



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional

Esta licencia permite a otras combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial, siempre y cuando den crédito y licencia a nuevas creaciones bajo los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>

**UNIVERSIDAD NACIONAL “SAN LUIS GONZAGA” DE ICA
ESCUELA DE POSGRADO**



**EFFECTO DE DIFERENTES LECHE DE ALIMENTACION INFANTIL
EN EL CRECIMIENTO DE *Streptococcus mutans* EN EL BIOFILM.
ESTUDIO *IN VITRO***

**Tesis para optar el grado de:
DOCTOR EN SALUD PUBLICA**

Autor:

MG. SARA CASTAÑEDA SARMIENTO

ASESOR:

Dr. JUAN MAYAUTE GHEZZI

ICA-PERÚ

2021

DEDICATORIA:

Al Maestro por excelencia, nuestro Señor Jesucristo, por guiar mis pasos a mi destino y al propósito de mi vida

A ti padre, Eusebio Castañeda Mendoza en memoria de tu legado y el dolor de tu ausencia

A ti hermoso regalo de nuestro Dios, a ti mi máxima expresión de amor, a ti mi querida Ruth Morales

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Juan Ghezzi Mayaute, Dra. Kelly Kathering Achachao Almerco, por su inspiración, constancia y aliento en los momentos precisos que inspiraron el término de mi estudio.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue valorar y comparar la formación de biofilm *in vitro* de *Streptococcus mutans* UA159 sobre las diferentes leches de alimentación infantil

Métodos: Experimental *in vitro*, en diferentes leches de alimentación infantil como leche humana, formulas infantiles, leche bovina evaporada, se evaluó la formación de biofilm cultivados durante 18 horas por *S. mutans*, cepa UA159 sobre 10% de CO₂ en placas de 96 pozos en medio de caldo infusión Cerebro Corazón (BHI) con 1% de sacarosa para el control positivo y sin sacarosa para el control negativo. Además, un BHI suplementado 40% en tres experimentos independientes, realizados en 6 réplicas, resultados que se registró mediante la absorbancia (A_{575nm}) cuantificados en lector de ELISA. Para el análisis estadístico fueron analizados mediante la prueba ANOVA y la comparación múltiple de Dunnett con el software GraphPadPrism versión 6 para Windows. Se consideró que los valores de $p < 0,05$ eran significativos.

Resultados: En diferentes leches de alimentación infantil, como leche humana, leche bovina, y fórmulas infantiles, se observó diferencias significativas resaltantes, la leche humana produjo 29.60% menos biofilm y la leche bovina tuvo un 24.01% menos, comparadas con nuestro grupo control positivo. En cuanto a las fórmula infantiles analizadas no se encontró diferencias significativas en el crecimiento de biofilm

Conclusiones: La leche humana presentó menor potencial cariogénico frente a las diferentes leches de alimentación infantil analizadas *in vitro*

Palabras claves: Formulas infantiles, leche humana, *Streptococcus mutans*

ABSTRAC

The objective of the study was to value and compare the formation of in vitro biofilm of *Streptococcus mutans* UA159 on the different infant feeding milks

Methods: Experimental in vitro, different infant milk such as human milk, infant formulas, evaporated bovine milk, the formation of biofilm was evaluated cultured for 18 hours by *S. mutans*, strain UA159 on 10% CO₂ in 96-well plates in Brain Heart Infusion Broth (BHI) medium with 1% sucrose for the positive control and without sucrose for the negative control. In addition, a 40% supplemented BHI in three independent experiments, performed in 6 replications, results that were recorded by means of absorbances (A_{575nm}) quantified in an ELISA reader. For the statistical analysis, using the ANOVA test and Dunnett's multiple comparison with GraphPadPrism version 6 software for Windows. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results: In different infant milk, such as human milk, bovine milk, and infant formulas, significant differences were observed, human milk produced 29.60% less biofilm and bovine milk had 24.01% less, compared to our positive control group. Regarding the infant formula analyzed, no significant differences were found in biofilm growth.

Conclusions: Human milk had a lower cariogenic potential compared to the different infant milk tested in vitro

Keywords: Infant formulas, human milk, *Streptococcus mutans*

INDICE

INTRODUCCIÓN

CAPITULO I: MARCO TEÓRICO	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Bases Teóricas	8
1.3 Marco Conceptual	23
1.4 Marco Filosófico	24
CAPITULO II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
2.1 Situación problemática	26
2.2 Formulación del problema	27
a) <i>Problema general</i>	27
b) <i>Problema específico</i>	27
2.3. Justificación e importancia	28
2.4. Objetivos	29
a) <i>Objetivo general</i>	29
b) <i>Objetivos específicos</i>	29
2.5 Hipótesis de la investigación	29
a) <i>Hipótesis general</i>	29
b) <i>Hipótesis específicas</i>	30
2.6 Variables de la Investigación	30
a) <i>Identificación de variables</i>	30
b) <i>Operacionalización de variables</i>	31
CAPITULO III : METODOLOGIA DE LA INVESTIGACIÓN	32
3.1 Tipo, nivel y diseño de investigación	32
3.2 Población – Muestra	32
CAPITULO IV: TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN	34
4.1 Técnicas de recolección de Datos	34
4.2 Instrumentos de Recolección de Datos	38
4.3 Técnicas de Procesamiento, Análisis e Interpretación de Resultados	38
CAPITULO V : CONSTRATACIÓN DE HIPOTESIS	39
CAPITULO VI: PRESENTACIÓN, INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.	40
6.1 Presentación de los resultados	40
6.2 Discusión de resultados	45

CONCLUSIONES.	50
RECOMEDACIONES	50
FUENTES DE INFORMACIÓN	51
ANEXOS	60

INTRODUCCIÓN

El proyecto del microbioma humano, comprende diferentes hábitats del cuerpo, como el tracto gastrointestinal, la cavidad oral, la cavidad nasofaríngea, vaginal y la piel, este proyecto reveló diferencias notables, en la diversidad de microorganismos que componen nuestro microbioma, gran parte de esta diversidad permanece aún inexplicable, aunque la dieta, el medio ambiente, la genética del huésped y la exposición microbiana temprana han sido implicados en algunas respuestas (Consortium, 2013; Lloyd-Price et al., 2016)

. La cavidad oral alberga el segundo microbioma más diverso del cuerpo, que actualmente presenta más de 771 especies que colonizan las superficies duras de los dientes y los tejidos blandos (Berg et al., 2020). Estos microorganismos viven en simbiosis, sin embargo cuando se produce un desequilibrio en su entorno, alterando el microambiente, ocurrirá una disbiosis en la cavidad oral (Verma et al., 2018), ofreciendo así, una ventaja para la aparición de patógenos, que producirán diferentes tipos de enfermedades, entre ellas las más prevalentes a nivel mundial (caries dental y la enfermedad periodontal (Peres et al., 2019).

En infantes generalmente esta disbiosis será producida por una contaminación pasiva hacia el niño de parte de la madre, que transmitirá ciertos microorganismos a través de la leche, comida, agua y por la saliva de las personas próximas al bebe (Lamont et al., 2015). Estudios describen al *Streptococcus mutans* como el agente etiológico de la caries dental (Halpin et al., 2008),

El hábitat más común de los *S. mutans* es el biofilm, que se forma sobre las superficies duras del diente, produciendo un biofilm multiespecie, donde el potencial cariogénico de esta bacteria reside en la capacidad de sintetizar glucano a partir de sacarosa, de transportar y metabolizar carbohidratos en ácidos orgánicos (acidogenicidad) y en la capacidad de crecer bajo condiciones de estrés ambiental, particularmente pH bajo (Lemos & Burne, 2008; Lemos et al., 2019) también es conocida como una bacteria ácido-láctica, porque depende exclusivamente de la glucólisis para obtener energía, a su vez metaboliza una gran variedad de carbohidratos, como la cepa UA159 que codifica 14 tipos de azúcares (Ajdić et al., 2002), en especial la sacarosa que es un disacárido compuesto de glucosa y fructosa que ha demostrado, por varias razones, ser el más cariogénico de todos los

carbohidratos. Es así que el *S. mutans* desarrolló múltiples vías para catabolizar la sacarosa para la producción de ácido (Ajdić et al., 2002; Zeng & Burne, 2013), a su vez desarrolló también varias glucosiltransferasas (Gtfs) que sintetizan la sacarosa en glucanos, promoviendo la formación de biofilm a través de la unión celular a las superficies dentales y otros microorganismos orales.(Bowen & Koo, 2011; Lemos et al., 2019)

Por otro lado la alimentación de los infantes está conformado a base de leche humana, bovina y diversas fórmulas infantiles, que en su mayoría están compuesto por carbohidratos, proteínas, grasas, vitaminas, minerales y agua (More et al., 2018). La cuestión de crear un vínculo entre la caries de infancia temprana y la lactancia materna se ha abordado durante muchos años, con resultados contradictorios, pues la lactancia materna hasta la edad de 1 año no se asocia con un mayor riesgo de caries dental, e incluso puede proporcionar protección en comparación con la alimentación con leche de fórmula.

Sin embargo, en aquellos que son amamantados después de los 12 meses demuestran un mayor riesgo de caries, por los hábitos alimenticios de la madre o el bebé (alimentación durante la noche, cantidad de comidas por día, alimentos dulces, etc.), higiene dental o contextos socioculturales (Branger et al., 2019; Tham et al., 2015; Victora et al., 2016).

Para comprender mejor el potencial cariogénico que puedan presentar tanto la leche materna, bovina, como las fórmulas infantiles, por la presencia de carbohidratos en su composición y sabiendo que el *S. mutans* está presente en la mayoría de infantes con una alta capacidad de sintetizar gran cantidad de carbohidratos para convertirlos en glucanos, promoviendo la formación de biofilm cariogénico, se tornará necesario investigar la formación de biofilm in vitro por *S. mutans* en diferentes leches de alimentación infantil, con la finalidad de comparar el efecto que puedan producir cada una de ellas.

CAPITULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes

Antecedentes internacionales

Trongsilat *et al.* (2020) evaluaron la capacidad y acidogenicidad de la formación del biofilm de la leche humana en relación a otras fórmulas infantiles. Para ello, se utilizó leche humana de seis madres donantes, la misma que se combinó con fórmula a base de leche natural, fórmula a base de leche suplementada con sacarosa, fórmula a base de soja. Todas las muestras se cultivaron por medio de infusión cerebro-corazón que contiene sacarosa al 10% para la evaluación de la formación de biofilm y su acidogenicidad. Así, las muestras se tiñeron con violeta cristal que se cuantificó mediante la absorbancia a 595nm. Respecto a la acidogenicidad de las diferentes muestras de biofilm se evaluó después de 24 horas de incubación. Para el análisis estadístico realizó análisis multivariado, prueba de Kruskal Wallis y prueba de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$. Los resultados mostraron que la formación de biofilm de la leche humana por *S. mutans* presentan un potencial cariogénico significativamente menor en comparación a otras fórmulas infantiles. El valor de la absorbancia fue significativamente menor en las muestras de leche humana en comparación con las otras muestras. Además, el pH de la formación de biofilm de leche humana nos disminuyó el pH crítico después de periodo de 24 horas de incubación. Los autores concluyeron que la leche humana presenta una tendencia a no ser cariogénico debido a su reducida acidogenicidad y formación limitada de biofilm.

Dagon *et al.*(2019) compararon el potencial cariogénico de fórmulas infantiles Tipo 2, indicados para infantes de 6 a 12 meses de edad. Las que fueron procesadas en agua estéril según lo indicaba el fabricante, luego se seleccionaron teniendo en cuenta la presencia de fluoruros de 1 ppm y otro sin tal elemento, para ello las 9 muestras de fórmulas infantiles se inocularon en suspensión de *S. mutans*. Luego con estas consideraciones se dividieron en dos grupos: En el primero las muestras fueron cultivadas inmediatamente en placas Agar *Mitis Salivarius* . En el segundo grupo las muestras fueron cultivadas en placas de Agar *Mitis Salivarius* después de su incubación a 37 °C durante 4 horas en bajo condiciones anaeróbicas. A

continuación, para evaluar e Agar *Mitis Salivarius* I crecimiento bacteriano, mediante unidades formadoras de colonias (UFC) de los *S. mutans*. Así también los cambios de pH asociados con el crecimiento bacteriano de cada una de las suspensiones, lo que fue medido después de la incubación. Los autores encontraron los siguientes resultados: El pH fue más bajo en el segundo grupo que fue incubado previamente, tanto las fórmulas infantiles con y sin flúor. así también Las UFC de *S. mutans* aumentaron significativamente en el segundo grupo comparación ($P < 0,001$). No hubo diferencias significativas entre las UFC de los medios del primer grupo que fue cultivadas directamente y el grupo que fueron incubados previamente en relación a las colonias *S. mutans* de las diferentes fórmulas infantiles procesadas en agua destilada en presencia fluorada y ausencia de fluoruros. Concluyeron que el potencial cariogénico entre los dos grupos de fórmulas infantiles con presencia y ausencia de fluoruros no reveló ninguna diferencia significativa.

Signori *et al.*(2018) investigaron el efecto de la leche humana, y la leche humana añadida con sacarosa, en el potencial cariogénico del biofilm en un modelo de microcosmos. También se comparó el potencial cariogénico de la sacarosa y la leche bovina. Para ello se cultivaron muestras de biofilm de microcosmos en discos de esmalte en placas de numero de 24 pocillos. Evaluaron 6 condiciones de formación de biofilm, leche materna con saliva artificial, leche materna con saliva añadida con sacarosa, leche bovina con saliva artificial, leche bovina con saliva artificial añadida con sacarosa; como control negativo representado por saliva artificial, y el control positivo saliva artificial añadido con sacarosa al 1%. Después de 5 días evaluaron, cambio de dureza superficial, composición microbiológica de biofilm y pH del sobrenadante. Todos los grupos tuvieron una pérdida de dureza significativamente menor en frente al grupo de saliva artificial con 1% de sacarosa. . La leche humana y bovina añadida con sacarosa mostró una mayor pérdida de dureza. Respecto a los valores de pH del sobrenadante luego de 6 horas los diversos tratamientos fueron similares para los grupos con sacarosa y leche materna añadida con sacarosa ($p > 0.05$). Se encontraron valores mayores de formación de biofilm en los grupos añadidos con sacarosa y leche bovina en comparación con el grupo suplementado solo con saliva artificial. El grupo de leche bovina mostró mayor cantidad de formación de biofilm y microorganismo acidúrica totales en comparación con el grupo de leche materna. Los autores indican que se puede inferir que la leche humana como

la de vaca tienen cierto potencial cariogénico, Sin embargo, difieren de la sacarosa respecto a la pérdida de minerales. Se observó un aumento del pH del sobrenadante. Se encontraron valores más altos en la formación de biofilm en los grupos de sacarosa y leche bovina en comparación con el grupo suplementado solo con saliva artificial. El grupo de leche bovina mayor cantidad de formación de biofilm y microorganismos acidúrica totales en comparación con el grupo de leche humana.

Lee J. *et al.* (2018) evaluaron las propiedades cariogénicas de las bebidas de almendras, observaron características que favorecen la formación del biofilm, la producción de ácido de *S. mutans* y la capacidad para amortiguar los cambios en el pH de las bebidas de almendra, bebidas de soja y la leche entera bovina. En ese sentido se analizó el crecimiento de biofilm por *S. mutans* utilizando un modelo de placa in vitro y se midió mediante tinción con violeta cristal. Luego se evaluó la producción de ácido por *S. mutans* mediante un ensayo colorimétrico de L-lactato y la medición del pH de cultivos bacterianos. Así también se evaluó la capacidad amortiguadora mediante un ensayo de titulación de pH. La bebida de soja presentó mayor formación en el biofilm, frente a las otras bebidas; No obstante, se observaron que en la leche de almendras sin azúcar que presentó menor crecimiento de biofilm ($p < 0,001$). Entre las bebidas de almendras, la bebida endulzada con sacarosa favoreció al mayor nivel formación de biofilm ($p < 0,001$). Las bebidas de almendras endulzada con sacarosa produjo el pH más bajo, seguida de la bebida de soja y la leche bovina; el pH más alto fue la bebida de almendras sin azúcar. Cuando se analizó por titulación de pH, la bebida de almendras sin azúcar que presentó la capacidad de amortiguación más débil, mientras que la leche bovina mostró la más alta ($p < 0,001$). Estos resultados recomiendan que las bebidas de almendras, excepto las que están endulzadas con sacarosa, poseen propiedades cariogénicas limitadas, mientras que la bebida de soja presenta el mayor potencial cariogénico. Estas bebidas alternativas se vuelven cada vez más populares, los dentistas deben informar a sus pacientes que las bebidas de almendras, especialmente las que son endulzadas con sacarosa, tienen un potencial cariogénico. Esta información resulta importante para los pacientes que son intolerantes a la lactosa o que tienen alergia a la leche bovina, por lo que optan por bebidas alternativas como las bebidas de almendra y bebidas a base de soja, se recomienda que sin contenido de azúcar pueden ser una mejor alternativa que las bebidas a base de soja.

