\Delta^9$ ) y viii) linoleico (18:2 $\Delta^{9, 12}$ ). Además, se evaluaron dos tipos de mezclas de ácidos grasos: ix) ácidos oleico y linoleico; y x) ácidos oleico, linoleico y esteárico, todos expuestos a una concentración final de 10 mM. Los biofilms fueron expuestos a sacarosa al 10% y luego a los tratamientos ya mencionados por 5 min tres veces al día. El medio de cultivo fue cambiado dos veces al día. Al final del experimento, el biofilm fue separado de los bloques para el análisis de microorganismos viables. Los bloques sobre los que se cultivó y maduró el biofilm fueron recuperados para evaluar la dureza superficial final. La desmineralización producida durante el experimento se estimó mediante porcentaje de pérdida de dureza superficial (%PDS). La acidogenicidad de los biofilm fue estimada mediante medición del pH del medio de cultivo cada vez que este se cambiaba por uno nuevo. Cada tratamiento se realizó en triplicado, en tres fases diferentes (n=9).

## 6.2 Obtención de los bloques de esmalte bovino

Se obtuvieron incisivos de bovino los cuales fueron desinfectados en una solución de NaOCl al 5% y posteriormente limpiados para deshacerse de restos orgánicos. Luego se separó la raíz de la corona de los incisivos, con una cortadora con disco diamantado (LECO VC50 Diamond Saw, Michigan, USA), las coronas fueron almacenadas en NaCl 0,9% durante no más de 30 días. Usando una herramienta rotativa en pieza de mano con discos diamantados, se obtuvieron 40 bloques de esmalte de dimensiones de 5×9×2 mm. Una vez obtenidos los bloques y cercioradas las medidas, las superficies de esmalte fueron pulidas con lijas de granulación ascendente 400, 600, 800 y 1200, en una pulidora automática (LECO SS200, Michigan, USA). Finalmente, se terminó este proceso con discos de acabado y pulido (Sof-lex®, 3M, Minnessota, USA) completando 40 bloques de 4x7x1mm. Luego, se determinó la dureza superficial inicial de los bloques de esmalte usando un microindentador (402 MVD, Wolpert Wilson Instruments,USA). Se realizaron tres indentaciones en el centro, con un intervalo de 100 µm entre sí, usando indentación Knoop 50 g por 5 segundos. Se excluyeron de la muestra los bloques con valores de dureza mayores y menores a 400 y 250 respectivamente. Se calculó la media y la desviación estándar para cada bloque, con un coeficiente de variación máximo de un 9%. Se seleccionaron un total de 90 bloques de esmalte. Secuencialmente se incorporaron los bloques en una estructura de acero inoxidable especialmente diseñada en base a elementos ortodónticos, los cuales se esterilizaron usando autoclave a 121°C por 15 min. A continuación, los bloques de esmalte fueron cubiertos con saliva humana centrifugada y ultra filtrada (0,22 µm) durante 30 min. La saliva estimulada se obtuvo de dos donantes, quienes se encontraban en ayuno de 10 a 12 horas y sin lavado de dientes previamente. Para conservar sus propiedades, la saliva se mezcló con buffer AB y además con fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 1: 100 (v/v), un cóctel inhibidor de proteasa, todo esto con el fin de mantener las propiedades de la saliva. Esta capa de saliva en los bloques de

esmalte, permite la formación de una película adquirida, para la adherencia inicial de *S. mutans* (86).

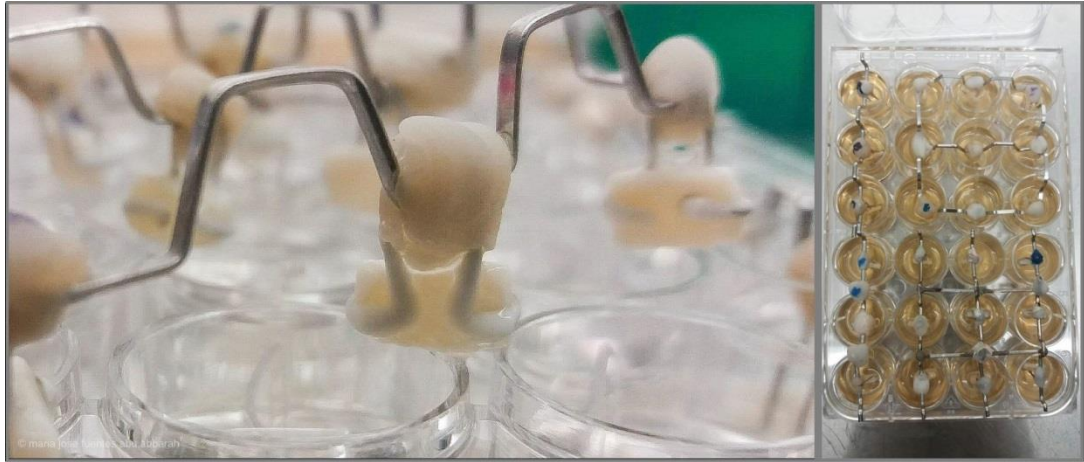


**Figura 3: Proceso de obtención de bloques de esmalte bovino.** 1. Incisivo de bovino recién extraído, antes de la limpieza. 2. Incisivo de bovino seleccionado. 3. Cortadora con disco diamantado, separando la corona de la raíz del incisivo. 4. Corona, con áreas delimitadas a cortar. 5. Bloque de esmalte antes de pulir. 6. Pulido de bloque. 7. Bloques pulidos de esmalte de bovino 4x7x1 mm. 8. Medición dureza superficial inicial con microindentador. 9. Montaje de los bloques de esmalte en aparato ortodóntico de acero inoxidable, diseñado para el modelo de caries *in vitro*.

### 6.3 Formación del biofilm de *Streptococcus mutans*

Se utilizaron colonias de tercera generación de *S. mutans* UA159 (SM) (gentilmente provistos por Prof. Rodrigo Arthur, UFRGS, RGS, Brasil) que se encontraban en stock a -80 °C. Estas fueron reactivadas en caldo BHI suplementado con glucosa al 1% (Merck, Darmstadt, Alemania) a 37 °C y 10% de CO<sub>2</sub> durante 18 horas. Se tomaron 10µL del inóculo y se sembraron en una placa de agar BHI, (Merck, Darmstadt, Alemania) la cual se incubó por 24 horas a 37 °C y 10% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se verificó la pureza de la placa y se seleccionaron de 5-10 colonias de *S. mutans* UA159, incorporándolas en un tubo estéril con medio BHI, suplementado con glucosa al 1%. Una vez que se alcanzó la densidad óptica (DO) 0,8 (600 nm)(87), se transfirió 100 µL de inóculo por cada 50 ml de medio BHI suplementado con sacarosa 1%. Después de homogenizar el cultivo, 2 mL fueron transferidos a cada pozo de la placa de cultivo (Corning Costar, Massachusetts, USA). Después de que los bloques de esmalte fueron esterilizados y con la película adquirida ya formada(86), fueron colocados en la placa de cultivo e incubados a 37 °C, 10% CO<sub>2</sub> por 8 h, para permitir la adherencia de los microorganismos a la película adquirida. Para alcanzar la madurez del biofilm antes del tratamiento, las biopelículas en los bloques se dejaron crecer durante 16 horas adicionales con glucosa 0,1 mM, que es similar a la concentración basal de glucosa en la saliva (85).



