

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



“ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO INHIBITORIO DE UN BIOYOGURT CON CEPAS PROBIÓTICAS: L. REUTERI, L. RHAMNOSUS, L. JOHNSONII, SOBRE EL CRECIMIENTO DEL PORPHYROMONA GINGIVALIS, EN LOS LABORATORIOS DE LA UCSM, AREQUIPA 2016.”

Tesis presentada por la bachiller:

Daniela Apaza Huamaní.

Para obtener el Título Profesional de:

Cirujano Dentista.

AREQUIPA –PERÚ

2016



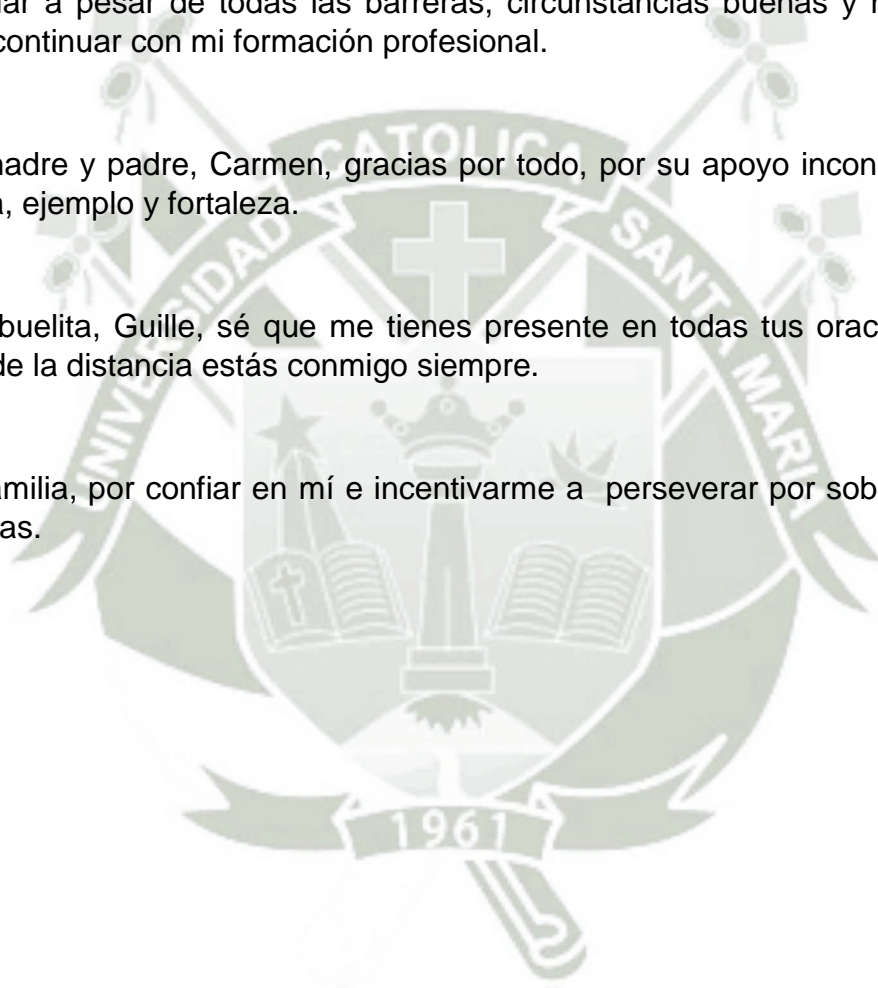
DEDICATORIA

A Dios, por brindarme todos los medios necesarios, guiarme y permitirme continuar a pesar de todas las barreras, circunstancias buenas y malas, y poder continuar con mi formación profesional.

A mi madre y padre, Carmen, gracias por todo, por su apoyo incondicional, su guía, ejemplo y fortaleza.

A mi abuelita, Guille, sé que me tienes presente en todas tus oraciones, a pesar de la distancia estás conmigo siempre.

A mi familia, por confiar en mí e incentivarme a perseverar por sobre todas las cosas.



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Barriga Flores, por incentivar me a realizar esta investigación.

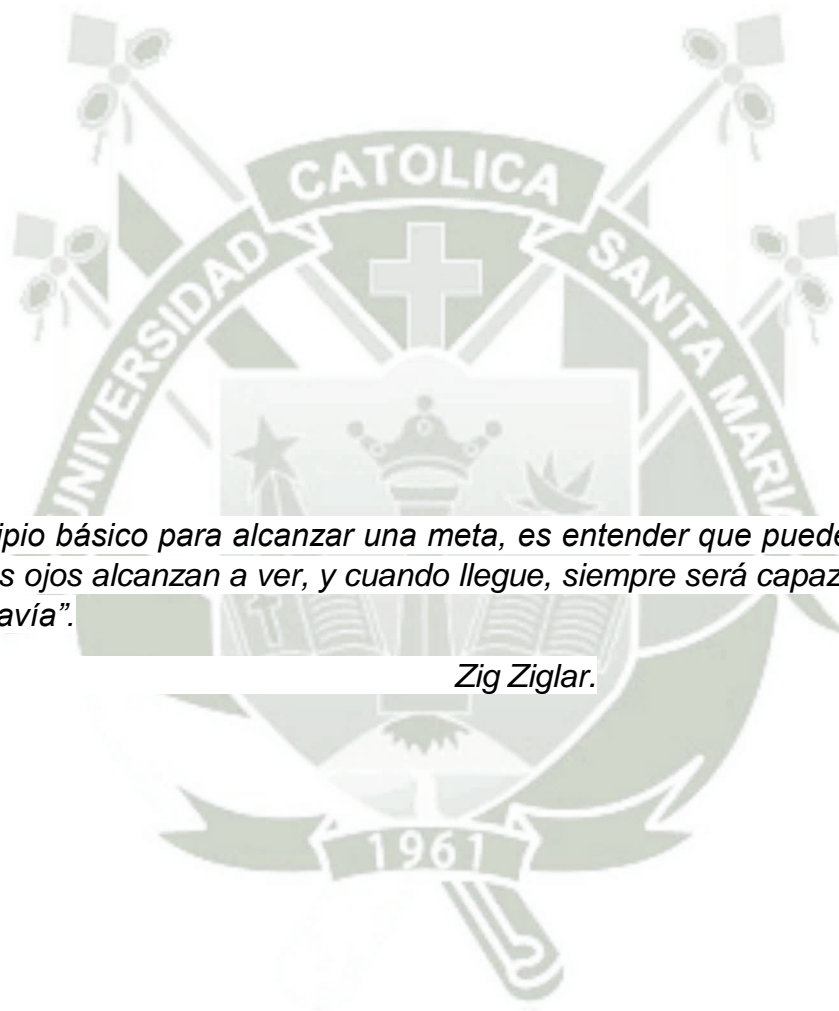
A la Dra. Jave, por sus conocimientos compartidos para conmigo.

A mi madre, por su ejemplo de perseverar a pesar de las circunstancias, su comprensión y apoyo.

A la gran familia ABC Dent, gracias a todos, por su apoyo, paciencia e incentivo para continuar con mi formación profesional.

A mis amigos, que me acompañaron siempre, gracias por compartir conmigo tantos momentos, buenos o malos, por su disposición de ayudarme siempre, a los que estuvieron desde el principio de estos años y a los que llegaron recién y se convirtieron en la mejor casualidad, Jackeline, Magnito y Johana gracias por su tiempo, sus consejos y su amistad incondicional.

A todas las personas que me ayudaron desde el inicio de la carrera, docentes, amigos, doctores, que de una u otra forma me ayudaron para culminar con este proyecto.



“El principio básico para alcanzar una meta, es entender que puede ir tan lejos como sus ojos alcanzan a ver, y cuando llegue, siempre será capaz de ver más lejos todavía”.

Zig Ziglar.

INDICE

CAPITULO I PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	15
1.1. Determinación del problema	15
1.2. Enunciado del Problema.....	15
1.3. Descripción del Problema	16
1.3.1. Área del conocimiento	16
1.3.2. Operacionalización de variables	16
1.3.3. Interrogantes Básicas	17
1.3.4. Taxonomía de la investigación	17
1.4. Justificación	18
2. OBJETIVOS	19
3. MARCO TEORICO	19
3.1. Conceptos básicos	19
3.1.1. Enfermedad Periodontal	19
3.1.2. Gingivitis.....	20
3.1.3. Periodontitis.....	21
3.1.4. Microbiología Oral	22
3.1.4.1. Porphyromona Gingivalis.....	23
3.1.4.2. Porphyromona Gingivalis y enfermedades sistémicas	28
3.1.4.3. Mecanismos de asociación entre enfermedades periodontales y riesgo cardiovascular	28
3.1.4.4. Mecanismos de asociación entre enfermedades respiratorias y Porphyromona Gingivalis	30
3.1.5. Tratamiento Periodontal	31
3.1.5.1. Terapia Antibiótica local.....	32
3.1.5.2. Terapia Antibiótica sistémica	33
3.1.6. Biofilms bacterianos.....	35
3.1.7. Probióticos.....	37
3.1.7.1. Historia de los Probióticos	37
3.1.7.2. Definición de Probióticos	39

3.1.7.3.	Mecanismo de acción de los Probióticos.....	40
3.1.7.4.	Bacterias Acido Lácticas	42
3.1.7.5.	Lactobacillus	44
3.1.7.6.	Lactobacillus Reuteri.....	45
3.1.7.7.	Lactobacillus Rhamnosus	48
3.1.7.8.	Lactobacillus Johnsonii	50
3.1.7.9.	Administración de los Probióticos.....	51
3.1.8.	Probióticos y su relación con Odontología.....	52
3.1.9.	Efecto de los probióticos en las condiciones periodontales	53
3.1.10.	Acción de los probióticos sobre el biofilm oral	57
3.1.11.	Medios de Cultivo.....	59
3.2.	Revisión de Antecedentes Investigativos	64
4.	HIPÓTESIS.....	70

CAPITULO II PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1.	TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN	72
1.1.	Técnica:.....	72
1.2.	Instrumentos.....	73
1.3.	Materiales.....	73
2.	CAMPO DE VERIFICACIÓN	74
2.1.	Ámbito Espacial.....	74
2.2.	Ámbito Temporal	74
2.3.	Unidades de Estudio.....	74
2.4.	Cuantificación de los casos	75
3.	ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS	76
3.1.	Organización	76
3.2.	Recursos	77
a.	Recursos Humanos.....	77
b.	Recursos Físicos.....	77
c.	Recursos Económicos.....	77
4.	ESTRATEGIA PARA MANEJO DE DATOS.....	77
4.1.	Nivel de sistematización	77
4.2.	Nivel de estudio de datos.....	78

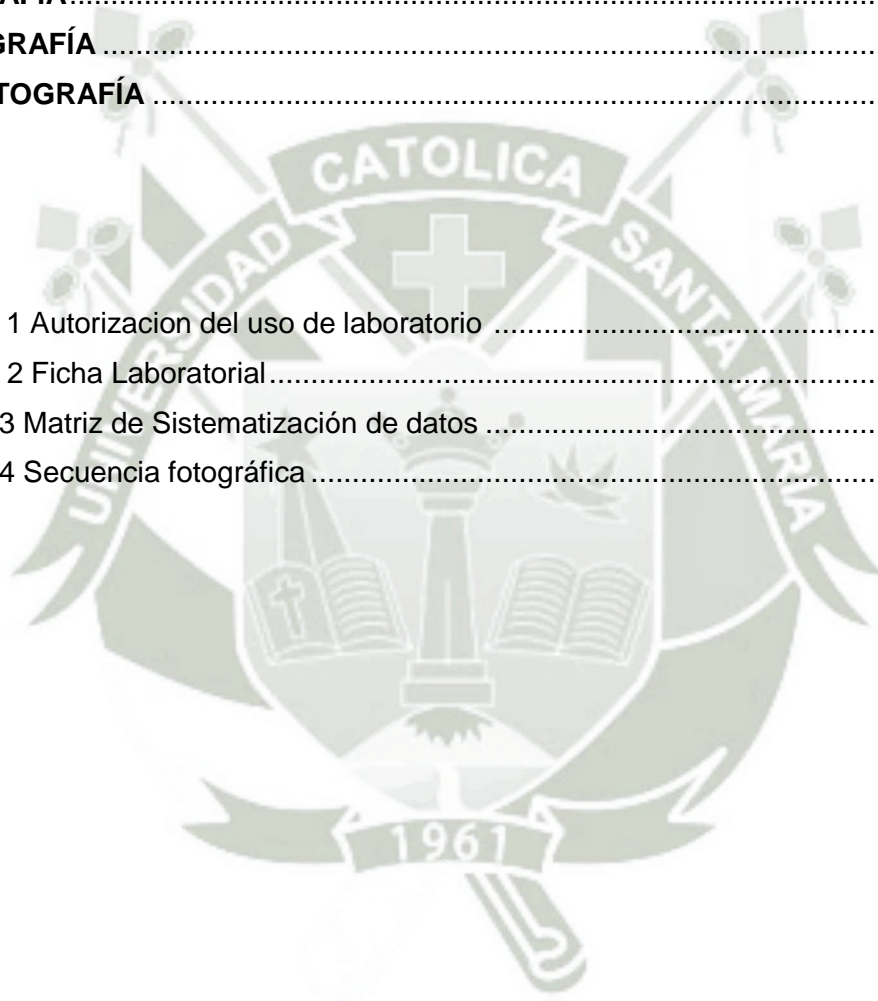
CAPÍTULO III RESULTADOS

PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS	80
DISCUSIÓN.....	92
CONCLUSIONES.....	94
RECOMENDACIONES.....	95

BIBLIOGRAFÍA.....	96
HEMEROGRAFÍA.....	97
INFORMATOGRAFÍA.....	98

ANEXOS

ANEXO N° 1 Autorización del uso de laboratorio	100
ANEXO N° 2 Ficha Laboratorial.....	101
ANEXO N°3 Matriz de Sistematización de datos	102
ANEXO N°4 Secuencia fotográfica	79



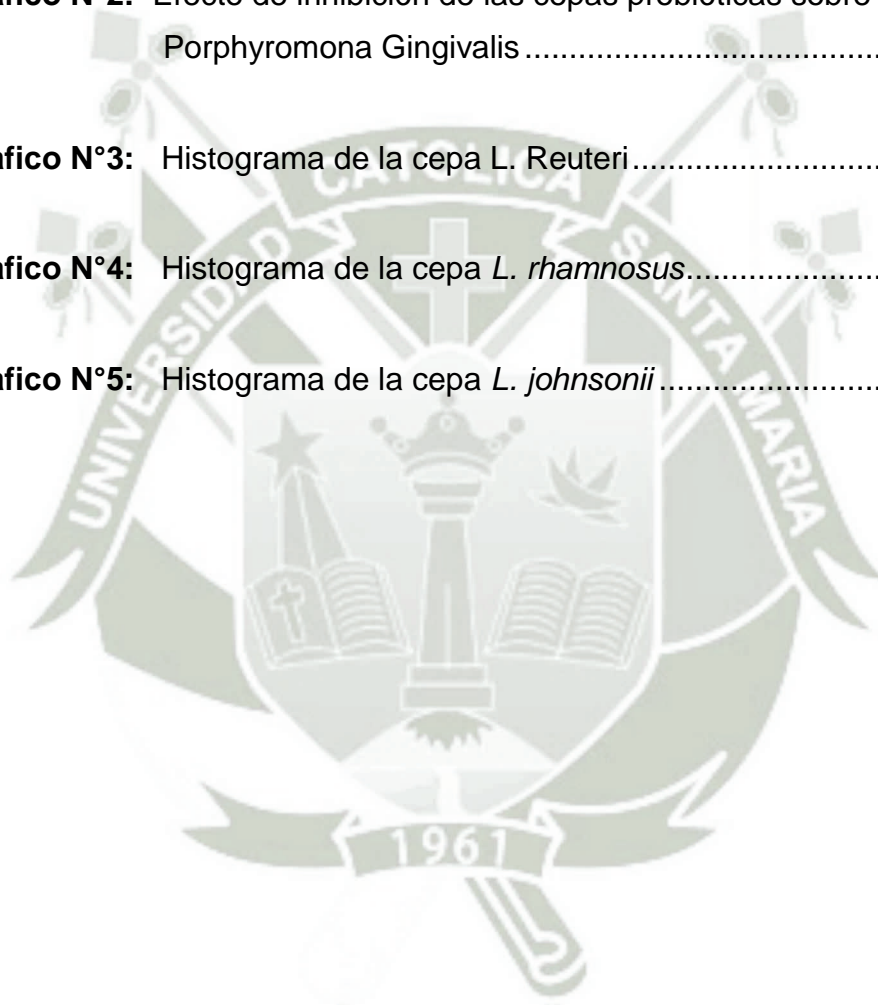
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1. Mediciones de los halos de inhibición para las cepas probióticas.....	80
Tabla N° 2. Estadística descriptiva	84
Tabla N° 3. Pruebas de normalidad	89
Tabla N°4. Estadísticos de pruebaa,b.....	90



ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfico N°1: Valores máximos de halos de inhibición (mm) de las cepas probióticas sobre la <i>Porphyromona Gingivalis</i>	81
Gráfico N°2: Efecto de inhibición de las cepas probióticas sobre la <i>Porphyromona Gingivalis</i>	82
Grafico N°3: Histograma de la cepa <i>L. Reuteri</i>	86
Grafico N°4: Histograma de la cepa <i>L. rhamnosus</i>	86
Grafico N°5: Histograma de la cepa <i>L. johnsonii</i>	87



RESUMEN

La presente investigación tiene como objetivo fundamental determinar la eficacia inhibitoria in vitro de un bioyogurt con cepas probióticas de *Lactobacillus Reuteri*, *Lactobacillus Rhamnosus* y *Lactobacillus Johnsonii*, sobre el crecimiento del *Porphyromona Gingivalis*, para la realización de este trabajo se dispuso de cepas certificadas de *Porphyromona Gingivalis*, así mismo se dispuso de materiales y la autorización para el uso de los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María.

Corresponde a un estudio experimental, prospectivo, transversal, comparativo y de nivel experimental. Primero se procedió a la preparación de los medios de cultivo: Agar Rogosa, Caldo Tioglicolato y Agar Sangre, y a la posterior reactivación de las cepas ATCC, una vez activadas se procede a replicar las bacterias en 12 Placas Petri, a cada repetición se le aplicó discos con el bioyogurt inhibidos con los *Lactobacillus Reuteri*, *Rhamnosus* y *Johnsonii*, mediante el método de Kirby – Bauer o discos de difusión, una vez realizado se coloca en la cámara de anaerobiosis a 37°C y 10% de CO₂ por el lapso de 24 horas, para luego realizar las lecturas de las placas e interpretación de resultados, que consistió en medir los diámetros del halo de inhibición, utilizando un calibrador de Vernier o una regla milimetrada.

