



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

**EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DE LOS
PROBIÓTICOS *Lactobacillus rhamnosus GG* (ATCC 53103) Y
Bifidobacterium bifidum (ATCC 11863) CONTRA *Streptococcus
mutans* (ATCC 25175) Y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)**

TESIS

Para optar el título profesional de:

CIRUJANO DENTISTA

AUTOR

María del Carmen De Lama Odría

ASESOR DE TESIS

Dra. Juana del Valle Mendoza

**Lima, Perú
2015**

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a quien me ha enseñado más que nadie en la vida. A aquella persona que con paciencia me reveló la clave de vivir plenamente. A quien demostró que los fracasos son las mejores formas de aprender, siempre y cuando se realicen con el amor más puro y desinteresado.

A ti Francisco Odría Lack, tata, cada página de este escrito.

A mis padres, quienes nunca se dan por vencidos conmigo, siendo mi guía y aliento.

A la Dra. Dafna Geller, porque sin su apoyo y confianza no hubiera llegado a esta etapa.

AGRADECIMIENTOS

*A mi asesora, la Dra. del Valle, quien se
convirtió en mi mentora en el apasionante
mundo de la investigación.*

*A mis padres, por su amor, paciencia y
apoyo incondicional.*

*A mi hermana, por ser fuente de honestidad
e inspiración en los momentos que más lo
necesité durante el desarrollo de mi tesis.*

*A cada miembro del equipo de investigación
de la universidad que participó en
la ejecución de esta tesis, especialmente a*

Carmen Tinco Valdez, por su dedicación e invaluable amistad.

RESUMEN

Introducción: Actualmente, existe un alto consumo de probióticos debido a su capacidad de combatir microorganismos patógenos. Pese a ello, existe poca evidencia científica del efecto de éstos sobre la microbiota oral.

Objetivo: Evaluar la capacidad antimicrobiana del *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG) y del *Bifidobacterium bifidum* frente a la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* y su antagonista *Streptococcus sanguinis*.

Materiales y Métodos: Para este estudio experimental *in vitro*, se utilizaron cepas de *S. mutans* (ATCC 27175), *S. sanguinis* (ATCC10556), LGG (ATCC 53103) y *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 11863). Las dos primeras cultivadas en caldo Brain Heart Infusion (BHI) y las dos últimas en *Man Rogosa Sharpe* (MRS), incubadas en condiciones de anaerobiosis, a 37°C, durante 72 horas. Se prepararon 4 grupos de estudio: prueba de inhibición de *S. mutans* por LGG y *B. bifidum* (grupo 1); de *S. sanguinis* por LGG y *B. bifidum* (grupo 2); de LGG por *S. mutans* y *S. sanguinis* (grupo 3) y de *B. bifidum* por *S. mutans* y *S. sanguinis* (grupo 4). El efecto inhibitorio se evaluó con la prueba de difusión con pocillos, los cuales contenían el inóculo de la bacteria seleccionada como agente antibacteriano. El agar BHI contenía el cultivo del microorganismo que se buscaba inhibir. La clorhexidina fue el control positivo del crecimiento bacteriano en agar y las bacterias periopatógenas los cultivos indicadores del efecto antibacteriano de los probióticos.

Resultados: El LGG y el *B. bifidum* demostraron no tener un efecto antibacteriano frente al *S. mutans* y *S. sanguinis*.

Conclusiones: Los probióticos LGG y *Bifidobacterium bifidum* no poseen un efecto antibacteriano contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*, siendo de relevancia clínica para la adecuada elección de microorganismos para las nuevas estrategias preventivas de caries en base a terapias de reemplazo.

Palabras claves: Efecto antibacteriano, probiótico, *Lactobacillus rhamnosus GG*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*

ABSTRACT

Introduction: Nowadays there is a high consumption of probiotics in food products due to its ability to fight pathogens. However, less is known of the effects of probiotics in oral microbial ecology.