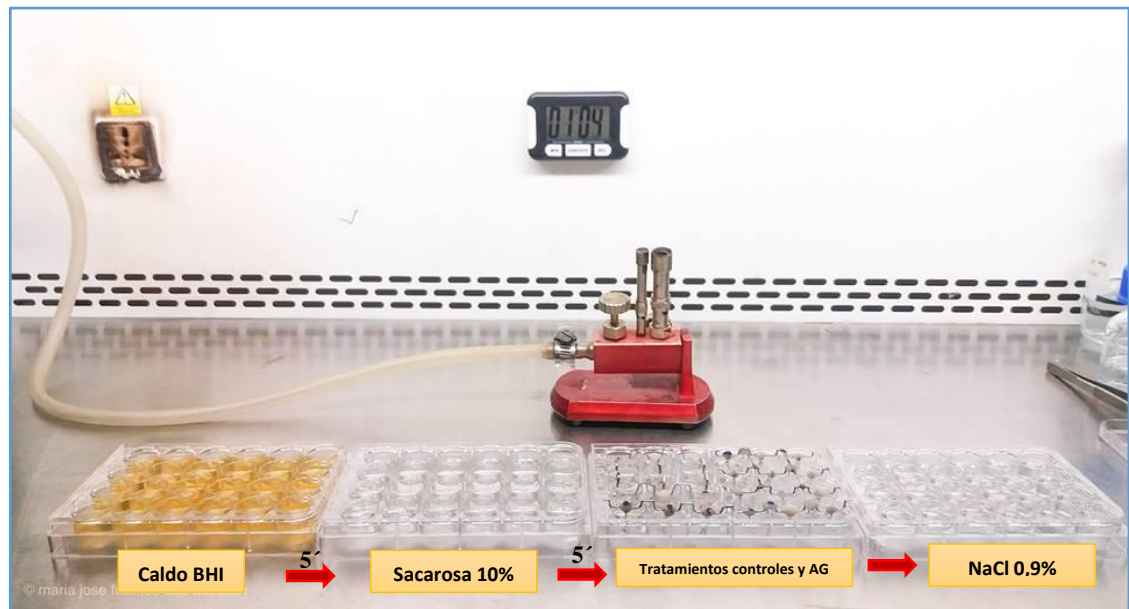


**Figura 4. Formación de biofilms de *S. mutans*** 1. Biofilm formado luego de 5 días de crecimiento. 2. Bloques de esmalte sumergidos en el inóculo bacteriano.

#### 6.4 Exposición de los biofilm a ácidos grasos

A cada bloque de esmalte se le asignó aleatoriamente uno de los diez tratamientos (85). Con el biofilm visiblemente maduro después de 16 horas de crecimiento, los bloques de los diferentes tratamientos, se expusieron tres veces por día, en momentos definidos (9:30, 13:30 y 17:30) al desafío cariogénico con sacarosa al 10% durante cinco minutos. Seguido, con la emulsión de ácidos los grasos, en etanol al 1% y Tween 20 al 4% (Calbiochem, California, USA) en H<sub>2</sub>O desionizada y esterilizada, por cinco minutos adicionales. El control negativo NaCl 0,9%, no fue expuesto al desafío cariogénico. Los ácidos grasos utilizados fueron: ácido oleico (18:1 $\Delta^9$ ), (Calbiochem, California, USA), linoleico (18:2 $\Delta^9$ ,<sup>12</sup>) (Calbiochem, California, USA), esteárico (18:00) (AppliChem, Darmstadt, Alemania) y palmítico (16:00) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Alemania). Después de la exposición a los diferentes tratamientos de ácidos grasos, los biofilms se lavaron tres veces con NaCl al 0,9% y se devolvieron a la misma posición en la placa. La soluciones control de este experimento fueron: sacarosa 10%, cloruro de sodio (NaCl) 0.9%, fluoruro de sodio (NaF)

0,05%, Tween 20 al 4%, quienes posterior a su exposición fueron lavado con NaCl al 0.9%. Se realizó un recambio de los medios de cultivo dos veces en el día, antes de la primera y luego de la última exposición. Este procedimiento se repitió durante 5 días, luego de los cuales se separaron los biofilm de los bloques de esmalte y se calculó número microorganismos viables. Se midió la dureza superficial final y se determinó el porcentaje de pérdida de dureza superficial. Cada tratamiento fue realizado en triplicado, en tres fases diferentes (n=9).



**Figura 5: Diseño experimental: Exposición de los bloques a los diferentes tratamientos.**

## 6.5 Acidogenicidad del biofilm

Como una forma de verificar la producción de ácido por el biofilm formado en el esmalte, se midió el pH del medio de cultivo dentro de cada pozo mediante un microelectrodo (HI 1083B, Hanna Instruments, Rumania) acoplado a un medidor de pH portátil (HI 9126-02, Hanna instruments, Rumania). Las mediciones se llevaron a cabo dos veces por día, antes de cada cambio de medio (9:30 y 17:30 horas), durante toda la duración del experimento.

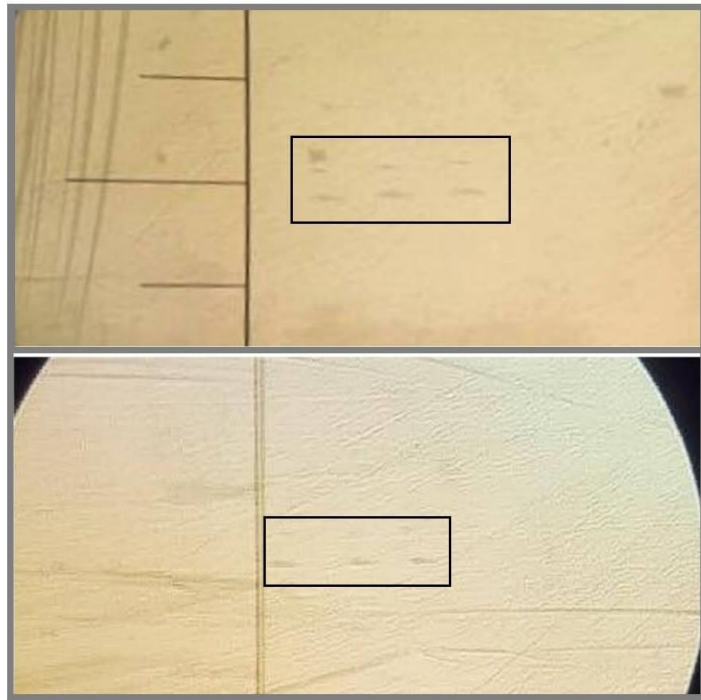
## 6.6 Desmineralización de los bloques

Después del experimento la dureza superficial fue evaluada con un microdurómetro (402 MVD, Wolpert Wilson Instruments, USA), el que permitió evaluar la desmineralización del esmalte (88). Se realizaron 3 indentaciones con una separación de 100  $\mu\text{m}$  entre sí en el centro del bloque dentario a 100  $\mu\text{m}$  de separación de los tres valores de referencia iniciales, usando indentación Knoop con una carga de 50 g por 5 segundos en esmalte, por lo tanto, los promedios de éstas tres mediciones fueron utilizados para calcular la dureza del esmalte (59). Para determinar el porcentaje de pérdida de dureza superficial (%PDS) se utilizó, la siguiente fórmula (85)

$$\% = \left( \frac{DS_{inicial} - DS_{posterior}}{DS_{inicial}} \right) * 100$$

:

Donde DS inicial corresponde a la dureza superficial del bloque dentario, medida antes de ser expuesto al tratamiento y DSposterior es la dureza superficial medida en el bloque dentario posterior a ser expuesto al tratamiento experimental.