Tan *et al.* (2016) los investigadores evaluaron sistemáticamente el potencial cariogénico de diversas fórmulas infantiles comerciales. Luego de establecer una estrategia de búsqueda en la diversas bases de búsqueda reconocidas. En base al resultado referente al potencial cariogénico de las fórmulas que contienen solo sacarosa son probablemente más cariogénico que las fórmulas que contienen lactosa. No obstante, el nivel de evidencia fue limitado y no concluyente. En cuanto a al contenido de caseína variable: No se encontró una correlación significativa entre la cariogenicidad y el contenido de caseína. Por ello no se pueden hacer recomendaciones precisas. En consecuencia se sugiere más estudios bien diseñados para aclarar el efecto del contenido de caseína en la cariogenicidad.

Meltharyna M. *et al.* (2017) analizaron el efecto de las diferentes fórmulas infantiles a base de leche vaca, a base de soja y con proteínas hidrolizadas en la formación del biofilm de *S. mutans* las que fueron seleccionadas por su mayor preferencia, y las destinadas a consumo de infantes de 1 a 3 años de edad, estuvo representada por tres diferentes marcas comerciales. Los resultados expresaron una diferencia significativa en el efecto de las fórmulas infantiles a base de leche de vaca, a base de soja y de proteínas hidrolizadas en la formación de biofilm por *S. mutans* ($p = 0,002$). Llegando los autores a la conclusión que la fórmula infantil a base de leche de vaca mostró una menor formación de biofilm por *S. mutans* en relación a las diferentes fórmulas. Se sustenta que la formulas a base de leche de vaca contiene caseína se le atribuye propiedades antibacterianas e inhibe la unión de *S. mutans* a la superficie del sustrato. Por lo tanto los autores sugieren investigaciones relacionadas a la propiedades de la caseína.

Acosta A. *et al* (2017) compararon el efecto de la glucosa y *Stevia rebaudiana* sobre el crecimiento *S. mutans* y la concentración del pH extracelular en un medio de cultivo axénico. La muestra estuvo conformada por tres grupos de cultivos de *S. mutans* en caldo infusión cerebro corazón (BHI). Al grupo 1 se le añadió 8mM de edulcorante a base de *Stevia rebaudiana*, considerado como el sustituto de la sacarosa, al grupo 2 se le añadió 8mM glucosa, siendo esta una azúcar simple que unido a la fructuosa forman la sacarosa y el grupo 3 de control donde no se le añadió suplemento alguno. El crecimiento de *S. mutans* se registró mediante la absorbancia y el pH del cultivo se midió con un pHmetro a diferentes tiempos (0,24,48 y 72 horas).

Los resultados demostraron que el grupo al que se le añadió glucosa presentó mayor crecimiento de *S. mutans* comparado con el grupo que contenía edulcorante a base de *Stevia*. Así, este último cultivo presentó menor pH. Por lo tanto se evidenciaron de esta manera que el sustituto de la sacarosa *Stevia rebaudiana* inhibe el crecimiento de *S. mutans*. Sin embargo, disminuye el pH del medio, como resultado de la desmineralización del esmalte dental, aumentando su potencial cariogénico

Hinds L. et al (2016), compararon la formación de biofilm por *S. mutans* en presencia de fórmulas infantiles a base de lactosa y sacarosa respectivamente. Así también analizó la formación de biofilm con fórmulas infantiles (FI) de contenido diferente de hierro, para ello se trató un cultivo de *S. mutans* a 24 horas con diversas concentraciones de FI diluida en medios bacteriológicos. Después se procedió a lavar, fijar y teñir el biofilm con cristal violeta. Luego se evaluó la formación del biofilm por medio de la absorbancia. Las FI a base de sacarosa proporcionaron aumentos significativos en la formación del biofilm en comparación con las FI a base de lactosa. La FI de marca comercial específicamente Similac Sensitive RS que es a base de sacarosa en la mayoría de las diluciones proporcionó el aumento más significativo en el crecimiento de biofilm en comparación con el control. Se observó que la sacarosa como un componente individual, así resultó un aumento significativo en el crecimiento de biofilm que la lactosa o el hierro en comparación con el control. No hubo diferencias significativas en la formación de biofilm al comparar la FI con alto contenido de hierro con la FI con hierro normal o la FI con bajo contenido de hierro.

Hernández C et al. (2016) determinaron la formación de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC) en saliva de *S. mutans*, *Lactobacillus ssp.* (LB) en saliva de niños antes y después del consumo por 30 días de leche añadida con xilitol. Para ello se diseñó un estudio analítico, prospectivo, la muestra fue integrada por 20 niños comprendidos entre 5 a 11 años de edad. Durante 30 días por la mañana, previa higiene bucal nocturna se dio a beber a cada niño 250 ml de leche con xilitol (0.024 g/ml); se determinó UFC utilizando el método de placa vertida utilizando el agar Mitis Salivarius con batricina para *S. mutans*, de la misma manera se utilizó agar lactobacillus selectivo (LBS) para LB antes y después del consumo de leche. Como resultado se observó que el consumo de leche añadida con xilitol redujo los niveles de *S. mutans* y LB. (68 y 86 %) respectivamente en saliva después del consumo de la leche con xilitol. Los autores concluyeron que la leche añadida con xilitol produce

una reducción significativa de *S. mutans* y LB en la saliva después de 30 días ($p > 0.05$). Del mismo modo indicaron que xilitol resulto un eficaz sustituto de azúcar no cariogénico consumido por los niños.

Allison et al. (2015) evaluaron los efectos de la leche humana (LH) y sus componentes en la formación de biofilm por biofilm *S. mutans*. En cuanto a la muestra, se recolectó LH de 11 participantes durante 3-9 meses después del parto. Para evaluar el efecto sobre la formación de biofilm, se trató un cultivo de *S. mutans* de 16 horas con diluciones de LH y varios de sus componentes principales como: lactosa, lactoferrina, IgA, además caseína en placas de microtitulación de 96 pocillos durante 24 horas. Luego fueron procesadas, fijadas, lavadas, teñidas con cristal violeta para evaluar la formación del biofilm, el mismo que se realizó mediante la absorbancia. Siendo los resultados que las diluciones de las muestras de LH aumento significativamente la formación del biofilm en comparación con el control, respecto a sus componentes, la lactoferrina disminuyó significativamente la formación del biofilm en todas las diluciones. Sin embargo, la lactosa no tuvo efecto en las concentraciones promedio de LH, excepto en su concentración más baja donde se incrementó. En cuanto la IgA disminuyó significativamente la formación del biofilm en su concentración más alta. Así también la caseína causó un aumento significativo en la formación del biofilm en todas las concentraciones probadas por encima del contenido promedio de LH. Por ende los autores concluyeron el aumento de la formación del biofilm de *S. mutans* por la LH de 3-9 meses después del parto. Entre sus componentes, la lactosa no tuvo efecto. En cambio, la lactoferrina como la IgA disminuyeron significativamente en la formación del biofilm en sus concentraciones mayores. Solo la caseína aumento significativamente la formación del biofilm.

Duse M. et al (2014) evaluaron la influencia de diferentes leches de alimentación infantil en la formación de biofilm por *Streptococcus mutans*. Para ello se analizaron 03 muestras de leche humana de tres madres diferentes y 05 fórmulas infantiles. Las mismas se evaluaron mediante el protocolo de unidades formadoras de colonias Para procesar inóculo bacteriano se cultivó el *S. mutans* en caldo de infusión cerebro corazón durante 18 horas a 37 ° C en condiciones microaerófilo. El crecimiento de *S. mutans* se determinó en 2 veces. La primera vez después de la inoculación de las leches y la otra después de 24 horas de incubación. Luego de 24 horas de incubación se observaron cambios en la formación del biofilm, las fórmulas

infantiles suplementadas con *Lactobacillus reuteri* y con *Bifidobacterium lactis* mostraron una menor formación del biofilm frente a las fórmulas no suplementadas. Se concluyó que las fórmulas infantiles suplementadas con probióticos inhiben el crecimiento bacteriano, por lo tanto, se especulan que las mismas representa un factor preventivo y protector sobre el proceso de caries infancia temprana.

Antecedentes Nacionales

Velásquez F et al (2017) evaluaron las posibles propiedades antibacterianas de la bebida de soja frente a la leche de vaca, con el fin de proponer alternativas preventivas relacionadas a disminución de la incidencia y prevalencia caries dental, considerando que la bebida de soja es un derivado vegetal alternativa a en casos de alergia a componentes respecto a la leche de vaca,. Para ello se diseñó un estudio de tipo experimental, longitudinal, prospectivo, que tuvo como finalidad la comparar el efecto antibacteriano, en el biofilm de *S. mutans*. Por consiguiente se obtuvo la muestra de saliva de 20 infantes, se cultivó en *Agar Mitis Salivarius*. Después de la identificación y aislamientos de cepas puras, se procedió a hacer los ensayos para probar la eficacia antibacteriana de la bebida de soja, se evaluó la susceptibilidad bacteriana mediante el halo de inhibición producido por la bebida de soja, la leche de vaca, así como del control positivo (clorhexidina 0.12%) y del control negativo (Agua destilada), se midió en diferentes periodos, a las 24, 48 y 72 horas. Se obtuvo como resultado que los promedios obtenidos en las tres mediciones a las diferentes horas, demostró que no existe diferencia estadística significativa respecto a los efectos antibacterianos de la bebida de soja y la leche de vaca en comparación al digluconato de Clorhexidina al 0.12%, en la inhibición del *S. mutans* (P =0.10). Por lo tanto los autores concluyeron que no existe efectos antibacterianos de la bebida de soya y la leche de vaca frente al digluconato de clorhexidina al 0.12%.

Antecedentes local

Como resultado de la búsqueda sistemática mediante el uso de las herramientas en diferentes bases de datos. No se observó registro alguno referentes a estudios locales.

1.2 Bases Teóricas

Alimentación Infantil

Organismos internacionales como OMS y el UNICEF recomiendan para una alimentación infantil ideal, lactancia materna exclusiva durante los primeros 6 meses de vida.(Organización Mundial de la Salud, 2010)

Lactancia materna exclusiva refiere a que el lactante recibe únicamente de leche de las mamas de su madre o de una nodriza, o recibe leche humana extraída de las mamas pecho y no recibe ningún tipo de líquidos o sólidos, ni siquiera agua, con la excepción de solución de rehidratación oral, gotas o jarabes de suplementos.(Kim et al., 2018; Kramer & Kakuma, 2004)

La alimentación complementaria se denomina al proceso que se inicia cuando la leche humana no es suficiente para cubrir los requerimientos nutricionales del lactante, por esta razón son necesarios otros alimentos y líquidos. El rango del grupo etario para la alimentación complementaria, generalmente es considerado desde los 6 a los 23 meses de edad, aun cuando la lactancia materna debería continuar más allá de los 2 años de edad, la lactancia materna que continúa más allá de los 2 años de edad se denominada lactancia materna prolongada, que se considera a libre demanda.(Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia [UNICEF], 2008)

Estas recomendaciones pueden ser adaptadas de acuerdo a cultura y necesidades de los lactantes y niños pequeños que viven en circunstancias excepcionalmente difíciles, como es el caso de prematuros o lactantes con bajo peso al nacer; niños con desnutrición grave; y en situaciones de emergencia. Existen recomendaciones y protocolos para lactantes nacidos de madres infectadas con diversas compromisos virales como: VIH, COVID-19.

La leche humana en mujeres posparto portadoras en SARS-CoV-2 es recomendable la lactancia para el recién nacido, en caso que la madre y el recién nacido se encuentren con una salud estable se favorece la lactancia materna directa, considerandos siempre las medidas de higiene respiratoria apropiadas. Sin embargo en caso que la salud de la madre no permite la lactancia materna directa, la leche debe extraerse previamente y mantenerse sin pasteurizar, siguiendo los protocolos indicados por la OMS.(Fernández-Carrasco FJ et al., 2020)

La leche humana.

Es un líquido producido por la glándula mamaria, de gran complejidad biológica, constituido por nutrimentos, sustancias inmunológicas, hormonas, enzimas, factores de crecimiento, células inmunoprotectoras, etc., que la hacen nutricional e inmunológicamente apta para que un niño sea alimentado con ella en forma exclusiva durante los primeros 6 meses de vida (Ballard , 2013; García-López, 2011).

Componentes de la leche humana

La leche humana presenta múltiples componentes, los mismo que se modifican en sus diferentes etapas así tenemos:

El Precalostro es un exudado del plasma que se produce en la glándula mamaria a desde la semana 16 de gestación, la leche es muy rica en proteínas, nitrógeno total, inmunoglobulinas, ácidos grasos, magnesio, hierro, sodio y cloro. Además tiene bajas concentraciones de lactosa, ya que un recién nacido prematuro tiene poca actividad de lactasa (Ballard, 2013)

El Calostro es producida a los 5 a 7 días después del parto, aunque en las madres multíparas puede presentarse al momento del nacimiento del bebé. Se caracteriza por presentar una consistencia pegajosa y es de color amarillento debido a la presencia de β -carotenos. Su volumen puede variar de 2 a 20 mL/día en los tres primeros días; a medida que el bebé succiona, aumenta hasta 580 mL/día hacia el sexto día (García-López, 2011). Este volumen es suficiente para cubrir las necesidades del recién nacido por lo que no es necesario complementar con fórmulas lácteas. Tiene mayor cantidad de proteínas (97% en forma de inmunoglobulina, vitaminas liposolubles, lactoferrina, factor de crecimiento, lactobacilos bífidos, sodio y zinc. En concentraciones menores se encuentran las grasas, la lactosa y las vitaminas hidrosolubles. Por ello, el calostro protege contra infecciones y alergias ya que transfiere inmunidad pasiva al recién nacido por absorción intestinal de inmunoglobulinas; además, contiene 2000 a 4000 linfocitos/mm³ y altas concentraciones de lisozima (Ballard, 2013).

Leche de transición se produce después del calostro y dura entre 5 y 10 días. Al transcurrir los días progresivamente se elevan la cantidad de lactosa, grasas, por

aumento de colesterol y fosfolípidos y vitaminas hidrosolubles; disminuyendo las proteínas, las inmunoglobulinas y las vitaminas liposolubles debido a que se diluyen por el incremento en el volumen de producción, que puede alcanzar 660 mL/día aproximadamente el día 15 posparto. Su color blanco se debe a la emulsificación de grasas y a la presencia de caseinato de calcio (Ballard, 2013).

Leche madura inicia su producción al día 15 posparto y puede continuar por más de 15 meses, su volumen promedio es de 750 mL/día, llegando hasta 1,200 mL/día en madres con embarazo múltiple, la misma que está compuesta por elementos como: agua, hidratos de carbono, grasas, proteínas, minerales, vitaminas y oligoelementos.

El agua que representa el 87% del total de sus componentes y cubre satisfactoriamente los requerimientos del bebé, aún en circunstancias extremas de calor, por lo que no se requieren líquidos suplementarios.

Los hidratos de carbono y las grasas aportan al día un promedio 670 a 700 kcal/L. Así los hidratos de carbono aportan energía al sistema nervioso central. La lactosa constituye el principal hidrato de carbono que favorece el desarrollo de la flora intestinal por las Bifidobacterias e impide el crecimiento de microorganismos patógenos por ser acidificante; mejora la absorción de calcio y mantiene estable la osmolaridad de la leche porque conserva bajas concentraciones de sodio y potasio (Ballard, 2013).

Respecto al volumen de lípidos varían entre 1 a 7 g/dL. La leche humana aporta ácidos grasos conocidos como ácidos grasos indispensables ya que no pueden ser sintetizados de nuevo por el ser humano y proceden de la dieta de la madre, estos ácidos grasos se convierten en ácidos grasos poliinsaturados, vital en el desarrollo estructural y funcional de los sistemas visual-sensoriales, perceptual y cognitivo del lactante; y el ácido araquidónico, útil como sustrato como las prostaglandinas, los leucotrienos y tromboxanos, que modulan las respuestas inflamatoria e inmune al activar la proliferación de linfocitos y las células asesinas por naturaleza. Denominadas también células NK por sus siglas en Inglés (Ballard, 2013).