Aim: To determinate the antimicrobial effect of the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium bifidum* against the cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and its antagonist *Streptococcus sanguinis*.

Material and methods: For the present experimental study *in vitro*, strains of *S. mutans* (ATCC 27175), *S. sanguinis* (ATCC10556), LGG (ATCC 53103) and *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 11863) were used. The two first bacteria were grown in Brain Heart Infusion broth (BHI) and the rest in Man Rogosa Sharpe (MRS). The samples were incubated under anaerobic conditions at 37 °C for 72 hours. For inhibition tests, four groups were prepared: *S. mutans* inhibition by LGG and *B. bifidum* (1); *S. sanguinis* inhibition by LGG and *B. bifidum* (2); LGG inhibition by *S. mutans* and *S. sanguinis* (3) and *B. bifidum* inhibition by *S. mutans* and *S. sanguinis* (4). The inhibitory effect was evaluated with the cup-plate diffusion method in which each well contained 100 µL of the bacteria selected as inhibitory agent. The wells were made on a BHI agar containing the microorganism to be inhibited. Chlorhexidine was the positive control of agar bacterial growth and periopathogenic bacteria the indicators of the antibacterial effect of probiotics.

Results: LGG and *B. bifidum* proved to have no antibacterial effect against *S. mutans* and *S. sanguinis*.

Conclusion: The probiotics LGG and *Bifidobacterium bifidum* do not have antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*, being these results of clinical relevance for the future selection criteria of the microorganisms designated to be part of the new strategies for caries prevention based on bacterial replacement therapies.

Keywords: Growth inhibition, probiotic, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	
II.1 Planteamiento del problema	3
II.2 Justificación	5
III. MARCO CONCEPTUAL	6
IV. OBJETIVOS	
IV.1 Objetivo general	22
IV.2 Objetivos específicos	22
V. HIPÓTESIS	23
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	
VI.1 Diseño de estudio	24
VI.2 Población y muestra	24
VI.3 Operacionalización de variables	25
VI.4 Técnicas y procedimientos	27
VI.5 Plan de análisis	37
VI.6 Consideraciones éticas	38
VII. RESULTADOS	39
VIII. DISCUSIÓN	41
IX. CONCLUSIONES	51
X. BIBLIOGRAFÍA	52
GLOSARIO	
ANEXO	

I. INTRODUCCIÓN

La cavidad oral se caracteriza por poseer una exuberante y heterogénea comunidad de microorganismos. Esta microbiota tiende a organizarse en una biopelícula que recubre las diversas estructuras que conforman esta cavidad, permitiendo que cada célula de este ecosistema microbiano establezca una relación que regule la expresión génica y la supervivencia. En condiciones normales, un delicado equilibrio se mantiene entre los organismos patógenos, los organismos que otorgan beneficios al individuo y la respuesta inmune de este último.^(1,2) Sin embargo, la desestabilización de la relación entre estos componentes cumple un rol importante en el desarrollo de diversas patologías orales, siendo la caries dental una de las más prevalentes.⁽²⁾ Esta enfermedad se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública a tratar, siendo clasificada como la tercera calamidad sanitaria mundial (después de las enfermedades cardiovasculares y el cáncer).⁽³⁾

En una época de la odontología enfocada en la prevención, se ha iniciado la búsqueda de nuevas estrategias para evitar la formación de lesiones de caries que no estén exclusivamente orientadas al uso de agentes antimicrobianos o anti-adhesivos que afectan a las especies bacterianas relacionados con la etiología de esta enfermedad, sino que también permitan la manipulación y control del desarrollo de específico de los microorganismos cariogénicos en la biopelícula normal mediante la implantación de especies inocuas.^(4,5) Este concepto de terapia de reemplazo ha sido presentado recientemente en el área de la odontología como una alternativa prometedora después de los resultados exitosos del uso de probióticos en el campo de

la medicina. ⁽⁵⁾ La capacidad de los probióticos de modular los parámetros inmunológicos, de ayudar en la absorción de minerales, de sintetizar bacteriocinas y producir ácido láctico (disminuye el pH del medio), han brindado a estos microorganismos gran importancia clínica, permitiendo su uso para la inhibición de bacterias en el tracto digestivo (*Clostridium*, *Salmonella*, *Shigella* o *E. coli*). ^(6,7)