**Figura 6: Comparación de la desmineralización del esmalte en bloques dentales bovinos.** 1. Bloque Control negativo (NaCl 0,9%) 2. Bloque expuesto a ácido graso palmítico. Se observan 6 indentaciones en cada bloque, las superiores corresponden a la dureza superficial inicial, y las inferiores, corresponden a la dureza superficial posterior a la exposición de los tratamientos.

### **6.7 Análisis de biofilm**

Una vez completados los 5 días de experimentación, se lavaron los bloques de esmalte con NaCl 0,9% y se separó el biofilm de los bloques, vortexeando los bloques por 30 segundos (Maxi Mix II tipo 37600 Mixer, Thermolyne, Iowa, USA), el biofilm fue resuspendido en 1 mL de NaCl al 0,9%. De esta solución obtenida se determinó, microorganismos viables (85).



1 1 3

**Figura 7: Separación del biofilm para su análisis. 1:** Retiro del bloque de esmalte de su dispositivo para dejar en tubo con NaCl al 0,9%. **2:** Vortex para separar biofilm del bloque de esmalte. **3:** Obtención de precipitado de biofilm al fondo del tubo.

### 6.8 Microorganismos viables desde el biofilm

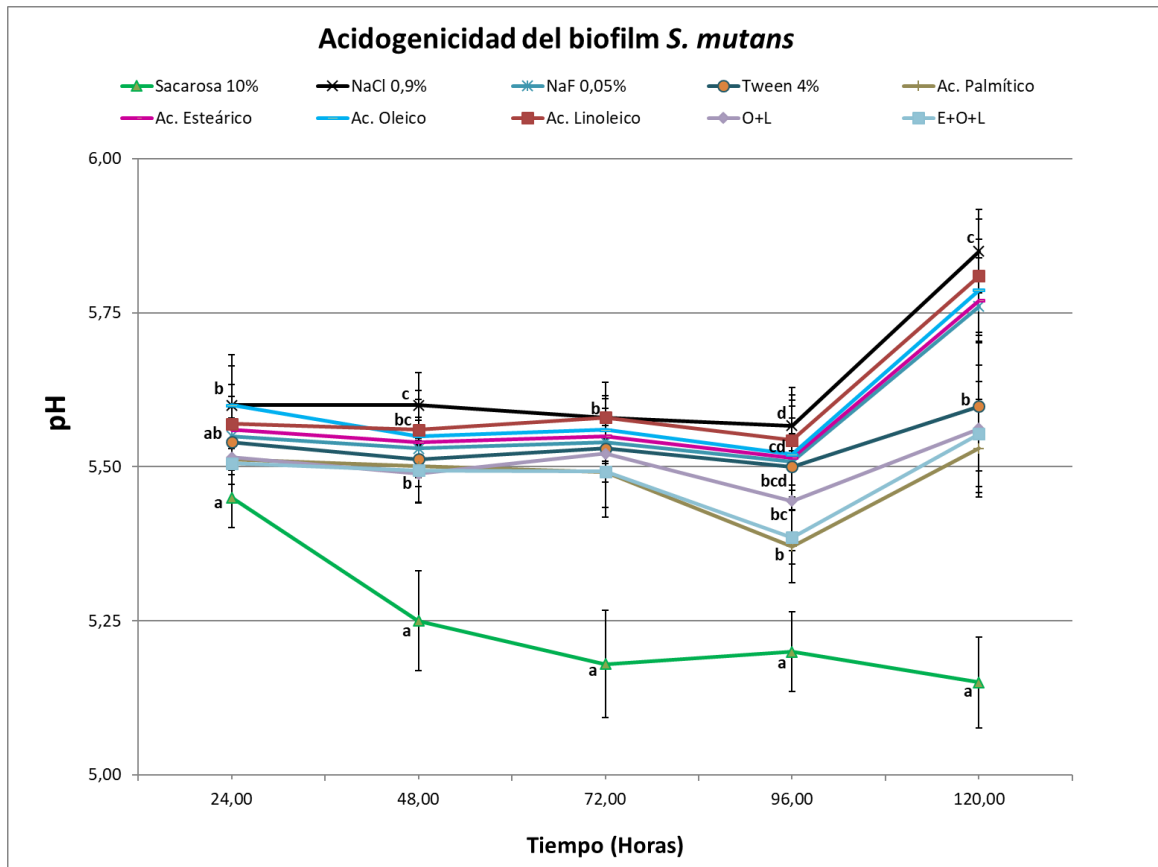
Usando ocho diluciones seriadas en NaCl al 0.9% de la suspensión del biofilm, se aplicaron 3 gotas de 20  $\mu$ l en medios de cultivo MSB para *S. mutans*. Luego se incubaron en condiciones anaeróbicas por 24 horas a 37 °C (Multigas Incubator MCO-19M, Panasonic, Osaka, Japón). Las unidades formadoras de colonias (UFC) se contaron bajo lupa (4x) a partir de la dilución más alta, que permitió la visualización de colonias distintivamente aisladas. Los datos de conteo se calibraron por el factor de dilución y se expresaron como UFC / ml del biofilm (89).

## **6.9 Análisis estadístico**

Las variables de este estudio fueron el pH, el %PDS, biomasa, microorganismos viables y polisacáridos extra e intracelulares. Se realizaron pruebas de normalidad, utilizando Shapiro Wilk, para evaluar la distribución de los datos, en los que se obtuvo una distribución normal, se utilizaron pruebas paramétricas. Todos los datos se analizaron mediante el software estadístico SPSS 25.0 para Windows (IBM Corporation, New York, USA). Las variables fueron sometidas a análisis de comparación múltiple de ANOVA de una vía con un post hoc de Tukey.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Acidogenicidad del biofilm *S. mutans*