Palabras clave: Enfermedad periodontal, *lactobacillus*, probióticos, bacterias anaerobias.

ABSTRACT

The present research has as its fundamental objective to determine the efficacy inhibitory in vitro of a bioyogurt with probiotic strains of *Lactobacillus Reuteri*, *Lactobacillus Rhamnosus*, *Lactobacillus Johnsonii*, on the growth of the *Porphyromona Gingivalis*, for the realization of this work available strains certified *Porphyromona Gingivalis*, as well as available materials and the authorization for the use of the laboratories of the Catholic University of Santa María.

Corresponds to a pilot study, prospective, cross-sectional, comparative and experimental level. First it is proceeded to the preparation of the culture media: Agar Rogosa, Broth, Thioglycolate and Blood Agar, and subsequent reactivation of the ATCC strains, once activated they proceed to replicate the bacteria in 12 Petri dishes, each repetition was applied discs with the bioyogurt inhibited the *Lactobacillus Reuteri*, *Rhamnosus*, *Johnsonii*, using the method of Kirby – Bauer or disk diffusion, once placed in the chamber of anaerobiosis at 37°C and 10% CO₂ for the span of 24 hours, and then perform the readings of the plates and interpretation of results, which consisted in measuring the diameters of the halo of inhibition, using a caliper of Vernier or a ruler sharp.

Key words: Periodontal disease, lactobacillus, probiotic, anaerobic bacteria.

INTRODUCCIÓN

Existen diversas infecciones en la cavidad oral, la enfermedad periodontal es una de las mayores afecciones que compromete la salud bucal de la población, es definida como un proceso inflamatorio, asociada con la presencia subgingival de una gran microbiota variada y numerosa, muchas de ellas anaerobias gram negativas, desencadenando la destrucción de los tejidos de soporte dentario, ligamento periodontal, cemento, hueso alveolar y por último la pérdida de la pieza dentaria.

La cavidad oral es un complejo ecosistema en el que se desarrollan variadas especies, con diferentes requerimientos nutricionales, atmosféricos y físico - químicos, sin embargo las comunidades microbianas llegan a una homeostasis con el huésped. Los cambios en el ambiente bucal, ya sean por enfermedad, conductas, dieta o medicamentos, alteran la homeostasis y es entonces cuando los patógenos potenciales pueden obtener una ventaja competitiva y predisponer enfermedad. (Cassell, Ellen, & Mangan, 2005).

La *Porphyromona Gingivalis* es considerada una de las bacterias predominantes y comensales de la periodontitis crónica, pero así como esta bacteria habita en la cavidad bucal, existen otras que por lo contrario son especies beneficiosas tales como los estreptococos, bifidobacterias, levaduras y lactobacilos, todos ellos considerados como bacterias probióticas. El término probiótico deriva del griego “pro” a favor y “bio” vida, la OMS los define como microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del huésped. (FAO, 2001).

De aquí parte el interés de numerosas investigaciones de buscar nuevas opciones de antibioterapia y reducir el nivel de patógenos, debido a la resistencia que dichas cepas están mostrando frente a los antibióticos comúnmente utilizados.

Por todo ello es que realicé la presente investigación, con la finalidad de comprobar la eficacia de algunos probióticos sobre la principal bacteria causante de la enfermedad periodontal, la Porphyromona Gingivalis.

Con tal objetivo y para su mejor entendimiento la tesis consta de tres capítulos. En el Capítulo I, denominado Planteamiento Teórico se aborda el problema, los objetivos, el marco teórico y la hipótesis.

En el Capítulo II, se aborda lo que corresponde al Planteamiento Operacional y recolección que consiste en las técnicas, instrumentos y materiales, así como el campo de verificación, y las estrategias de recolección y manejo de los resultados.

En el tercer capítulo, se da a conocer los resultados de la investigación que consiste en las tablas, interpretaciones y gráficas, así como la discusión, las conclusiones y recomendaciones.

Finalmente se incluye la Bibliografía, la Hemerografía, Informatografía, y los Anexos correspondientes.





CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO TEÓRICO



I.- PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Determinación del problema

La salud bucodental, es fundamental para gozar de una buena salud y una buena calidad de vida, se puede definir como la ausencia de dolor orofacial, cáncer de boca o de garganta, infecciones y llagas bucales, enfermedades periodontales, caries, pérdida de dientes y otras enfermedades y trastornos que limitan a la persona afectada la capacidad de morder, masticar, sonreír y hablar, al tiempo que repercuten en su bienestar psicosocial.

Las enfermedades periodontales y la caries constituyen la mayor parte de las enfermedades de la cavidad oral, actualmente existen nuevos agentes que están ayudando a combatir los microorganismos patógenos causantes de dichas enfermedades.

Los probióticos tienen el potencial de brindar beneficios muy importantes para la salud humana, diversos estudios confirman que administrados en cantidades adecuadas, también ejercen su acción sobre los diversos microorganismos de la cavidad oral.

1.2. Enunciado del Problema

“Estudio in vitro del efecto inhibitorio de un bioyogurt con cepas probióticas: *L. Reuteri*, *L. Rhamnosus*, *L. Johnsonii*, sobre el crecimiento del *Porphyromona Gingivalis*, en los laboratorios de la UCSM, Arequipa 2016.”

1.3. Descripción del Problema

1.3.1. Área del conocimiento

- a. **Área General** : Ciencias de la Salud
- b. **Área Específica** : Odontología
- c. **Especialidad** : Periodoncia
- d. **Línea o tópico** : Microbiología Periodontal

1.3.2. Operacionalización de variables

VARIABLE	INDICADORES	SUB INDICADORES
<p>INDEPENDIENTE</p> <p>VI₁ L. Reuteri</p> <p>VI₂ L. Rhamnosus</p> <p>VI₃ L. Johnsonii</p>		
<p>DEPENDIENTE</p> <p>Halo de inhibición de crecimiento in vitro del P. Gingivalis.</p>	<p>Formación del halo de inhibición.</p>	<p>Medida en mm</p>

1.3.3. Interrogantes Básicas

- a. ¿Cuál será el efecto inhibitorio del bioyogurt con *L. Reuteri* sobre el crecimiento del *Porphyromona Gingivalis*, en los laboratorios de la UCSM, Arequipa 2016.”?
- b. ¿Cuál será el efecto inhibitorio del bioyogurt con *L. Rhamnosus* sobre el crecimiento del *Porphyromona Gingivalis*, en los laboratorios de la UCSM, Arequipa 2016.”?
- c. ¿Cuál será el efecto inhibitorio del bioyogurt con *L. Johnsonii* sobre el crecimiento del *Porphyromona Gingivalis*, en los laboratorios de la UCSM, Arequipa 2016.”?
- d. ¿Cuál probiótico posee mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento del *Porphyromona Gingivalis*, en los laboratorios de la UCSM, Arequipa 2016.”?

1.3.4. Taxonomía de la investigación

ABORDAJE	TIPO DE ESTUDIO					DISEÑO	NIVEL
	Por la técnica de recolección	Por el tipo de dato	Por el nº de mediciones de la variable	Por el nº de muestras o poblaciones	Por el ámbito de recolección		
Cuantitativo	Experimental	Prospectivo	Transversal	Comparativo	Laboratorio	Cuasi Experimental	Experimental

1.4. Justificación

1.4.1. Originalidad

Esta investigación posee originalidad debido a que propone ser una nueva alternativa de tratamiento odontológico.

1.4.2. Relevancia Científica

Ampliar los conocimientos que existen sobre la utilización de los probióticos, no sólo de forma preventiva sino también para el tratamiento de otras enfermedades de la cavidad oral, por lo que esta investigación espera ser un aporte para ampliar el conocimiento científico y ser una alternativa de tratamiento odontológico.

1.4.3. Viabilidad

Las condiciones de este estudio son viables debido a que se cuenta con disponibilidad de los materiales, infraestructura, equipos y tiempo necesario para realizar la investigación pertinente.

1.4.4. Interés

El interés personal, la contribución e incremento de conocimientos que propone esta nueva alternativa, así como también optar por Título Profesional de Cirujano Dentista.

2. OBJETIVOS

- 2.1. Determinar la eficacia del Bioyogurt con *Lactobacillus Reuteri*, sobre el crecimiento in vitro del *Porphyromona Gingivalis*, en los laboratorios de la UCSM, Arequipa 2016.
- 2.2. Determinar la eficacia del Bioyogurt con *Lactobacillus Rhamnosus*, sobre el crecimiento in vitro del *Porphyromona Gingivalis*, en los laboratorios de la UCSM, Arequipa 2016.
- 2.3. Determinar la eficacia del Bioyogurt con *Lactobacillus Johnsonii*, sobre el crecimiento in vitro del *Porphyromona Gingivalis*, en los laboratorios de la UCSM, Arequipa 2016.
- 2.4. Determinar el probiótico que posee mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento in vitro del *Porphyromona Gingivalis*, en los laboratorios de la UCSM, Arequipa 2016.

3. MARCO TEORICO

3.1. Conceptos básicos

3.1.1. Enfermedad Periodontal

El término enfermedad periodontal o enfermedad gingivoperiodontal alude a procesos patológicos que conllevan a la alteración de las estructuras del periodonto, y se clasifican en dos grupos, la gingivitis y la periodontitis. (Negroni, 2009).

El periodonto está constituido por los tejidos de protección y apoyo del diente; se compone de encía (periodonto de protección), ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar (periodonto de inserción); estos tejidos están sujetos a variaciones

morfológicas y funcionales, así como a cambios motivados por la edad.

3.1.2. Gingivitis

La gingivitis es una condición reversible de los tejidos blandos gingivales, que, como consecuencia de un proceso inflamatorio, sangran y pueden cambiar de color, tamaño y consistencia. El proceso inflamatorio es de origen infeccioso, debido a la progresiva aparición de gérmenes anaerobios estrictos, como demuestra el cultivo de bacterias en las localizaciones que presentan una gingivitis establecida, frente a bacilos aerobios, y anaerobios facultativos propios del estado de salud gingival.

La presencia de inflamación en la porción marginal de la encía se puede valorar mediante el sondaje o a partir del cambio de color de la encía.

Estudios epidemiológicos han demostrado que la gingivitis es más prevalente y severa en adolescentes, observándose una tendencia decreciente después de esta edad. Con el paso de los años algunas de estas gingivitis se transforman en periodontitis.

Desde un punto de vista histopatológico y atendiendo a un grado de lesión tisular creciente, se ha clasificado la gingivitis como fase I o lesión inicial, gingivitis subclínica con predominio de PMN y vasculitis subepitelial, fase II o lesión precoz, con sangrado al sondaje y eritema gingival, predominio de linfocitos y fase III o lesión establecida, fase de gingivitis crónica con cambios de color, tamaño y textura con predominio de células plasmáticas.

Atendiendo a la intensidad de los signos clínicos, principalmente el sangrado, la coloración y el aumento de volumen de la encía, se ha clasificado la gingivitis como leve, moderada y grave.¹

3.1.3. Periodontitis

La Periodontitis se puede desarrollar a partir de una gingivitis pre-existente en pacientes inmunosuprimidos, en presencia de factores de riesgo y mediadores pro- inflamatorios, así como también ante la presencia de flora microbiana predominantemente periodontopatogénica.

Bajo estas circunstancias la inflamación gingival puede entonces extenderse a estructuras más profundas del sistema de sostén del diente. Las consecuencias incluyen destrucción de colágeno y pérdida de hueso alveolar (pérdida de sostén).

El epitelio de unión se degenera a un epitelio de “saco”, el cual prolifera apical y lateralmente. Se forma un verdadero saco periodontal, tal saco es un lugar predilecto y un reservorio para oportunistas, las bacterias patogénicas estas bacterias sustentan la periodontitis y aumentan el progreso de los procesos de la enfermedad.

En el margen gingival, las características de la periodontitis son similares a las de la gingivitis, pero los procesos inflamatorios se extienden más allá, dentro de la estructura periodontal más profunda (hueso alveolar y ligamento periodontal). Se forman bolsas periodontales verdaderas y el acoplamiento del tejido

¹ (Manual SEPA de periodoncia y terapéutica de implantes: fundamentos y guía práctica, Bs As, Médica Panamericana, 2005, pág. 27)

conectivo se pierde. La pérdida de tejidos blandos y duros es usualmente localizada y no generalizada.

Se puede clasificar la periodontitis como crónica (tipo II) o agresiva (tipo III), con grados de severidad variantes. Aproximadamente el 90% de todos los casos son caracterizados como “periodontitis crónica”.²

3.1.4. Microbiología Oral

La cavidad oral es una de las zonas anatómicas de nuestro organismo con mayor número y variedad de bacterias aerobias y anaerobias. Estos microorganismos interactúan tanto entre sí como con el medio oral estableciendo un complejo ecosistema dinámico donde se pueden encontrar de forma simultánea bacterias resistentes y transeúntes ocasionales.³

La citada situación se refleja de forma peculiar en cada nicho ecológico (lengua, encía, surco gingival, etc.), en el que podemos apreciar especies bacterianas en proporciones diferentes. Así por ejemplo, en el dorso de la lengua, asociada con otras bacterias Gram positivas anaerobias facultativas, predomina la especie *Streptococcus salivarius*, y en el surco gingival predominan *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* y *oralis*.⁴

² PERIODONTITIS – UNA ENFERMEDAD MULTIFACTORIAL (PAG 22 ETIOLOGIA Y PATOGÉNESIS - PERIODONTITIS)

³ MOUTON C. Robert. “Bacteriología bucodental”, Principales bacterias orales .Barcelona: Masson S.A. pág. 49-87

⁴ LIEBANA UREÑA. “Microbiología oral” 2da ed. Interamericana-McGraw Hill, 2002. Composición y ecología de la microbiología oral. Pág. 402-407

3.1.4.1. Porphyromona Gingivalis

Como *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, la otra bacteria periodontopatógena por excelencia se aísla preferentemente en el surco gingival, de forma especial cuando hay lesiones periodontales avanzadas; más raramente puede detectarse, quizás a modo de reservorio, en el dorso de la lengua, amígdalas y saliva.

No se le considera como parte integrante de la microbiota oral normal sino como un patógeno exógeno ausente en individuos sanos. Se le relaciona con multitud de procesos patológicos: gingivitis, pulpitis, abscesos periodontales y periapicales, etc, pero su asociación más importante es con la destrucción y progresión de algunos tipos de periodontitis.

Para su aislamiento, los medios de cultivo deben incluir vitamina K y de forma especial, por su dependencia del hierro, hemina o sangre, habitualmente la de carnero lacada, esto es, congelada y descongelada para que, al romperse la membrana de los hematíes, se liberen mejor los nutrientes. Para hacer los medios selectivos se añaden antibióticos no activos sobre *P. Gingivalis*; es el caso de kanamicina, tobramicina, ácidonalidíxico, colistina o bacitracina (el medio pre-conizado por Hunt contiene los tres últimos compuestos).

Las colonias, claramente diferenciadas, aparecen tras una incubación de al menos 48 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$; muestran la típica pigmentación marrón oscura o negra y no fluorescente bajo una luz ultravioleta. Las características in vitro para su identificación son, aparte de las propias del género, la

producción de indol a partir del triptófano y el hecho de poseer una enzima proteolítica semejante a la tripsina que hidroliza un sustrato incoloro, la benzoil-D,L-arginina- β -naftilamida (BANA), dando origen a un compuesto coloreado (β -naftilamida).

Para explicar su importante participación en procesos patológicos en la cavidad oral y de forma especial en el periodonto, se implican numerosos factores de virulencia que básicamente provocan la destrucción tisular y la evasión de las defensas del hospedador; entre ellos cabe destacar los siguientes:

- Cápsula:

Es de naturaleza polisacárida, que, aparte de permitir la subdivisión de la especie en seis serotipos, tiene una acción anti fagocitaria por su efecto antiopsónico.

- Membrana externa:

Tiene gran interés fisiopatológico por:

a) Poseer proteínas que se comportan como adhesinas que participan en fenómenos de adhesión y coagregación bacteriana y, por tanto, en la colonización de células epiteliales y fibroblastos y en la formación y mantenimiento de la placa subgingival; con respecto a esto último caben destacar los procesos coagregativos de *P. Gingivalis* con *A. actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum* y *Actinomyces naeslundii* (también localizados frecuentemente en el surco gingival).

b) La endotoxina asociada al lipopolisacárido (LPS) cuya actividad endotóxica, con respecto a otras bacterias gramnegativas, no parece muy importante.

c) Formar vesículas superficiales que se liberan con facilidad del resto del soma celular; dichas vesículas atraviesan barreras impermeables a la célula completa y transportan, de esta forma, factores de virulencia que serían trasladados a distancia (p. ej., proteasas o endoxinas de mayor efecto tóxico).

- Fimbrias:

Como las proteínas de la membrana externa y con sus mismas consecuencias, se comportan como adhesinas e intervienen en fenómenos de coagregación y adhesión a superficies epiteliales y dentales, en este último caso con la mediación de la saliva.

- Proteasas:

P. Gingivalis produce una amplia gama de enzimas proteolíticas; algunas se asocian a la membrana externa y otras se liberan al exterior o son transportadas a distancia por las vesículas superficiales. Gracias a ellas, *P. Gingivalis* obtiene nutrientes a partir de tejidos del hospedador provocando importantes daños tisulares; esto, además, favorece su multiplicación y su capacidad de penetración y diseminación.