Debido a estas ventajas clínicas y al hecho de que se ha establecido su alto consumo por medio de alimentos fermentados (yogurt, yogurt de soya u otros suplementos de la dieta), se han realizado algunos estudios *in vitro* y ensayos clínicos con el objetivo de determinar si los probióticos también podrían alterar el patrón de colonización de bacterias patógenas en la cavidad oral. Sin embargo, los resultados presentados aún son poco concluyentes y, en algunos casos, contradictorios, no ampliándose en estas situaciones el estudio sobre el efecto que podrían tener las bacterias orales sobre los probióticos al no poder ser inhibidas por estos últimos. ^(2,6)

Por ello, se decidió, por medio de la presente investigación, analizar la efectividad de los probióticos *Lactobacillus rhamnosus GG* y *Bifidobacterium bifidum* como agentes antimicrobianos contra la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* y su antagonista *Streptococcus sanguinis*.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

II.1 Planteamiento del problema

Hasta la actualidad, los diversos tratamientos implementados para la prevención de caries dental se han enfocado en la eliminación y control de las bacterias cariogénicas mediante el uso de agentes químicos como la clorhexidina y los fluoruros. A pesar de que estos agentes han tenido resultados favorables, ninguno ha podido evitar la reaparición de las colonias cariogénicas, la reinfección por fuentes externas y, especialmente, no son específicos por lo que también implican la inhibición del crecimiento de otros microorganismos no patógenos en la cavidad oral. ⁽⁸⁾

Ante esta situación, la terapia de reemplazo con probióticos ha surgido como una novedosa alternativa con la cual se buscaría promover la eliminación selectiva de microorganismos relacionados a la etiología de la caries dental, evitando su colonización. Por otro lado, sería un abordaje preventivo de fácil implementación diaria por encontrarse éstos de por sí incluidos en la dieta de las personas a través del consumo de alimentos fermentados y otros que los contengan. ^(2,8)

No obstante, a pesar de los estudios *in vitro* y ensayos clínicos realizados sobre el tema, los resultados aún son poco concluyentes y, en algunos casos, contradictorios, sin ahondar estas investigaciones en el efecto que podrían tener estas bacterias orales al no ser inhibidas sobre la función de los probióticos en la cavidad oral. ^(2,6) Esto

demuestra la necesidad de profundizar la investigación en esta área, sugiriéndolo como una línea de trabajo científico aplicada al campo de la odontología.

Por ello, la evaluación del efecto antimicrobiano de dos de los probióticos más utilizados en la industria alimentaria, el *Lactobacillus rhamnosus GG* y el *Bifidobacterium bifidum*, contra la bacteria *Streptococcus mutans* se presentó como un tema de investigación de gran importancia clínica. Al mismo tiempo, determinar el efecto de estas especies probióticas contra una bacteria antagónica al *Streptococcus mutans*, el *Streptococcus sanguinis*, permitió ampliar el conocimiento del comportamiento de los estreptococos orales en presencia de estos microorganismos, aportando una mayor información sobre el efecto de los probióticos sobre la microbiota oral a ser considerada en el futuro para el diseño de nuevas estrategias de prevención de la caries dental por medio de terapias de reemplazo bacteriano.

Por lo expuesto anteriormente, se formuló la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto antimicrobiano de las bacterias probióticas *Lactobacillus rhamnosus GG* y *Bifidobacterium bifidum* contra las bacterias *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*?

II.2 JUSTIFICACIÓN

El siguiente trabajo de investigación presenta una importancia social, debido a que permite establecer si los probióticos de mayor consumo poseen un efecto antimicrobiano capaz de favorecer diariamente al consumidor en la protección de las piezas dentarias de la colonización por bacterias cariogénicas. Estos conocimientos podrían ser considerados en el futuro para escoger adecuadamente las especies probióticas durante la planificación de programas de salud pública en los que se desee incluir terapias de reemplazo.