La presencia de las proteínas en la leche humana varía entre 8.2 y 9 g de por litro; su concentración se disminuye con el progreso de la lactancia. El tipo de proteínas que están presentes la leche humana, la hacen única para la especie

humana, por su mayor biodisponibilidad gracias a la presencia de diversas enzimas digestivas como la amilasa (Ballard, 2013).

Las proteínas de la leche humana son diversas así tenemos a las proteínas del suero, de las cuales la α -lactoalbúmina es la más numerosa lo que constituye el 37%. Su importancia radica en que actúa como cofactor en la biosíntesis de lactosa. Tiene baja alergenicidad, puesto que presenta un peso molecular de 14,500 Da, mucho menor comparado con la proteína conocida como β -lactoglobulina, que llega a pesar 36,000 Da, esta proteína se encuentra en la leche entera de vaca y por consiguiente las fórmulas infantiles, sin embargo, no está presente en la leche humana. Así la β -lactoglobulina es responsable de la mayoría de alergia en los niños, por ese motivo está contraindicado el consumo en los primeros meses de vida del lactante.(Allison et al., 2015; Bo Lönnerdal, 2009)

Por otro lado, la lactoferrina representa el 27% de total de seroproteínas, se une al hierro para mejorar su transporte y absorción, el hierro en forma natural contribuye la disminución de la prevalencia anemia en los recién nacidos, lo que no sucede en la fórmula infantiles, a lo que le tienen que añadir este mineral. Por otro lado es preciso indicar que la lactoferrina inhibe el crecimiento de bacterias como los *S. mutans*.

Otra proteína presente en la leche humana es la caseína. así tenemos que la β -caseína que se une con la K-caseína y con los iones de fósforo para formar micelas de reducido tamaño, que presentan una medida entre 30-75 nm, que comparando con los 600 nm que mide la α -caseína de la leche de vaca. Por lo tanto, la leche humana es biodisponible en el intestino del lactante por presentar un de tamaño reducido, en comparación con el tamaño de la leche de vaca.

En la leche humana madura, se encuentran gran variedad de vitaminas así tenemos a las vitaminas hidrosolubles presentan una concentración ideal como el niacina y la vitamina C que son la de mayor numero. De las vitaminas liposolubles, la leche contiene mayores concentraciones de β -caroteno y la vitamina E. A pesar de lo limitado de niveles óptimos de vitamina D los lactantes alimentados con leche humana no padecen raquitismo.(Ballard, 2013; Lönnerdal, 2009)

Respecto a los minerales, cobra vital importancia el hierro, cuyas acumulaciones se disminuye durante el periodo de la lactancia hasta mantenerse

estable a los seis meses, de manera se absorbe entre 45 y 75% de su contenido total, mientras que la leche de vaca sólo es de 10%, por lo tanto, la leche de vaca no es una fuente importante de hierro, mineral muy conveniente en los lactantes. De esta manera el hierro contenido en la leche humana se considera una alta biodisponibilidad, dado a su mayor absorción en comparación con la leche de vaca que esta adecuado para las crías del ganado vacuno, que tienen un estomago diferente al del ser humano (Lönnerdal, 2009).

Entre los oligoelementos están presentes el zinc que forma parte de los sistemas activadores de las enzimas; su concentración en la leche humana es aproximadamente de 2 a 4 mcg/mL y tiene biodisponibilidad elevada: 45 a 58% de la fracción sérica de las proteínas. Otro oligoelemento es el flúor, a pesar de su baja cantidad, es útil para prevenir las caries, lo cual es evidente si se compara a los lactantes alimentados al pecho materno con los alimentados con fórmulas infantiles, así también el magnesio que se mantiene en equilibrio muy estable con el calcio en la leche humana para prevenir hipocalcemia en el recién nacido (Lönnerdal & Kelleher, 2009).

Contraindicaciones a la lactancia materna.

La lactancia materna considerado como patrón de oro de la alimentación infantil. No obstante la misma presenta contraindicados como los relacionados a las afecciones maternas y del recién nacido. En estos casos la sugerencia es que no amamante en consecuencia se introduzca los sucedáneos de manera temporal o permanente (Eidelman & Schanler, 2012).

Respecto a las afecciones infantiles están incluidos a los recién nacidos que no deben reciben leche materna ni otra leche excepto fórmula especializada, así tenemos a la galactosemia clásica se necesita una fórmula infantil especial libre de la presencia de galactosa. Enfermedad de orina en jarabe de arce: se necesita una fórmula infantil especial libre de la presencia de leucina, isoleucina y valina. Fenilcetonuria en este caso se requiere una fórmula infantil especial libre de fenilalanina.

En lo recién nacidos la leche humana se considera como la mejor opción de alimentación. Sin embargo, pueden necesitar otros alimentos por un periodo limitado además de leche humana. así tenemos en recién nacidos con muy bajo peso al nacer

que nacen con menos de 1500g; muy prematuros, por ejemplo, los que nacen con menos de 32 semanas de gestación, en caso de los recién nacidos con riesgo de hipoglicemia debido a una alteración en la adaptación metabólica, o incremento de la demanda de la glucosa, en particular aquellos que son pretérmino, pequeños para la edad gestacional.

En cuanto a las afecciones maternas que se sugiere evitar la leche humana tenemos: Las infecciones por VIH, si la alimentación de sustitución es aceptable, factible, asequible, sostenible y segura. En la actualidad, no se sugiere que las madres VIH positivas amamanten. Sin embargo, en el mundo en vías de desarrollo, donde la mortalidad aumenta en los lactantes que no están amamantando por una alta prevalencia de malnutrición y enfermedades infecciosas regiones vulnerables como en el continente africano, la lactancia materna puede aumentar el riesgo de contraer la infección por VIH de la leche materna. Los lactantes en áreas con VIH endémico que son amamantados exclusivamente durante los primeros 3 meses tienen un riesgo menor de contraer la infección por el VIH que los que recibieron una dieta mixta de leche humana y otros alimentos como son las fórmulas infantiles comerciales. Informes actuales reportan que la combinación de la lactancia materna exclusiva durante 6 meses con terapia antirretroviral disminuye significativamente positiva la adquisición postnatal de VIH-1.

Se recomienda evitar la lactancia materna temporalmente en condiciones de salud grave que no permite cuidar a su bebé, así tenemos: la septicemia. Herpes Simplex Tipo I (HSV-1) se debe evitar contacto directo entre las lesiones ulcerosas en el pecho materno y la boca del bebé hasta que toda lesión activa haya superado (Eidelman & Schanler, 2012).

Otra de la contraindicación es en el caso que la madre es administrada por algunos fármacos, así tenemos a los medicamentos psicoterapéuticos sedativos, antiepilépticos, opioides y sus combinaciones pueden causar efectos colaterales tales como mareo y depresión respiratoria que pueden presentar repercusiones en los lactantes. Se sugiere evitar el uso de yodo radioactivo-131 debido a la existencia de nuevas opciones más seguras disponibles, medicamento que se administra en casos de una actividad excesiva de la glándula tiroides, cuando la madre es diagnosticada con hipertiroidismo, de modo que puede reiniciar la lactancia luego de dos meses de

recibir este tratamiento. El uso excesivo de yodo o tópicos en la presentación de yodopovidona, utilizado específicamente en heridas abiertas o membranas mucosas, puede ocasionar como consecuencia supresión tiroidea o anomalías electrolíticas en el lactante. Así también, la quimioterapia citotóxica requiere que la madre evite la lactancia durante el periodo de la terapia (Eidelman & Schanler, 2012).

En situaciones muy específicas cuando la lactancia no está contraindicada, aunque presentan condiciones clínicas comprometidas como: Absceso mamario: la lactancia debería continuar con la mama que no está afectado; después continuar de superado la lesión. En casos de Hepatitis B, los lactantes deben recibir la vacuna de la hepatitis B, en las primeras 48 horas o apenas sea posible después. En casos de hepatitis C, mastitis, si la lactancia suele ser muy dolorosa, debe extraerse la leche para evitar la afección. Madre portadora de Tuberculosis, la lactancia materna se puede reiniciar cuando con recibe tratamiento durante un periodo mínimo de 2 semanas.

Finalmente, también está contraindicando el uso de sustancias tóxicas, se ha observado efecto nocivo en los lactantes cuyas madres consumen nicotina, alcohol, anfetaminas, cocaína y estimulantes. El tabaquismo materno, se recomienda la suspensión de la misma, se asocia con una mayor incidencia de alergia respiratoria infantil. Así también, el alcohol, opioides, benzodiazepinas, cannabis y sustancias relacionadas pueden causar sedación tanto en la madre como al lactante (Eidelman & Schanler, 2012).

Inmunología de la leche humana.

Se tiene conocimiento que el sistema inmunitario del recién nacido es menor al del adulto en el 1%. La leche humana es considerada como “la primera vacuna” inmunidad pasiva que recibe el lactante, ya que lo protege contra numerosas infecciones a las que está expuesto durante el primer año de vida. De ahí que la lactancia se desarrolla y se activa el tejido linfoide presentes con las mucosas del lactante, en el intestino, los pulmones, las glándulas mamarias, las glándulas salivales y lagrimales, y las vías genitales (García-López, 2011).

La leche humana disminuye el riesgo de desarrollar enfermedad celiaca, tiene efectos preventivos para diferentes patologías como la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, la esclerosis múltiple y la artritis reumatoide. Así también La lactancia materna se asocia con la reducción en el riesgo de inflamación infantil enfermedad gastrointestinal, por todo ello constituye el patrón de oro de la alimentación infantil (Anatolitou, 2012).

Cuando la lactancia materna exclusiva está contraindicada, se recomienda incluir en la alimentación del recién nacido las diversas fórmulas infantiles comerciales, se prioriza el menor contenido de sacarosa entre sus componentes.

Fórmula infantil.

Constituye una alternativa a la leche humana para alimentar al infante en algunos casos que está contraindicado debido a múltiples causas como infecciones tanto de la madre como del lactante, Las fórmulas infantiles se obtiene de otros mamíferos como son la vaca, oveja y cabra.

Numerosas organizaciones de salud, incluida la Organización Mundial de la Salud, la Academia Americana de Pediatría, la Academia Americana de Médicos de Familia y varias otras, promueven la lactancia materna como el patrón de oro de la nutrición para los lactantes durante el primer año de vida. Se recomienda que los lactantes que no son amamantados consuman fórmulas infantiles fortificadas con hierro para prevenir la anemia (Tham et al., 2015).

Componentes de la fórmula infantil.

La fórmula para infantes es un producto a base de leche obtenida de mamíferos tanta de vacas u otros animales o una mezcla de otros ingredientes que han demostrado ser adecuados para la alimentación infantil. Todos los componentes y aditivos alimentarios deben estar libres de gluten. La fórmula para infantes preparada para el consumo de acuerdo con las instrucciones del fabricante debe contener por 100 ml, no menor de 60 kcal de energía (Adlerberth & Wold, 2009).

La composición de fórmulas infantiles incluye proteínas, lípidos, carbohidratos, ácido linoleico, vitaminas y minerales en rangos estandarizados. Cuando se prepare de acuerdo con las instrucciones según indica el fabricante, el producto debe estar libre de grumos y partículas gruesas grandes y en condiciones adecuadas para la alimentación del infante. Los componentes deben ser higiénicos, de calidad, seguros y adecuados para que los lactantes los ingieran, pasando por un control de calidad estricto. Además, se evalúan las características de calidad normales, como el color, el sabor y el olor. Así pues, se le añaden diversos espesantes y reguladores de la acidez. El resultado del producto y su componente no deberían ser tratados por irradiación ionizante. De esta manera, la seguridad nutricional y la adecuación de la fórmula deben demostrarse científicamente para apoyar el crecimiento y desarrollo de los infantes (Adlerberth & Wold, 2009).

El contenido de carbohidratos en la fórmula infantil se distribuye básicamente entre lactosa, sacarosa, maltosa o glucosa. Las fórmulas infantiles con mayor contenido de sacarosa son alternativas a las fórmulas a base de leche que contienen lactosa. Los gramos de azúcares totales que contienen aproximadamente varían entre de 1.28 a 11.16 g. en algunos casos se encuentra hasta 12 g de azúcar (More et al, 2018 ; Walker & Goran, 2015).

La leche humana proporciona una nutrición ideal al lactante y constituye una fuente de *lactobacillus*, *bifidobacterias* y *Streptococcus*. Sin embargo, ciertos componentes de la leche humana inhiben el crecimiento y la unión de algunas bacterias cariogénicas como el *S. mutans* (More et al., 2018).

Los estudios realizados por Holgerson et al. (2014) demostraron que los recuentos de los *lactobacillus* en la cavidad oral fueron más altos en infantes alimentados con en la lactancia materna en comparación con los lactantes alimentados con fórmula infantil. Por lo tanto los autores concluyeron que las especies de *lactobacillus* tenían un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *S. mutans*.

La microbiota de la oral difiere en los lactantes de alimentados con leche humana y alimentada con fórmula infantil. Los posibles mecanismos para las diferencias microbianas observadas incluyen la supresión de especies por *lactobacillus* nativos de la leche humana. Esto sugirió que los lactantes alimentados

con fórmula tenían un mayor riesgo de desarrollar caries dental por una presencia mayor de *S. mutans*.

Por otro lado Tan et al. (2015) realizaron una revisión sistemática, la misma que presentaba como por objetivo evaluar el potencial cariogénico de diversas fórmulas infantiles. Dentro de sus resultados encontraron algunos estudios que asociaban las fórmulas infantiles a base de sacarosa con la caries dental, Sin embargo, los resultados no fueron significativos. Por lo tanto, no fueron son concluyentes en consecuencia no se pueden hacer recomendaciones concretas. En especial respecto el rol de la caseína como efecto asociado al potencial cariogénico.

Potencial Cariogénico de la leche humana y la leche de vaca.

Diversos estudios han reportado que la prevalencia de caries dental causada por la leche de vaca es relativamente baja en comparación con la leche humana, entre los factores que están relacionados se ha considerado a un bajo contenido de minerales, pero una mayor concentración de lactosa de 7% de la leche humana frente al 3% correspondiente a la leche de vaca; Por otro lado, el menor contenido de proteínas de la leche humana aproximadamente 1.2 g / 100 ml frente a 3.3 g / 100 ml de la leche humana (More et al.,2018 ; Anatolitou, 2012). Aunque es preciso indicar que estas proteínas en menores en cantidades presentan una mayor biodisponibilidad para el infante. Por lo tanto, el factor mencionado de la leche de vaca podría tener un mayor potencial de remineralización de los dientes, en consecuencia, favorece la baja prevalencia de caries dental.

Sin embargo, la lactancia materna está considerada como el patrón de oro de la alimentación infantil, complementándose con una buena higiene bucal se puede mantener una boca saludable del infante, reduciendo de esta manera los factores de riesgo que generan las lesiones cariosas.

Potencial Cariogénico de las fórmulas infantiles.

Los hidratos de carbono utilizados en la fórmula infantil son principalmente basados en sacarosa y lactosa. La sacarosa se considera el carbohidrato dietético más cariogénico, fermentable por las bacterias orales. Este proceso resulta en la reducción del pH en la cavidad oral. De modo que actúa como un sustrato básico para la formación de polisacáridos extracelulares e intracelulares en la placa dental originando lo que se denomina biofilm. La lactosa es fermentada con menos facilidad por *S. mutans* en comparación con la sacarosa (More et al, 2018 ; Walker & Goran, 2015).

A medida que los infantes van cambiando el tipo de alimentación de la lactancia materna hacia una alimentación complementaria, se introducen a los alimentos sólidos, entre ellos están los productos alimenticios procesados adicionales que contienen azúcares añadidos. Al igual que algunas fórmulas infantiles, los mismos que están compuestos por sacarosa, fructuosa, glucosa y otros azúcares que no están presentes en la leche humana.

Lamentablemente los alimentos comerciales que consumen los infantes muy menudo están expuestos a fuentes de azúcares añadidos, de ahí que, estas azucares contribuyen a la exposición diaria total al azúcar (More et al, 2018 ; Walker & Goran, 2015).

Por lo tanto las azúcares añadidas denominadas también azúcar extrínseca, constituyen un factor de riesgo a lesiones cariosas, conduciendo a un desequilibrio de la microbiota en la cavidad oral, siendo necesario implementar medidas preventivas para reducir el riesgo mediante la higiene bucal y aplicaciones de flúor según el riesgo de cada infante.