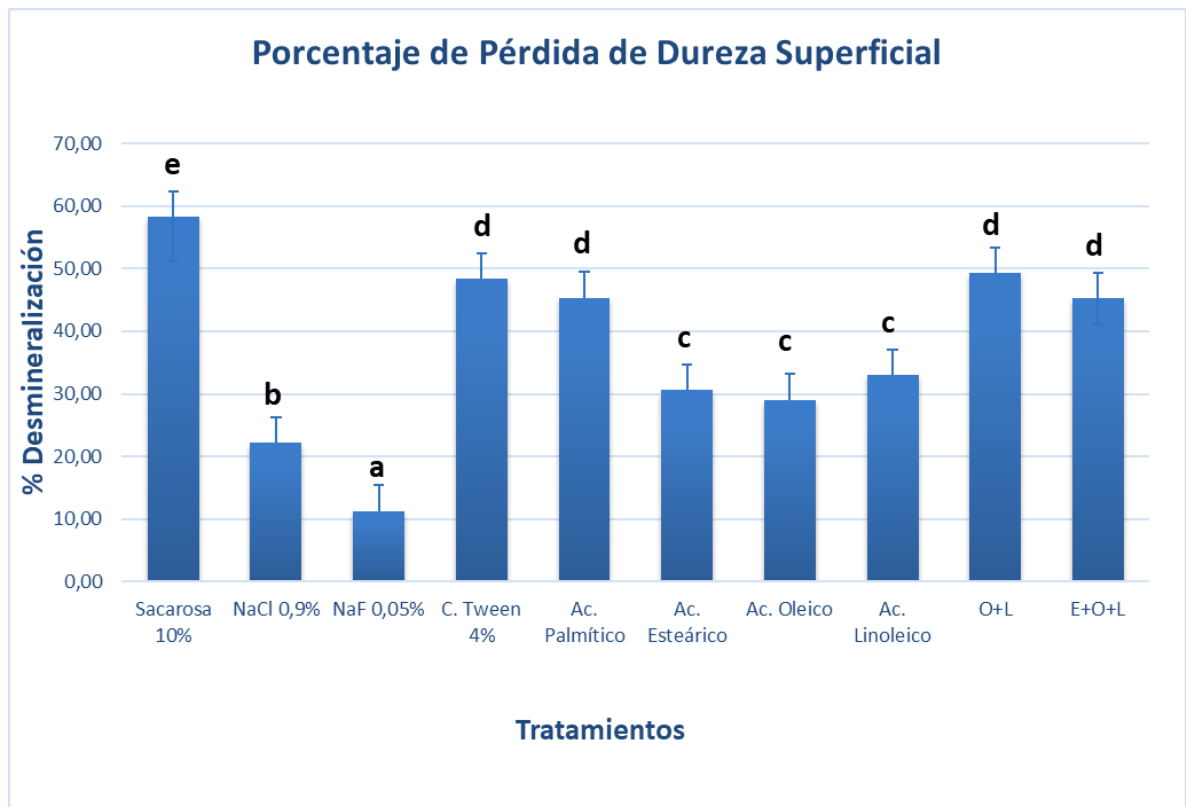
**Figura 8: Acidogenicidad del biofilm *S. mutans* al ser sometido a ácidos grasos saturados, insaturados y mezclas de ellos.** Los distintos tratamientos están señalados en la parte superior del gráfico, donde se observa, Ácido Palmítico, Ácido Esteárico, Ácido Oleico y Ácido Linoleico. Además de las mezclas entre ellos, Ácido Esteárico, Oleico y Linoleico (E+O+L) y Ácido Oleico junto con Ácido Linoleico (O+L). El control cariogénico (Sacarosa 10%), control anticariogénico (NaF 0,05%), control Tween (Tween 20 al 4%) y control negativo (NaCl 0,9%). Los puntos en el gráfico señalan el pH promedio de cada tratamiento (n=9, triplicado de tres fases) a las distintas horas que estuvieron cultivándose los bloques de esmalte. Las barras de error muestran la desviación estándar de

cada tratamiento. Diferentes letras en cada barra, representan diferencias estadísticamente significativas en un tiempo determinado. ( $p < 0,05$ ).

En la figura 8, se observa el pH de los biofilm a diferentes tiempos. Existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) en todas las horas estudiadas. A las 24 horas de inicio del experimento, entre el control cariogénico (sacarosa 10%) y los tratamientos con Ácido Oleico y NaCl 0,9% (control negativo) hay diferencias estadísticamente significativas. A las 48 horas, el control cariogénico (Sacarosa 10%) tiene diferencias significativas con el Ácido Palmítico y las mezclas de ácidos grasos. Estos a la vez, tienen diferencias con el control negativo NaCl al 0,9%. Ya finalizando el experimento, en la hora 120, el control cariogénico (sacarosa 10%) es quien presenta un mayor descenso de pH llegando a 5,15. Por el contrario los tratamientos con ácido Linoleico, Oleico, Esteárico y controles Anticariogénico NaF 0,05% y NaCl 0,9% (control negativo) presentan un aumento de pH, llegando este último control a un valor de 5,85. Los tratamientos con ácido Palmítico, las mezclas de ácidos grasos y Control Tween tienen diferencias estadísticamente significativas con los tratamientos que presentan el aumento y descenso de pH.



## 7.2. Desmineralización del esmalte

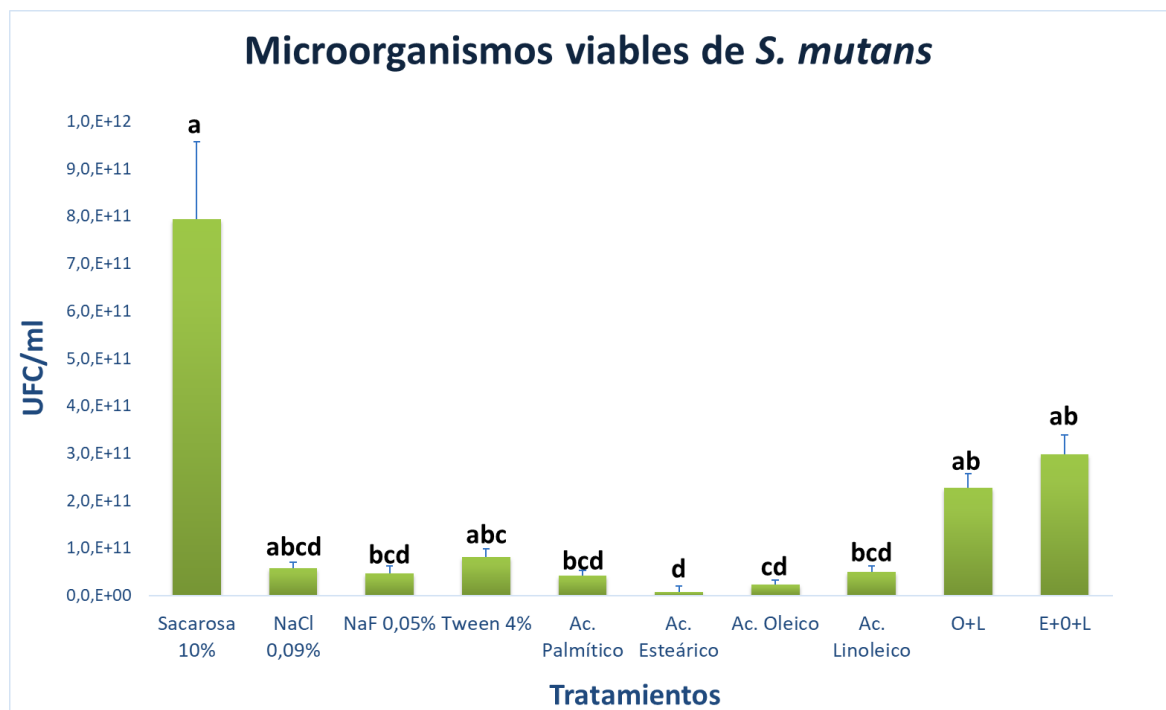


**Figura 9: Pérdida de dureza superficial (%PDS) en esmalte expuesto a ácidos grasos.** Las barras representan el promedio de %PDS del bloque de esmalte (n=9, triplicado de tres fases experimentales), las barras de error indican desviación estándar. Las letras diferentes demuestran que hay diferencias significativas entre grupos. ( $p < 0.05$ ).

En la desmineralización del esmalte (Figura 9), el Control cariogénico es el tratamiento que estadísticamente posee una mayor pérdida de dureza superficial con un valor de 58,29%. Por el contrario, el tratamiento con un menor porcentaje de desmineralización es NaF 0,05% (control anticariogénico) con un 11,28%. El tratamiento con NaCl al 0,09% posee diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de los tratamientos con un

porcentaje de 22.16%. Los ácidos grasos de 18 carbonos (Ac. Esteárico, Ac. Oleico y Ac. Linoleico) poseen diferencias estadísticamente significativas respecto a los tratamientos con mezclas de ácidos grasos (Oleico + Linoleico, Esteárico+ Oleico+ Linoleico), al tratamiento con Ac. Palmítico y al Control Tween 4%.

### 7.3. Microorganismos Viables del biofilm



**Figura 10: Microorganismos viables de los biofilms de *S. mutans* formados en esmalte.**

La cantidad de bacterias producidas por los biofilms de *S. mutans* expuestos a tratamientos con ácidos grasos y controles, fue contada y expresada en UFC. Las barras representan el promedio de colonias de *S. mutans* obtenidas por cada tratamiento (n=9, triplicado de tres fases experimentales) en esmalte. Las barras de error indican desviación estándar. Las letras diferentes representan diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0.05$ ).