Por último, rescata una importancia teórica, debido a que aporta conocimientos sobre el efecto antimicrobiano *in vitro* de las bacterias *Lactobacillus rhamnosus GG* y *Bifidobacterium bifidum* contra las especies *S. mutans* y *S. sanguinis*.

III. MARCO CONCEPTUAL

Efecto antibacteriano

Un agente antibacteriano es una sustancia química u orgánica capaz de inhibir el desarrollo o el crecimiento de las bacterias sin comprometer la integridad del organismo portador o infectado. El efecto antibacteriano se refiere a la forma en la que el agente alcanza el resultado esperado contra una especie bacteriana específica.⁽⁹⁾

Se pueden diferenciar tres tipos de efectos antibacterianos. El primero se refiere al efecto bacteriostático mediante el cual se inhibe el crecimiento, pero las células bacterianas no mueren. En este caso, los agentes antibacterianos comúnmente se unen a los ribosomas e inhiben la síntesis proteica. El tipo de unión es débil, por lo que la liberación de los ribosomas se puede producir, reanudándose el crecimiento bacteriano.⁽⁹⁾

El segundo efecto es el bactericida mediante el cual los agentes antibacterianos matan a las células bacterianas sin producir la ruptura o lisis de las mismas. El tercer efecto es el bacteriolítico. Éste se define como el efecto que causa la muerte de las células bacterianas por medio de la lisis de aquellas que conforman el cultivo.⁽⁹⁾

Respecto a las pruebas para analizar el efecto antimicrobiano, existen diversas técnicas, las cuales se encuentran comprendidas en dos grandes grupos. El primero corresponde a las pruebas cualitativas destinadas para determinar si un

microorganismo es resistente, susceptible o posee una susceptibilidad intermedia al agente antibacteriano. Por otro lado, el segundo grupo comprende las técnicas que permiten determinar las concentraciones en las cuales el agente ejerce un efecto bacteriostático y bactericida.⁽¹⁰⁾

Las técnicas más representativas del primer grupo son la de Kirby-Bauer y la de difusión en discos en agar variante de pocillo (conocida en inglés como *cup-plate diffusion method*). La primera es indicada para determinar el efecto antimicrobiano de un agente contra especímenes de relevancia clínica. Ésta consiste en la inoculación del organismo que se desea inhibir en una solución de medio de cultivo líquido selectivo, para luego incubarlo a 37° C por 2-4 horas. Seguidamente, 0.1 ml del caldo es sembrado sobre la superficie del medio sólido Mueller-Hinton, distribuyendo adecuadamente el inóculo con ayuda de un hisopo. Esta preparación es incubada *overnight* a la misma temperatura mencionada anteriormente. Para la colocación de los discos impregnados con el agente en prueba, un máximo de seis unidades de 5-8 mm es permitido en la placa Petri de 100 mm de diámetro. De acuerdo a los resultados, el microorganismo se puede considerar sensible, con sensibilidad intermedia o resistente a la sustancia evaluada.⁽¹¹⁾ Para los países del continente americano, los procesos de esta metodología se encuentran estandarizados por el *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. Esta institución publica anualmente una guía actualizada.⁽¹²⁾

En relación al método de difusión en agar variante de pocillos, éste difiere del de Kirby-Bauer en la preparación de pocillos o reservorios por perforación del agar, los