Microbiota de la cavidad oral

La microbiota de la cavidad oral fue el primer ecosistema microbiano en ser descrito por el neerlandés Anton van Leeuwenhoek en el 1863 quien observo por primera vez un biofilm oral, denominando a estos microorganismos como animáculos, Luego en el año 1924, J. Clarke aisló un organismo de las lesiones cariosas y por su característica propia de forma ovalada y mutante lo

denomino *Streptococcus mutans*. Sin embargo, a mediados de la década de 1960, los estudios clínicos y de laboratorio en animales describieron a *S. mutans* como un importante agente etiológico en la caries de dental.

Al transcurrir el tiempo estas técnicas fueron mejorando, actualmente con las técnicas de secuenciación a gran escala han permitido construir bases de datos genómicas, como la base de datos ampliada del microbioma oral humano (HOMD), sistema que ayudo a clasificar a los mismo y dar a conocer que actualmente existen aproximadamente 775 taxones presentes en la cavidad oral, se estima que el número de filotipos podrían estar alrededor de 19000 (Serrano y Jiménez, 2015; Simón-Soro & Mira, 2015; Verma et al., 2018).

La cavidad oral humana alberga la segunda microbiota más abundante después del tracto gastrointestinal, donde el 70% de las especies cultivables, el 30% no se han cultivado. Del 70%, solo el 57% tiene asignado un género y especie, de ellos el 13% aún no posee un nombre (Simón-Soro & Mira, 2015; Verma et al., 2018).

Las bacterias de la cavidad oral pertenecen a una comunidad compleja de numerosas especies que participan en la formación biofilm, envolviendo todas sus funciones, interacciones y propiedades. El concepto actual se contempla en la asociación y sucesión de varios microorganismos sobre una superficie abiótica o biótica. La cavidad oral, presenta superficies duras y superficies blandas, las cuales propiciarán la formación de biofilm en una eventual disbiosis, causando caries dental, siendo uno de los responsables el *S. mutans* (Zukanovi et al., 2018).

Disbiosis en la microbiota de la cavidad oral.

Los microorganismos en la cavidad oral, se conserva en equilibrio para mantener un ecosistema bucal saludable (simbiosis), cada individuo alberga una microbiota personalizada, que generalmente está relacionado a los hábitos alimentarios, higiene bucal, estilos de vida, entre otros factores que mantienen en constante equilibrio la cavidad (Serrano y Jiménez, 2015).

En consecuencia, son los diversos factores asociados a malos hábitos: como el consumo de tabaco, alcohol, desórdenes alimenticios, estrés, desequilibrio hormonal, pubertad, gestación, mala higiene bucal, diabetes, enfermedades crónicas y enfermedades autoinmunes. Perturban el equilibrio de la comunidad microbiana

produciendo desequilibrio en cada nicho presente en la cavidad oral (disbiosis). Así el consumo excesivo de carbohidratos unido a la mala higiene, harán que promueva el crecimiento del *S. mutans* sobre las superficies dentarias produciendo una disbiosis y posteriormente la formación de un biofilm cariogénico (Simón-Soro & Mira, 2015; Verma et al., 2018; Zukanovi et al., 2018).

Microbiota oral infantil.

La microbiota del recién nacido es colonizado inicialmente por bacterias anaeróbicas facultativos, como los del género *Streptococcus*, llamados también colonizadores iniciales o especies pioneras (*Sanguinis, mitis, gordonii, oralis* y *parasanguinis*) debido a que el tipo de nicho ecológico que presenta el recién nacido es solo mucosa, seguidos por géneros anaeróbicos, como la *Veillonella*.

Aun cuando el primer contacto de un recién nacido con microbiota se considera postnatal, existe evidencia clínica de presencia microbiana en placenta, sangre de cordón umbilical, líquido amniótico y meconio en embarazos a término. La microbiota de la placenta no son similares a la microbiota de la vagina, ni del estómago de la madre, pero si a la microbiota de la cavidad oral de la madre, lo mismo que sugiere que cada vez que la gestante se cepilla los dientes cambia la microbiota de la cavidad oral y también la microbiota de la placenta.

Las principales fuentes de transmisión microbiana a los neonatos durante los primeros períodos de variación microbiana lo conforman: la microbiota vaginal de la madre, intestinal, tipo de la saliva de la madre y personas cercas al bebe, así como también la leche humana y otras fuentes (Holgerson, 2013). Estas condiciones microbianas irán modificándose al pasar del tiempo.

La leche humana es considerada durante mucho tiempo un alimento superior para los bebés, aumentando la resistencia a las infecciones, proporcionando nutrición y siendo una fuente de rica en bacterias que sirven como inóculo para el recién nacido. El género *Streptococcus* es uno de los grupos bacterianos dominantes que se encuentran en la leche humana y diversas especies, incluido *Streptococcus salivarius* que se encuentran con frecuencia en la cavidad oral.

La alimentación complementaria modifica el microbiota oral, condicionada si la misma es rica en carbohidratos como la sacarosa presente muchas veces en las fórmulas infantiles; así también la erupción de la dentición primaria a los aproximadamente a los 6 meses de edad, la presencia de esta estructura dentaria, propiciara que otras especies microbianas puedan colonizar los nuevos nichos ecológicos, es el caso de los *S. mutans*, que colonizara las superficies dentarias, la *Prevotella intermedia*, espiroquetas y demás anaerobios encontrándose en el sulco gingival que se formara con la erupción de los primeros dientes (Saudamini et al, 2018; Simón-Soro & Mira, 2015; Zukanovi et al., 2018).

Taxonomía de los *Streptococcus mutans*.

El género de *Streptococcus*, es la especie más predominantes en la cavidad oral humana.(Beighton et al., 1991; Cruz Quintana et al., 2017; Lancefield, 1933; Sherman, 1937) Con el advenimiento de la secuenciación genética, se introdujo un enfoque nuevo y más preciso para la identificación de microorganismos, la secuencia de la región 16S rRNA se utiliza para determinar las relaciones filogenéticas específicas: como género y especie de los microorganismos (Kawamura et al., 1995; Whiley & Beighton, 1998).

El secuenciamiento genético del gen 16S rRNA, clasificó a los microorganismos de la cavidad oral en 6 filos, de esta manera encontraremos a las Actinobacterias, Proteobacteria, *Fusobacteria*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes* y a los *Firmicutes*, que constituyen el 96% del total de bacterias bucales (Cruz Quintana et al., 2017; Serrano HA, Jiménez M, 2015).

El *Streptococcus mutans* es una bacteria gram positiva, que posee una morfología en forma de cocos, como su propio nombre lo describe (cadena de cocos), esta bacteria está asociada directamente con la caries dental, debido a su capacidad acidogénica e acidúrica. Pertenece al filo de los *firmicutes*, clase: *bacilli*, orden: *Lactobacillales*, familia: *Streptococaceae*, genero: *Streptococcus* y especie: *mutans*. La especie más representativa de este género es la cepa UA159, que fue aislada de caries activa de niños, y porque posee toda la secuencia genómica completa disponible en la base de datos de MEDLINE o también podríamos encontrarla en HOMD.

Mecanismo de colonización

El género *Streptococcus* en general son importantes colonizadores primarios de la boca excepto el mutans, ellos presentan múltiples adhesinas de alta afinidad que median la unión inicial a las superficies dentales a través de interacciones en presencia de sustratos como la sacarosa en saliva, produciendo una película adquirida en la superficie, la misma que está conformada principalmente por las proteínas ricas en prolina, las glicoproteínas, las mucinas y el ácido siálico. Los polisacáridos extracelulares del *S. mutans* son producidos, por las enzimas proteicas extracelulares glucosiltransferasas (Gtf) y la fructosiltransferasa (Ftf), que permiten sintetizar glucano y fructanos provenientes de la sacarosa, estos son constituyentes principales de la matriz del biofilm cuya producción se desencadena con la adherencia bacteriana (Bowen & Koo, 2011; Kreth et al., 2009).

Los *S. mutans* son responsables de producir 3 tipos de glucanos extracelulares a través de las glucosiltransferasas GtfB, GtfC y GtfD, que facilitan la adhesión de las bacterianas y entre las bacterias, de manera que las Gtf promueven la unión irreversible de los microorganismos a la superficie del diente. Las Gtf se clasificadas en: Gtf C .se une y adsorbe a la película adquirida, Gtf B: incrementa la cohesión del biofilm, Gtf D: sintetiza un polisacárido soluble. Así como también están presentes las proteínas fijadoras de glucanos Gbp se encargan de la coagregación bacteriana.(Bowen, 2016)

1.2 Marco Conceptual

Biofilm

Comunidad de bacterias, hongos, protozoos, arqueas y virus, a menudo en forma de una estructura compleja (MacHiulskiene et al., 2020).

Leche humana

Líquido producido por la glándula mamaria, de gran complejidad biológica, constituido por nutrimentos, sustancias inmunológicas, hormonas, enzimas, factores de crecimiento, células inmunoprotectoras (García-López, 2011).

Sustituto de Leche Humana

Bebidas alimenticias que se utilizan como remplazo nutricionales de la leche (Grummer-Strawn, 2018).

Leche bovina

La producción de leche se refiere exclusivamente a la de ganado vacuno (More et al., 2018).

Fórmula Infantil

Es una alternativa a la leche materna para alimentar al niño y obtiene de otros humanos (madres sustitutas) u otros mamíferos. Las fuentes más utilizadas son la vaca, oveja y cabra. Las fuentes más utilizadas son la vaca, oveja y cabra (Saudamini et al., 2018).

Streptococcus mutans

Coco Gram positivo, anaeróbico facultativo productor de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas (Abranches et al., 2019; Lemos et al., 2019).

Potencial Cariogénico

Se denomina así, al efecto directo que presentan alimentos que están compuesto por azúcares, y también al efecto de las bacterias que sobre la formación de lesiones cariosas.

1.4 Marco Filosófico

Al promediar del siglo XX fue aceptada por consenso la Teoría Quimioparasitaria desarrollada por Miller (1890). Luego Keyes postuló en 1960 un esquema integrado por tres factores (huésped, microorganismos y dieta) considerados como factores primarios, los cuales se desarrollan dentro de la cavidad bucal; así también Newbrum en 1978 sustentó un modelo más preciso ante la evidencia, añadió el factor tiempo. Sin embargo, Uribe-Echevarría y Priotto en 1990 argumentan la llamada gráfica pentafactorial incluyendo el factor de la edad (Echevarria et al., 1990).

Diversos autores, como Frietas y Bratthal et al. (2001), asimismo Baelum y Fejerskov (2003), plantearon los factores modulares, que se desarrollan fuera de la cavidad bucal como: tiempo, edad, salud general, fluoruros, nivel de educativo, nivel socioeconómico, experiencia previa de caries, grupo epidemiológico y variables del comportamiento. Concluyendo en la configuración del Modelo Etiológico Multifactorial de la caries que es el resultado de diversos factores etiológicos, conformados por los factores primarios y moduladores, siendo adaptado por Baelum y Fejerskov en el 2001 (Fejerskov, 2008).

El consenso actual de la definición de caries dental fue publicado por la ORCA (The European Organisation for Caries Research) e ICDAS (International Caries Detection and Assessment System) en enero del 2020, el cual lo define como una enfermedad dinámica, multifactorial, no transmisible, mediada por biofilm, modulada por la dieta, que produce una pérdida mineral neta de los tejidos duros dentales (MacHiulskiene et al., 2020).

El mismo consenso proporciona una definición epidemiológica de Caries de Infancia Temprana (CIT) como la presencia de una o más caries (lesiones no cavitadas o cavitadas), ausentes (debido a caries) o superficies restauradas en cualquier diente primario de un niño menor de 6 años (MacHiulskiene et al., 2020).

La CIT es la "enfermedad crónica más común de la infancia", afecta al 60–90% de todos los niños en edad escolar (Machiulskiene et al., 2020; Tinanoff et al., 2019). Cuando progresa puede causar dolor agudo, sepsis y una posible pérdida de dientes; la mala salud dental en la infancia puede interferir con la calidad de vida, la nutrición y la participación escolar del niño nuestro país no es ajena a estos indicadores, y por

muchos años no se ven alguna mejora en el su control o prevención (Castillo et al., 2019).

La caries dental se ha investigado durante muchos años mediante el uso de métodos basados en cultivos selectivos, y el papel de *Streptococcus* y la presencia de *Lactobacillus* han sido reconocidos como roles sustanciales en la caries dental. Otros factores de riesgo no microbiológicos que pueden desempeñar un papel importante en Caries de la Infancia Temprana como son los factores del hospedador, los factores ambientales y la dieta. La caries dental es un producto de la pérdida de la estructura dental y es impulsada por el ácido producido por ciertas bacterias bucales que fermentan los sustratos de carbohidratos, que principalmente está basado en leches de alimentación infantil (Hughes et al., 2012).

La alimentación inicial de todo neonato es la leche humana, y complementariamente los sustitutos artificiales; esta interacción y la contribución del crecimiento de los microorganismos especialmente *S. mutans*, merecen ser tomados en cuenta.

El marco filosófico para el desarrollo de la investigación propuesta es el positivismo propuesta por Augusto Comte que es una teoría del conocimiento que sostiene que la verdadera fuente del saber son los hechos, la experiencia y la observación: detallada, continua, objetiva, predictiva y causal de esos fenómenos experienciales, mediante la aplicación de los pasos del método científico, guiado por la razón analítica, indispensable para lograr los objetivos propuestos y contribuir en el planteo de propuestas para el control y prevención de esta afección como es la Caries de Infancia Temprana.

CAPITULO II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Situación problemática

Según la Organización Mundial de la salud la ingesta elevada de azúcares libres es preocupante por su asociación de una dieta rica en carbohidratos y diversas patologías crónicas, entre ellas tenemos a la diabetes tipo II, la obesidad, síndrome metabólico y caries dental (OMS, 2003).

La OMS en su más reciente informe sobre azúcar y salud, recomienda limitar el consumo de azúcar libre a menos del 10% de la energía consumida para prevenir las patologías relacionadas, Así, la restricción de la ingesta a menos del 5% podría ofrecer beneficios adicionales especialmente en relación con la caries dental (OMS, 2003).

Diversos estudios de cohorte en poblaciones de niños sugieren una asociación positiva entre el nivel de ingesta de azúcares libres y la caries dental. Las pruebas científicas sugieren la prevalencia más alta de caries dental cuando el nivel de ingesta de azúcar es superior al 10% de la ingesta calórica total en comparación con lo que ocurre cuando es inferior al 10% de la ingesta calórica total (OMS, 2015).

Numerosas organizaciones de salud, como la Organización Mundial de la Salud (2002), la Academia Americana de Pediatría (1997), la Academia Americana de Médicos de Familia (2003) y otras, promueven la lactancia materna exclusiva como el patrón dorado hasta los 6 meses, luego continuar con la alimentación complementaria, añadiendo a su alimentación otras fuentes de nutrientes hasta los 2 años de edad (Walker & Goran, 2015).

El contenido de carbohidratos en la fórmula infantil está compuesto principalmente entre lactosa, sacarosa, maltosa o glucosa. Las fórmulas con mayor contenido de sacarosa son alternativas a las fórmulas a base de fórmulas que contienen lactosa. Los gramos de azúcares totales varían de 1.28 a 11.16 g. En algunos productos contienen hasta 12 g de azúcar (Insitute of Medicine, 2004).

La leche humana proporciona nutrición al infante y es una fuente de bacterias entre ellas se puede mencionar, *Staphylococcus*, *Lactobacilos*, *Bifidobacterias* y *Streptococcus* en cantidades mínimas y solo las necesarias, No obstante los

componentes de la leche humana inhiben el crecimiento y la unión de las bacterias cariogénicas, en particular del *Streptococcus mutans* (Danielsson Niemi et al., 2009).

El estudio realizado por Holgerson et al.(2014), reveló que la presencia de los *Lactobacilos* en la cavidad bucal fueron más altos en la leche humana en comparación con los lactantes alimentados con fórmula. Así concluyeron que las especies de *Lactobacilos* tenían un efecto inhibitorio sobre los *Streptococcus mutans*. En consecuencia esto sugirió que los bebés alimentados con fórmula infantil tenían un mayor riesgo de desarrollar caries dental.

La caries de infancia temprana (CIT) es un problema global que compromete la salud bucal, y Perú no es ajeno a ello, constituyéndose en uno de los países con alta prevalencia de CIT no tratada en América Latina. Así tenemos que los factores de riesgo para CIT los conforma la pobreza, escaso conocimiento en salud oral y alto consumo de azúcar (Castillo et al., 2019).

2.2 Formulación del problema

a) Problema general

P.E.1 ¿Cuál es el potencial cariogénico que producen las diferentes leches de alimentación infantil por la presencia de *Streptococcus mutans* en el biofilm?

b) Problema específico

P.E.1 ¿Cuál es el potencial cariogénico de la leche humana en la formación de biofilm por *Streptococcus mutans*?