El efecto destructivo de estas enzimas se extiende también a elementos del sistema inmunitario, permitiendo la evasión bacteriana de la respuesta del hospedador. Se comprende que estas proteasas, al

comportarse como agresinas e impedinas, desempeñen un papel fundamental en el surco gingival para producir periodontitis. La clasificación de estas enzimas es compleja y no está exenta de confusión; una forma esquemática y simple es la siguiente:

– Enzimas proteolíticas semejantes a tripsina, que son en realidad proteasas tiólicas y caseinolíticas. Las proteasas tiólicas contienen cisteína, son conocidas como gingipaínas y poseen en muchos casos una gran especificidad sobre proteínas que contienen determinados aminoácidos (arginina o lisina). Sus principales efectos biológicos son:

a) Se comportan como colagenasas que degradan el colágeno de tipo I y tipo IV, su acción se traduce en la destrucción del ligamento periodontal y el tejido conectivo del diente y reabsorción ósea.

b) Acción hemolítica con destrucción de hematíes para obtener hierro, que es vital para *P. Gingivalis*.

c) Acción destructora de proteínas reguladoras; con la consecuencia de un incremento de la permeabilidad vascular en el surco gingival, inflamación y un mayor número de nutrientes disponibles para las bacterias, el resultado es que el proceso inflamatorio se perpetúa.

d) Provocan la destrucción de inmunoglobulinas (IgA1, IgA2 e IgG)

e) Pueden captar hierro de moléculas que lo contengan (p. ej., transferrina, lactoferrina o hemoglobina); esto se debe, como se comentó, a la dependencia de *P. Gingivalis* de este metal; por ello, *in vitro* es fundamental

la sangre (contiene compuestos férricos como hemoglobina, mioglobina o meta-hemoglobina); además, *P. Gingivalis* es capaz de almacenarlo acumulándolo superficialmente, de ahí el color marrón oscuro o negruzco de las colonias, para metabolizarlo en condiciones deficitarias.

f) activación de precursores inactivos de metaloproteasas, que de esta forma se encuentran en la matriz extracelular de las células epiteliales que rodean el diente; el resultado es la destrucción tisular.

- Metabolitos tóxicos tisulares:

Son ácidos grasos de cadena corta, amoníaco, compuestos azufrados volátiles, metilmercaptano, que aumenta la permeabilidad de la mucosa oral, indol, etc.

- Moléculas antibacterianas:

Muchos de los metabolitos citados ejercen un efecto competitivo con otras bacterias; a ellos hay que añadir la producción de bacteriocinas por parte de algunas cepas de *P. Gingivalis*.

Todas estas moléculas están implicadas en las amplias interrelaciones que las bacterias establecen en la cavidad oral.⁵

⁵ LIEBANA UREÑA. "Microbiología oral" 2da ed. Interamericana-McGraw Hill, 2002. composición y ecología de la microbiología oral. Pág. 375-377.

3.1.4.2. **Porphyromona Gingivalis y enfermedades sistémicas**

Durante las bacteriemias se han encontrado más de 30 especies bacterianas responsables de patologías como fiebre reumática, valvulopatías y endocarditis bacteriana; entre esas especies, *Porphyromona Gingivalis*, como se mencionó antes, a través de sus fimbrias se adhiere e invade las células epiteliales y endoteliales, se multiplica dentro de ellas, evade la respuesta inmune y altera su función normal

Estudios clínicos han demostrado asociación entre enfermedades periodontales destructivas y riesgo creciente de complicaciones ateroscleróticas (ruptura de la placa), incluyendo infarto al miocardio (IM) y accidente cerebrovascular.

3.1.4.3. **Mecanismos de asociación entre enfermedades periodontales y riesgo cardiovascular**

La asociación de *Porphyromona Gingivalis* con aterosclerosis involucra la entrada de bacterias provenientes del periodonto a la circulación, evento que contribuye directamente en la formación del proceso ateromatoso y a la alteración de los procesos inflamatorios, que involucran tanto a la enfermedad periodontal como a la aterosclerosis y a la enfermedad cardiovascular.

Las bacterias periodontales ingresan al torrente sanguíneo y se transforman en potentes agentes trombogénicos por tener la capacidad de inducir la adhesión y la agregación plaquetaria por mimetismo de los sitios de unión al colágeno tipo I y III. Las fimbrias de *Porphyromona Gingivalis* permiten adherirse e invadir las células

epiteliales y endoteliales, entran por procesos de endocitosis, se multiplican dentro de ellas, evaden la respuesta inmune y alteran su función normal. Fig. 1.

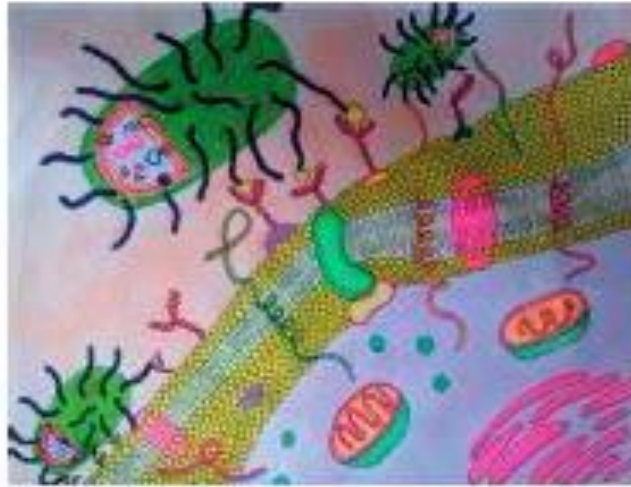


Fig1. Representación de la adhesión molecular de Porphyromona Gingivalis a células epiteliales.

Fuente: Fandiño, Muñoz, Parra, Salgado, 2013.

La asociación entre Porphyromona Gingivalis y el riesgo de sufrir aterosclerosis se debe, entre otros, a los efectos sistémicos de los lipopolisacáridos (LPS) bacterianos liberados en el periodonto infectado e inflamado y transportados por el torrente sanguíneo para anclarse a receptores de las células sub-epiteliales; esta unión, activa vías de transducción de señales y conduce a la sobreexpresión de moléculas de adhesión de las células endoteliales, estas moléculas de adhesión endoteliales permiten la fijación y entrada de monocitos al sub-endotelio. Fig. 2

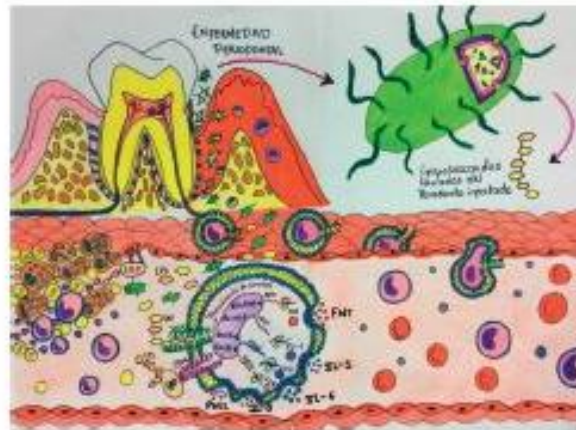


Figura 2. Representación del efecto de los LPS de *P. Gingivalis* sobre el proceso aterogénico.

3.1.4.4. Mecanismos de asociación entre enfermedades respiratorias y *Porphyromona Gingivalis*

En la boca, algunos microorganismos son aspirados hacia los pulmones. Este proceso surge cuando se inicia una colonización bacteriana a causa de: primero, placa acumulada; segundo, enzimas asociadas con la enfermedad periodontal que modifican las superficies mucosas para promover la adhesión y la colonización de patógenos y tercero, las citoquinas procedentes de tejidos periodontales pueden alterar el epitelio respiratorio para promover la infección por patógenos respiratorios. Existe relación directa entre enfermedades respiratorias agudas y una inadecuada higiene oral.

Se han reportado casos de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y alteraciones periodontales,

en las cuales, uno de los patógenos causante es *Porphyromonas gingivalis*.⁶

3.1.5. Tratamiento Periodontal

Toda terapia periodontal busca retardar, detener o revertir la destrucción periodontal y prevenir la recurrencia de la enfermedad, para evitar en lo que sea posible la pérdida de piezas dentales. (Collins, 1993), manifestó: Un tratamiento exitoso no solo está basado en el mejoramiento de los parámetros clínicos e idealmente en la regeneración de las estructuras perdidas y la recuperación de la función normal, sino que también, en cambios cualitativos y cuantitativos dentro de la microbiota subgingival.

La terapia periodontal convencional se basa en la supresión de los focos infecciosos subgingivales a través del desbridamiento mecánico, (cuyo procedimiento consiste en la remoción de placa bacteriana y cálculo supra y subgingival), raspado radicular, eliminación de factores de retención de placa, si el caso lo amerita cirugía periodontal.

(Bollen, 1996) La estrategia microbiológica de la terapia periodontal tiene como objetivo principal eliminar las bacterias patógenas específicas, y permitir la subsecuente recolonización por una microbiota compatible con salud. El destartaje y el raspado radicular resuelven el proceso de inflamación y detienen el curso de la periodontitis, sin embargo, áreas problemáticas como permanencia de bolsas periodontales profundas, defectos óseos y furcaciones, no

⁶ http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2015000100006

responden óptimamente al desbridamiento mecánico como única terapia necesitando complementarla con el uso de antibióticos. (Collins, 1993) La antibioterapia periodontal considera 3 aspectos fundamentales: tipo de fármacos, especies de microorganismos patógenos, y características del huésped, puede ser local o sistémica.

3.1.5.1. Terapia Antibiótica local

La antibioterapia local consiste en depositar el fármaco en el lugar afectado por el foco infeccioso, está demostrado que los antibióticos de liberación local alcanzan mayores concentraciones que los de tipo sistémico. La cantidad de medicamento liberado a menudo alcanza concentraciones que exceden los 1000µg/ml, este nivel es considerado bactericida para la mayoría de las bacterias que presentan resistencia a las concentraciones sistémicamente liberadas.

(Walker, 2004) No existen reacciones adversas ni efectos secundarios asociados a los antimicrobianos de administración local, esta terapia puede ser utilizada también para antibióticos que son demasiados tóxicos para ser administrados por vía sistémica y podría considerarse exitoso para microorganismos confinados en determinados focos infecciosos. (Walker, 2004) (Mombelli, 2004), refirió: “Una desventaja obvia de la terapia sistémica, es que solo una pequeña proporción de la dosis total alcanza la microbiota subgingival y el saco periodontal, mientras que el remanente es “perdido” en el resto del cuerpo”. Por lo tanto se ha establecido como desafío principal que, la administración local de antibióticos es el de mantener una

alta concentración de la droga sobre un área determinada por un prolongado periodo de tiempo.

Desde el punto de vista microbiológico, se considera casi ideal la aplicación de antimicrobianos de liberación local para el tratamiento de sitios bien definidos. Debido a que la terapia mecánica sirve para desorganizar y eliminar el biofilm bacteriano, los 42 antibióticos administrados localmente al alcanzar concentraciones mayores que los de origen sistémico, permiten una óptima eliminación de bacterias. (Walker, 2004) Entre los antibióticos empleados en la terapia periodontal de uso local tenemos:

- Doxiciclina
- Tetraciclina
- Minociclina.

3.1.5.2. Terapia Antibiótica sistémica

(Mombelli, 2004), manifestó: Los antibióticos de tipo sistémico, penetran y afectan todos los nichos ecológicos de los microorganismos de la cavidad oral en forma total, de sitios enfermos y sanos.

Esto podría ser una ventaja en situaciones donde los periodontopatógenos están distribuidos a través de la totalidad de la boca, como ha sido visto en algunos pacientes, incluyendo sitios como el dorso de la lengua y las amígdalas.

El uso en conjunto de antibióticos sistémicos y tratamiento mecánico convencional, puede mejorar los resultados clínicos y hace predecible la eliminación de bacterias fuertemente asociadas con la patología. Se ha utilizado una gama de los antibióticos para el tratamiento de las enfermedades

periodontales, entre los que se encuentran las tetraciclinas, clindamicina, metronidazol y otros de la familia de las penicilinas.

(Slots, 1996) En cuanto a las características del hospedero, ocasionalmente se pueden desarrollar diversas reacciones adversas entre las cuales se ha documentado aquellas que aparecen en la siguiente tabla.

Antibiótico	Reacciones adversas
Metronidazol	Náusea, vomito 12%
Clindamicina	Diarrea 7%
Penicilina (amoxicilina)	Hipersensibilidad (rash) 5%, diarrea 5%
Tetraciclina	Fotosensibilidad
Azitromicina	Diarrea 5%
Claritromicina	Diarrea 3%
Quinolonas (ciprofloxacino)	Nausea, vomito 5% Fotosensibilidad Riesgo de lesión en tendón de Aquiles (desórdenes con el ejercicio)

Tabla1. Lista de reacciones adversas de antibióticos usados en la terapia periodontal
Fuente: Systemic Antibiotics in Periodontics Periodontol, 2004.

Se ha demostrado que pacientes con periodontitis crónica con historial de terapias recientes con penicilina demostraron elevados niveles de Prevotella intermedia resistente a la penicilina, también, se ha documentado casos que luego de terapias con tetraciclinas, la microbiota subgingival de pacientes con periodontitis contiene un número elevado de bacterias resistentes a este antibiótico.

(Slots, 1996) (Socransky & Haffajee, 1992), mencionaron: La presencia de bacterias patogénicas resistentes a los antibióticos, resultado de un inapropiado uso sistémico de

ellos, se ha convertido en un serio problema clínico de salud pública.

Por lo tanto, se considera prioritario el desarrollo de modalidades alternativas para tratar las infecciones en la medicina moderna y esto incluye infecciones de la boca.⁷

Especies	Periodontitis crónica	Periodontitis agresiva localizada	Periodontitis agresiva
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	28.2%	81.8%	40.9%
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	53.8%	13.3%	79.6%
<i>Prevotella intermedia</i>	50.2%	53.4%	71.4%
<i>Tannerella forsythia</i>	50.6%	0	50.8%
<i>Campylobacter rectus</i>	40.3%	12.5%	47.8%

. Prevalencia de las especies microbianas asociadas con diferentes formas clínicas de periodontitis.

Fuente: Newman, Takei, Klollenvold, & Carranza, 2014.

3.1.6. Biofilms bacterianos

Los biofilms se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo.

La capacidad de formación de biofilm no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biofilms.

⁷ <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6678/1/T-UCCE-0015-338.pdf>

Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario del biofilm es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total.

Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos secretados por las propias células que forman parte del mismo. En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de lisis de las bacterias.

La característica que mejor distingue las infecciones crónicas relacionadas con biofilms de las infecciones agudas es su respuesta a tratamientos antibióticos. Mientras que las infecciones agudas pueden ser eliminadas tras un breve tratamiento antibiótico, las infecciones por biofilms normalmente no consiguen ser completamente eliminadas, producen episodios recurrentes y la mayoría de las veces deben resolverse sustituyendo el implante.

Esto se debe a que las bacterias del biofilm pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en medio líquido.⁸

⁸ https://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/SEM37_14.pdf

Tabla 1. Lista parcial de infecciones humanas en las que están involucrados biofilms bacterianos (Costerton *et al.*, 1999)

Infección o enfermedad	Especie bacteriana formadora de biofilm
Caries dental	Cocos gram-positivos acidogénicos (ej. <i>Streptococcus</i>)
Periodonitis	Bacterias anaeróbicas orales gram-negativas
Otitis media	Cepas no tipables de <i>Haemophilus influenzae</i>
Infecciones del músculo-esqueleto	Cocos gram-positivos (ej. <i>Staphylococcus</i>)
Fascitis necrotizante	Streptococos Grupo A
Osteomielitis	Varias especies bacterianas y fúngicas, generalmente mezcladas
Prostatitis bacteriana	<i>Escherichia coli</i> y otras bacterias gram-negativas
Endocarditis de la válvula nativa	<i>Streptococcus</i> del grupo "viridans"
Neumonía por fibrosis quística	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>
Meloidosis	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Infecciones nosocomiales:	
Neumonía (cuidados intensivos)	Bacilos gram-negativos
Suturas	<i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>
Orificios de salida	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Vías arteriovenosas	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Bucles esclerales	Cocos gram-positivos
Lentes de contacto	<i>P. aeruginosa</i> y cocos gram-positivos
Cistitis por catéteres urinarios	<i>E. coli</i> y otros bacilos gram-negativos
Peritonitis por diálisis peritoneal	Una variedad de bacterias y hongos
DIU	<i>Actinomyces israeli</i> y muchos otros microorganismos
Tubos endotraqueales	Una variedad de bacterias y hongos
Catéteres hickman	<i>S. epidermidis</i> y <i>Candida albicans</i>
Catéteres centrales venosos	<i>S. epidermidis</i> y otros
Válvulas mecánicas del corazón	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Injertos vasculares	Cocos gram-positivos
Bloqueo del conducto biliar	Una variedad de bacterias entéricas y hongos
Dispositivos ortopédicos	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>
Prótesis del pene	<i>S. epidermidis</i> y <i>S. aureus</i>

3.1.7. Probióticos

3.1.7.1. Historia de los Probióticos

Hace un siglo, Elie Metchnikoff (científico ruso, premio Nobel, y profesor del Instituto Pasteur en París) postuló que las bacterias ácido lácticas (BAL) ofrecían beneficios a la salud que llevaban a la longevidad.

Sugirió que la “autointoxicación intestinal” y el envejecimiento resultante podrían suprimirse modificando la microbiota intestinal y utilizando microbios útiles para sustituir a los microbios proteolíticos como *Clostridium* — productores de sustancias tóxicas que surgen de la digestión de proteínas, entre las que se encuentran fenoles, indoles, y amoníaco —. Desarrolló entonces una dieta con leche fermentada por la bacteria, a la que denominó “bacilo búlgaro.” En 1917, antes del descubrimiento de Alexander Fleming de la penicilina, el profesor alemán Alfred Nissle aisló una cepa no patógena de *Escherichia coli* de las heces de un soldado de la Primera Guerra Mundial que no había desarrollado enterocolitis durante un brote grave de shigellosis. Los trastornos del tracto intestinal frecuentemente eran tratados con bacterias no patógenas viables, para cambiar o reemplazar la microflora intestinal.

La cepa de *Escherichia coli* de Nissle 1917 es uno de los pocos ejemplos de un probiótico no BAL. Henry Tissier (del Instituto Pasteur) aisló por primera vez una *Bifidobacteria* de un lactante alimentado a pecho, a la que denominó *Bacillus bifidus communis*.

Tissier postulaba que las bifidobacterias desplazarían a las bacterias proteolíticas que provocan la diarrea y recomendó la administración de bifidobacteria a lactantes que padecían de este síntoma.

El término “probiótico” fue introducido por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell; a diferencia de los antibióticos, se definió al probiótico como aquel factor de origen microbiológico que estimula el crecimiento de otros organismos. En 1989, Roy Fuller enfatizó el requisito de

viabilidad para los probióticos e introdujo la idea de que tienen un efecto beneficioso para el huésped.

3.1.7.2. Definición de Probióticos

Los probióticos son microbios vivos que pueden incluirse en la preparación de una amplia gama de productos, incluyendo alimentos, medicamentos, y suplementos dietéticos.

Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son las usadas más comúnmente como probióticos, pero la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y algunas especies de *E. coli* y *Bacillus* también son utilizados como probióticos. Las bacterias de ácido láctico (LAB), entre las que se encuentra la especie *Lactobacillus*, han sido utilizadas para la conservación de alimentos mediante fermentación durante miles de años; pueden ejercer una función doble, actuando como agentes fermentadores de alimentos, pudiendo además generar efectos beneficiosos a la salud.

En términos estrictos, sin embargo, el término “probiótico” debe reservarse para los microbios vivos que han demostrado en estudios humanos controlados producir un beneficio a la salud. La fermentación de alimentos brinda perfiles de sabor característicos y reduce el pH, lo que impide la contaminación provocada por posibles patógenos. La fermentación se utiliza a nivel mundial para el mantenimiento de una gama de materiales agrícolas sin

procesar (cereales, raíces, tubérculos, frutas y hortalizas, leche, carne, pescado etc.).⁹

3.1.7.3. Mecanismo de acción de los Probióticos

La acción de los probióticos no se conoce demasiado bien, pero se piensa que intervienen en realidad varios mecanismos de acción (Kaur y cols. 2009), entre ellos:

1) Los probióticos liberan componentes antimicrobianos como ácidos orgánicos, ácidos grasos libres, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, las cuales pueden inducir una acción antagonista contra los organismos patógenos. Además, la acumulación de tales metabolitos puede reducir el pH del medio ambiente, lo que puede directamente inhibir el crecimiento de organismos dañinos. El probiótico mejor caracterizado que presenta estas propiedades es el *Lactobacillus casei* cepa GG.

Las bacterias de ácido láctico también liberan sustancias antimicrobianas como reuterinas y bacteriocinas. Esta es la teoría más ampliamente aceptada.

2) Competición por los nutrientes en el tracto gastrointestinal.

3) Competición por los receptores, donde los probióticos compiten contra los patógenos por el limitado número de receptores presentes sobre la superficie del epitelio intestinal.

9

http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/1182/19_probioticos_prebioticos_es.pdf

- 4) Aumento de la secreción de mucina que produce un aumento de la unión de las bacterias probióticas a la mucosa intestinal. Esta acción bloquea la unión de los enteropatógenos a los receptores epiteliales.
- 5) Los probióticos pueden también modificar los receptores de toxinas y bloquear las enfermedades mediadas por toxinas.
- 6) Los probióticos también pueden promover la estimulación no específica del sistema inmune del huésped, incluyendo proliferación celular inmune, aumento de la actividad fagocítica de los macrófagos, y el aumento de la producción de inmunoglobulinas secretoras IgA e IgM.
- 7) La estabilización de la permeabilidad intestinal limita la colonización por los patógenos, elimina a los antígenos extraños que han penetrado en la mucosa y regula la respuesta inmune específica de antígeno.
- 8) Las bacterias probióticas estimulan el tejido linfoide del intestino y la inmunomodulación de la respuesta del tejido epitelial y linfoide del intestino.¹⁰

¹⁰ <http://www.sepa.es/images/stories/SEPA/PDF/21-3.pdf#page=20>

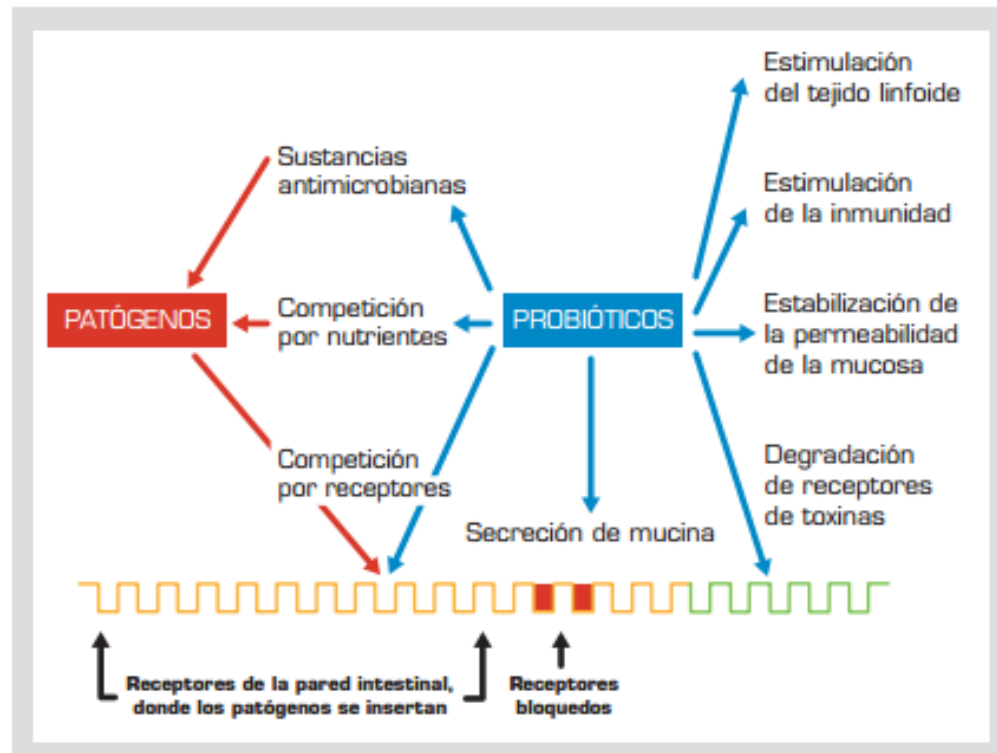


Fig. Mecanismos de acción de los probióticos.

3.1.7.4. Bacterias Acido Lácticas

Los bactericidas químicos y antibióticos empleados para prevenir las infecciones bacterianas a menudo generan disturbios en la microbiota de la cavidad oral y del tracto digestivo, lo cual favorece el desarrollo de resistencia en algunos microorganismos, por lo que pierden su efectividad. Un número muy pequeño de estudios ha abordado con éxito la búsqueda de agentes naturales para ser empleados como antimicrobianos contra patógenos orales.

La bacterioterapia se basa en combatir las infecciones bucales mediante la administración de bacterias inocuas que producen bacteriocinas (o sustancias similares a

bacteriocinas), o de alimentos probióticos que contienen microorganismos con habilidades particulares, los que, al ser suministrados en cantidades suficientes, dan lugar a efectos fisiológicos benéficos en la salud del huésped.

Actualmente, probióticos y prebióticos son utilizados en la elaboración de alimentos con el fin de prevenir algunas enfermedades de los tractos intestinal o urinario, e infecciones vaginales, entre otras.

Hace algunas décadas, la terapia con antibióticos de las enfermedades bucales, principalmente de caries y periodontitis, fue reemplazada por el uso de algunos probióticos en el tratamiento de la caries.

Las bacterias lácticas (BAL), consideradas esenciales durante centurias en la producción de alimentos fermentados, son sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS) por la FDA (Food and Drug Administration), la que resguarda su uso en la ingesta humana.⁹ Este grupo de microorganismos despertó un interés creciente debido a que, mediante sus diferentes vías metabólicas, influyen en las características sensoriales de los alimentos, aumentan su valor nutricional por la producción “in situ” de vitaminas, otorgan beneficios adicionales a la salud humana gracias a sus propiedades pro bióticas, y generan metabolitos (como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo y bacteriocinas o sustancias parecidas a bacteriocinas) con efecto antagónico al crecimiento de microorganismos indeseables, tales como los microorganismos cariogénicos.

Varios estudios obtuvieron resultados satisfactorios en la evaluación del antagonismo de cepas bacterianas contra el establecimiento de *Streptococcus mutans* en el biofilm dental.

El objetivo de este trabajo fue aislar, purificar y conservar cepas de *Streptococcus* spp. y *Lactobacillus* spp. de la cavidad bucal y enfrentarlas, “in vitro”, a bacterias lácticas productoras de bacteriocinas.¹¹

3.1.7.5. *Lactobacillus*

Los lactobacilos tienen forma bacilar, variando desde bacilos largos y delgados a cortos y curvados, no esporulados, aerotolerantes y anaerobios, acidúricos o acidófilos (pH entre 1.0 y 5.0), de requerimientos nutricionales complejos. Los límites de temperatura para desarrollar van desde 2° a 53°C con óptima de 30 a 40°C. (Jay, 2000; Madigan y col., 2004).

El género *Lactobacillus* es el más grande, comprendiendo alrededor de 80 especies reconocidas y organizadas en tres grupos basados principalmente en las características fermentativas. El grupo 1 incluye especies homofermentativas estrictas.

¹¹ Metabolitos de bacterias lácticas antagonistas al crecimiento de microorganismos cariogénicos Artículo en Revista de la Asociación Odontológica Argentina · Marzo 2015 https://www.researchgate.net/profile/Olga_Vasek/publication/282731487_Metabolitos_de_bacterias_lacticas_antagonistas_al_crecimiento_de_microorganismos_cariogénicos/links/561a4ccd08ae044edbb208bd.pdf

El grupo 2 está formado por especies heterofermentativas facultativas. El grupo 3 está formado por especies heterofermentativas estrictas.

Las especies homofermentativas se asocian principalmente con el hombre y animales, ya que se les puede encontrar en la cavidad oral, contenido intestinal y vagina de mamíferos; mientras que las especies heterofermentativas están asociadas con los alimentos, en donde llevan a cabo fermentaciones controladas o causan deterioro especialmente en productos empacados refrigerados, se pueden aislar fácilmente de productos cárnicos, lácteos, pescados, aguas residuales, cerveza, fruta, verduras y ensilados.

Generalmente resisten mejor las condiciones de acidez que las restantes bacterias del ácido láctico y pueden crecer bien a valores de pH alrededor de 4 o 5. Esta propiedad permite su aislamiento selectivo a partir de muestras naturales, empleando medios de cultivo de pH ácido que contengan carbohidratos (Madigan y col., 2004).¹²

3.1.7.6. Lactobacillus Reuteri

Lactobacillus Reuteri es una de las pocas especies probióticas cuyo hábitat natural es el tracto digestivo de mamíferos y aves. Es una de las primeras especies

12

<https://www.uaeh.edu.mx/docencia/Tesis/icbi/licenciatura/documentos/Susceptibilidad%20de%20bacterias%20acido%20lacticas.pdf>

bacterianas para establecerse de forma natural en la microbiota normal del recién nacido, la mayoría de las otras cepas probióticas son solamente temporales o transitorios habitantes del tracto gastrointestinal, derivadas de la ingesta de alimentos. (Nootriment, 2013).

En los seres humanos *Lactobacillus Reuteri* se ha aislado a partir de:

- La leche materna
- La boca (saliva)
- El estómago
- El intestino delgado (duodeno y el íleon)
- El colon (intestino grueso)
- Excrementos
- La vagina (Nootriment, 2013)

Lactobacillus Reuteri fue reconocida y registrada en las clasificaciones científicas de bacterias del ácido láctico, agrupada por error como miembro de *Lactobacillus fermentum*. Pero en la década de 1960, el microbiólogo alemán Gerhard Reuter pudo distinguir *Lactobacillus reuteri* de *Lactobacillus fermentum* y reclasificó la especie como “*Lactobacillus fermentum* biotipo II”. (BioGaia, 2013)

En 1980 Kandler et al, identificó a la bacteria como una especie distinta, y eligieron el nombre de la especie como “reuteri” en honor a su descubridor Gerhard Reuter. La primera cepa de *Lactobacillus reuteri* para uso humano fue aislado en 1990 de la leche materna de una madre peruana que vivía en los Andes, esta cepa fue depositada en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) como

Lactobacillus reuteri SD 2112 (SD = fuerte), y más tarde se le dio el número ATCC 55730. (BioGaia, 2013)

En el año 2007, Lactobacillus reuteri ATCC 55730 fue reemplazada por la "versión hija", cuya única diferencia entre las cepas es la pérdida de dos plásmidos de ATCC 55730 que llevaron a la resistencia a la tetraciclina y la lincomicina, respectivamente. Sin embargo en la actualidad se ha demostrado la irrelevancia de los genes de los plásmidos a las funciones de la cepa, además se confirmó que todas las funciones relacionadas con probióticos probados de Lactobacillus reuteri DSM 17938, se retienen de los

Lactobacillus reuteri ATCC 55730, otras cepas humanas que se utilizan comercialmente son Lactobacillus reuteri ATCC PTA 5289 y ATCC PTA 6475. (BioGaia, 2013) En el año de 1985, el profesor Steven Lindgren de la Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas en Uppsala, Suecia, y el profesor Walter Dobrogosz de la Universidad Estatal de Carolina del Norte, EE.UU, descubrieron las propiedades antimicrobianas de L. reuteri cuando observaron la capacidad de la bacteria para producir una sustancia llamada reuterina que posee una actividad de amplio espectro contra los patógenos intestinales comunes.¹³

¹³ <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6678/1/T-UCCE-0015-338.pdf>

3.1.7.7. **Lactobacillus Rhamnosus**

Lactobacillus rhamnosus es una bacteria que originalmente fue considerada una subespecie de *L. casei*, pero más tarde la investigación genética encontró que es una especie propia. Se trata de un corto Gram positivas anaerobias facultativas barra que aparece a menudo en las cadenas.

Algunas cepas de *L. rhamnosus* bacterias están siendo utilizados como probióticos, y son particularmente útiles en el tratamiento de mujeres con infecciones relacionadas, más particularmente, muy difícil de tratar los casos de vaginosis bacteriana (o "BV"). El *Lactobacillus rhamnosus*, *L. reuteri* especies se encuentran más comúnmente en la hembra saludables tracto genito-urinario y son más útiles para complementar con el fin de recuperar el control sobre el crecimiento bacteriano durante una infección activa. *L. rhamnosus* a veces se utiliza en el yogur y productos lácteos tales como la fermentación de la leche pasteurizada y queso semicurado.

Mientras que con frecuencia se considera un organismo benéfico, *L. rhamnosus* no puede ser tan beneficioso para ciertos subgrupos de la población; en raras circunstancias, especialmente aquellos que involucran principalmente el sistema inmunológico debilitado o bebés, no puede haber ninguna ventaja.

Lactobacillus rhamnosus GG (ATCC 53103) es una cepa de *L. rhamnosus* que fue aislado en 1983 desde el tracto

intestinal de un ser humano sano; presentada por patente en 17 de abril de 1985, por Sherwood Gorbach y Barry Goldin, y el " GG " se deriva de las primeras letras de sus apellidos. La patente se refiere a una cepa de "L. acidophilus GG" con American Type Culture Collection (ATCC) número de acceso 53103; posteriormente reclasificados como una cepa de L. rhamnosus. Las reivindicaciones de la patente de la L. rhamnosus GG (ATCC 53103) de la cepa es ácido y bilis-estable, tiene una gran afección por humanos de la mucosa intestinal de células, y produce ácido láctico. Desde el descubrimiento de la L. rhamnosus GG de la cepa, se ha estudiado ampliamente en sus diversos beneficios para la salud y en la actualidad es el más estudiado del mundo, bacteria probiótica con más de 800 estudios científicos.

Mientras *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) es capaz de sobrevivir al ácido y a la bilis del estómago y el intestino, se reivindica para colonizar el tracto digestivo, y para el equilibrio de la microflora intestinal, la evidencia sugiere que los *Lactobacillus rhamnosus* es probable que un transitorio habitante, y no autóctonos a pesar de todo, se considera un probiótico útil para el tratamiento de diversas enfermedades, como funciona en muchos niveles. La mayoría de los mecanismos moleculares que no se conocen, sin embargo.

El uso de *L. rhamnosus* GG para probiótico terapia ha sido asociado con casos muy raros de la sepsis en ciertos

grupos de riesgo, principalmente aquellos con un sistema inmunológico debilitado y bebés.¹⁴

3.1.7.8. *Lactobacillus Johnsonii*

Lactobacillus johnsonii es uno de los muchos microorganismos que residen en el intestino humano. Como todas las especies del género *Lactobacillus*, es un anaerobio, bacteria Gram-positiva, que tiene una varilla de forma similar y no se someten a la formación de esporas.

El tracto gastrointestinal del ser humano en la que *L. johnsonii* reside es abundante con los nutrientes y se basa en más de 500 especies de microbios que habitan en el fin de desarrollar y funcionar correctamente. Específicamente *L. johnsonii* y otros tracto gastrointestinal microbios ayuda en polisacáridos y proteínas la digestión y también generar una variedad de nutrientes, incluyendo vitaminas y ácidos grasos de cadena corta que componen el 15% de la de un ser humano de la ingesta calórica total.

Además, debido a que *L. johnsonii* es capaz de someterse a fermentación y por lo tanto puede hacer que el ácido láctico, que juega un papel importante en la fermentación y conservación de diversos alimentos, tales como los productos lácteos, la carne, los productos vegetales, y cereales.

Por último, *L. johnsonii* es caracterizado como parte del complejo del género *Lactobacillus*. Este complejo se

¹⁴ https://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_rhamnosus

compone de seis especies de Lactobacillus que se cree que están involucrados en probiótico actividades, lo que significa que son capaces de someterse a los procesos que se cree que es beneficioso para los humanos, la salud general y el bienestar. Tal probióticos beneficios especialmente atribuido a *L. johnsonii* incluyen la inmunomodulación, la inhibición de patógenos, y el apego de las células epiteliales.

3.1.7.9. Administración de los Probióticos

Los agentes probióticos han sido clasificados dentro del grupo de los alimentos funcionales, estos son aquellos que en forma natural o procesada, contienen componentes que ejercen efectos beneficiosos para el organismo que van más allá de la función nutritiva. (Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos INTA, 2011) (Caglar, Kargul, & Tanboga, 2005), enumeraron las formas en las que pueden ser suministrados los probióticos y son las siguientes:

- a) Agregados a una bebida o alimento como un cultivo concentrado.
- b) Inoculado dentro de fibras prebióticas (ingredientes no digeribles que se encuentran en los alimentos que favorecen el crecimiento de los probióticos).
- c) Inoculado dentro de productos lácteos como yogurt, leche, queso.

- d) Concentrado y envasado como suplementos dietéticos (cápsulas, polvo, tabletas, gomas de mascar y gotas). (Pérez Luyo, 2008)¹⁵

3.1.8. Probióticos y su relación con Odontología

Gorbach y Goldin (1985) aislaron del intestino humano el *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) que es la bacteria probiótica más ampliamente estudiada. Se demostró que produce una sustancia con un potencial inhibitorio contra la actividad de diferentes especies bacterianas, incluyendo las especies cariogénicas como los *Streptococcus* spp. Näse y col. (2001), en un estudio en niños de 1 a 6 años, en Finlandia, examinaron *Lactobacillus rhamnosus* GG: LGG en leche, y se encontró que reduce significativamente el riesgo de caries.