cuales contienen el agente evaluado a una concentración determinada, entrando en mayor contacto con el microorganismo inoculado previamente en el agar antes de solidificarse. Esta técnica es mayormente utilizada para evaluar la susceptibilidad de algunos microorganismos a un extracto etanólico. ⁽¹³⁾ Para llevar a cabo las pruebas de inhibición con esta técnica, se debe dejar enfriar el agar recién autoclavado hasta que alcance una temperatura de entre 40°-50°C. Luego, se agrega inmediatamente la muestra del microorganismo a inhibir a una concentración bacteriana similar a la establecida con la escala 0.5 de McFarland. Paso seguido, la mezcla es homogenizada y repartida en las placas Petri. Después de la solidificación del agar, pocillos de entre 5 y 8 mm de diámetro son realizados en el agar por perforación. ⁽¹⁴⁾ En estos pocillos se incorporan 100 µL del agente inhibidor, llevando posteriormente las placas a cultivar considerando las condiciones de crecimiento del microorganismo inoculado en el agar. ⁽¹³⁾

En el grupo de las pruebas de susceptibilidad cuantitativas podemos encontrar las técnicas de macro y microdilución en caldo, las cuales son empleadas para determinar la mínima concentración inhibitoria (MIC) y la mínima concentración bactericida (MBC). ⁽¹⁰⁾ La primera se lleva a cabo preparando una dilución del agente antimicrobiano en estudio con un factor de dilución 1:2 en un medio líquido de cultivo y a un volumen final de 1-2 mL. Luego, los tubos que contienen las diluciones son inoculados con el microorganismo que se busca inhibir en una concentración estándar (escala 0.5 de McFarland). Este cultivo es incubado overnight para después analizar la presencia de crecimiento, evidenciada por el grado de turbidez del medio. La segunda técnica se diferencia de la primera debido a que, en

lugar de utilizar tubos para realizar las diluciones seriadas, se emplean placas de microdilución (comúnmente de 96 pocillos) que poseen fondo plano y que permiten trabajar con volúmenes finales en microlitros, variando éstos entre 100 y 200 μL . A cada pocillo de la placa que posee una dilución del agente antimicrobiano se le adicionan entre 1-5 μL del cultivo microbiano en la misma concentración que la estipulada para las otras pruebas mencionadas. ⁽¹⁰⁾

Streptococcus mutans

Esta bacteria fue descrita por Clarke en 1924, quien la aisló de las muestras de placa de zonas donde se presentaban lesiones de caries o de la saliva de personas con alta actividad de caries. Le dio su nombre de *mutans* debido a que, tras la tinción Gram, observó que poseía una forma más ovalada que redondeada, lo que la hacía parecer una forma “mutante” de un *Streptococcus* convencional. ⁽¹⁵⁾ Esta cepa bacteriana es genéticamente heterogénea y se puede subdividir en distintos tipos en relación a las estructuras antigénicas. Esto nos da como resultado ocho serotipos, designados por letras de la “a” a la “h”. ⁽¹⁵⁾

Este microorganismo es de tipo Gram positivo, anaerobio facultativo, no móvil, catalasa negativo, no esporulado. Fermenta el manitol y sorbitol. Utiliza la sacarosa para sintetizar glucanos solubles y es alfa hemolítico en el agar de sangre. Su pared celular está principalmente conformada por ácidos teicoicos y recubierta por una cápsula o glucocalix. ⁽¹⁶⁾

El *S. mutans* es capaz de formar biopelículas por medio de un número de mecanismos, incluyendo la expresión de adhesinas (SpaP) en su superficie. Esta bacteria hace contacto con las glucoproteínas salivales que recubren estas superficies. A este evento le siguen dos etapas de adhesión, seguidas de la formación de la biopelícula. La primera etapa es reversible y depende de la cantidad de sustrato en boca, es decir, sacarosa. Cuando esta última está disponible en boca, las glucotransferasas bacterianas son mediadoras de adhesión al sintetizar glucanos solubles e insolubles en agua. Estos glucanos también interactúan con proteínas de unión de superficie para promover la agregación célula-célula. ⁽¹⁷⁾