P.E.2 ¿Cuál es el potencial cariogénico de la leche bovina en la formación de biofilm por *Streptococcus mutans*?

P.E.3 ¿Cuál es el potencial cariogénico de la fórmula infantil a base de lactosa la formación de biofilm por *Streptococcus mutans*?

P.E.4 ¿Cuál es el potencial cariogénico de la fórmula infantil a base de sacarosa la formación de biofilm por *Streptococcus mutans*?

P.E.5 ¿Existen diferencias del potencial cariogénico de las diferentes leches de alimentación infantil en la formación de biofilm por *Streptococcus mutans*?

2.3. Justificación e importancia

El presente trabajo de investigación se justifica por las siguientes razones:

Justificación Teórica

Los resultados del presente estudio pretenden brindar información relevante respecto los efectos de las diferentes leches sobre el crecimiento de *S. mutans* en el biofilm y las consecuencias que derivan en la salud oral del infante como es la caries dental; actualmente ha sido poco estudiado en nuestro medio, por lo tanto llenara un vacío en la información teórica. Dicha información es muy importante en salud pública con respecto a la toma de decisiones para la prevención, promoción y tratamiento de las enfermedades derivadas como consecuencia de los efectos nocivos.

Justificación Práctica

Los resultados del presente estudio sobre los efectos y diferencias en el crecimiento de *S. mutans* de las distintas leches de alimentación infantil brindara una aplicación práctica para que el clínico pueda recomendar el consumo de determinado tipo de leche que tenga repercusiones en beneficio en la salud integral en especial énfasis en salud bucal del infante, con la finalidad de contribuir en la prevención de diversas enfermedades entre ellas las caries dental.

Justificación metodológica

La metodología del presente trabajo de investigación servirá de base para futuras investigaciones en nuestro medio, como se ha mencionado anteriormente no existen investigaciones al respecto, siendo este trabajo uno de los primeros que utilizaría esta metodología y diseño en nuestro país que evalúen las fórmulas infantiles de mayor consumo en infantes.

Justificación económica social

La presente investigación busca proporcionar información necesaria mediante la evaluación del contenido de sacarosa de las diferentes leches de alimentación infantil, carbohidrato consumido en exceso está asociado a varias enfermedades. Por lo tanto el resultado del presente estudio será útil y beneficiosa a la comunidad, a las autoridades, los profesionales de la salud y a los padres de familia con el fin de promover la salud de los infantes en la etapa de lactante, en consecuencia recudir la

alta prevalencia e incidencia de múltiples enfermedades crónicas como la caries dental.

2.4. Objetivos

a) Objetivo general

Evaluar y comparar la formación de biofilm in vitro de *Streptococcus mutans* UA159 sobre las diferentes leches de alimentación infantil.

b) Objetivos específicos

Determinar el potencial cariogénico de la leche humana en el crecimiento del *Streptococcus mutans* en el biofilm.

Determinar el potencial cariogénico de la leche bovina en el crecimiento del *Streptococcus mutans* en el biofilm.

Determinar el potencial cariogénico de fórmula infantil a base de lactosa en el crecimiento de *Streptococcus mutans* en el biofilm.

Determinar el potencial cariogénico de fórmula infantil a base de sacarosa en el crecimiento de *Streptococcus mutans* en el biofilm.

Comparar el potencial cariogénico de las diferentes leches de alimentación infantil en el crecimiento del *Streptococcus mutans* en el biofilm.

2.5 Hipótesis de la investigación

a) Hipótesis general

Hi : La diferentes leches de alimentación infantil propiciarán el crecimiento de *Streptococcus mutans* en el biofilm similar al grupo control positivo

b) Hipótesis específicas

HE₁ La leche humana propicia el crecimiento de *Streptococcus mutans* en la formación del biofilm

HE₂ La leche bovina propicia el crecimiento de *Streptococcus mutans* en la formación del biofilm

HE₃ La fórmula infantil a base de lactosa propicia el crecimiento de *Streptococcus mutans* en la formación del biofilm

HE₄ La fórmula infantil a base de sacarosa propicia el crecimiento de *Streptococcus mutans* en la formación del biofilm

HE₅ Existirán diferencias en la formación de Biofilm por *Streptococcus mutans*, en las diferentes leches de alimentación infantil.

2.6 Variables de la Investigación

a) Identificación de variables

El presente trabajo de investigación se compone de las siguientes variables:

Variable independiente.

Leches de Alimentación Infantil

Variable Dependiente.

Formación de Biofilm por *Streptococcus mutans*

b) Operacionalización de variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	TIPO DE VARIABLE	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA
<p>Variable Independiente</p> <p>Leche de Alimentación infantil</p>	<p>Alimento líquido con una elevada proporción de agua y una composición de glúcidos, lípidos y proteínas bastante equilibrada que contiene una importante cantidad de sales, vitaminas y enzimas.</p>	<p>Cualitativa</p>	<p>Leche Humana</p> <p>Leche bovina</p> <p>Fórmula infantil a base de sacarosa</p> <p>Fórmula infantil a base de lactosa</p>	<p>Tipo de leche</p>	<p>Nominal</p>
<p>Variable Independiente</p> <p><i>Streptococcus mutans</i></p>	<p>Coco Gram positivo, Productor de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en, Aproximadamente, 24 horas.</p>	<p>Cuantitativa</p>	<p>Crecimiento y producción de polisacáridos extracelulares</p>	<p>Marcador de Elisa</p>	<p>Razón</p>

CAPITULO III : METODOLOGIA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Tipo, nivel y diseño de investigación

Tipo : Experimental

Nivel : Comparativo

Diseño : Analítico, longitudinal

3.2 Población – Muestra

Población:

La población estará constituida por el conjunto conformado por cultivos de las cepas de *Streptococcus mutans* UA 159 (ATCC® 25175™)

Muestra:

La muestra fue elegida de manera no probabilística, no aleatoria es decir, que no depende de la probabilidad si no por conveniencia del estudio. Se utilizara la fórmula de diferencia de medias

$$n = \frac{2(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 (DE)^2}{[d]^2}$$

Donde :

n : tamaño de muestra

$\alpha = 0.05$

$Z_{\alpha/2} = 1.64$

$Z_{\beta} = 0.84$

DE: desviación estándar

d: diferencia entre promedios

Reemplazando:

Para $(DE/d) = 0.50$

$n = 2(1.64 + 0.84)^2 (0.5)^2 = 3$

Finalmente se necesitan:

nf= número de concentraciones * 3 repeticiones

nf= 18 * 3

nf= 48 pozos de las placas de poliestireno por cada muestra.

La unidad de análisis estará conformado por placas de 96 pozos de poliestireno que contienen los biofilm formados o no del *S. mutans* UA159, que fueron adquiridos del laboratorio GenLab del Perú S.A.C.

Criterios de Inclusión.

Se consideró los siguientes:

Ensayos que contienen Cepas de *S. mutans* UA159, libres de contaminación.

Materiales e instrumentos esterilizados.

Criterios de Exclusión.

Todo microorganismos que no sea *S. mutans* UA159.

Todo medio contaminado.

Densidad óptica inicial mayor a 0.3 de absorbancia para los ensayos.

CAPITULO IV: TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN

4.1 Técnicas de recolección de Datos

El presente estudio fue aprobado por del Comité Institucional de Ética de Investigación de la universidad Nacional Mayor de San Marcos. UNMSM (Anexo 1), el Consentimiento Informado de la donante de carácter voluntario de la muestra de la leche humana (Anexo 2). Previo al estudio se llevó a cabo se capacito al investigador en temas relacionados al estudio en los laboratorios de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM (Anexo 3). Del mismo modo, la autorización, y permisos para el uso de los laboratorios de microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Estatal de Campinas UNICAMP (Anexo 4).

Cepa estudiada, activación y condiciones de crecimiento.

La cepa de *S. mutans* UA159, fue activada de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se utilizó un medio el cultivo BHI (Brain Heart Infusion), para la reactivación de la cepa, diseminando el microorganismo con el hisopo de la propia capsula a través del medio de cultivo, por el método de aislamiento por agotamiento de estrías. Luego fue incubada a 37°C por 24-48 horas, sobre la condición de 10% de CO₂, las colonias más puras y aisladas serán transportadas con el asa de Cole a un tubo de vidrio que contiene 5mL de caldo MSB(mitis salivarius con bacitracina), un medio enriquecido específico para crecer solo la especie mutans, entonces se transfirieron aproximadamente 5 colonias e incubamos por 18h sobre 10%CO₂, pasadas las 18 h realizaremos alícuotas o stock de nuestra cepa UA159 para trabajar durante el desarrollo de la investigación, para ello, los 5mL de cultivo de *S. mutans*, serán homogenizados con un vortex por 30 segundos y se pipetearon 400 µL de nuestro cultivo y fue colocado en los eppendorff de 1.5 mL que contenían 600µL de glicerol estéril, la función del glicerol es para conservar nuestros microorganismos hasta un plazo de 1 año. Homogenizaremos nuestro eppendorff de 1.5mL para mezclar bien nuestros microorganismos con el glicerol, posteriormente guardaremos las alícuotas o stock realizados a -20°C. Para todos los experimentos, las cepas fueron inoculadas a partir de las alícuotas congeladas a (-20°C) en las placas de Petri conteniendo agar MSB para garantizar que no exista contaminación de nuestras muestras, serán incubadas por un espacio de 24-30h a 37°C en la condición

atmosférica de 10% CO₂, respectivamente. Un total de 5 colonias serán entonces transferidas para tubos de ensayo con 5mL de medio BHI, los cuales serán incubados en las mismas condiciones durante 18h. estas cultivos tenían las absorbancias (A_{550nm}) determinadas en el espectrofotómetro para obtener la misma cantidad de concentración inicial para realizar todos los experimentos bajo un mismo patrón en cuanto a la cantidad de células inoculadas para cada experimento, como análisis de crecimiento planctónico, morfología, también producción de polisacáridos extracelulares y formación de biofilm.

Características de crecimiento planctónico del S. mutans en microaerofilia (10% CO₂).

El crecimiento planctónico fue realizado y analizado a través de la determinación de las curvas de crecimiento en BHI, sobre 10% de CO₂, como será descrito resumidamente, para el crecimiento en microaerofilia, las cepas fueron inoculadas a partir de inóculos ajustados de cultivo de 18 h (para A_{550nm} 0,03) en 50 mL de BHI en garrafas de 250 mL (Schott Duran, Alemanha), las cuales fueron incubadas en la estufa a 37°C durante un periodo de 8 h. a cada una hora serán extraídas pequeñas cantidades de cultivo, alícuotas de 350 µL, las cuales fueron medidas las absorbancias en el espectrofotómetro a (A_{550nm}), obteniendo nuestros datos para el posterior análisis y determinación de las absorbancias.

Análisis de la morfología bacteriana por microscopia de luz.

La morfología celular del *S. mutans* fue analizada a través de microscopia de luz, de las bacterias crecidas durante 18h. Alícuotas de 12 µL de estos cultivos fueron transferidas para las láminas de vidrio, secas sobre temperatura ambiente, e posteriormente coloreadas por el método de Gram las cepas fueron entonces observadas por microscopia de luz con una objetiva de 100X con ole de inmersión en un microscopio óptico, incorporado con cámara digital y computador (Leica DMLP).

Agregación bacteriana mediada por polisacáridos extracelulares (PEC) producidos a partir de la sacarosa.

El análisis de agregación bacteriana mediada por PEC fue realizado siguiendo estudios anteriores (Alves *et al.*, 2016). Para observar la producción de polisacáridos de nuestra cepa, a partir de la sacarosa, ya que el *S mutans* tiene la capacidad de sintetizar glucanos a través de las glicosiltransferasas genes (gtfB, gtfC y gtfD) en su genoma, que son importantes en la producción de la matriz extracelular del biofilm. Resumidamente las cepas fueron crecidas a partir de inóculos que contienen el mismo número de bacterias en tubos de ensayos conteniendo 5 mL de BHI suplementado con 1% de sacarosa e incubadas a 37°C por 18 h, sobre la atmósfera de 10% CO₂. A seguir la agregación mediada por PEC fue analizada visualmente y comparadas con el artículo referencia de Alves para la definición semicuantitativa de las intensidades de agregación. Los tubos fueron fotografiados sobre un fondo negro, como control utilizamos cultivos en BHI no suplementados de sacarosa.

Análisis de formación de Biofilm.

Procedimientos de recolección de muestras de leche de alimentación infantil.

Se seleccionaron 6 diferentes tipos de Leche de alimentación infantil yLAI), 1 leche humana (LH), 4 fórmulas infantiles (FI), 1 leche bovina (LB) evaporada de mayor consumo en el Perú. Con respecto, a la leche humana se obtuvo bajo consentimiento informado de una donante, de 3 meses posparto, que se encuentra en aparente buen estado de salud general, se realizó bajo estrictas condiciones de higiene y bioseguridad para evitar la contaminación de la leche, la extracción fue realizado el mismo día del experimento en un ambiente privado y tranquilo, con previa higiene de agua y jabón de la mamas, así como también de las manos, la leche materna fue extraído por la misma madre en un tubo Falcom estéril de 50mL hasta completar los 20mL, vamos a centrifugar a 4500 rpm por 5 min, luego de eso vamos a coleccionar solo el sobrenadante, el sobrenadante fue esterilizada usando filtros de 0.22 µm de diámetro (Millipore ExpressTM plus), que en la prueba piloto observamos contaminación al momento de realizar los experimentos pudiendo dar error en los resultados posteriores, luego de la esterilización la leche fue almacenada a -4C en la

refrigeradora hasta su posterior uso. De la misma manera se realizó la esterilización por filtración e posterior almacenamiento de las otras leches de alimentación infantil, siguiendo previamente la preparación de cada una de ellas de acuerdo a las especificaciones del fabricante para las leches de fórmula, en caso de la leche evaporada se siguió los protocolos de preparación recomendados por especialistas.

Análisis de formación de biofilm maduro en placas de 96 pozos de poliestireno.

La formación de biofilm durante 18 h fue analizada a través de ensayos con placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano de la marca (Cralplast). Para esto. Volúmenes de 3 mL de medio BHI (BHI más 1% de sacarosa) o BHIS (BHI suplementado con 40% de las diferentes leches de alimentación para infantes), fueron inoculados con 171 μ L de cultivos de *S. mutans* UA159 en BHI en fase exponencial (A_{550nm} 0.3). Volúmenes de 200 μ L/pozo de estos cultivos diluidas 1:40 fueron transferidas en 6 replicas para las placas, que fueron incubadas a 37°C sobre 10% de CO₂ durante 18 h. los restantes de los cultivos diluidos fueron paralelamente incubados sobre las mismas condiciones como control del crecimiento planctónico durante 18 h, transcurrido el tiempo de incubación, fueron homogenizadas en un vortex para la lectura en el espectrofotómetro (A_{550nm}). Asi como también pasadas las 18 h fueron removidas de cada pozo los cultivos microbianos con la ayuda de una pipeta multicanal y las placas mantenidas en la estufa a 37°C, antes del procesamiento del biofilm. A seguir, los biofilm fueron lavados 3 veces con agua destilada, para remover las células poco adheridas y luego será secadas sobre temperatura ambiente (25°C) por 20 min. Luego de esto, los biofilm serán coloreados con 200 μ L de solución de cristal violeta al 1% durante 30 min y nuevamente lavados por 3 veces con agua destilada, después de lavado dejaremos secándolos a temperatura ambiente por 20 min. Entonces una vez que nuestro Biofilm quedo coloreado, este será solubilizado durante la incubación con etanol absoluto al 100% (200 μ L por pozo) por 30 min a temperatura ambiente. A seguir, volúmenes de 100 μ L de la dilución fueron transferidos para una nueva placa de 96 pozos de fondo plano, para la determinación de las absorbancias (A_{575nm}) en lector de ELISA

(VersaMAX, molecular devices, EUA). Las medidas de la absorbancia son expresadas como medidas indirectas de la biomasa del Biofilm.

4.2 Instrumentos de Recolección de Datos

Para llevar a cabo el presente estudio se confeccionaron fichas de observación específicas para el registro y recolección de los datos.