En la figura 11, se presenta el promedio de las unidades formadoras de colonia de los microorganismos viables en los biofilm de los diferentes tratamientos de ácidos grasos y controles. Se observa que los tratamientos con ácido grasos de 18 carbono, (ac. Esteárico, Oleico y Linoleico) presentan valores estadísticamente significativos respecto a las mezclas de ácidos grasos y al control cariogénico (sacarosa 10%). Este último, es quien presenta el mayor recuento de UFC en relación a todos los otros tratamientos. El NaCl al 0,9% (control negativo) no presenta diferencias significativas con ningún grupo. Por otro lado, el control anticariogénico NaF 0,05%, y ac. Palmítico, sólo poseen desigualdad estadísticamente significativa con el control cariogénico (sacarosa 10%). Finalmente, el control Tween 20 al 4% sólo posee diferencias con el ac. Esteárico.

## 8. DISCUSIÓN

Si bien, el rol antimicrobiano de macronutrientes como los ácidos grasos de la dieta ha sido reportado (12, 15, 19-21, 84), la evidencia sigue siendo escasa para demostrar su rol anticariogénico. Las primeras investigaciones comenzaron a principios del siglo pasado, las cuales indicaron que la sacarosa no es el único factor dietético involucrado en la etiología de la caries. Los lípidos de la dieta pueden producir un efecto protector, pues inducirían una disminución de la cariogenicidad asociándolo a un descenso en la virulencia de los biofilms (17). Más recientemente se propone, que la exposición *in vitro* (15) al igual que *in situ* (84) de biofilm de *S. mutans* expuesto primero a sacarosa y luego a los ácidos grasos libres insaturados, reducen la cariogenicidad inducida por el disacárido.

Aunque estos estudios han abierto una nueva línea de investigación, es poca la evidencia del efecto de los ácidos grasos saturados en la capacidad anticariogénica. Diversas investigaciones se han realizado sobre el efecto antimicrobiano de los ácidos grasos de cadena corta y mediana para microorganismos orales (12, 21), pero nunca se ha expuesto el ácido palmítico (16:00) en un modelo de biofilm caries *in vitro*. Además, todas las investigaciones antes mencionadas se basaron en ácidos grasos libres y sus ésteres, desconociéndose el comportamiento antimicrobiano de las mezclas de ellos en igual proporción. Por estos motivos se llevó a cabo el presente estudio, donde se expusieron los biofilms de *S. mutans* a sacarosa y luego a una emulsión de ácidos grasos saturados, insaturados y mezclas de ellos. Los resultados que se obtuvieron concuerdan con las investigaciones anteriormente realizadas (15, 84).

Las biopelículas expuestas a ácidos grasos de 18 carbonos con agente surfactante, produjeron una reducción en la desmineralización del esmalte y en los microorganismos viables al ser comparado con su control cariogénico, ( $P < 0,05$ ). El ácido palmítico y todas las mezclas no mostraron reducción en la desmineralización. Se observaron diferencias

estadísticamente significativas en la acidogenicidad del biofilm, entre los tratamientos con ácidos grasos en la hora 120. ( $P < 0.05$ ). El experimento fue realizado en triplicado, en tres fases diferentes (n=9) por 5 días consecutivos.

Para comprender los resultados de la presente investigación, es necesario conocer la actividad antimicrobiana de los ácidos grasos contra diferentes microorganismos orales, siendo más efectiva sobre bacterias de tipo Gram positivas que en Gram negativas, en cadenas de carbono más largas (90) e insaturadas (19). Además, se ha postulado que los ácidos grasos actúan como sustancias inhibidoras del metabolismo bacteriano, lo que se traduce en una supresión de la actividad enzimática, déficit en la obtención de nutrientes y la generación de productos tóxicos (18). Esto está dado, por la regulación negativa de los genes virulentos encargados de formar el biofilm. Entre ellos se encuentran, *gtfB* y *ftf*, que codifican enzimas que catalizan la escisión de sacarosa para sintetizar polisacáridos extracelulares de glucano y fructano, que facilitan la adherencia y agregación de las bacterias (91). Por otro lado, se propone que estos ácidos grasos se asemejan a la membrana bipolar bacteriana, ya que tienen una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica. Gracias a estas características anfipáticas de los ácidos grasos, actuarían sobre la membrana celular, penetrando e interrumpiendo la función normal de éstas. De esta forma, afectan principalmente la integridad de la membrana plasmática bacteriana, adquiriendo mayor fluidez y permeabilidad, generando poros que provocan el colapso de la bacteria afectada, y por consecuencia, alterando las funciones vitales como la fosforilación oxidativa (92, 93).

Los ácidos grasos tienen dos vías para ser utilizados por la maquinaria metabólica bacteriana. Por un lado, está la forma más prevalente que es la destinación de estos para formar diversas estructuras lipídicas dentro del citoplasma. En este proceso la célula realizará pequeñas modificaciones con el menor gasto energético posible, utilizando estos

ácidos grasos en estructuras existentes. La segunda vía es la metabolización de los ácidos grasos para la producción energética. Esta se lleva a cabo al interior de la mitocondria, se subdivide en tres pasos, la  $\beta$ -oxidación, ciclo del ácido cítrico y la cadena respiratoria, permitiendo que se conserve energía en forma de ATP (86).

Al analizar el gráfico de la figura 8, se observa la acidogenicidad de los biofilm, desde las 24 horas hasta el término del experimento, 120 horas. El pH del control cariogénico (sacarosa 10%) disminuyó significativamente en relación con los otros tratamientos. Es así como llega al valor 5,15 en la hora 120. Esto es debido, a que el principal el factor de virulencia del *S. mutans*, es la producción y tolerancia al pH ácido (34). Se evidencia que existe un aumento en la concentración microbiana del biofilm, que puede bajar el pH por debajo de los 5.5 afectando a la organización de la membrana del *S. mutans*, induciendo un cambio en el perfil lipídico de ésta. Se aumenta la proporción de ácidos grasos monoinsaturados en la membrana bacteriana (94), lo que desencadena una mayor supervivencia ácida por un aumento en la actividad ATPasa (95). Si se bloquea el aumento a ácidos grasos monoinsaturados mediante la adición de un inhibidor de la biosíntesis de ácidos grasos, el organismo se vuelve más sensible al pH ácido. La enzima, codificada por el gen *FabM*, es la responsable de la producción de ácidos grasos monoinsaturados (96).

En cuanto a los datos de las muestras tratadas con NaF 0,05% (control anticariogénico), se ha estudiado que la velocidad de producción de ácidos de los biofilm expuestos a fluoruros, cuales disminuyen a medida que aumenta la edad de éste (97). Finalmente, los ácidos grasos poseen diferencias estadísticas entre sí ( $p < 0,05$ ) en la hora 120, tratamientos con ácido Linoleico, Oleico, Esteárico y controles Anticariogénico NaF 0,05% y NaCl 0,9% (control negativo) presentan un aumento de pH, llegando este último control negativo a un valor de 5,85. Los tratamientos con ácido Palmítico, las mezclas de ácidos grasos y Control Tween 20 al 4%, tienen diferencias estadísticamente significativas con los tratamientos que presentan un aumento de pH. Al igual que el control cariogénico, el

aumento en la concentración microbiana del biofilm tiene una directa relación en el valor del pH (34). Por lo tanto, en los tratamientos que presentan una acidificación del medio de cultivo se espera una mayor desmineralización, mayor concentración microbiana del biofilm y menor efecto antibacteriano (84).