Otro mecanismo estudiado es por medio de la síntesis de polisacáridos extracelulares e insolubles ⁽¹⁸⁾. Al mismo tiempo, la adhesión es mediada por vías sacarosa-dependientes o independientes. Se describen a los segundos como los responsables de la adhesión a los componentes de la película adquirida del esmalte, mientras que los primeros son los responsables de establecer la colonización de las superficies dentarias. Se piensa que la vía sacarosa-independiente está influenciada por el antígeno I/II, una proteína designada como P1, SpaP, Sr, PAc o antígeno B. Las proteínas de esta familia de antígeno se diferencian con respecto al tipo de unión, sea con una aglutinina salival, componente de la película salival o con otra bacteria de la placa dental. Con respecto a la vía sacarosa-dependiente, ésta se encuentra principalmente mediada por la acción de las glucosiltransferasas (GTFs), encargadas de la síntesis de glucanos solubles o insolubles (mayor importancia en la colonización de superficies lisas). Este proceso consiste en la división de la

molécula de sacarosa en glucosa y fructuosa. Las GTFs relacionadas con el *S. mutans* son la *gtfB*, *gtfC* y *gtfD*.^(19,20)

El *S. mutans* contiene una vía glucolítica por medio de la cual se produce lactato, acetato y etanol como productos de la fermentación. El primero es de abundancia proporcional a la concentración de glucosa. Actualmente, se trata de proponer terapias de reemplazo con *S. mutans* deficientes de lactato deshidrogenasa, de forma que se pueda reducir la actividad cariogénica. Cuando aumenta la producción de ácidos y disminuye el pH del medio, los protones del medio externo poseen la capacidad de permeabilizar la membrana y acidificar el citoplasma. Por ello, es de suma importancia el rol de la ATPasa translocadora de protones, ya que mantiene los gradientes de concentración entre el medio externo e interno. Al mismo tiempo, los ácidos grasos que componen la membrana de la bacteria cambian su configuración, de forma que se disminuye la permeabilidad a los protones. El mecanismo de acción de la ATPasa translocadora de protones y el cambio en la expresión de genes y proteínas constituyen la respuesta de ácido tolerancia (ATR).⁽¹⁹⁾

Se ha reconocido en la actualidad que el *S. mutans* depende de un sistema de *Quorum-sensing* esencial para la competencia genética. Los genes *comC*, *comD* y *comE* codifican un precursor de “péptido estimulante de competencia” (CSP).⁽¹⁸⁾ Este *Quorum-sensing* funciona de forma óptima cuando las células se encuentran en una biopelícula de crecimiento constante. En un estudio de Yung Hua-Li y cols. en el 2002, se demostró que el *S. mutans* usa una forma de secreción de CSP típica de los Gram positivos que le permite determinar la densidad de las células bacterianas

circundantes, permitiendo mantener la competencia genética. Este sistema está relacionado con la respuesta bacteriana para la resistencia del incremento de acidez del medio. En este estudio también se demostró que la alteración del gen *comC* (inhabilitando la producción o secreción de CSP) lleva a la formación de una biopelícula con arquitectura amorfa, mientras que la alteración de los genes *comD* y *comE* está relacionada con aquellas de densidad reducida. ^(18, 21)

El medio de cultivo y aislamiento más indicado para este tipo de bacterias es el Agar Mitis Salivarius Bacitracina, compuesto de sacarosa al 20% (15% más que el Agar Mitis Salivarius convencional) y con un suplemento de 0.2u/ml de bacitracina. Además, cuenta con telurio potásico, azul trispán y cristal violeta, los cuales actúan como sustancias inhibitorias. ⁽²²⁾

El otro medio de cultivo utilizado es el Brain Heart Infusión (BHI) del cual el *Streptococcus mutans* obtiene nitrógeno orgánico, azufre y vitaminas a partir de su composición de infusión de cerebro y corazón y peptona. La fuente de carbohidratos es la glucosa. Además, el pH es de 7,4; ajustado con fosfato disódico de hidrógeno para satisfacer los criterios de rendimiento bacteriano. ⁽²³⁾