Se concluyó que el uso de leche que contenga la bacteria probiótica LGG brinda efectos benéficos en la salud oral de esos niños. Grudianov y col. (2002) encontraron que los probióticos se adhieren al tejido dental, establecen un efecto cariostático y pueden formar parte del biofilm que lucha contra las bacterias cariogénicas.

Ahola y col. (2002) determinaron que la intervención con probióticos: LGG y *Bifidobacterium* spp. reduce el riesgo de elevados niveles de *Streptococcus mutans*. Wei y col. (2002) produjeron altas concentraciones de anticuerpos contra las

¹⁵ <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6678/1/T-UC-0015-338.pdf>

bacterias cariogénicas humanas: *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, en calostro de leche fermentada de bovino. Vancikova y col. (2003), basándose en el estudio anterior, observaron que los probióticos mejoran la respuesta oral inmune (9). Von Bultzingslowen y col. (2003) determinaron que cepas probióticas selectas como *L. plantarum* refuerzan la cavidad oral y el tracto gastrointestinal mediante una diseminación bacteriana, lo cual mejora la ingesta de alimentos y el peso corporal en animales a los cuales se les realizó quimioterapia.

Esto tiene un efecto positivo en el campo de la oncología, ya que durante la quimioterapia, en casos de cáncer, se pueden presentar infecciones sistémicas por una alteración en la microflora orofaríngea y gastrointestinal, causando inmunosupresión. Hatakka y col. (2005), en un estudio en adultos mayores, los cuales consumieron queso probiótico, mostraron que los probióticos reducen la prevalencia de *Candida* spp. Oral, y también la hiposalivación. Esta observación es interesante teniendo en cuenta el incremento de la resistencia a las drogas de la *Candida* spp.

3.1.9. Efecto de los probióticos en las condiciones periodontales

Las enfermedades periodontales, junto a la caries dental, representan la mayor parte de las enfermedades orales. Según la Organización Mundial de la Salud, la mayoría de los niños presentan signos de gingivitis y entre los adultos las etapas iniciales de la enfermedad periodontal son altamente prevalentes.

El biofilm bacteriano, que se forma en los tejidos duros y blandos de la cavidad oral, es considerado como el principal factor etiológico en la mayoría de las condiciones patológicas de la cavidad oral.

La acumulación de bacterias dentro del biofilm, facilitado por un pobre mantenimiento de la salud oral, predispone a cambios en la comunidad microbiana, conduciendo a la aparición de la inflamación periodontal. La complejidad de la microbiota periodontal se asemeja a la microbiota del tracto gastrointestinal, donde las enfermedades infecciosas son tratadas mediante probióticos. En la cavidad oral, la terapia de reemplazo muestra beneficios en la prevención de la caries dental, aunque aún existen pocos estudios que muestren la efectividad del uso de probióticos en el tratamiento de la periodontitis.

En la Tabla 1 se resume las especies probióticas usadas para aplicación oral en general. Teniendo en cuenta las dos mayores estrategias contra las enfermedades periodontales: la eliminación de patógenos específicos y la supresión de la respuesta destructiva del huésped, el enfoque de la terapia con probióticos puede ser de utilidad para lograr el objetivo de estos tratamientos.

Grudianov y col. (2002) examinaron tabletas probióticas con *Bifidobacterium* spp. En un tratamiento de gingivitis y diferentes grados de periodontitis. El tratamiento de los pacientes del grupo control fue con "Tantum verde".

Los casos de gingivitis y periodontitis fueron tratados con probióticos, el efecto de ellos para la normalización de la microflora fue mayor en comparación con el grupo que recibió Tantum verde.

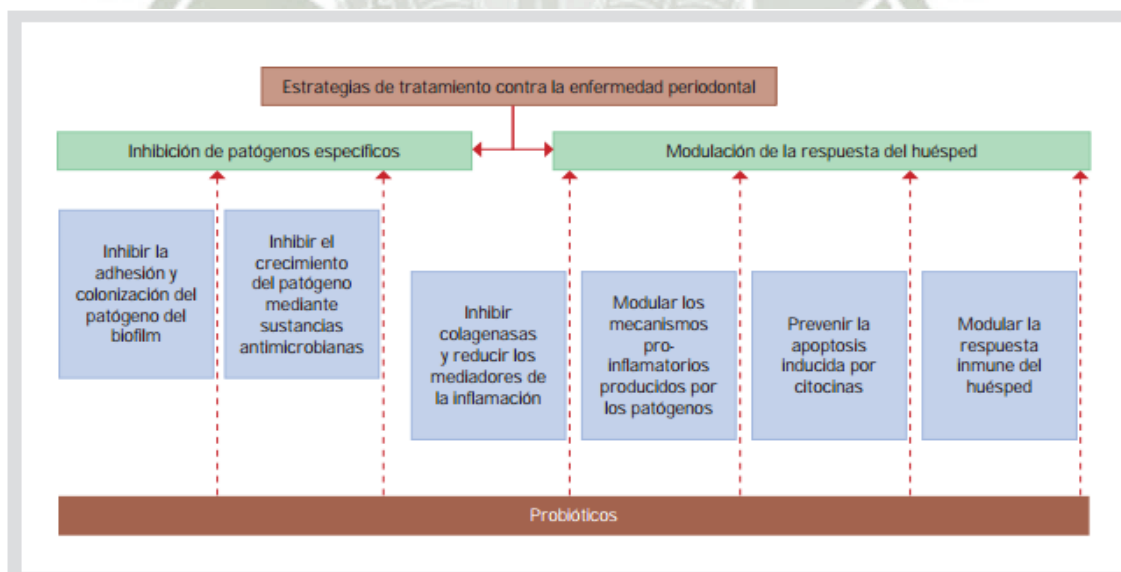
Ishikawa (2003) demostró que cepas de *Lactobacillus* spp. Son útiles en la reducción de la inflamación gingival y en el número de bacilos pigmentados como *Porphyromonas gingivalis*, en saliva y placa subgingival. Burton y col. (2005) concluyeron que las cepas bacterianas probióticas originarias de la microbiota oral de humanos

sanos, tienen una aplicación potencial para la prevención y tratamiento de la halitosis.

En este estudio se empleó el *Streptococcus salivarius*, el cual según (xilitol) en el otro, encontrando que la administración oral del probiótico *Lactobacillus salivarius* WB21 disminuye significativamente el índice de placa y la profundidad de bolsa de los pacientes fumadores, lo que sugiere una mejoría clínica de las condiciones periodontales mediante el uso del probiótico.

El *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* es considerado como un periodontopatógeno clave y está asociado con la periodontitis agresiva. La periodontitis asociada con *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* es difícil de tratar únicamente mediante la remoción mecánica del biofilm subgingival, por lo que es necesario el tratamiento complementario con antibióticos sistémicos.

De ahí la importancia de este estudio que muestra una alternativa diferente a la antibioterapia.



Posibles mecanismos mediante los cuales las especies probióticas podrían incidir positivamente sobre la salud periodontal. (Adaptado de Stamatova y Meurman 2009).

Tabla 1. Especies de probióticos y su efecto en la salud en la cavidad oral (resultado de investigaciones clínicas).

Especies de Probióticos	Efecto	Medios de Administración	Referencia
<i>L. reuteri</i> ATCC 55730 <i>L. reuteri</i> ATCC PTA:5289	Reducción en los niveles salivales de <i>S. mutans</i>	Pastillas	Caglar et al. 2008
<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	Reducción de <i>S. mutans</i>	Tabletas	Caglar et al. 2006
<i>L. rhamnosus</i> GG, ATCC 53103	Reducción del riesgo de niveles elevados de <i>S. mutans</i>	Queso	
<i>L. rhamnosus</i> GG, ATCC 53103	Reducción en los niveles salivales de <i>S. mutans</i>	Leche	
<i>Bifidobacterium</i> DN-173 010	Supresión del crecimiento de bacterias negras pigmentadas en muestras de saliva implicadas con halitosis	Yogurt	
<i>S. salivarius</i> K12	Reducción de gingivitis y placa	Enjuagatorios bucales	
<i>L. reuteri</i>		Formulación probiótica	
<i>L. casei</i> 37		Apósito periodontal	
<i>L. rhamnosus</i> GG (ATCC 53103), <i>L. rhamnosus</i> LC705, <i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp., <i>shermanii</i> JS	Mejora de periodontitis en relación a signos y síntomas	Queso	
<i>L. acidophilus</i> LAFTIL10	Mejora de los signos clínicos periodontales en fumadores y no fumadores		

<http://www.scielo.cl/pdf/piro/v3n3/art07.pdf>

Tabla 1 Algunos de los productos probióticos, relacionados con la industria alimenticia, comercializados en España.

Empresa	Marca	Cepa probiótica
Danone	Activia Actimel Danaten	Bifidobacterium infantis Lactobacillus casei Lactobacillus helveticus
Nestlé	LC1 Nativa Nidina Premium	Lactobacillus johnsonii Bifidobacterium lactis B. lactis
Kaiku	BifiActivium Vita Actif	Bifidobacterium* L. helveticus Lactobacillus rhamnosus GG
Clesa	Activ Bifidus Activ Lb Casei	Bifidobacterium* L. casei
Asturiana	Naturactiva Bifidusactivo	L. casei Bifidobacterium*
García Baquero	Queso Bifidus	Lactobacillus acidophilus y B. lactis
Priégola	Simbi	L. casei, L. acidophilus y B. lactis
Vrai	Yogur bifidus	Bifidobacterium*

* La marca comercial no especifica la especie; B. lactis: Bifidobacterium lactis; L. helveticus: Lactobacillus helveticus; L. casei: Lactobacillus casei; L. acidophilus: Lactobacillus acidophilus.

3.1.10. Acción de los probióticos sobre el biofilm oral

Se espera que los mecanismos de acción de los probióticos sobre la boca sean similares a los observados en otras partes del cuerpo. Por ejemplo, las bacterias probióticas orales deben adherirse y colonizar los tejidos periodontales incluyendo las superficies duras, y debe convertirse en parte del biofilm. No deben fermentar los azúcares, ya que posteriormente disminuye el pH y puede ser perjudicial, dando lugar a caries.

De lo que si hay pruebas es de que los probióticos ejercen su efecto sin colonizar o solo con una colonización temporal del huésped. Tan pronto como se detiene su consumo, las bacterias probióticas son excretadas. Incluso sin una colonización permanente, puede preverse que el uso repetido

diario de productos probióticos, durante un largo periodo de tiempo, favorecerá un mayor nivel de cepas probióticas en la cavidad oral.

Especies de Probioticos	Efecto	administración	Referencia
L. Reuteri ATCC 55730	Reducción en los niveles salivales de Streptococcus mutans y Disminución del sangrado gingival y reducción de gingivitis	Tabletas	Caglar et al. 2008 Krasse y Matsuoka 2006
Lactobacillus rhamnosus GG ATCC 53103	Reducción de los niveles salivales de Streptococcus mutans	Leche y Queso	Caglar et al. 2006
Bifidobacterium DN- 173010	Supresión del crecimiento de bacterias negras pigmentadas en muestras de saliva implicadas con halitosis	Yogurt	Näse 2001
Lactobacillus salivarius WB2	Reduccion de índice de placa y profundida de bolsa periodontal	Tabletas	Shimauchi 2008

Fuente: Muñoz Salas & Alarcón Palacios, 2010

PROBIÓTICOS	ADMINISTRACIÓN	EFECTO	AUTOR
Mezcla de probióticos	Tabletas "Acilact" y "Bifidobacterium"	Reducción de patógenos periodontales	Grudianov y cols (2002)
Lactobacillus casei	Cemento periodontal	Reducción de signos de gingivitis y periodontitis	Volozhin y cols (2004)
Lactobacillus reuteri	Tabletas de L. reuteri	Reducción de placa y gingivitis	Krasse y cols (2006)
Streptococcus Sanguis, S. Salivarius, S. Mitis	Aplicación de Streptococcus después de raspados	Recolonización subgingival retardada	Theguels y cols (2007)
Lactobacillus brevis	Tabletas de L. brevis	Mejora de signos y síntomas de periodontitis	Riccia y cols (2007)
Lactobacillus reuteri Prodentis	Tabletas	Mejora parámetros clínicos y microflora en periodontitis	Vivekananda (2010)

Fuente: Vicario Juan, 2012

3.1.11. Medios de Cultivo

Son preparados que intentan reproducir artificialmente las condiciones del hábitat natural de los agentes bacterianos. Sus componentes deben cubrir todas las necesidades nutricionales de las bacterias que se van a estudiar y deben incorporarse en una mezcla justa y equilibrada; esto permitirá su crecimiento y multiplicación, obteniéndose lo que se denomina un cultivo microbiano. La inoculación del microorganismo (o la muestra clínica que contenga) en un medio de cultivo se denomina siembra.

No todas las bacterias tienen las mismas características nutricionales; hay algunas poco exigentes que crecen en la mayoría de los medios, otras que necesitan algunas sustancias en particular, otras que son más difíciles de cultivar e incluso las hay que no crecen en ningún medio conocido hasta la fecha. Composición. Hay una gran cantidad de sustancias que se añaden a los medios de cultivo, ya que como se ha señalado, deben satisfacer todas las necesidades nutricionales.

A continuación se señalan las más importantes:

- Agua.
- Peptonas.
- Hidratos de carbono.
- Extracto de carne.
- Extracto de levadura.
- Suero o sangre de caballo o de carnero, líquido ascítico y vitaminas.

- Cloruro de sodio.
- Minerales y otras sustancias que los microorganismos no pueden sintetizar.
- Agentes solidificantes.

Clasificación de los medios de cultivo

Según su contenido

- Definidos o sintéticos
- No sintéticos o empíricos

Según su estado

- Líquidos
- Semisólidos
- Sólidos

Según su utilización en el laboratorio

- Básicos o comunes
- Enriquecidos
- Selectivos¹⁶

Elección del medio de cultivo

La elección del método depende de las necesidades locales y de los recursos disponibles.¹⁷

Pruebas de inhibición del crecimiento bacteriano

La prueba de sensibilidad antimicrobiana es una de las tantas armas con la que se cuenta en el laboratorio para ayudar a los

¹⁶ LIEBANA UREÑA. O. Cit. Pág. 83 -86

¹⁷ KONEMAN, Elmer "Diagnostico Microbiológico" 6ta Ed. Madrid: Editorial Medica Panamericana 2006. pág. 569

profesionales en medicina, controlar los procesos infecciosos que se desarrolla en los pacientes.

Pero para poder desarrollar todo el potencial con que se cuenta hay que cumplir con un requisito fundamental es necesario lograr el aislamiento del agente productor del cuadro clínico mediante los cultivos correspondiente.¹⁸

Ya que no se puede predecir la susceptibilidad de las bacterias, hongos y virus a los agentes antimicrobianos, con frecuencia es necesario estudiar la sensibilidad individual de cada patógeno a estas drogas, pudiendo elegir entonces el agente apropiado, que proporciona mayores posibilidades de una evolución favorable. Por supuesto, el resultado terapéutico final depende de muchas otras variables.¹⁹

Para el estudio de la sensibilidad in vitro de las bacterias es necesario poder conocer algunos conceptos básicos.

Rango.

Es el intervalo de concentraciones de un antibiótico en el que se sitúa la sensibilidad de una serie de cepas pertenecientes a una misma especie bacteriana (p.ej., 0.125ug/ml-64ug/ml), indica que estudiando el conjunto de cepas de una misma especie, la más sensible es inhibida con la primera concentración y la más resistente con la segunda).

Media.

¹⁸ HERRERA, Marco Luis. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños*. 1999, vol.34. http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1017-85461999000100010&script=sci_arttext

¹⁹ <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.pe/2014/10/halos-de-inhibicion.html>

Corresponde a la concentración que por término medio inhibiría el crecimiento de las cepas estudiadas pertenecientes a una misma especie. Concentración mínima inhibitoria (CMI). Es la menor concentración del antimicrobiano, expresada en ug/ml o mg/l, que inhibe el crecimiento visible de inóculo bacteriano estandarizado.

Concentración mínima bactericida (CMB).

Es la menor concentración de antibiótico, expresada en ug/ml o mg/l, que es capaz de matar al 99,9% de las bacterias de un cultivo estandarizado. CMI 90 y CMI 50.

Es la concentración mínima de antimicrobiano, expresada en ug/m, que inhibe, respectivamente, el 90 o el 50% de los microorganismos estudiados.

Valoración de la actividad in vitro

Para establecer el tratamiento de la mayoría de las enfermedades infecciosas resulta de gran ayuda conocer los agentes responsables de las mismas y la actividad que los antimicrobianos ejercen sobre ellos. El laboratorio de microbiología dispone de métodos que permiten evaluar la actividad in vitro de los antibióticos.

- Difusión en agar (disco-placa).
- E-test.
- Dilución en agar.
- Dilución en caldo. 110
- Actividad bactericida del suero (ABS).
- Curva de letalidad.
- Efecto post-antibiótico (EPA).
- Estudio de la asociación de los antibióticos.

- Método de dilución.

Dilución en agar

Se inoculan placas con concentraciones dobles progresivas de antibiótico y una testigo sin fármaco con varias cepas bacterianas. Tras la incubación pertinente se determinara la CMI de acuerdo con los criterios ya expuestos.

Dilución en caldo

Puede hacerse en forma de macrodilución o microdilución. Se emplea un inóculo bacteriano estandarizado y diluciones dobles progresivas de antibiótico.

Tras la incubación se hacen subcultivos en placas, y de esta forma se calculan las CMI y CMB en relación a un control sin fármaco.²⁰

Método difusión (kirby – Bauer)

Es una prueba de inhibición que se emplea para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterapéutico.²¹

Esta técnica consiste en que sobre el medio de cultivo incluido en una placa de Petri con un inóculo bacteriano estandarizado se colocan discos de antibióticos de una concentración determinada.