La desmineralización en el esmalte es producida por la caída del pH en el biofilm, a medida que éste desciende, disminuyen las concentraciones de calcio y fosfato, llegando al punto en que estas concentraciones son insuficientes para evitar la disolución de los cristales de hidroxiapatita (40). En la figura 9, el control cariogénico (Sacarosa 10%), es el tratamiento que posee una mayor pérdida de dureza superficial del esmalte, esto es consecuente con la acidogenicidad que presenta su biofilm, debido a la producción de ácidos por los azúcares fermentables (34). Por el contrario, el tratamiento con un menor porcentaje de desmineralización es NaF 0,05% (control anticariogénico) con un 11.28%, este hallazgo respalda los datos clínicos, los que sugieren un modelo dosis-respuesta a la concentración del fluoruro para controlar la caries del esmalte (98, 99). Los ácidos grasos de 18 carbonos, Oleico, Linoelico y Esteárico poseen una menor pérdida de dureza superficial en comparación al resto de los tratamientos con ácidos grasos y al control Tween 20. En los ácidos grasos de 18 carbonos insaturados, Oleico y Linoleico, el resultado obtenido tiene relación a estudios previos (11, 15, 84), no así el ácido graso Esteárico. Al estar en una emulsión con Tween 20 al 4%, las micelas pudieron interactuar con el biofilm de *S. mutans*, generando cambios significativos en la desmineralización del esmalte en comparación a estudios anteriores (15).

Existe un aumento en la desmineralización del esmalte, al mezclar ácidos grasos de diferentes grados de saturación. Es interesante observar que cuando se mezclan ácidos grasos de 18 carbonos saturados (ac. Esteárico), con insaturados (Oleico y Linoleico), se pierden sus propiedades antibacterianas. Resultando un efecto antagónico, en vez del efecto sinérgico esperado. Se propone que la concentración micelar crítica y que el tamaño de la

partícula son parámetros claves para los adyuvantes tensioactivos (100). Existen parámetros moleculares necesarios para penetrar eficientemente las biopelículas bacterianas. Una fracción considerable del biofilm del *S. mutans* no es accesible para moléculas solutas en la difusión. Esto está influenciado por interacciones electrostáticas de los componentes de la biopelícula, cuales además son muy dependientes del tamaño de las moléculas difusoras (101). Las cargas del Tween 20 al 4% junto a la mezclas de ácidos grasos se pueden ver alteradas, al igual del tamaño de sus partículas, por lo tanto, no penetran eficientemente el biofilm del *S. mutans*. Por lo tanto, la accesibilidad restringida de macromoléculas y macroconjuntos a los biofilm debe examinarse cuidadosamente para ofrecer pautas en el desarrollo de nuevos tratamientos antibacterianos.

Del ácido Palmítico sólo existen estudios planctónicos, sobre su capacidad antimicrobiana sobre el *S. mutans* en relación a UFC a las 24 horas (21). Éste ácido graso. posee un 45% de porcentaje de pérdida de dureza superficial, esto es porque la potencia antibacteriana de cada ácido graso libre, está influenciada por su estructura y forma molecular, incluida la longitud de la cadena de carbono y la presencia, número, posición y orientación de dobles enlaces (18).

En relación a los microorganismos viables de los biofilm (figura 10), se observa un efecto antibacteriano de los diferentes tratamientos con los ácidos grasos de 18 carbonos. En donde, el ácido Esteárico incluso supera al efecto del control anticariogénico (NaF 0,05%). Además, se observa que los tratamientos con ácido grasos de 18 carbono presentan valores estadísticamente significativos respecto a las mezclas de ácidos grasos y al control cariogénico (sacarosa 10%). El daño de las membranas bacterianas puede estar relacionado con la disminución de la viabilidad. La regulación negativa de la expresión génica asociada al biofilm, puede contribuir a la inhibición del crecimiento bacteriano (91).



El NaCl al 0,9% (control negativo) no presenta diferencias significativas con ningún grupo. Este control nunca se expuso al desafío cariogénico de Sacarosa al 10% por 5 minutos, por lo tanto, el *S. mutans* del aquel biofilm no se multiplicó exponencialmente, pero sí sobrevivió en condiciones basales, gracias al azúcar aportada por el medio de cultivo BHI. Por otro lado, el control anticariogénico NaF 0,05%, y el tratamiento con ac. Palmítico, sólo poseen desigualdad estadísticamente significativa con el control cariogénico (sacarosa 10%). Teniendo estos un efecto antibacteriano, pero no superior al de los ácidos grasos de 18 carbono. Finalmente, el control Tween 20 al 4% sólo posee diferencias significativas con el ac. Esteárico, sin embargo, su viabilidad bacteriana no se desarrolla exponencialmente como control cariogénico, ni se inhibe como el control anticaries (NaF 0,05%). Esto ocurre, porque no presenta ningún efecto antimicrobiano.

Estos resultados sugieren que los ácidos grasos de 18 carbonos pueden ser potencialmente agentes terapéuticos suplementarios para la prevención y el tratamiento de la caries dental.

Se justifican estudios adicionales, especialmente en condiciones *in vivo*. Porque las biopelículas orales no están formadas por una sola especie de bacteria. Son un consorcio microbiano multiespecies (102). Además de *S. mutans*, se encuentra *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* y *Lactobacillus acidophilus*, entre otros (103). Por lo tanto, aún existe el desafío de inhibir la virulencia de las biopelículas sin inducir necesariamente una disbiosis microbiana de la cavidad oral.

Finalmente, cada vez más patógenos orales han desarrollado resistencia a los antibióticos (104). Los ácidos grasos pueden ser una buena herramienta para la disminución de ésta, ya que no poseen un sólo mecanismo antibacteriano, y los efectos adversos secundarios, como diarrea, vómitos y manchas en los dientes son mínimos (105). A diferencia de los antibióticos convencionales como la clorhexidina, algunas de las

estrategias de tratamiento novedosas apuntan específicamente a las características únicas de los biofilm, para minimizar o eliminar la resistencia a los medicamentos de la biopelícula oral (102).

## 9. CONCLUSIÓN

Los ácidos grasos de 18 carbonos, saturados e insaturados tienen un efecto anticariogénico, sobre el biofilm de *S. mutans* en un modelo de caries *in vitro*. No así, los ácidos grasos saturados de 16 carbonos, quienes carecen de estas propiedades anticariogénicas. Las mezclas de ácidos grasos, pierden las propiedades antibacterianas que tenían estos al estar solos.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kassebaum NJ, Smith AGC, Bernabe E, Fleming TD, Reynolds AE, Vos T, et al. Global, Regional, and National Prevalence, Incidence, and Disability-Adjusted Life Years for Oral Conditions for 195 Countries, 1990-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors. *J Dent Res.* 2017;96(4):380-7.
2. Kassebaum NJ, Bernabe E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJ, Marcenes W. Global burden of untreated caries: a systematic review and metaregression. *J Dent Res.* 2015;94(5):650-8.
3. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ.* 2005;83(9):661-9.
4. Fejerskov O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res.* 2004;38(3):182-91.
5. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* 2004;38(3):204-11.
6. Giacaman RA. Sugars and beyond. The role of sugars and the other nutrients and their potential impact on caries. *Oral Dis.* 2017.
7. Simon-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol.* 2015;23(2):76-82.
8. Sheiham A, James WP. Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized. *J Dent Res.* 2015;94(10):1341-7.
9. Berkowitz R. Etiology of nursing caries: a microbiologic perspective. *J Public Health Dent.* 1996;56(1):51-4.
10. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers.* 2017;3:17030.
11. Diaz-Garrido N, Lozano C, Giacaman RA. Frequency of sucrose exposure on the cariogenicity of a biofilm-caries model. *Eur J Dent.* 2016;10(3):345-50.
12. Kabara JJ, Swieczkowski DM, Conley AJ, Truant JP. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1972;2(1):23-8.