4.3 Técnicas de Procesamiento, Análisis e Interpretación de Resultados

Se registraron los resultados en la ficha de recolección de datos diseñados para la investigación en forma secuencial, luego se trasladaron a una base de datos electrónica con campos de ingreso controlados en Microsoft Office Excel 2019. En los experimentos de la formación de biofilm, las diferencias estadísticas entre los grupos de tratamiento se analizaron mediante la prueba ANOVA y la comparación múltiple de Dunnett.. El análisis estadístico se realizó con el software GraphPadPrism versión 6 para Windows. Se consideró que los valores de $p < 0,05$ eran significativos.

CAPITULO V : CONSTRATACIÓN DE HIPOTESIS

Planteamiento:

Ho: Las diferentes leches de alimentación infantil no propiciarán el crecimiento de *Streptococcus mutans* en el biofilm y los resultados serán similares al grupo control negativo.

Hi: La diferentes leches de alimentación infantil propiciarán el crecimiento de *Streptococcus mutans* en el biofilm similar al grupo control positivo

- Nivel significancia o riesgo: 0,05
- Utilización del estadístico de prueba: ANOVA y prueba post-hoc de Dunnet.
- Lectura del p. valor: 0,03 y 0,04
- Decisión estadística: Existe diferencia estadísticamente significativa al comparar los grupos leches de alimentación ($p < 0,05$).
- Conclusiones estadísticas: Hay asociación estadísticamente significativa entre las diferentes leches de alimentación y el crecimiento de *Streptococcus mutans* en el biofilm.
- Interpretación: La lectura del p valor es menor al nivel de significancia por lo tanto rechazamos la hipótesis nula (H_0) y se evidencia una asociación; aceptando así la hipótesis verdadera.

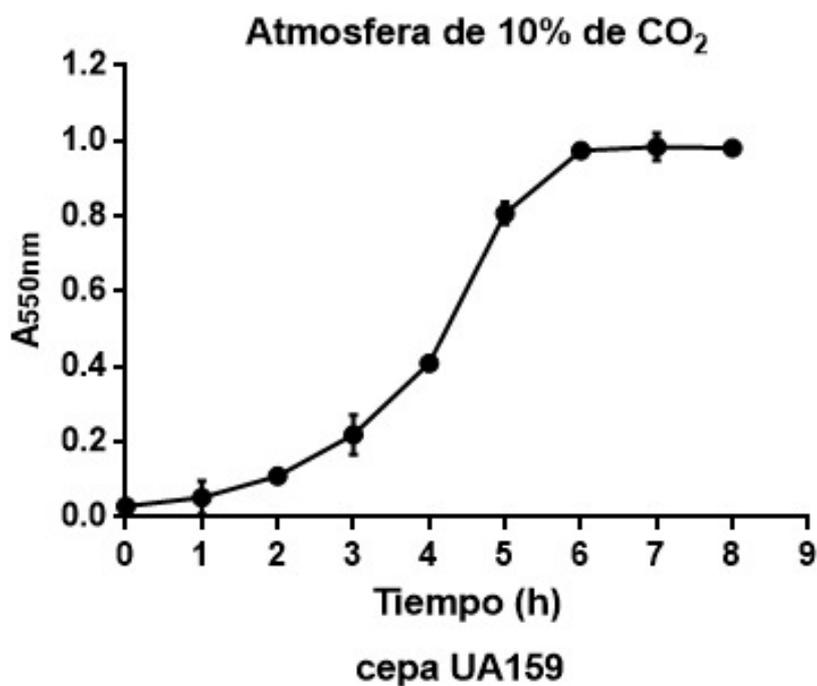
CAPITULO VI: PRESENTACIÓN, INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

6.1 Presentación de los resultados

No existe diferencia en los padrones de crecimiento planctónico por *S. mutans* de la cepa UA159.

Figura 1

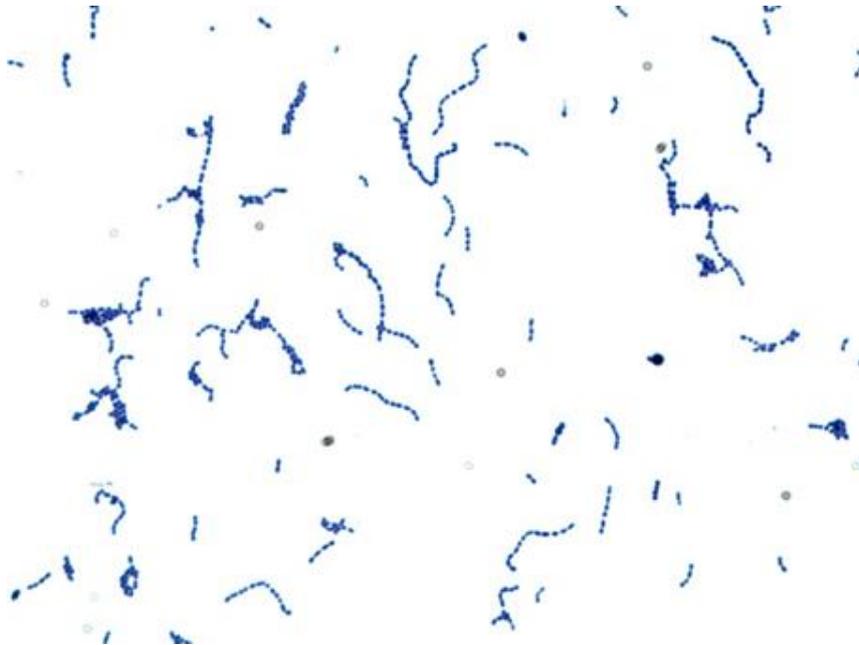
Curva de crecimiento bacteriano



Nota. Curva de crecimiento de la cepa *S. mutans* en BHI (10% de CO₂). Media de tres experimentos independientes realizados por duplicado, medidas en el espectrofotómetro (A_{550nm} 0.3), las barras indican los desvíos padrones de los experimentos independientes.

Figura 2

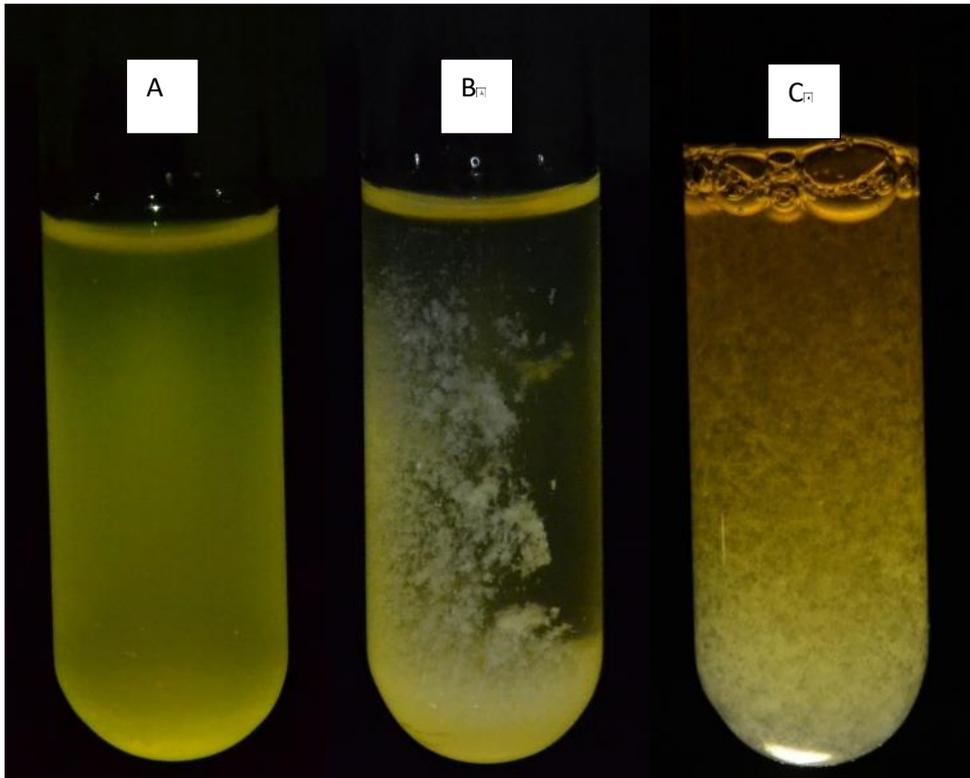
Morfología normal del S. mutans en la condición de 10% de CO₂.



Nota. Análisis Gram de la cepa de *S. mutans* UA159, crecida en medio BHI durante 18 h y colorada por el método de Gram, con propósito de observarla en el microscopio óptico a un aumento de 100X, las imágenes fueron obtenidas con auxilio de una cámara fotográfica incorporada al microscopio, esta imagen es representativa de 3 cultivos diferentes.

Figura 3

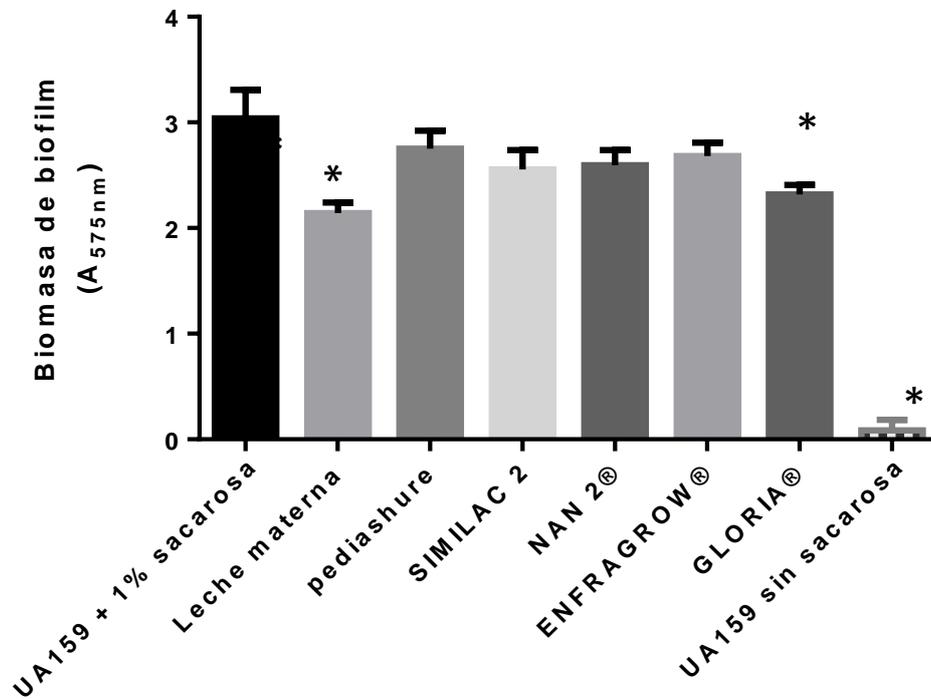
Análisis de agregación mediada por polisacáridos celulares a partir de la sacarosa.



Nota. Análisis de agregación bacteriana de la cepa UA159 mediada por PEC en la presencia de sacarosa al 1%. (A) La cepa fue crecida a partir de inóculos en una absorbancia de (A_{550nm} 0.3) durante 18 h en medio BHI sin sacarosa, usada como control de la agregación bacteriana. (B, C) fueron crecidos en BHI con 1 % de sacarosa para la producción de PEC, todos ellos sobre la atmosfera de 10% de CO_2 . A seguir los tubos fueron fotografiados sobre un fondo negro (B) antes de agitar por 10 segundos en un vortex. (C) después de agitarlo.

Figura 4

Análisis comparativo de la biomasa de biofilm formado in vitro, durante 18 h bajo la presencia de diferentes leches de alimentación para infantes.



Nota. Análisis comparativos de la biomasa de biofilm formados durante 18 horas por *S. mutans* sobre 10% de CO₂. Biofilm formados en placas de 96 pozos en medio de BHI con 1% de sacarosa para el control positivo y sin sacarosa para el control negativo. O BHIS (BHI suplementado 40% de las diferentes leches de alimentación para infantes). Las columnas representan la media de tres experimentos independientes, realizados en 6 réplicas. Las barras indican los desvíos padrones y los asteriscos indican las diferencias significativas en comparación con el control positivo que sería la cepa UA159 más 1 % de sacarosa. (Dunnet p<0,05).

TABLA 1

Biomasa de biofilm formado in vitro, durante 18 h bajo la presencia de diferentes leches de alimentación para infantes (Experimento 1)

Experimento 1	UA159 + 1% sacarosa	LECHE MATERNA	PEDIASHURE	SIMILAC 2	NAN 2®	ENFRAGROW®	GLORIA®	UA159 sin sacarosa	CONTROL (-) BHI sin S. mutans
1.1	3.243	2.242	2.921	2.694	2.695	2.785	2.418	0.084	0.0015
1.2	3.243	2.243	2.832	2.784	2.696	2.815	2.419	0.084	0.0015
1.3	3.245	2.244	2.964	2.699	2.694	2.785	2.518	0.084	0.0015
1.4	3.247	2.242	2.952	2.668	2.696	2.804	2.320	0.084	0.0015
1.5	3.241	2.242	2.979	2.599	2.693	2.802	2.522	0.084	0.0014
1.6	3.248	2.244	2.880	2.687	2.696	2.780	2.317	0.084	0.0014
Promedio	3.245	2.243	2.921	2.689	2.695	2.795	2.419	0.084	0.001
Desviación Standar	0.002	0.001	0.051	0.054	0.001	0.013	0.082	0.000	0.000

TABLA 2

Biomasa de biofilm formado in vitro, durante 18 h bajo la presencia de diferentes leches de alimentación para infantes (Experimento 2)

Experimento 2	UA159 + 1% sacarosa	LECHE MATERNA	PEDIASHURE	SIMILAC 2	NAN 2®	ENFRAGROW®	GLORIA®	UA159 sin sacarosa	CONTROL (-) BHI sin S. mutans
2.1	3.013	2.013	2.752	2.614	2.670	2.670	2.289	0.082	0.0014
2.2	3.103	2.013	2.752	2.606	2.678	2.678	2.299	0.082	0.0014
2.3	3.067	2.013	2.552	2.602	2.688	2.688	2.322	0.082	0.0015
2.4	3.042	2.013	2.752	2.618	2.684	2.684	2.292	0.082	0.0015
2.5	3.138	2.015	2.739	2.621	2.681	2.681	2.322	0.082	0.0014
2.6	3.134	2.015	2.742	2.608	2.688	2.688	2.312	0.082	0.0015
Promedio	3.083	2.013	2.715	2.612	2.682	2.682	2.306	0.082	0.001
Desviación Standar	0.046	0.001	0.073	0.007	0.006	0.006	0.013	0.000	0.000

TABLA 3

Biomasa de biofilm formado in vitro, durante 18 h bajo la presencia de diferentes leches de alimentación para infantes (Experimento 3)

Experimento 3	UA159 + 1% sacarosa	LECHE MATERNA	PEDIASHURE	SIMILAC 2	NAN 2®	ENFRAGROW®	GLORIA®	UA159 sin sacarosa	CONTROL (-) BHI sin S. mutans
3.1	2.819	2.042	2.505	2.264	2.385	2.685	2.218	0.084	0.0015
3.2	2.818	2.043	2.505	2.364	2.369	2.685	2.227	0.084	0.0015
3.3	2.818	2.044	2.602	2.369	2.294	2.685	2.240	0.084	0.0014
3.4	2.822	2.042	2.402	2.174	2.496	2.684	2.229	0.084	0.0015
3.5	2.816	2.042	2.502	2.169	2.293	2.684	2.204	0.084	0.0014
3.6	2.814	2.044	2.502	2.246	2.496	2.686	2.198	0.084	0.0014
Promedio	2.818	2.043	2.503	2.264	2.389	2.685	2.219	0.084	0.001
Desviación standar	0.002	0.001	0.058	0.080	0.083	0.001	0.015	0.000	0.000

TABLA 4

Análisis comparativo de la biomasa de biofilm formado in vitro, durante 18 h bajo la presencia de diferentes leches de alimentación para infantes.

Experimentos Independentes	UA159 + 1% sacarosa	LECHE MATERNA	PEDIASHURE	SIMILAC 2	NAN 2®	ENFRAGROW®	GLORIA®	UA159 Sin sacarosa	CONTROL (-) BHI sin S. mutans
Experimento 1	3.245	2.243	2.921	2.689	2.695	2.795	2.419	0.084	0.0015
Experimento 2	3.083	2.013	2.714	2.612	2.682	2.715	2.306	0.082	0.0015
Experimento 3	2.817	2.043	2.502	2.264	2.389	2.489	2.219	0.084	0.0015
Promedio	3.048	2.100	2.712	2.522	2.589	2.666	2.315	0.083	0.0015
Desviación Standar	0.176	0.102	0.171	0.185	0.141	0.130	0.082	0.001	2.1684E-19

6.2 Discusión de resultados

En las diferentes leches de alimentación infantil, como leche humana, leche bovina, y las fórmulas infantiles, se observó diferencias significativas resaltantes, la leche humana que produjo 29.60% menos biofilm y la leche bovina tuvo un 24.01% menos, comparadas con nuestro grupo control positivo. En el caso de nuestro control negativo era un resultado esperado, sin producción de biofilm por falta de sacarosa para la producción de glucanos, que son esenciales en la formación del biofilm por *S.mutans*.