Streptococcus sanguinis

La bacteria *Streptococcus sanguinis* es miembro del grupo de *Streptococcus Viridans*, Gram positiva, alfa hemolítica, catalasa negativa, anaerobia facultativa, no esporulada que no fermenta manitol ni sorbitol. Se caracteriza por ser una de las primeras colonizadoras de los dientes y por presentarse como uno de los principales

componentes bacterianos de la placa dental, interfiriendo con la colonización por *Streptococcus mutans*.⁽²⁴⁾

Streptococcus sanguinis posee la capacidad de incorporar ADN extracelular libre en el ambiente, estableciendo una competencia genética que es un rasgo compartido con otras estreptococos orales como el *Streptococcus mutans*. Para esta competencia, los genes *comC*, *comD* y *comE* codifican un precursor de “péptido estimulante de competencia” (CSP) para la amplificación de los productos génicos de la bacteria cuando la concentración celular del medio alcanza densidades críticas.⁽²⁴⁾

Esta bacteria produce peróxido de hidrógeno como subproducto de su metabolismo aeróbico y por la acción de enzimas oxidadas como la piruvato oxidasa y la NADH oxidasa. Su producción está relacionada a la competencia entre especies bacterianas en el medio. La función del peróxido de hidrógeno es reducir el crecimiento de microorganismos co-resistentes. Es por medio de la producción de este compuesto que se demostró la actividad antagónica contra el *Streptococcus mutans*. Para la producción de H₂O₂ se requiere la expresión del gen *spxB* para la descarboxilasa SpxB.⁽²⁵⁾

El mecanismo de resistencia de esta bacteria a bajos niveles de pH está constituido por una bomba translocadora de protones, la misma que posee función ATPasa. El menor pH óptimo para la función de esta bomba determina la resistencia ácida del *S. sanguinis*. Para el *S. sanguinis*, el pH óptimo es de 6; correspondiéndole a este microorganismo la capacidad de resistir eficientemente en medios con un pH de hasta 7. Esto se debe a que la resistencia al ácido es dependiente de la permeabilidad

de las membranas bacterianas a los protones, la cual está dictada por un flujo de salida activo a través de las bombas translocadoras de protones. ⁽²⁶⁾

Por otro lado, el *Streptococcus sanguinis* es uno de los agentes causales principales de la endocarditis bacteriana, relacionada a sus diversos factores de virulencia. Uno de ellos es la hidrólisis de nucleótidos de ATP y ADP por nucleotidasas ubicadas en la pared celular. Este proceso modula la agregación plaquetaria de manera negativa, debido a que la adenosina que se produce con la actividad enzimática es antagónica a este tipo de agregación celular. La principal nucleotidasa es la ecto-5'-nucleotidasa o Nt5e. ⁽²⁷⁾

Probióticos

Los probióticos han sido definidos en el 2001 por la Organización Mundial de la Salud y la Organización de Alimentos y Agricultura como microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, otorgan beneficios de salud al huésped. ^(1,2)

El concepto de los probióticos nace en el año 1908 cuando el científico ruso Elie Metchnikoff sugirió que la larga vida de los pastores búlgaros podría ser resultado del consumo de leche fermentada y sus productos. Su hipótesis era que cuando se consumen los bacilos, sus productos influían en la microbiota colónica, de manera que disminuía el efecto tóxico de los productos bacterianos comunes. ⁽¹⁾ El término "probiótico" fue utilizado por primera vez por Lilly y Stillwell en el año 1995, palabra derivada de la lengua griega y que significa "para la vida". ⁽²⁸⁾ Los primeros

estudios clínicos fueron realizados a partir de 1930, evaluando el efecto de los probióticos como tratamiento de la dificultad evacuatoria intestinal. ^(1,2)

Las bacterias probióticas más utilizadas pertenecen al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. De la familia de los *Lactobacillus*, tenemos *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GG, *L. johnsonii*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. paracasei*. De la familia de los *Bifidobacterium* tenemos *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*, *Bifidobacterium* DN-173 010. ⁽¹⁾