13. Hayes ML. The effects of fatty acids and their monoesters on the metabolic activity of dental plaque. *J Dent Res.* 1984;63(1):2-5.
14. Schuster GS, Dirksen TR, Ciarlone AE, Burnett GW, Reynolds MT, Lankford MT. Anticaries and antiplaque potential of free-fatty acids in vitro and in vivo. *Pharmacol Ther Dent.* 1980;5(1-2):25-33.
15. Giacaman RA, Jobet-Vila P, Munoz-Sandoval C. Fatty acid effect on sucrose-induced enamel demineralization and cariogenicity of an experimental biofilm-caries model. *Odontology.* 2015;103(2):169-76.
16. Desbois AP, Lawlor KC. Antibacterial activity of long-chain polyunsaturated fatty acids against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. *Mar Drugs.* 2013;11(11):4544-57.
17. Kabara JJ. Dietary lipids as anticariogenic agents. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 1986;6(3-4):87-113.
18. Desbois AP, Smith VJ. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;85(6):1629-42.
19. Huang CB, Ebersole JL. A novel bioactivity of omega-3 polyunsaturated fatty acids and their ester derivatives. *Mol Oral Microbiol.* 2010;25(1):75-80.
20. Huang CB, George B, Ebersole JL. Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. *Arch Oral Biol.* 2010;55(8):555-60.
21. Huang CB, Alimova Y, Myers TM, Ebersole JL. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. *Arch Oral Biol.* 2011;56(7):650-4.
22. Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century--the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003;31 Suppl 1:3-23.
23. Sheiham A. Oral health, general health and quality of life. *Bull World Health Organ.* 2005;83(9):644.
24. Urzua I, Mendoza C, Arteaga O, Rodriguez G, Cabello R, Faleiros S, et al. Dental caries prevalence and tooth loss in Chilean adult population: first national dental examination survey. *Int J Dent.* 2012;2012:810170.

25. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology*. 2003;149(Pt 2):279-94.
26. Pitts NBZ, D. T. White paper on dental caries prevention and management. FDI World Dental Federation. 2016;[http://www.fdiworlddental.org/sites/default/files/media/documents/2016-fdi\\_cpp-white\\_paper.pdf](http://www.fdiworlddental.org/sites/default/files/media/documents/2016-fdi_cpp-white_paper.pdf).
27. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000*. 2002;28:12-55.
28. Ferrer M, López López A, Camelo A, Simon-Soro A, Mira A. La microbiota oral2016.
29. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res*. 2011;90(3):294-303.
30. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation--new insight. *J Dent Res*. 2006;85(10):878-87.
31. Lemos JA, Quivey RG, Jr., Koo H, Abranches J. *Streptococcus mutans*: a new Gram-positive paradigm? *Microbiology*. 2013;159(Pt 3):436-45.
32. Banas JA, Vickerman MM. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(2):89-99.
33. Jakubovics NS, Yassin SA, Rickard AH. Community interactions of oral streptococci. *Adv Appl Microbiol*. 2014;87:43-110.
34. Krzysciak W, Jurczak A, Koscielniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(4):499-515.
35. Koo H, Falsetta ML, Klein MI. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Dent Res*. 2013;92(12):1065-73.
36. Simmer JP, Fincham AG. Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1995;6(2):84-108.
37. Elliott JC, Holcomb DW, Young RA. Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel. *Calcif Tissue Int*. 1985;37(4):372-5.

38. Robinson C, Kirkham J, Stonehouse NJ, Shore RC. Control of crystal growth during enamel maturation. *Connect Tissue Res.* 1989;22(1-4):139-45.
39. Eanes ED. Enamel apatite: chemistry, structure and properties. *J Dent Res.* 1979;58(Spec Issue B):829-36.
40. Bradshaw DJ, Lynch RJ. Diet and the microbial aetiology of dental caries: new paradigms. *Int Dent J.* 2013;63 Suppl 2:64-72.
41. Dawes C. What is the critical pH and why does a tooth dissolve in acid? *J Can Dent Assoc.* 2003;69(11):722-4.
42. Struzycka I. The oral microbiome in dental caries. *Pol J Microbiol.* 2014;63(2):127-35.
43. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community - implications for health and disease. *BMC Oral Health.* 2006;6 Suppl 1:S14.
44. Kreth J, Giacaman RA, Raghavan R, Merritt J. The road less traveled - defining molecular commensalism with *Streptococcus sanguinis*. *Mol Oral Microbiol.* 2017;32(3):181-96.
45. Beighton D, Hellyer PH, Lynch EJ, Heath MR. Salivary levels of mutans streptococci, lactobacilli, yeasts, and root caries prevalence in non-institutionalized elderly dental patients. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1991;19(5):302-7.
46. Eckert R, Sullivan R, Shi W. Targeted antimicrobial treatment to re-establish a healthy microbial flora for long-term protection. *Adv Dent Res.* 2012;24(2):94-7.
47. Mantzourani M, Fenlon M, Beighton D. Association between Bifidobacteriaceae and the clinical severity of root caries lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24(1):32-7.
48. Van Houte J, Sansone C, Joshipura K, Kent R. In vitro acidogenic potential and mutans streptococci of human smooth-surface plaque associated with initial caries lesions and sound enamel. *J Dent Res.* 1991;70(12):1497-502.
49. Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2005;33(4):248-55.
50. Giacaman RA, Araneda E, Padilla C. Association between biofilm-forming isolates of mutans streptococci and caries experience in adults. *Arch Oral Biol.* 2010;55(8):550-4.

51. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5721-32.
52. Benitez-Paez A, Belda-Ferre P, Simon-Soro A, Mira A. Microbiota diversity and gene expression dynamics in human oral biofilms. *BMC Genomics.* 2014;15:311.
53. Simon-Soro A, Guillen-Navarro M, Mira A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *J Oral Microbiol.* 2014;6:25443.
54. Moynihan P. The interrelationship between diet and oral health. *Proc Nutr Soc.* 2005;64(4):571-80.
55. Sheiham A. Dietary effects on dental diseases. *Public Health Nutr.* 2001;4(2B):569-91.
56. Moynihan PJ. The role of diet and nutrition in the etiology and prevention of oral diseases. *Bull World Health Organ.* 2005;83(9):694-9.
57. Al-Dajani M, Limeback H. Emerging science in the dietary control and prevention of dental caries. *J Calif Dent Assoc.* 2012;40(10):799-804.
58. Zero DT. Sugars - the arch criminal? *Caries Res.* 2004;38(3):277-85.
59. Cury JA, Rebelo MA, Del Bel Cury AA, Derbyshire MT, Tabchoury CP. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Res.* 2000;34(6):491-7.
60. Moynihan P, Petersen PE. Diet, nutrition and the prevention of dental diseases. *Public Health Nutr.* 2004;7(1A):201-26.
61. Anderson CA, Curzon ME, Van Loveren C, Tatsi C, Duggal MS. Sucrose and dental caries: a review of the evidence. *Obes Rev.* 2009;10 Suppl 1:41-54.
62. Bernabe E, Vehkalahti MM, Sheiham A, Lundqvist A, Suominen AL. The Shape of the Dose-Response Relationship between Sugars and Caries in Adults. *J Dent Res.* 2016;95(2):167-72.
63. Moynihan PJ, Kelly SA. Effect on caries of restricting sugars intake: systematic review to inform WHO guidelines. *J Dent Res.* 2014;93(1):8-18.
64. Guideline: Sugars Intake for Adults and Children. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Geneva2015.