Respecto a la leche humana, investigadores como Allison et al.(2015) encontraron resultados similares, observaron el efecto de los componentes de la leche humana tales como la lactosa, IgA y lactoferrina en la formación del biofilm. En cuanto a la lactosa, que presenta concentraciones medias de aproximadamente 6,4 a 7,6 g / dL, principal carbohidrato de la leche humana, la misma no tuvo ningún efecto significativo en la formación de biofilm, en cambio la lactoferrina por su acción antibacteriana inhiben la formación del biofilm. Es preciso indicar que la concentración de la IgA y lactoferrina va disminuyendo a medida que la leche humana se torna más madura, esto es cuando el lactante presente más edad.

Así, la leche humana expone factores de riesgo como son los carbohidratos representados por la lactosa, la misma que presenta potencial cariogénico menor comparado con la sacarosa, principal sustrato para la formación del biofilm por *S. mutans*. Así también protectores como IgA, lactoferrina, calcio, fosforo y proteínas la caseína que dificultan su formación. Recientes revisiones sistemática con metaanálisis de la mejor evidencia disponible indica que la lactancia materna hasta los 2 años de edad no aumenta el riesgo de caries de infancia temprana.(Moynihan et al., 2019) La leche humana primordial alimento de los infantes, recomendada por organizaciones internacionales e nacionales OMS, OPS, UNICEF, MINSa como patrón de oro durante los 6 primeros meses de manera exclusiva. Luego la alimentación complementaria a la leche humana, alimentos que también que pueden aumentar el riesgo cariogénico. Por ello urge la necesidad de implementar tempranamente medidas de higiene bucal coincidiendo con la erupción de los primeros dientes. Según las recomendaciones de diversas organizaciones como Academia Americana de Odontología Pediátrica (AAPD) y el MINSa en nuestro país.

Así también, Duse et al.,(2014) encontraron formación significativa del biofilm en presencia de la leche humana. No obstante la fórmulas infantiles con contenidos añadidos de probióticos, tuvieron menor expresión en la formación del biofilm frente a las fórmulas que no contenían las mismas. Aunque limitado el estudio por el número de muestras, sugieren la participación de los probióticos como un factor protector a riesgo de caries de infancia temprana.

Respecto a la menor formación de biofilm en presencia de la leche bovina frente a las fórmulas infantiles, se explica por el contenido importante de inmunoglobulinas, que inhiben la formación del biofilm así como proteínas y minerales inclusive mayor en comparación de la leche humana, este contenido de minerales favorecen a la remineralización del esmalte, Así también forman parte del contenido de las fórmulas infantiles, azúcar añadidos por el fabricante como la sacarosa, carbohidrato más cariogénico y fermentable que promueve la formación del biofilm en presencia del *S. mutans*, aumentando diferencia de la leche humana que su carbohidrato principal es el disacárido lactosa. Del mismo modo, Lee et al., analizó la formación del biofilm en presencia de leche entera, la misma que se expresó de manera importante. Sin embargo, la leche bovina es rica en minerales como calcio, fosfato y caseína, los que contribuyen a una fuerte capacidad de amortiguación frente a un pH ácido (Lee et al., 2018).

En cuanto a las fórmulas infantiles el presente estudio mostró mayor formación del biofilm frente a la leche humana y la leche evaporada, las mismas que fueron similares al control positivo a base de sacarosa al 1%. Datos que coinciden con los estudios realizados por Hinds et al.(2016), al comparar las fórmulas infantiles a base cantidad de sacarosa proporcionaban mayor formación de biofilm en comparación de fórmulas infantiles a base de lactosa, demostrando que la sacarosa promueve la mayor formación de biofilm por *S. mutans*. Anatolitou (2012) Igualmente Dagón et al.(2014), luego de cultivar e incubar muestras de fórmulas infantiles líderes en el mercado, las mismas que contenían carbohidratos como, glucosa, lactosa, maltosa, concluyeron que las fórmulas infantiles pueden tener mayor potencial cariogénico, puesto que aumentan la UFC de *S. mutans*. De forma similar Acosta et al., encontró mayor de formación de biofilm en presencia de sustratos ricos en carbohidratos como

la glucosa.(Dagon et al., 2019) Así también, estudios liderados por Meltharyna et al.(2017) compararon fórmulas infantiles a base de leche vaca, de bebida de soya y proteínas hidrolizadas, observaron que la formula infantil a base de leche de vaca mostro menor formación de biofilm frente a las otras fórmulas, este menor formación fue atribuido a la acción de una proteína presente en la leche de vaca denominada caseína, que presenta como propiedad antibacteriana esta inhibe la unión de los *S. mutans* a la superficie de los sustratos, reduciendo la actividad dela enzima glucosiltransferasa.

Así pues, una revisión sistemática liderados por Tan et al.(2015), mostro en base al resultado referente al potencial cariogénico de las fórmulas que contienen solo sacarosa son probablemente más cariogénico que las fórmulas que contienen lactosa. No obstante, el nivel de evidencia fue limitado y no concluyente. En cuanto a al contenido de caseína variable: No se encontró una correlación significativa entre la cariogenicidad y el contenido variable de caseína. Por ello no se pueden hacer recomendaciones precisas. En consecuencia se sugiere más estudios bien diseñados para aclarar el efecto del contenido de caseína en la cariogenicidad.

Por otro lado, los microorganismos que habitan en la cavidad oral generalmente presentan mucha diversidad en sus fenotipos de cada especie, es por eso la necesidad de observar y analizar a través del método de Gram los cultivos microbianos de 18 h en crecimiento platónico de nuestra cepa en estudio, para confirmar los datos ya conocidos de esta especie UA159, que a su vez es la cepa de referencia entre los *S. mutans*. Generalmente esta bacteria Gram positiva forma cadenas cortas (cerca de 6 a 18 cocos por cadena), que por lo general no están agregadas.

El análisis de crecimiento planctónico sobre la condición atmosférica de 10% de CO₂ revelan que nuestra cepa de *S. mutans* UA159 se comporta de manera muy semejante al estudio de Alves et al. (2016), siendo las fases de crecimiento de esta cepa representativas con otros trabajos. Así mismo, los padrones comparativos de las curvas de crecimiento de esta cepa bacteriana, muestran aspectos similares en medición y absorbancias, encontrándose dentro de los parámetros normales de crecimiento en esta condición. Lo que resulta importante para evaluar el crecimiento bacteriano y la formación del biofilm.

Así mismo, el crecimiento bacteriano y la formación de biofilm se expresaron de manera diferente en presencia de diversas leches de alimentación infantil. Por lo tanto, el crecimiento bacteriano en la leche humana es menor, seguida de la leche bovina, finalmente la formulas infantiles ricas en carbohidratos presentaron mayor crecimiento bacteriano y formación de biofilm.

Dentro las limitaciones del estudio se considera el número reducido de muestras que fueron elegidas por conveniencia, de mayor consumo en el mercado. Además los diversos estudios presentan metodologías distintas para la evaluación de la formación del biofilm por *S. mutans*, utilizando como control positivo diferentes concentraciones de sacarosa, 10%, 5% y 1% al igual que el presente estudio, lo que conduce resultados diversos.

Por otro lado para cuantificar la formación del biofilm por *S. mutans*, los estudios previos utilizaron diferentes métodos directos e indirectos, entre ellos emplearon métodos actualizados como la cuantificación mediante la absorbancia utilizando para ello el espectrofotómetro y/o lector de ELISA. En el presente estudio se evaluó la formación del biofilm por las diferentes leches de alimentación infantil cuantificando la absorbancia (A_{575nm}) en el lector de Elisa (VersaMAX, molecular devices, EUA). Lo que constituye una fortaleza respecto a la tecnología moderna utilizado en la actualidad en estudios similares.

Igualmente, los resultados sirven para la orientación tanto para las autoridades políticas de gobierno, profesionales de la salud y padres de familia en la toma de decisiones respecto a la alimentación de los infantes como en las medidas tempranas de higiene oral, y la reducción de los factores de riesgo potenciales para disminución de incidencia y prevalencia la caries de infancia temprana.

CONCLUSIONES.

Las diferentes leches de alimentación infantil, la leche humana leche bovina evaporada, y formulas infantiles expresaron distinto crecimiento bacteriano y formación del biofilm por *S mutans*

La leche humana presento menor potencial cariogénico frente a la leche bovina y fórmulas infantiles

La leche bovina presenta mayor potencial cariogénico en comparación de las fórmulas infantiles

Las fórmulas infantiles presentaron mayor potencial cariogénico en comparación de la leche humana y leche bovina.

Las diferentes leches de alimentación infantil expresaron que a mayor contenido de sacarosa en la leche de alimentación infantil mayor formación de biofilm de *Streptococcus mutans*.

RECOMEDACIONES

Implementar medidas preventivas tempranas de higiene oral, y la coincidente con la erupción de los primeros dientes deciduos con responsabilidad de los padres o tutores de los infantes

Promover la lactancia materna exclusiva en los primeros 6 meses de vida, asesoramiento preventivo, incluido el relacionado con las prácticas de alimentación infantil asesoría por los cirujanos dentistas y demás profesionales de la salud.

Desarrollar planes nacionales, políticas de promoción y prevención de la salud con énfasis en salud oral por los entidades de gobierno a fin de reducir la incidencia y prevalencia de caries de infancia temprana.

FUENTES DE INFORMACIÓN

- Abranches, J., Zeng, L., Kajfasz, J. K., Palmer, S., Chakraborty, B., Wen, Z., Richards, V. P., Brady, L. J., & Lemos, J. A. (2019). Biology of Oral Streptococci. *Gram-Positive Pathogens*, 6(5), 426–434.
<https://doi.org/10.1128/9781683670131.ch26>
- Acosta S, Pérez-Domínguez M, Ramos N, Pérez-Ybarra L.(2017) Efecto de glucosa y de *Stevia rebaudiana* sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* en medio de cultivo axénico. *Odous Científica*. 18(1): 7-21
- Adlerberth, I., & Wold, A. E. (2009). Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 98(2), 229–238.
<https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.01060.x>
- Ajdić, D., McShan, W. M., McLaughlin, R. E., Savić, G., Chang, J., Carson, M. B., Primeaux, C., Tian, R., Kenton, S., Jia, H., Lin, S., Qian, Y., Li, S., Zhu, H., Najar, F., Lai, H., White, J., Roe, B. A., & Ferretti, J. J. (2002). Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 14434–14439. <https://doi.org/10.1073/pnas.172501299>
- Allison, L. M., Walker, L. A., Sanders, B. J., Yang, Z., Eckert, G., & Gregory, R. L. (2015). Effect of human milk and its components on streptococcus mutans biofilm formation. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 39(3), 255–261.
<https://doi.org/10.17796/1053-4628-39.3.255>
- Alves, L. A., Nomura, R., Mariano, F. S., Harth-Chu, E. N., Stipp, R. N., Nakano, K., & Mattos-Graner, R. O. (2016). CovR Regulates *Streptococcus mutans* Susceptibility To Complement Immunity and Survival in Blood. *Infection and immunity*, 84(11), 3206–3219. <https://doi.org/10.1128/IAI.00406-16>
- Anatolitou, F. (2012). Human milk benefits and breastfeeding How to cite. *Www.Jpnim.Com Open Access Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine J Pediatr Neonat Individual Med*, 11(11), 11–1811.
<https://doi.org/10.7363/010113>

- Ballard O, M. AL. (2013). Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60(1), 49–74.
<https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002.Human>
- Beighton, D., Hardie, J. M., & Whiley, R. A. (1991). A scheme for the identification of viridans streptococci. *Journal of Medical Microbiology*, 35(6), 367–372.
<https://doi.org/10.1099/00222615-35-6-367>
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schloter, M. (2020). Microbiome d1. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*. 2020;8(1):1–22. efinition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8(1), 1–22.
<https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Bowen, W. H. (2016). Dental caries – not just holes in teeth! A perspective. *Molecular Oral Microbiology*, 31(3), 228–233. <https://doi.org/10.1111/omi.12132>
- Bowen W. H., & Koo, H. (2011). Biology of Streptococcus mutans-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries research*, 45(1), 69–86. <https://doi.org/10.1159/000324598>
- Branger, B., Camelot, F., Droz, D., Houbiers, B., Marchalot, A., Bruel, H., Laczny, E., & Clement, C. (2019). Breastfeeding and early childhood caries. Review of the literature, recommendations, and prevention. *Archives de Pediatrie*, 26(8), 497–503. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2019.10.004>
- Early Childhood Caries(2019): IAPD Bangkok Declaration. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 29(3), 384–386. <https://doi.org/10.1111/ipd.12490>
- Castillo, J. L., Palma, C., & Cabrera-Matta, A. (2019). Early Childhood Caries in Peru. *Frontiers in Public Health*, 7(November), 1–7.
<https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00337>
- Structure Human Microbiome Project Consortium (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214.

<https://doi.org/10.1038/nature11234>

- Cruz Quintana, S. M., Díaz Sjostrom, P., Arias Socarrás, D., & Mazón Baldeón, G. M. (2017). Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. *Revista Cubana de Estomatología*, 54(1), 84–99.
- Dagon, N., Greenstein, R. B. N., Mazor, Y., & Ratson, T. (2019). Cariogenic potential of infant formulas—an in vitro study. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 43(3), 181–184. <https://doi.org/10.17796/1053-4625-43.3.6>
- Danielsson Niemi, L., Hernell, O., & Johansson, I. (2009). Human milk compounds inhibiting adhesion of mutans streptococci to host ligand-coated hydroxyapatite in vitro. *Caries Research*, 43(3), 171–178. <https://doi.org/10.1159/000213888>
- Eidelman, A. I., & Schanler, R. J. (2012). Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*, 129(3). <https://doi.org/10.1542/peds.2011-3552>
- Fejerskov, E. K. and O., & London, UK, Aarhus, D. (2005). Essentials of dental caries. *British Dental Journal*, 199(5), 307–307. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4812727>
- Fejerskov O., K. E. (2008). The disease and its diagnosis. Defining the disease: an introduction. In *Dental caries. The disease and its clinical management*.
- Fernández-Carrasco, F. J., Vázquez-Lara, J. M., González-Mey, U., Gómez-Salgado, J., Parrón-Carreño, T., & Rodríguez-Díaz, L. (2020). Infección por coronavirus Covid-19 y lactancia materna: una revisión exploratoria [Coronavirus Covid-19 infection and breastfeeding: an exploratory review]. *Revista española de salud pública*, 94, e202005055.
- García-López, R. (2011). Composición e inmunología de la leche humana Acta Pediátrica de México Volumen 32, Núm. 4, julio-agosto. *Acta Pediatr Mex*, 32(4), 223–230. www.nietoeditore.com.mx
- Grummer-Strawn, L. M. (2018). Clarifying the Definition of Breast-Milk Substitutes. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 67(6), 683. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000002137>
- Halpin, R. M., O'Connor, M. M., McMahon, A., Boughton, C., O'Riordan, E. D., O'Sullivan, M., & Brady, D. B. (2008). Role of Streptococcus mutans in human

- dental decay. *European Food Research & Technology.*, 227(5), 353–380.
<https://doi.org/10.1080/11026480260363242>
- Hernández C, Meléndez CA, Sandoval M, Villalobos M, Ibarra (2016) Streptococcus mutans y Lactobacillus sp. en saliva, consumo leche con xilitol. *oral*; 17(54): 1370-1373.
- Hinds, LM, Moser, EA, Eckert, G. y Gregory, RL (2016). Efecto de los preparados para lactantes en la formación de biopelículas de Streptococcus mutans. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 40 (3), 178-185. <https://doi.org/10.17796/1053-4628-40.3.178>
- Holgerson, P. L., Vestman, N. R., Claesson, R., Ohman, C., Domellöf, M., Tanner, A. C., Hernell, O., & Johansson, I. (2013). Oral microbial profile discriminates breast-fed from formula-fed infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 56(2), 127–136. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31826f2bc6>
- Hughes, C. V., Dahlan, M., Papadopoulou, E., Loo, C. Y., Pradhan, N. S., Lu, S. C., Mathney, J. M. J., Bravoco, A., Kent, R. L., & Tanner, A. C. R. (2012). Aciduric microbiota and mutans streptococci in severe and recurrent severe early childhood caries. *Pediatric Dentistry*, 34(2), 16–23.
- Institute of Medicine. (2004). Chapter 3. Comparing infant formula to breast milk. In *Infant Formula: Evaluating the Safety of New Ingredients*.
<https://doi.org/10.17226/10935>
- Lemos J & Burne R (2008). A model of efficiency: Stress tolerance by Streptococcus mutans. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Kawamura, Y., Hou, X. G., Sultana, F., Miura, H., & Ezaki, T. (1995). Determination of 16S rRNA sequences of Streptococcus mitis and Streptococcus gordonii and phylogenetic relationships among members of the genus Streptococcus. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(2), 406–408.
<https://doi.org/10.1099/00207713-45-2-406>
- Kim, S. K., Park, S., Oh, J., Kim, J., & Ahn, S. (2018). Interventions promoting exclusive breastfeeding up to six months after birth: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *International Journal of Nursing*