Según el diámetro de los halos de inhibición medidos en milímetros y de acuerdo con parámetros previamente establecidos, se obtienen diferentes calificaciones:

S, sensible, el antibiótico puede usarse en dosis terapéuticas

²⁰ LIEBANA UREÑA. O. Cit. Pág. 115-119

²¹ <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.pe/2014/10/halos-de-inhibicion.html>

R, resistente, el antibiótico no puede emplearse

Cuando los diámetros de los halos son inferiores a la calificación S pero superiores a la de R, surge la categoría I o intermedia; esta plantea dos alternativas, la primera cuando el antimicrobiano tienen un margen de seguridad de no producir efectos secundarios, con lo que podrá usarse en dosis superiores a las habitualmente consideradas como terapéuticas, y la segunda cuando el antibiótico carece de esos márgenes de seguridad y no podrá usarse en dosis altas.

3.2. Revisión de Antecedentes Investigativos

a. Título: EFECTO DE LOS PROBIÓTICOS EN LAS CONDICIONES PERIODONTALES

Autor: Marco Alarcón Palacios

Fuente: Revista Scielo Año 2010

Resumen: Los probióticos se definen como microorganismos que, administrados en cantidades adecuadas, brindan un beneficio en la salud del huésped. El efecto del tratamiento con probióticos viene siendo estudiado extensamente en una diversidad de indicaciones sistémicas y desórdenes médicos. Recientemente existe un gran interés en el control probiótico contra las infecciones orales más comunes como la caries dental y la periodontitis, sin embargo, la información disponible sobre los efectos de probióticos en la salud periodontal y sus condiciones clínicas es aún limitada. La presente revisión describe el conocimiento actual en bacterioterapia con probióticos desde una perspectiva en la salud oral y periodontal.

b. Título: LACTOBACILLUS REUTERI PRODENTIS COMO AGENTE PROBIÓTICO EN LA SALUD PERIODONTAL.

Autor: Mónica Vicario Juan

Fuente: Repositorio de Tesis de la Universidad Internacional de Cataluña.

Resumen: La presente investigación tuvo como objetivo analizar si el agente probiótico usado por el paciente causó algún efecto secundario adverso no deseado, así como la observación del factor “cumplimiento” por parte del paciente a la hora de seguir con las pautas asignadas por el protocolo de estudio.

Un total de 20 participantes fueron divididos aleatoriamente en dos grupos, el grupo test o en el grupo control. Los sujetos continuaron con sus normas habituales de dieta y de higiene oral y no pudieron usar durante el periodo de experimentación de 30 días ningún tipo de colutorio antiséptico o pauta antibiótica. Ninguno de ellos recibió tratamiento periodontal (ni profilaxis, ni raspados y alisados radiculares) durante el periodo de estudio.

Los hallazgos obtenidos sugieren que el uso del probiótico (Lactobacillus Reuteri Prodentis) en comprimidos orales es útil para el tratamiento de la inflamación y de los signos clínicos y parámetros microbiológicos involucrados en la periodontitis crónica inicial - moderada en pacientes adultos no fumadores.

En conclusión, la administración del agente probiótico Lactobacillus Reuteri Prodentis consiguió mejorar los parámetros clínicos de reducción de sondaje, sangrado al sondaje y niveles de placa bacteriana en pacientes no fumadores con periodontitis crónica iniciales – moderadas a corto plazo. Así mismo, se consiguió una reducción de la carga bacteriana total y en particular de

Porphyromona Gingivalis especialmente implicada en la destrucción de los tejidos periodontales.

c. Título: EFECTO INHIBITORIO IN VITRO DE UN BIOYOGURT CON CEPAS PROBIÓTICAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE STREPTOCOCCUS MUTANS ATCC 25175.

Autor: Ríos Caro, Teresa y Quispe Dionicio, Gary

Fuente: Revista Visión Dental, Edición Junio 2013.

Resumen:

Se realizó un estudio experimental, longitudinal y prospectivo. La población bajo estudio estuvo conformada por la totalidad de las placas petri de laboratorio conteniendo los microorganismos específicos dentro de su correspondiente medio de cultivo. Se excluyeron aquellas muestras de cultivos en los que se observó deficiencias en la manipulación. La presente investigación se ajusta a un diseño de pre prueba - post prueba en dos grupos experimentales.

Estableciéndose así una muestra conformada por 16 evaluaciones para cada grupo de estudio. El material biológico utilizado estuvo constituido por: Cultivo de Streptococcus mutans ATCC 25175, Bioyogurt LAIVE, conteniendo las 3 cepas probióticas (Lactobacillus paracasei subsp. Casei, Lactobacillus acidophilus, y Bifidobacterium) comercializado por la empresa Laive S.A. y Yogurt LAIVE, comercializado por la empresa Laive S.A. Se usaron 10 litros de bioyogurt y 10 litros de yogurt y se ajustó el pH en un rango de 6,5 a 7,0; luego se distribuyó en recipientes de plástico a razón de 100 ml cada uno, hasta alcanzar un total de 21 recipientes del yogurt y 21 recipientes del bioyogurt; luego, se

procedió a taparlos. Todos los recipientes fueron pasteurizados en baño maría a 90 °C por 2 min, se enfrió a temperatura ambiente y se midió el pH para tener un dato inicial de referencia.

Se conformaron dos sistemas de ensayos: Sistema 1 (Grupo Control): 21 recipientes con el cultivo de Streptococcus mutans ATCC 25175 con 100 ml del yogurt cada uno, el cuál no contiene cepas probióticas. Sistema 2 (Grupo Problema): 21 recipientes con el cultivo de Streptococcus mutans ATCC 25175 con 100 ml de bioyogurt con cepas probióticas cada uno.

Se determinó el efecto inhibitorio in vitro de cepas probióticas presentes en un bioyogurt comercial sobre el crecimiento de Streptococcus mutans ATCC 25175, comparado con un yogur comercial sin cepas probióticas sobre una muestra de 16 repeticiones para cada uno de los sistemas de ensayo.

El efecto inhibitorio comparado de ambos yogures establece una diferencia altamente significativa sobre crecimiento de Streptococcus mutans ATCC 25175 ($p < 0.05$).

d. Tema: EFECTO DE DOS PROBIÓTICOS QUE CONTIENEN CEPAS DE LACTOBACILLUS CASEI VARIEDAD RHAMNOSUS Y LACTOBACILLUS JOHNSONII SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO DE STREPTOCOCCUS MUTANS

Autor: M. Rebolledo; E. Rojas, F. Salgado.

Fuente: Revista Scielo, Año 2012

Resumen: Estudios previos señalan que el efecto de cepas probióticas inhibe la colonización de los patógenos responsables de la caries dental como el Streptococcus mutans, previniendo la aparición de la caries dental. El objetivo fue medir el efecto de las cepas probióticas Lactobacillus casei variedad rhamnosus

(LCR32) y *Lactobacillus johnsonii* (LA1) sobre el crecimiento in vitro de *Streptococcus mutans*. Se midió el efecto in vitro de las cepas de dos probióticos comercializados en Chile; *Lactobacillus casei* variedad rhamnosus (LCR32) contenidas en Lactil® y *Lactobacillus johnsonii* (LA1) contenidas en Chamyto, sobre el crecimiento in vitro de *Streptococcus mutans*. Se realizaron medios de cultivo selectivos para *Streptococcus mutans* a los cuales se les adicionaron cuatro diluciones diferentes de cada probiótico y se midió el halo de inhibición de los *Streptococcus mutans* con un pie de metro. Los probióticos con las cepas *Lactobacillus casei* variedad rhamnosus (LCR32) y *Lactobacillus johnsonii* (LA1) inhiben el crecimiento sobre *Streptococcus mutans*. El probiótico con la cepa *Lactobacillus casei* variedad rhamnosus (LCR35), mostró halos de inhibición más significativos en comparación a la cepa *Lactobacillus johnsonii* (LA1). Las cepas probióticas *Lactobacillus casei* variedad rhamnosus (LCR35) y *Lactobacillus Johnsonii* (LA1) disminuyen la colonización de las principales bacterias productoras de caries dental, de tal forma estos probióticos podrían ser utilizados como apoyo en la prevención y profilaxis de la enfermedad en pacientes de alto riesgo cariogénico, en forma adicional a otros medios de prevención.

e. Tema: EL CONTROL DEL BIOFILM Y LOS PROBIÓTICOS

Autor: Margarita Iniesta, Eduardo Montero, Milena Zurbriggen y David Herrera

Fuente: Revista Sepa España.

Resumen: En los últimos años, ha habido un creciente interés por los productos probióticos debido a su acción moduladora sobre la microbiología. El término “probiótico” se usa actualmente para designar a las bacterias que tienen un efecto beneficioso sobre los humanos y los humanos; y la literatura científica ha podido avalar este efecto beneficioso sobre la salud humana. Los probióticos también se están usando en el campo de las enfermedades periodontales, y la razón por la que los probióticos podrían tener una oportunidad en el cuidado de la salud periodontal estaría relacionada con el cuidado de las mismas: el biofilm dental. Por lo tanto es imprescindible aclarar si los probióticos pueden ejercer efecto sobre la microbiología periodontal.

Los antibióticos se utilizan de manera universal para prevenir y tratar las infecciones causadas por microorganismos endógenos y exógenos. La gran facilidad para disponer de antibióticos eficaces y baratos en la última mitad del siglo XX ha revolucionado el tratamiento de las enfermedades infecciosas y ha reducido el porcentaje de la mortandad, al menos en los países desarrollados. Sin embargo, el desarrollo de resistencias a un número cada vez más amplio de antibióticos por parte de algunos patógenos, es una de las razones por la que la investigación de los probióticos se ha convertido en un tema de actualidad.

En los últimos años, la investigación sobre los probióticos ha progresado considerablemente, lográndose avances en la caracterización de cepas probióticas concretas, en las cantidades y frecuencia de administración necesarias para obtener un efecto beneficioso, en su relación con ciertas patologías y en la seguridad en su consumo (Khani y cols. 2012.)

Desde luego, la mayor cantidad de investigación se ha realizado en el campo de las enfermedades extraorales, pero en relación con las patologías que puedan afectar a la cavidad oral existen numerosas áreas de aplicación abiertas, como son la caries, la candidiasis, la halitosis y las enfermedades periodontales, que requieren estudios de investigación que las avalen.

4. HIPÓTESIS

Dado que, los probióticos se definen como microorganismos que, liberan componentes antimicrobianos como ácidos orgánicos, ácidos grasos libres, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, los cuales pueden inducir una acción antagonista contra los organismos patógenos y administrados en cantidades adecuadas, brindan un beneficio en la salud del huésped.

Es probable que, alguna de las cepas probióticas: *L. Reuteri*, *L. Rhamnosus* o *L. Johnsonii* tenga mayor capacidad de inhibir el crecimiento in vitro del *Porphyromona Gingivalis*.



CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO

OPERACIONAL

II.- PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACIÓN

1.1. Técnica:

a. Precisión de la técnica

Se realizará mediante la observación y medición microbiológica laboratorial.

b. Estructura del instrumento

VARIABLE	TÉCNICA	INSTRUMENTO
Inhibición del Porphyromona Gingivalis	Medición	Ficha laboratorial de recolección de datos

c. Descripción de la técnica

- 1) La técnica se caracterizará por la realización de un bioyogurt casero, al que se le adicionarán las cepas probióticas, conformando tres grupos de muestra.
- 2) Se procederá a la reactivación de la cepa P. Gingivalis y su posterior siembra en caldos de cultivo para su crecimiento, las cuales se mantendrán en condiciones de anaerobiosis.

- 3) Se realizará la prueba de sensibilidad antimicrobiana con discos de papel filtro estériles, los que serán sumergidos con cada una de las muestras de yogurt con las cepas probióticas a investigar.

1.2. Instrumentos

a. Instrumento Documental:

1. Precisión del instrumento

Se utilizarán instrumentos de tipo elaborado, denominado **FICHA LABORATORIAL**

2. Estructura del instrumento

Medición Post test	Especie	Indicadores	ITEMS
24 horas	Cepa Porphyromona Gingivalis	Halo de inhibición	Medida en mm

3. Modelo del instrumento:

Véase en anexos.

1.3. Materiales

b. Instrumentos mecánicos

- Hojas de papel
- Lapicero

- Computadora y accesorios
- Placas Petri
- Asas estériles
- Tubos de ensayo
- Hisopos
- Mecheros
- Refrigeradora
- Autoclave
- Incubadora
- Pinzas
- Rejilla
- Cocina
- Cámara fotográfica

c. Materiales o insumos

- Agar sangre
- Papel filtro

2. CAMPO DE VERIFICACIÓN

2.1. Ámbito Espacial

La investigación se llevará a cabo en la ciudad de Arequipa, en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María.

2.2. Ámbito Temporal

La investigación se llevará a cabo en Setiembre y Octubre del 2016.

2.3. Unidades de Estudio

a. Unidades de análisis

Muestras biológicas (Placas Petri)

b. Alternativa de manejo

Grupos

c. Identificación de los grupos

La muestra total para la investigación es de tamaño 36, que se divide en tres submuestras de 12 unidades cada una.

d. Control de los grupos

d.1. Criterios de inclusión

- Cepas certificadas de Porphyromona Gingivalis (ATCC33277)
- Cepas comerciales de Lactobacillus Reuteri
- Cepas comerciales de Lactobacillus Rhamnosus
- Cepas comerciales de Lactobacillus Johnsonii

d.2. Criterios de exclusión

- Cepa de Porphyromona Gingivalis que no se la haya mantenido en refrigeración previo a su activación.
- Cultivos en los que no se respeten los parámetros establecidos de temperatura e incubación.
- Cultivos que no se respeten su condición estéril.
- Cultivos en los que no se respete su condición anaerobia.

2.4. Cuantificación de los casos

Para la comparación entre las tres cepas probióticas se empleará una prueba No Paramétrica (Kruskal Wallis).

Para obtener una muestra apropiada se trabajara con:

- a) Nivel de confiabilidad $(1-\alpha)$ del 95%, por lo que $\alpha=5\%$
- b) Nivel de potencia $(1-\beta)$ de 40%
- c) Error máximo permitido (expresados en desviaciones estándar) $\Delta=0.05$; es decir que el error máximo será igual a una desviación estándar de los datos.

Para calcular la muestra aplicamos la siguiente fórmula con sus parámetros correspondientes:

$$n = \frac{\lambda}{\Delta} =$$

Datos:

- n = Tamaño de la muestra
- λ Lambda = 0.575
- Δ Delta = nivel de error

Reemplazando:

$$n = \frac{\lambda}{\Delta} = \frac{0.575}{0.05} \approx 12$$

Entonces el número total de las muestras por cada subgrupo es de 12, siendo 36 la muestra total para la investigación.

3. ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.1. Organización

- Autorización del coordinador del laboratorio de la Universidad Católica de Santa María.

- Coordinación con el encargado del laboratorio a utilizar.
- Preparación de las unidades de estudio
- Formalización de las unidades de estudio
- Recolección de datos

3.2. Recursos

a. Recursos Humanos

Investigadora : Daniela Apaza Huamaní

Asesora : Dra. María del Socorro Barriga Flores

b. Recursos Físicos

Están dados por la Infraestructura de la Universidad Católica de Santa María.

c. Recursos Económicos

El presupuesto para la investigación será aportado por la investigadora.

4. ESTRATEGIA PARA MANEJO DE DATOS

4.1. Nivel de sistematización

4.1.1. Tipo de procesamiento

El procedimiento de datos se realizará manualmente.

4.1.2. Plan de procesamiento

- **Clasificación de datos**

Toda la información obtenida se ordenará en una matriz de sistematización cuyo detalle aparecerá en los anexos.

- **Plan de recuento**

Se realizará una matriz de datos y se contabilizarán manualmente.

- **Plan de análisis de datos**

Se realizará un análisis cuantitativo.

- **Plan de graficación**

Se utilizarán gráficos considerando la exigencia de los cuadros.

- **Plan de tabulación**

Se emplearán cuadros simples, que se ajusten a las necesidades de análisis y a los objetivos.

4.2. Nivel de estudio de datos

4.2.1 Metodología de interpretación

La interpretación se realizará en base a la comparación de datos y por la apreciación crítica.

4.2.2. Modalidad interpretativa

Se optará por una interpretación subsiguiente a cada cuadro y una discusión global de los datos.

CAPÍTULO III

RESULTADOS



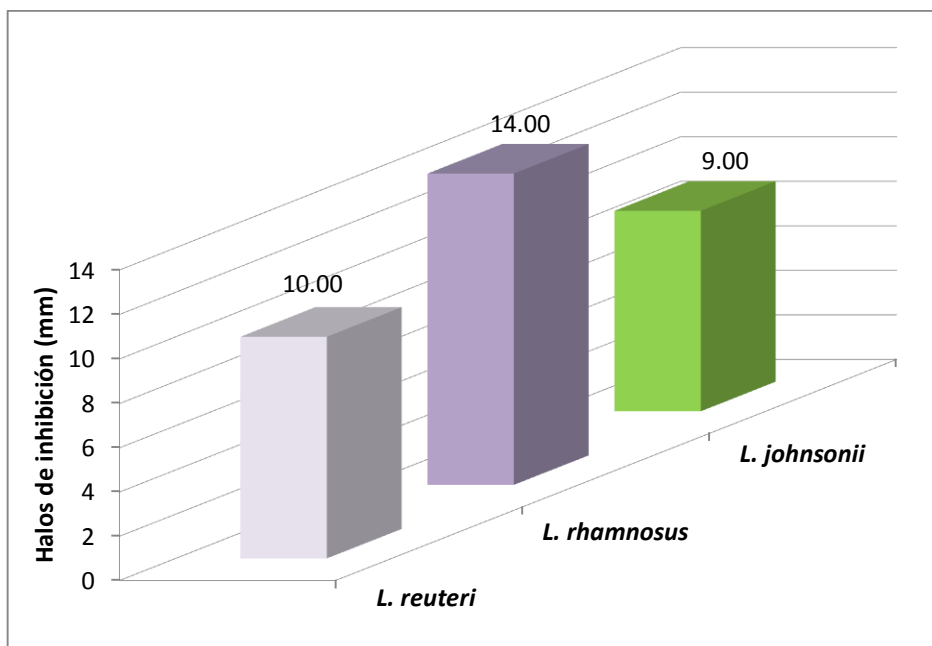
PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Tabla N°1. Mediciones de los halos de inhibición para las cepas probióticas

Repeticiones	Formación del halo de inhibición		
	L. reuteri (mm)	L. rhamnosus (mm)	L. johnsonii (mm)
1	8	10	8
2	10	12	8
3	10	10	6
4	8	10	9
5	8	13	6
6	10	10	8
7	10	14	8
8	10	12	6
9	8	10	8
10	10	12	6
11	9	11	8
12	10	12	8

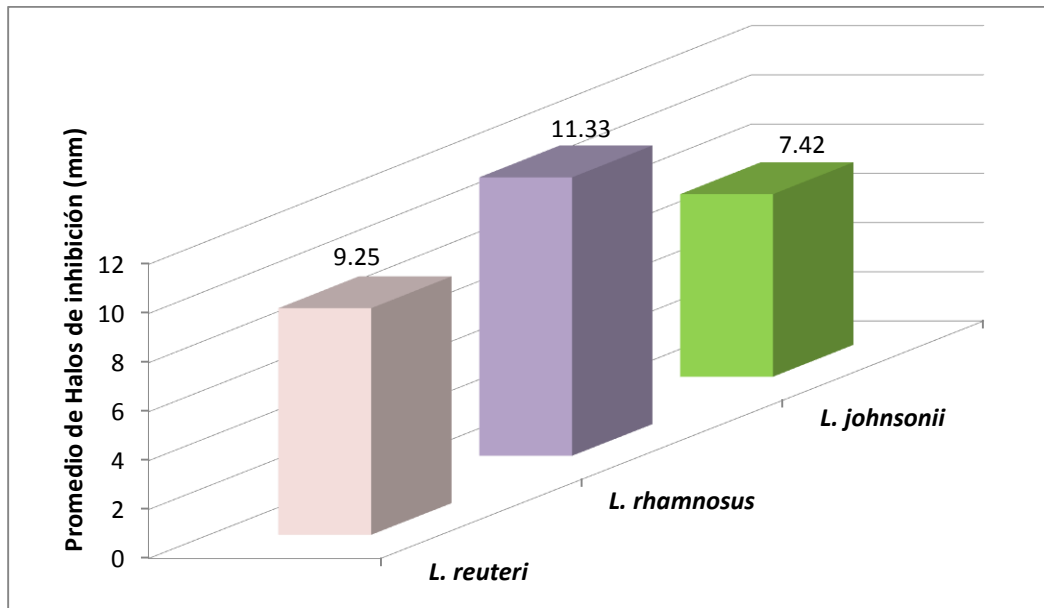
En la tabla N°1 se muestran las mediciones de los halos de medición de las cepas probióticas (L. Reuteri, L. Rhamnosus y L. Johnsonii) sobre la cepa Porphyromona Gingivalis.