65. Raigond P, Ezekiel R, Raigond B. Resistant starch in food: a review. *J Sci Food Agric.* 2015;95(10):1968-78.
66. Lingstrom P, van Houte J, Kashket S. Food starches and dental caries. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(3):366-80.
67. Halvorsrud K, Lewney J, Craig D, Moynihan PJ. Effects of Starch on Oral Health: Systematic Review to Inform WHO Guideline. *J Dent Res.* 2018:22034518788283.
68. Pertierra AG, Rivera JMT. Bioquímica metabólica. Conceptos y tests: Editorial Tébar, S. L.; 2009.
69. Burne RA, Marquis RE. Alkali production by oral bacteria and protection against dental caries. *FEMS Microbiol Lett.* 2000;193(1):1-6.
70. Takahashi N. Oral Microbiome Metabolism: From "Who Are They?" to "What Are They Doing?". *J Dent Res.* 2015;94(12):1628-37.
71. Ferreira SS, Scaramucci T, Hara AT, Aoki IV, Sobral MA. Supplementation of an orange juice with dietary proteins to prevent enamel and dentin erosion. *Braz Dent J.* 2015;26(3):263-7.
72. Giacaman RA J-VP, Muñoz-Sandoval C. Anti-caries activity of egg ovalbumin in an experimental caries biofilm model on enamel and dentin. 61th ORCA Congress July 2–5; Germany, Greifswald, 2014.
73. Giacaman R JC, Valenzuela-Ramos R. Anticariogenic activity of egg ovalbumin after sucrose exposure to the oral biofilm on enamel, in situ. 62th ORCA Congress July 1–4,; Brussels, Belgium 2015.
74. Irz X, Shankar, B., & Srinivasan, C. S. . Dietary Recommendations in the Report of a Joint WHO/FAO. Expert Consultation on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. WHO Technical Report Series; 2003.
75. Tvrzicka E, Kremmyda LS, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011;155(2):117-30.

76. Kremmyda LS, Tvrzicka E, Stankova B, Zak A. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease: a review. part 2: fatty acid physiological roles and applications in human health and disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2011;155(3):195-218.
77. Calder PC. Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2015;39(1 Suppl):18S-32S.
78. Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr.* 2002;56 Suppl 3:S14-9.
79. Rioux V, Legrand P. Saturated fatty acids: simple molecular structures with complex cellular functions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007;10(6):752-8.
80. Whelan J, Fritsche K. Linoleic acid. *Adv Nutr.* 2013;4(3):311-2.
81. Bowen WH. Food components and caries. *Adv Dent Res.* 1994;8(2):215-20.
82. Williams KA, Schemehorn BR, McDonald JL, Jr., Stookey GK, Katz S. Influence of selected fatty acids upon plaque formation and caries in the rat. *Arch Oral Biol.* 1982;27(12):1027-31.
83. Osborn MO, Carey JF, Fisher AK. Effect of dietary protein and fat on dental caries in the rat. *J Dent Res.* 1966;45(5):1564.
84. Giacaman RA, Valenzuela-Ramos R, Munoz-Sandoval C. In situ anticariogenic activity of free fatty acids after sucrose exposure to oral biofilms formed on enamel. *Am J Dent.* 2016;29(2):81-6.
85. Ccahuana-Vasquez RA, Cury JA. *S. mutans* biofilm model to evaluate antimicrobial substances and enamel demineralization. *Braz Oral Res.* 2010;24(2):135-41.
86. Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(5):782-9.
87. Giacaman RA, Munoz MJ, Ccahuana-Vasquez RA, Munoz-Sandoval C, Cury JA. Effect of fluoridated milk on enamel and root dentin demineralization evaluated by a biofilm caries model. *Caries Res.* 2012;46(5):460-6.
88. Zero DT. In situ caries models. *Adv Dent Res.* 1995;9(3):214-30; discussion 31-4.

89. Aires CP, Del Bel Cury AA, Tenuta LM, Klein MI, Koo H, Duarte S, et al. Effect of starch and sucrose on dental biofilm formation and on root dentine demineralization. *Caries Res.* 2008;42(5):380-6.
90. Nieman C. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriol Rev.* 1954;18(2):147-63.
91. Sun M, Dong J, Xia Y, Shu R. Antibacterial activities of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) against planktonic and biofilm growing *Streptococcus mutans*. *Microb Pathog.* 2017;107:212-8.
92. Sheu CW, Konings WN, Freese E. Effects of acetate and other short-chain fatty acids on sugar and amino acid uptake of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 1972;111(2):525-30.
93. Wojtczak L, Wieckowski MR. The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr.* 1999;31(5):447-55.
94. Fozo EM, Quivey RG, Jr. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(2):929-36.
95. Bojanich MA, Calderon RO. *Streptococcus mutans* membrane lipid composition: Virulence factors and structural parameters. *Arch Oral Biol.* 2017;81:74-80.
96. Fozo EM, Quivey RG, Jr. The *fabM* gene product of *Streptococcus mutans* is responsible for the synthesis of monounsaturated fatty acids and is necessary for survival at low pH. *J Bacteriol.* 2004;186(13):4152-8.
97. Chau NP, Pandit S, Jung JE, Jeon JG. Evaluation of *Streptococcus mutans* adhesion to fluoride varnishes and subsequent change in biofilm accumulation and acidogenicity. *J Dent.* 2014;42(6):726-34.
98. Fernandez CE, Tenuta LM, Cury JA. Validation of a Cariogenic Biofilm Model to Evaluate the Effect of Fluoride on Enamel and Root Dentine Demineralization. *PLoS One.* 2016;11(1):e0146478.
99. Fernandez CE, Fontana M, Samarian D, Cury JA, Rickard AH, Gonzalez-Cabezas C. Effect of Fluoride-Containing Toothpastes on Enamel Demineralization and *Streptococcus mutans* Biofilm Architecture. *Caries Res.* 2016;50(2):151-8.

100. Yoshino N, Takeshita R, Kawamura H, Murakami K, Sasaki Y, Sugiyama I, et al. Critical micelle concentration and particle size determine adjuvanticity of cyclic lipopeptides. *Scand J Immunol*. 2018:e12698.
101. Chen F, Rice KC, Liu XM, Reinhardt RA, Bayles KW, Wang D. Triclosan-loaded tooth-binding micelles for prevention and treatment of dental biofilm. *Pharm Res*. 2010;27(11):2356-64.
102. Kuang X, Chen V, Xu X. Novel Approaches to the Control of Oral Microbial Biofilms. *Biomed Res Int*. 2018;2018:6498932.
103. Janardhanan S, Mahendra J, Giriya AS, Mahendra L, Priyadharsini V. Antimicrobial Effects of *Garcinia Mangostana* on Cariogenic Microorganisms. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(1):ZC19-ZC22.
104. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(2):114-22.
105. Leisteuvo J, Jarvinen H, Osterblad M, Leisteuvo T, Huovinen P, Tenovuo J. Resistance to mercury and antimicrobial agents in *Streptococcus mutans* isolates from human subjects in relation to exposure to dental amalgam fillings. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(2):456-7.