- Studies*, 80(January), 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.ijnurstu.2018.01.004>
- Kramer, M. S., & Kakuma, R. (2004). The optimal duration of exclusive breastfeeding: A systematic review. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 554, 63–77. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4242-8_7
- Kreth, J., Merritt, J., & Qi, F. (2009). Bacterial and host interactions of oral streptococci. *DNA and Cell Biology*, 28(8), 397–403. <https://doi.org/10.1089/dna.2009.0868>
- Lancefield, B. R. C. (1933). A serological differentiation of human and (From the Hospital of The Rockefeller Institute for Medical Research). *The Journal of Experimental Medicine*, 1919(1), 571–595.
- Lee, J., Townsend, J. A., Thompson, T., Garitty, T., De, A., Yu, Q., Peters, B. M., & Wen, Z. T. (2018). Analysis of the Cariogenic Potential of Various Almond Milk Beverages using a Streptococcus mutans Biofilm Model in vitro. *Caries Research*, 52(1–2), 51–57. <https://doi.org/10.1159/000479936>
- Lemos, J. A., Palmer, S. R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I. A., Abranches, J., & Brady, L. J. (2019). The Biology of Streptococcus mutans . *Gram-Positive Pathogens*, 7(1), 435–448. <https://doi.org/10.1128/9781683670131.ch27>
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., & Huttenhower, C. (2016). The healthy human microbiome. *Genome Medicine*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0307-y>
- Lönnerdal, B., & Kelleher, S. L. (2009). Micronutrient transfer: Infant absorption. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 639, 29–40. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8749-3_3
- Lönnerdal, Bo. (2009). Nutritional roles of lactoferrin. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 12(3), 293–297. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328328d13e>
- MacHiulskiene, V., Campus, G., Carvalho, J. C., Dige, I., Ekstrand, K. R., Jablonski-Momeni, A., Maltz, M., Manton, D. J., Martignon, S., Martinez-Mier, E. A., Pitts, N. B., Schulte, A. G., Splieth, C. H., Tenuta, L. M. A., Ferreira Zandona, A., &

- Nyvad, B. (2020). Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Research*, 54(1), 7–14.
<https://doi.org/10.1159/000503309>
- Meltharyna, M., Suharsini, M., & Sutadi, H. (2017). Effect of different types of milk formula against streptococcus mutans biofilm formation in vitro. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(Special Issue October), 34–37.
<https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10s5.23088>
- Moynihan, P., Tanner, L. M., Holmes, R. D., Hillier-Brown, F., Mashayekhi, A., Kelly, S. A. M., & Craig, D. (2019). Systematic Review of Evidence Pertaining to Factors That Modify Risk of Early Childhood Caries. *JDR Clinical and Translational Research*, 4(3), 202–216.
<https://doi.org/10.1177/2380084418824262>
- Ole Fejerskov, B. N. and E. K. (2015). *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management* (B. Wiley (ed.); 3er ed.).
- Organización Mundial de la Salud. Lactancia materna y COVID-19 Para trabajadores de la salud.[Online]. [Citado el 07de Mayo de 2020] Disponible en: <https://www.who.int/es/emergencias/diseases/novel-coronavirus-2019/question-and-answers-hub/q-a-detail/q-a-on-covid-19-and-breastfeeding>OMS. (2015). Ingesta de azúcares para adultos y niños. In *Organización Mundial de la Salud (OMS)* (p. 7).
- OMS. (2003). Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. In *dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas*
https://www.who.int/nutrition/publications/obesity/WHO_TRS_916_spa.pdf
- OMS. (2010). *La alimentación del lactante y del niño pequeño*.
<https://www.who.int/nutrition/publications/infantfeeding/9789241597494/es/>
- OMS/UNICEF. (2008). Principios de orientación para la alimentación de niños no amamantados entre los 6 y los 24 meses de edad. In *VIH y alimentación infantil: herramientas y materiales*. <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPIDISC&lang=p&nextAction=Ink&exprSearch=185271&indexSearch=ID>

- OMS/UNICEF. (2007). *Indicadores para evaluar las prácticas de alimentación del lactante y del niño pequeño*.
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44156/9789243596662_spa.pdf;jsessionid=D8A099D26447EA62F046CCD4266B1EEF?sequence=1
- Peres, M. A., Macpherson, L. M. D., Weyant, R. J., Daly, B., Venturelli, R., Mathur, M. R., Listl, S., Celeste, R. K., Guarnizo-Herreño, C. C., Kearns, C., Benizian, H., Allison, P., & Watt, R. G. (2019). Oral diseases: a global public health challenge. *The Lancet*, 394(10194), 249–260. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31146-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31146-8)
- Saudamini Girish More, R., & Sankeshwari, Pratibha A. Patil, Sagar S. Jalihal, A. V. A. (2018). Infant Formula and Early Childhood Caries. *Journal of Dental Research and Review*, 5(1), 7–11. <https://doi.org/10.4103/jdrr.jdrr>
- Serrano HA, Jiménez M, C. N. (2015). Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. *Revista CES Odontología*, 28(2), 112–118.
- Sherman, J. M. (1937). the Streptococci. *Bacteriological Reviews*, 1(1), 3–97.
<https://doi.org/10.1128/membr.1.1.3-97.1937>
- Simón-Soro, A., & Mira, A. (2015). Solving the etiology of dental caries. *Trends in Microbiology*, 23(2), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.10.010>
- Signori, C., Hartwig, A. D., Silva-Júnior, I., Correa, M. B., Azevedo, M. S., & Cenci, M. S. (2018). The role of human milk and sucrose on cariogenicity of microcosm biofilms. *Brazilian oral research*, 32, e109. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0109>
- Tan, S. F., Tong, H. J., Lin, X. Y., Mok, B., & Hong, C. H. (2016). The cariogenicity of commercial infant formulas: a systematic review. *European archives of paediatric dentistry : official journal of the European Academy of Paediatric Dentistry*, 17(3), 145–156. <https://doi.org/10.1007/s40368-016-0228-x>
- Tham, R., Bowatte, G., Dharmage, S., Tan, D., Lau, M., Dai, X., Allen, K., & Lodge, C. (2015). Breastfeeding and the risk of dental caries: A systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics*, 104, 62–84. <https://doi.org/10.1111/apa.13118>

- Tinanoff, N., Baez, R. J., Diaz Guillory, C., Donly, K. J., Feldens, C. A., McGrath, C., Phantumvanit, P., Pitts, N. B., Seow, W. K., Sharkov, N., Songpaisan, Y., & Twetman, S. (2019). Early childhood caries epidemiology, aetiology, risk assessment, societal burden, management, education, and policy: Global perspective. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 29(3), 238–248. <https://doi.org/10.1111/ipd.12484>
- Trongsilat S, Lapirattanakul J, Surarit R, Smutkeeree A,(2020).In vitro comparison of biofilm formation and acidogenicity between human breast milk and other milk formulas, *Pediatric Dental Journal*, 30(2),57-63
- Velázquez F, Padilla T, Catacora P. Efecto antimicrobiano de dos tipos de leche en los niveles de unidades formadoras de colonias de *Streptococcus mutans*: estudio piloto. *Rev. Estomatol. Altiplano*. 2017;4(2):25–33.
- Verma, D., Garg, P. K., & Dubey, A. K. (2018). Insights into the human oral microbiome. *Archives of Microbiology*, 200(4), 525–540. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-1505-3>
- Victora, C. G., Bahl, R., Barros, A. J. D., França, G. V. A., Horton, S., Krasevec, J., Murch, S., Sankar, M. J., Walker, N., Rollins, N. C., Allen, K., Dharmage, S., Lodge, C., Peres, K. G., Bhandari, N., Chowdhury, R., Sinha, B., Taneja, S., Giugliani, E., ... Richter, L. (2016). Breastfeeding in the 21st century: Epidemiology, mechanisms, and lifelong effect. *The Lancet*, 387(10017), 475–490. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01024-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01024-7)
- Walker, R. W., & Goran, M. I. (2015). Laboratory determined sugar content and composition of commercial infant formulas, baby foods and common grocery items targeted to children. *Nutrients*, 7(7), 5850–5867. <https://doi.org/10.3390/nu7075254>
- Whiley, R. A., & Beighton, D. (1998). Current classification of the oral streptococci. In *Oral Microbiology and Immunology* (Vol. 13, Issue 4, pp. 195–216). <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1998.tb00698.x>
- Zeng, L., & Burne, R. A. (2013). Comprehensive mutational analysis of sucrose-metabolizing pathways in *Streptococcus mutans* reveals novel roles for the sucrose phosphotransferase system permease. *Journal of Bacteriology*, 195(4),

833–843. <https://doi.org/10.1128/JB.02042-12>

Zukanovi, A., Markovi, N., Arslanagi, A., Bajri, E., & Nakaš, E. (2018). *Modifications of the conventional method for the detection of mutans streptococcus*. 7(1), 13–20.

ANEXOS

ANEXO 1



Comité Institucional de Ética en Investigación IMT "DAC" UNMSM

Constancia de Aprobación CIEI-2020-16

El Comité Institucional de Ética en Investigación del Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión" de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos aprobó el 07 de Septiembre de 2020 la revisión del estudio de investigación: "Efecto de diferentes leches de alimentación infantil en el crecimiento de *streptococcus mutans* en el biofilm. Estudio *in vitro*" a cargo de la investigadora principal Sara Castañeda Sarmiento.

- Modalidad de revisión: Expedito
- La presente aprobación del CIEI – IMT "DAC" UNMSM es por un año, del 07 Septiembre de 2020 al 06 de Septiembre de 2021
- El protocolo de investigación sellado por el CIEI – IMT "DAC" se encuentra adjunto a la presente constancia de aprobación.

Lima, 07 de Septiembre de 2020

Sofía González Collantes
Presidenta

ANEXO 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

<i>Título del estudio :</i>	EFECTO DE DIFERENTES LECHES DE ALIMENTACION INFANTIL EN EL CRECIMIENTO DE <i>Streptococcus mutans</i> EN EL BIOFILM. ESTUDIO IN VITRO
<i>Investigador (a) :</i>	Mg Esp. Sara Castañeda Sarmiento
<i>Institución :</i>	Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica

Propósito del estudio: Lo estamos invitando a participar en un estudio para evaluar y comparar el efecto de diferentes leches de alimentación infantil sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* en el biofilm. Este es un estudio desarrollado por investigadores de posgrado de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica y aplicado en los laboratorios de Microbiología de la facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

El Biofilm es una comunidad formada por microorganismos como bacterias, hongos, protozoos, arqueas y virus, Bacterias como *Streptococcus mutans* junto con otros factores desarrollan enfermedades como caries dental. Los resultados del presente estudio pretenden brindar información relevante respecto los efectos de las diferentes leches sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans* en el biofilm y las consecuencias que derivan en la salud bucal del niño como es la caries dental

Procedimientos: Si decide participar en este estudio se realizará lo siguiente:

1. Se le pedirá la madre lactante recolectar 15 ml de leche materna por medio de la extracción manual, previa higiene con agua y jabón, en un ambiente privado, tranquilo y cómodo.
2. Es procedimiento se hará dos veces, uno para una prueba inicial, otro para la prueba final

Riesgos:

La toma de muestra de la leche materna no existe riesgo que le pueda afectar, ni molestia alguna que le pueda ocasionar.

Beneficios:

No existen beneficios para la participante, sin embargo, se le brindara información sobre la importancia de lactancia materna.

Costos y compensación

Los costos de todos los procedimientos y pruebas serán cubiertos por el estudio y no le ocasionarán gasto alguno. No deberá pagar nada por participar en el estudio. Igualmente, no recibirá ningún incentivo económico ni de otra índole, solo una compensación por gastos de transporte (20 soles) y/o un refrigerio por el tiempo brindado.

Confidencialidad:

Nosotros guardaremos su información con códigos y no con nombres. Sólo los investigadores tendrán acceso a las bases de datos. Si los resultados de este seguimiento son publicados, no se mostrará ninguna información que permita la identificación de las personas que participaron en este estudio.

Derechos del participante:

Si decide participar en el estudio de carácter voluntario, puede retirarse de éste en cualquier momento, o no participar en una parte del estudio sin daño alguno. Si tiene alguna duda adicional, por favor pregunte al personal del estudio o llame Sara Castañeda Sarmiento al celular numero 978484873

DECLARACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO

Acepto voluntariamente participar en este estudio, comprendo de las actividades en las que participaré si decido ingresar al estudio, también entiendo que puedo decidir no participar y que puedo retirarme del estudio en cualquier momento.

Nombres y Apellidos

Participante

Fecha y Hora

ANEXO 3

CONSTANCIA

Por la presente, se deja constancia que la CD SARA CASTAÑEDA SARMIENTO, ha desarrollado la parte experimental de su trabajo de investigación, referente al crecimiento del *S.mutans*, en muestras diversas de leches de alimentación infantil, en el Laboratorio de Microbiología, de la Facultad de Odontología, de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Se expide la presente constancia, a solicitud de la interesada para los fines que considere conveniente.

Lima, Setiembre del 2020


Mg Hilda Moromi Nakata
Responsable del Proyecto de Servicio
Laboratorio de Microbiología
FO-UNMSM

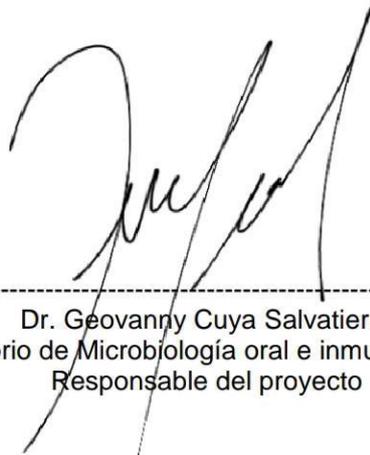
ANEXO 4

Constancia

Por la presente, se deja constancia que la **CD. SARA CASTAÑEDA SARMIENTO**, ha realizado algunos experimentos en nuestro laboratorio de microbiología en inmunología oral de la universidad estatal de Campinas-UNICAMP, referente a su trabajo de investigación titulado "Crecimiento de *S. mutans*, en diversas leches de alimentación infantil"

Se expide la siguiente constancia a solicitud de la interesada, para los fines que crea conveniente.

Sao paulo, 10/11/2020



Dr. Geovanny Cuya Salvatierra
Laboratorio de Microbiología oral e inmunología oral
Responsable del proyecto

ANEXO 5

Información nutricional de diferentes leches de alimentación infantil

Marca	Azúcar Totales	Sacarosa	Lactosa	Maltosa	Frutoligosacaridos	Total Carbohidrato	Hierro	Calcio	Fosforo
PEDIASURE®					2.06g	80,43g	5,48mg	463mg	388mg
SIMILAC 2® Formula Infantil de seguimiento					1.32g	53.1g	6,8mg	600mg	400mg
NAN®2 Formula infantil de continuación	45g		43,7g			58.8g	5.5mg	570mg	340mg
ENFRAGROW® Promental	30g		28.7g			61.5g	7.4mg	564mg	400mg
LECHE HUMANA	7 g		7 g				0.04mg	28mg	15mg
GLORIA® NIÑOS Leche evaporada	11.2g	2.0g				12.6g		212mg	176mg

Nota. La tabla representa la información nutricional de diferentes componentes contenidos en 100g. Tomado según lo indican los fabricantes en sus presentaciones comerciales

ANEXO 6

Formato de recolección de datos

EXPERIMENTOS	UA159 + 1% sacarosa	LECHE MATERNA	PEDIASHURE	SIMILAC 2	NAN 2®	ENFRAGROW®	GLORIA®	UA159 sin sacarosa	CONTROL(-) BHI sin S. mutans