Gráfico N°1. Valores máximos de halos de inhibición (mm) de las cepas probióticas sobre la Porphyromona Gingivalis



En el Gráfico N°1 se observa los valores máximos de inhibición en el crecimiento de la Porphyromona Gingivalis es 14 mm de halo de inhibición con la cepa *L. rhamnosus*, le sigue la cepa *L. Reuteri* con 10 mm y finalmente la *L. johnsonii* con 9 mm de inhibición.

Gráfico N°2. Efecto de inhibición de las cepas probióticas sobre la Porphyromona Gingivalis



En el gráfico N°2 se muestra el efecto de inhibición de las cepas probióticas sobre la Porphyromona Gingivalis, los valores mostrados es el promedio de las mediciones obtenidas donde de las tres cepas *L. Rhamnosus* es la que ha mostrado tener el más alto efecto antibacteriano sobre la Porphyromona Gingivalis con 11.33 mm de halo de inhibición y el que menor efecto antibacteriano es la cepa *L. johnsonii* con 9 mm de halo de inhibición.

Análisis Estadístico de los datos

Se realizó el análisis estadístico para lo cual se usó el software EXCEL y SPSS® Statistics Versión 22 con la finalidad de evaluar las mediciones de los halos de inhibición del crecimiento de la cepa *Porphyromona Gingivalis* para cada una de las cepas probióticas usadas en el ensayo, y determinar si hay diferencia significativa en el efecto antibacteriano entre las tres cepas probióticas.

Se evaluó los halos de crecimiento medidos en milímetros (mm), de las cuales para cada cepa probiótica se hizo 12 repeticiones.

Las mediciones de los halos de inhibición de cada cepa probiótica sobre la cepa *Porphyromona Gingivalis* fueron evaluadas mediante el Análisis Descriptivo.

Posteriormente se evaluó los supuestos de normalidad y varianzas homogéneas, para luego determinar la diferencia de medias a través de análisis de ANOVA DE UN SOLO FACTOR, en el caso que no se cumpla con los supuestos en mención se utiliza el análisis de PRUEBAS NO PARAMETRICAS.

1. Análisis de la variable

- Variable: Efecto antibacteriano
- Indicador: Halo de Inhibición (mm)
- Tipo de variable: Cuantitativo
- Escala de medición: Razón

2. Estadística descriptiva

El análisis de la variable se realizó a través de la estadística descriptiva en Excel Office®.

Tabla N° 2. Estadística descriptiva

	L. Reuteri (mm)	L. Rhamnosus (mm)	L. Johnsonii (mm)
Media	9.25	11.33	7.42
Error típico	0.28	0.40	0.31
Mediana	10.00	11.50	8.00
Moda	10.00	10.00	8.00
Desviación estándar	0.97	1.37	1.08
Coefficiente de variación	10.07	16.58	15.83
Varianza de la muestra	0.93	1.88	1.17
Curtosis	-1.86	-0.69	-1.38
Coefficiente de asimetría	-0.59	0.55	-0.52
Rango	2.00	4.00	3.00
Mínimo	8.00	10.00	6.00
Máximo	10.00	14.00	9.00
Suma	111.00	136.00	89.00
Cuenta	12.00	12.00	12.00
Mayor (1)	10.00	14.00	9.00
Menor(1)	8.00	10.00	6.00
Nivel de confianza (95.0%)	0.61	0.87	0.69

Según la tabla N°2 hay un límite superior e inferior de los datos, siendo los halos de inhibición más pequeños (de 6 a 9) para la cepa L. Johnsonii, le sigue la cepa L. Reuteri (de 8 a 10) y finalmente la más alta es la cepa L. Rhamnosus (de 10 a 14).

El análisis de las variables (3 cepas) permite tener tanto las medidas de tendencia central (media, mediana y moda) y las de variabilidad (varianza, desviación estándar y coeficiente de variación).

Es así que en la Tabla N°2 para las tres cepas tanto los valores de la media, mediana y moda están muy cerca entre ellos lo que podría indicar que los datos se encuentran dentro de la curva normal con una desviación estándar de los datos de 0.97 para *L. Reuteri* (que es la más baja de las tres, lo que permitiría presumir que hay poca variabilidad en sus datos), de 1.37 para *L. rhamnosus* y 1.08 para *L. johnsonii*.

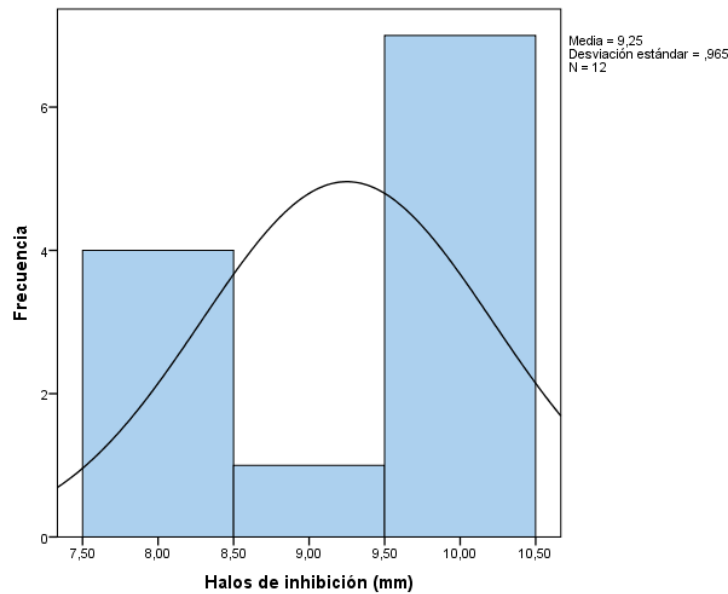
Cabe mencionar, sin embargo, éstos no determinan el comportamiento normal de las variables, solo nos dan la dispersión y distribución de los datos. La normalidad se determina por pruebas de Normalidad (descrito posteriormente).

La variabilidad en los datos para cada una de las variables según su coeficiente de variación y varianza es baja, como se presumía anteriormente para la cepa *L. Reuteri* con un coeficiente de variación de 10% de variación de sus datos, mientras que para *L. rhamnosus* hay un coeficiente de variación de 16.58% (es el más alto de las tres cepas) y de 15.83 para *L. johnsonii*, en éstos dos últimos hay mayor variación de los datos en sus repeticiones.

Además en los tres casos en los valores de la media, mediana y moda; la media es el menor valor de las tres, la mediana es mayor que la media, la moda (valor que más se repite) para el caso de *L. Reuteri* es igual a la mediana por lo cual existe una distribución asimétrica con cola a la izquierda (sesgada a la izquierda o asimetría negativa) con un coeficiente de asimetría de 0.55.

Este comportamiento se observa claramente en el histograma (Gráfico N°3) donde la barra entre los halos de inhibición de 9.50 y 10.50 hay una frecuencia de repetición de 7 veces.

Gráfico N°3. Histograma de la cepa L. Reuteri



Para el caso de *L. rhamnosus* la mediana es mayor que la media y la moda es menor que la media por lo cual existe una distribución asimétrica con cola a la izquierda (ligeramente sesgada a la izquierda o asimetría negativa) con un coeficiente de asimetría de 0.55.

Este comportamiento se observa claramente en el histograma (Gráfico N°4) donde la barra del halo de inhibición de 10 mm se presenta con una frecuencia de repetición de 5 veces.

Gráfico N°4. Histograma de la cepa L. rhamnosus

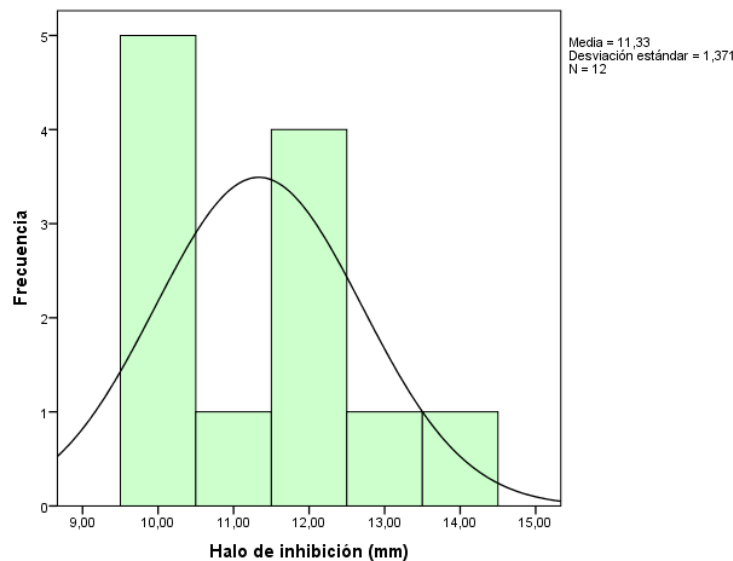
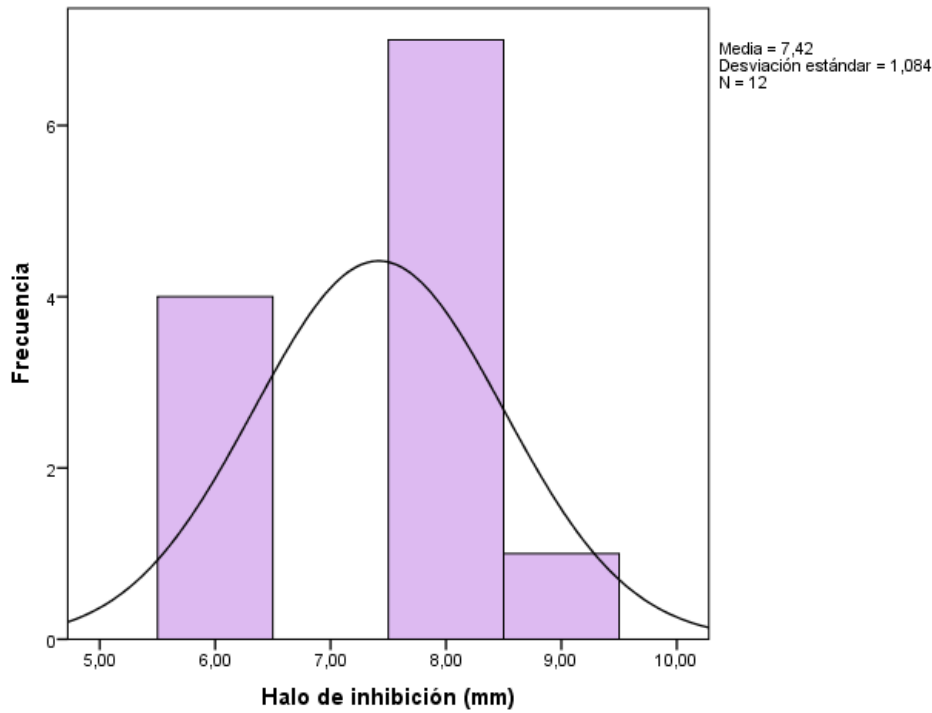
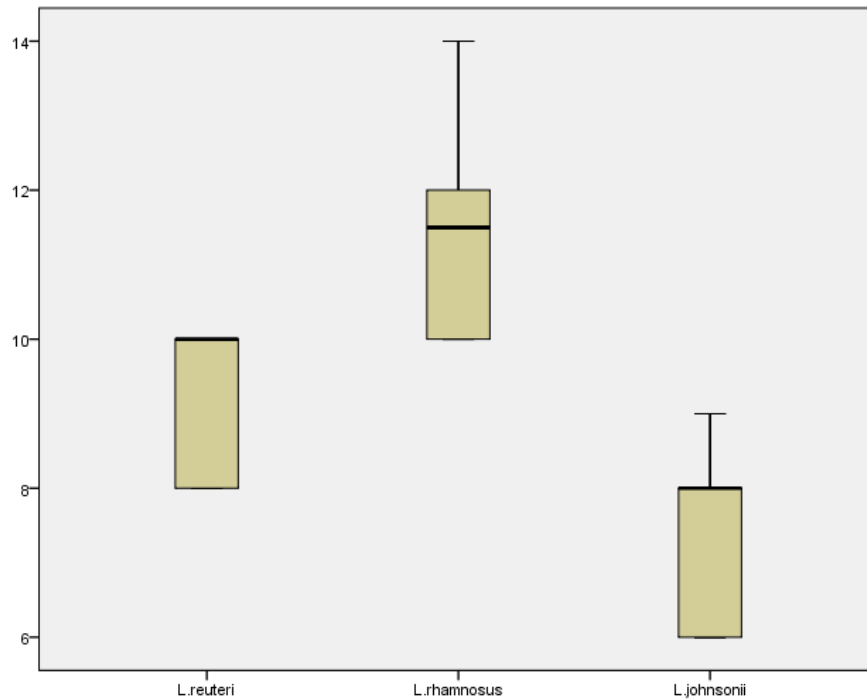


Grafico N°5. Histograma de la cepa L. johnsonii



Para el caso de *L. Johnsonii* la mediana es mayor que la media y la moda es igual que la mediana y mayor que la media, por lo cual existe una distribución asimétrica con cola a la izquierda (sesgada a la izquierda o asimetría negativa) con un coeficiente de asimetría de -0.52. Este comportamiento se observa claramente en el histograma (Gráfico N°5) donde la barra del halo de inhibición de 8 mm se presenta con una frecuencia de repetición de 7 veces. Siendo entre las tres cepas, esta última, la de menor halo de inhibición y la de mayor inhibición la cepa *L. rhamnosus*.

Gráfico N° 6. Diagrama de cajas de las cepas probióticas



En el gráfico N°6 se observa el diagrama de cajas o bigotes la cual sirve para evaluar gráficamente la distribución de las variables; donde para las tres cepas la distancia entre la mediana y los cuartiles varia bastante, ya que la línea que corresponde a la mediana no está ubicada en el centro de la caja más si existiendo una tendencia al lado superior (mayores valores). Lo que corrobora anteriormente en los gráficos de los histogramas; es decir presentan una asimetría negativa.

Cabe destacar que según el diagrama de cajas no se observan datos extremos u outliers para ninguna de las tres cepas probióticas.

3. Evaluación de supuestos de normalidad y homogeneidad

Tabla N° 3. Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
L. rhamnosus	,251	12	,035	,849	12	,036
L. johnsonii	,371	12	,000	,741	12	,002
L. Reuteri	,365	12	,000	,680	12	,001

a. Corrección de significación de Lilliefors

En el software SPSS ® Statistics Version 22 se realizó la prueba de Normalidad (Tabla N°3), donde los valores de significancia (Sig.) son menores a 0.05 (p) por lo que las cepas probióticas utilizadas no poseen una distribución normal (0.036; 0.02 y 0.01 son menores que 0.05).

Al no poseer una distribución normal, estas variables no cumplen con los requisitos para aplicar el ANOVA, por lo que se le aplicaran un análisis NO PARAMÉTRICO.

4. Análisis no paramétrico

Dentro del análisis no paramétrico, se utilizó la prueba de Kruskal Wallis; la cual fue realizada usando el software SPSS ® Statistics Version 22. Para lo cual se definió una hipótesis y determinó los estadísticos.

- **Definición de Hipótesis:**

Ho: No hay diferencia significativa entre las tres cepas probióticas frente a la *Porphyromona Gingivalis*.

Hi: Si hay diferencia significativa en al menos una de las tres cepas probióticas frente a la *Porphyromona Gingivalis*.

- **Estadístico de Kruskal Wallis:**

Según la Tabla N°4 siendo el estadístico de Chi cuadrado (6000) y el valor de Sig, asintótica 0.423 mayor que 0.05 (p), se acepta la hipótesis nula (Ho), es decir, no hay diferencia significativa entre las tres cepas probióticas frente a la *Porphyromona gingivalis* a un 95% de significancia.

Tabla N°4. Estadísticos de prueba a,b

	L. Reuteri	L. Rhamnosus	L. Johnsonii
Chi-cuadrado	6,000	6,000	6,000
Gl	6	6	6
Sig. Asintótica	,423	,423	,423

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Repeticiones

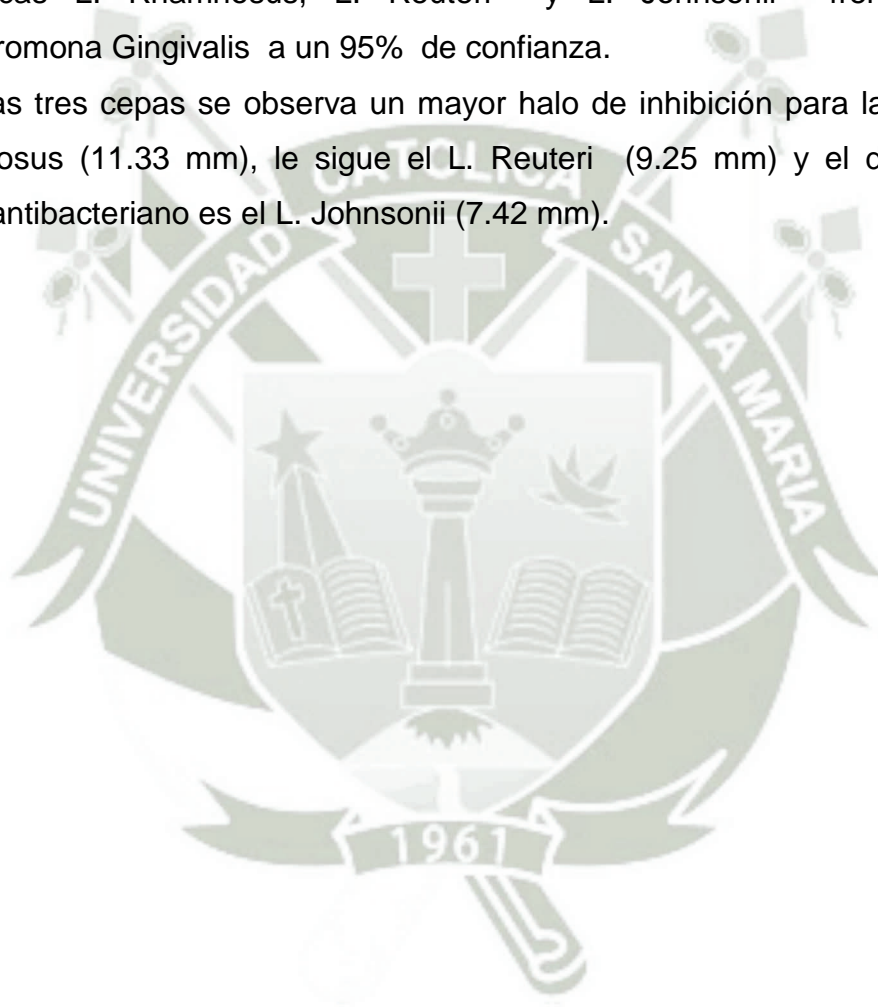
c. Se basa en 10000 tablas de muestras con una semilla de inicio 2000000.

Sin embargo, de las tres cepas el L. Rhamnosus posee el mayor efecto inhibitorio de crecimiento contra la *Porphyromona Gingivalis*, le sigue el L. Reuteri y el de menor efecto antibacteriano es el L. Johnsonii.

CONCLUSION:

Los datos de las mediciones de los 3 halos de inhibición no presentan una normalidad según la Prueba de normalidad realizada, por lo que no se puede realizar un ANOVA (ANDEVA). Por lo tanto, se realizó una prueba no paramétrica. Según el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis no existe diferencia significativa de los efectos antibacterianos entre las cepas probióticas *L. Rhamnosus*, *L. Reuteri* y *L. Johnsonii* frente a la *Porphyromona Gingivalis* a un 95% de confianza.

De estas tres cepas se observa un mayor halo de inhibición para la cepa *L. Rhamnosus* (11.33 mm), le sigue el *L. Reuteri* (9.25 mm) y el de menor efecto antibacteriano es el *L. Johnsonii* (7.42 mm).



DISCUSIÓN

Actualmente, tras numerosas investigaciones se asocia a la enfermedad periodontal con alteraciones sistémicas, como resultados adversos del embarazo, enfermedades cardiovasculares, respiratorias y diabetes mellitus, debido a la gran cantidad de superficie de epitelio ulcerado de las bolsas que permite el paso de numerosas bacterias.

Uno de los tratamientos para la periodontitis es el pulido y alisado radicular, con el objetivo de controlar la infección, eliminando los microorganismos patogénicos que se encuentran en el biofilm subgingival y en otros nichos, sin embargo este tratamiento no siempre es efectivo, dado que las bacterias, agentes patógenos y el agente hospedero están demostrando resistencia incluso a terapia antibiótica, por este motivo es que se está buscando nuevas modalidades de tratamiento.

Se ha reportado que tras la administración de probióticos existe mayor nivel de inserción clínica y disminución de la profundidad al sondaje, índice de placa, índice de sangrado y recuento de periodontopatógenos en los pacientes con periodontitis crónica.

Roberts y Darveu, 2002: En el campo de la enfermedad periodontal, se sugiere que los probióticos podrían suprimir la aparición de los patógenos endógenos, o prevenir la sobreinfección con patógenos exógenos, o incluso podrían también protegernos a través del fomento de una respuesta del huésped beneficiosa.

En la investigación los datos de las mediciones de los 3 halos de inhibición no presentan una normalidad según la Prueba de normalidad realizada, por lo que no se puede realizar un ANOVA (ANDEVA).

Por lo tanto, se realizó una prueba no paramétrica, según el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis no existe diferencia significativa de los efectos

antibacterianos entre las cepas probióticas *L. Rhamnosus*, *L. Reuteri* y *L. Johnsonii* frente a la *Porphyromona Gingivalis* a un 95% de confianza.

De estas tres cepas se observa un mayor halo de inhibición para la cepa *L. Rhamnosus* (11.33 mm), le sigue el *L. Reuteri* (9.25 mm) y el de menor efecto antibacteriano es el *L. johnsonii* (7.42 mm).

De esta manera se verificó la afirmación anterior; es decir que en ningún caso se pudo afirmar que dos probióticos produjeron halos de igual magnitud.

Coincidiendo con las investigaciones anteriores se confirma que no todos los probióticas tienen efecto inhibitorio sobre ciertas bacterias orales.



CONCLUSIONES

PRIMERA

- Se determinó mediante el presente estudio que el *Lactobacillus Reuteri*, posee un efecto inhibitor sobre el crecimiento in vitro de *Porphyromona Gingivalis*, microorganismo predominante en la enfermedad periodontal crónica, con un halo de inhibición de (9.25 mm).

SEGUNDA

- Se determinó que *Lactobacillus Rhamnosus* presenta un efecto inhibitor sobre el crecimiento in vitro de *Porphyromona Gingivalis*, con un halo de inhibición de (11.33 mm).

TERCERA

- Se determinó que *Lactobacillus Johnsonii* posee un efecto inhibitor sobre el crecimiento in vitro de *Porphyromona Gingivalis*, con un halo de inhibición de (7.42 mm).

CUARTA

- Se determinó que el probiótico que posee mayor efecto inhibitorio es el *Lactobacillus Rhamnosus*.

QUINTA

- Con estas conclusiones queda verificada la hipótesis de investigación.

RECOMENDACIONES

PRIMERA

- A pesar de que en la actualidad existen numerosas investigaciones científicas que respaldan a la bacterioterapia o terapia probiótica, se recomienda realizar más estudios in vitro que determinen el efecto inhibitor de otro tipo de bacterias probióticas del género *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* sobre *Porphyromona Gingivalis*.

SEGUNDA

- Realizar estudios in vitro que determinen el efecto inhibitor de bacterias probióticas sobre otros géneros de bacterias periodontopatógenos.

TERCERA

- Realizar estudios “in vivo” que evalúen el comportamiento de las cepas probióticas *Lactobacillus Reuteri*, *Lactobacillus Johnsonii* y *Lactobacillus Rhamnosus* en la cavidad oral.

BIBLIOGRAFÍA

- Jay Lindhe, Thorkild Karring, Niklaus P. Lang, Periodontología clínica e implantología odontológica 5° Edic. 2008.
- LIEBANA UREÑA. “Microbiología oral” 2da ed. Interamericana-McGraw Hill, 2002. Composición y ecología de la microbiología oral.
- MOUTON, Christian BACTERIOLOGIA BUCODENTAL. Editorial Masson S.A. Madrid. España. 1995
- Negroni Marta, Microbiología estomatológica, fundamentos y guía práctica, 2ª ed, Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Rodríguez Gómez, Juan Miguel, Microorganismos y salud: Bacterias lácticas y bifidobacterias probióticas, Editorial Complutense, 2008.

HEMEROGRAFÍA

- Collins, J. (3 de Junio de 1993). Effects of a combination therapy to eliminate Porphyromona gingivalis in refractory periodontitis. *Journal Periodontology* 64, 998-1007. Recuperado el 5 de Noviembre de 2015
- Frías López, M. C., & Herrera, J. I. (16 de Junio de 2007). Diagnóstico de la enfermedad periodontal basado en la respuesta del huésped. *Cient. dent*, 4, 63-73.
- Hanioka, T., Takaya, K., Matsumori, Y., Matsuse, R., & Shizukuishi, S. (16 de Abril de 2000). Relationship of the substance P to indicators of host response in human gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol*, 27(4), 262-266.
- Hatakka, k., & Cols. (2007). Probiotics reduce the prevalence of oral candida in the elderly- a randomired controlled trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 36, 506- 513.


INFORMATOGRAFÍA

- <http://www.scielo.cl/pdf/piro/v3n3/art07.pdf>
- Quintessenz Journals
https://www.sepa.es/images/stories/SEPA/REVISTA_PO/articulos.pdf/22-4_05.pdf
- http://www.iosrphr.org/papers/v2i4/Part_4/H0244146.pdf
- http://Revista_Vision_Dental_Junio_2013.pdf
- <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/130016/Efecto-del-consumo-de-leche-enriquecida-con-probi%C3%B3ticos-lactobacilos,-en-%20la-incidencia-de-lesiones-de-caries-en-ni%C3%B1os-preescolares.pdf?sequence=1>
- <http://www.revistahigienistas.com/new/doc/PREMIOMARISACASARES2015.pdf>
- <http://medind.nic.in/iaa/t13/i11/iaat13i11p524.pdf>
- http://dspace.ceu.es/jspui/bitstream/10637/7953/1/Estudio%20experimental%20del%20uso%20de%20Lactobacillus%20reuteri%20DSM%2017938%20y%20ATCC%20PTA%205289%20sobre%20%C3%ADndices%20de%20salud%20bucodental%20en%20una%20poblaci%C3%B3n%20escolar_Tesis_Carla%20Borrell%20Garc%C3%ADa.pdf



ANEXO N° 1

Autorización del uso de laboratorio


100-3344
AREQUIPA - PERU

Universidad Católica de Santa María

(51 54) 382038 Fax: (51 54) 251213 ucsm@ucsm.edu.pe <http://www.ucsm.edu.pe> Apartado: 1350

UCSM-COORD.LAB-024-2016- 2016

APAZA HUAMANI, DANIELA

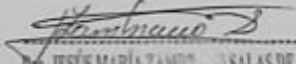
Arequipa, 2016-10-11

Pase a los Asistentes de Laboratorio:

<i>Sra Sofia Ayahuana</i>	<i>Horario: Lab H 402</i>
<i>Jenes, Martes</i>	<i>Martes, Viernes 7.00 - 11.00</i>
<i>Sra Rocío Rodríguez</i>	<i>Martes, Jueves 14.00 - 18.00</i>
<i>Sábado</i>	<i>Sábado 7.00 - 11.00</i>

Se autoriza el uso del LABORATORIO *H-402*, para que el Sr(a)(ta)(s) alumno(a)(s) de ODONTOLOGIA, pueda ejecutar el trabajo de investigación titulado: "ESTUDIO IN VITRO DEL EFECTO INHIBITORIO DE UN BIOYOGURT CON CEPAS PROBIOTICAS: L.REUTERI, L. RHAMNOSUS, L. JOHNSONII SOBRE EL CRECIMIENTO DEL PORPHYROMONA GINGIVALIS, EN LOS LABORATORIOS DE LA UCSM, AREQUIPA, 2016"., previa coordinación de horario.

Atentamente,


JESÚ MARÍA ZAMUDIO SALAS DE CALLE
COORDINADORA DE LABORATORIOS
Y CABINETES
UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ANEXO N° 2

FICHA DE OBSERVACIÓN LABORATORIAL

Muestras	Halo de inhibición (mm)		
	L. Reuteri	L. Rhamnosus	L. Johnsonii
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			

ANEXO N°3

MATRIZ DE SISTEMATIZACIÓN DE DATOS

Muestras	Halo de inhibición (mm)		
	L. Reuteri	L. Rhamnosus	L. Johnsonii
1	8	10	8
2	10	12	8
3	10	10	6
4	8	10	9
5	8	13	6
6	10	10	8
7	10	14	8
8	10	12	6
9	8	10	8
10	10	12	6
11	9	11	8
12	10	12	8



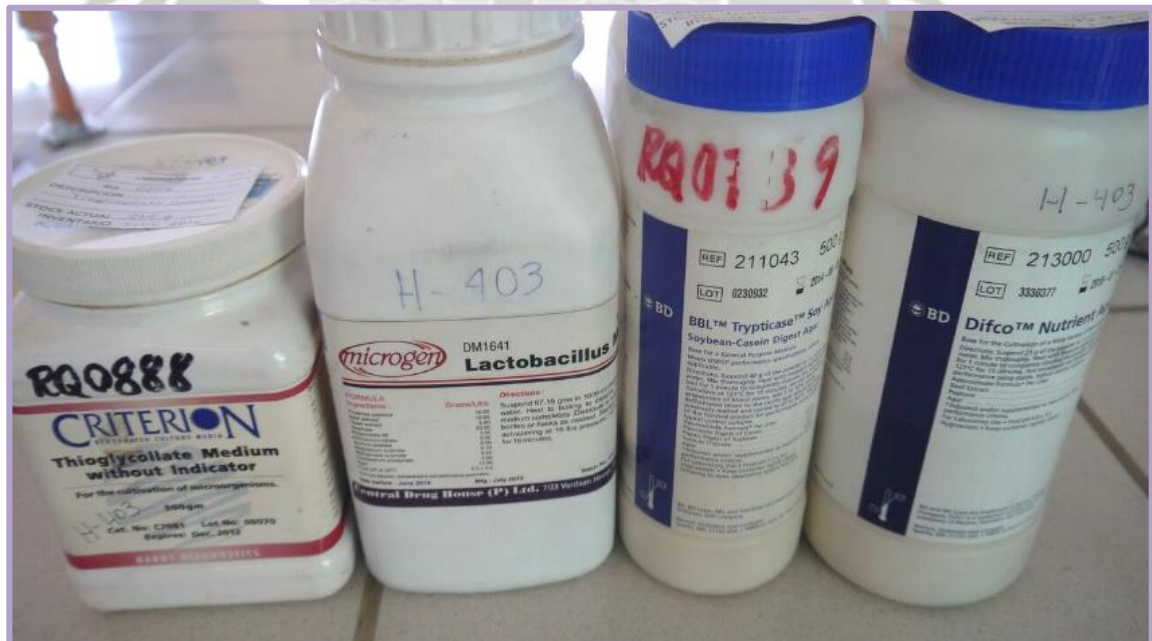
ANEXO N°4

SECUENCIA FOTOGRÁFICA

1. Adquisición de las cepas certificadas de Porphyromona Gingivalis



2. Medios de cultivo



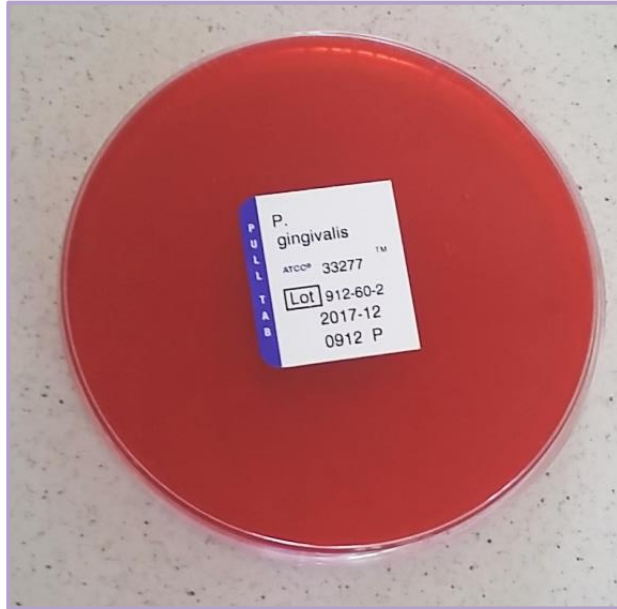
3. Preparación de los medios de cultivo



4. Medios autoclavados, para el plaqueado correspondiente.



5. Activación de las cepas

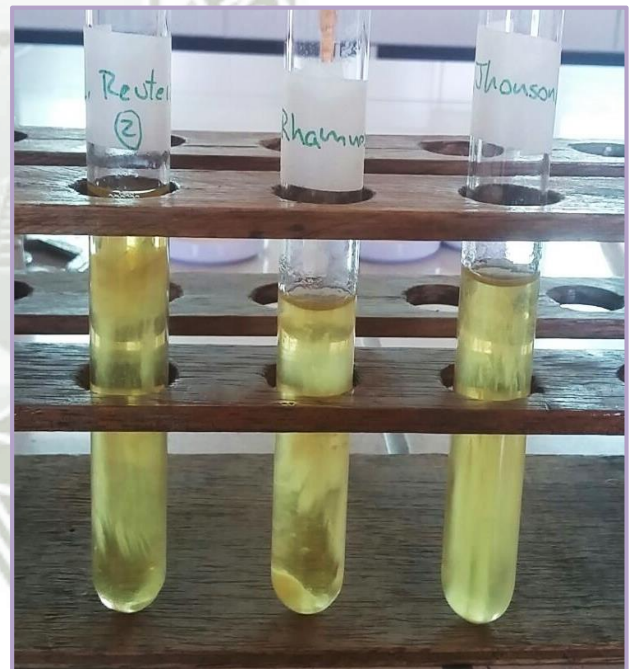


6. Siembra de los probióticos en Agar Rogosa





7. Crecimiento de *Lactobacillus* en Agar Rogosa y replicación en caldo Tioglicolato



8. Inoculados los probióticos en el bioyogurt, se realiza la preparación del campo para colocar los agentes antimicrobianos con discos de difusión.



9. Colocados los discos de difusión en cada resiembra, estas son guardadas en la cámara de anaerobiosis por el lapso de 24 horas, para observar el halo de inhibición de cada probiótico y continuar con la medición correspondiente.