Los mecanismos de acción que explican los efectos benéficos de los probióticos incluyen la modulación de la respuesta inmune del huésped, degradación de toxinas, competencia con el agente patógeno por nutrientes, factores de crecimiento, adhesión y alteración de la actividad metabólica de los microorganismos de una localización específica. ⁽²⁹⁾ Además, los probióticos producen diversas bacteriocinas, las cuales son toxinas proteicas sintetizadas en el ribosoma. Estas proteínas, descubiertas en 1925 por Gratia, pueden ser clasificadas en cuatro grupos. Las de clase I, como la nisina, son péptidos de pequeño peso molecular. Las de clase II corresponden a los péptidos con peso molecular menor a 10 kDa. Este grupo puede ser dividido a su vez en clase IIa (de actividad antilisterial, amplio rango de actividad) y en clase IIb (bacteriocinas circulares de amplio efecto sobre la permeabilidad de la membrana y la formación de la pared celular). Las de clase III corresponden a las de peso molecular mayor de 30 kDa y las de clase IV son básicamente glucoproteínas o lipoproteínas. ⁽³⁰⁾

Para el estudio del efecto de los probióticos en la cavidad oral, los medios de administración escogidos han sido el uso de tabletas, pastillas, queso, yogurt, enjuagues bucales, líquidos (como la leche fermentada) o cápsulas. ⁽¹⁾

Respecto a lo que los probióticos puedan lograr en la cavidad oral, se sospecha que estos pueden controlar la caries dental debido a su acción inhibitoria de estreptococos. ^(1,2) De esta manera, los probióticos tendrían una interacción directa con la placa dental, impedirían la adhesión de los microorganismos orales a las proteínas de la película adquirida, regularían la permeabilidad de la mucosa, tendrían un efecto sobre el sistema inmune local y producirían antioxidantes. ⁽¹⁾

Lactobacillus rhamnosus GG

El *Lactobacillus* es una de las bacterias más utilizadas como probióticos, perteneciente a la familia de bacterias ácido lácticas. Es Gram positiva, no esporulada, y anaerobia. Taxonómicamente, pertenece al *phylum Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Lactobacillaceae*. Requieren medios de crecimiento ricos en carbohidratos, aminoácidos, péptidos, ácidos grasos, sales, derivados de ácidos nucleicos y vitaminas. ⁽³¹⁾ Este microorganismos recibió el nombre de sus descubridores, Sherwood Gorbach y Barry Goldin. ⁽³²⁾

Estas bacterias expresan ligandos para los receptores tipo Toll (TLRs), los cuales inician la respuesta inmune por medio del reconocimiento de los agentes patógenos por parte de las células epiteliales. Éstas, al estar en contacto con lo probióticos, expresan y sintetizan IL-8 y TNF- α . ⁽²⁹⁾

Por otro lado, estos microorganismos producen durante el metabolismo anaerobio de carbohidratos ácidos grasos de cadena corta como el fórmico, acético y propiónico, además del ácido láctico. Estos ácidos poseen la habilidad de atravesar las membranas celulares, disociarse en el ambiente más alcalino del citoplasma, para luego acidificarlo. ⁽²⁹⁾

Por las características mencionadas anteriormente, se le atribuyen al *Lactobacillus rhamnosus GG* diversos efectos positivos en la salud, como la prevención y tratamiento de la diarrea aguda infantil, la prevención de la diarrea asociada a antibióticos y la prevención y tratamiento de alergias. ⁽³²⁾ Así mismo, su adhesión a la mucosa intestinal puede persistir por más de una semana después de la ingesta y su administración en mujeres embarazadas ha reportado la colonización de éste probiótico en sus hijos hasta los 24 meses de edad. ⁽³²⁾

Por ellos, sus efectos positivos en el huésped han generado interés en el campo de investigación de la odontología, especialmente porque se conoce que es capaz de colonizar la cavidad oral y ser cultivada hasta después de 2 semanas de la ingesta. ⁽³²⁾

Bifidobacterium bifidum

Género de bacteria Gram positiva, anaerobia, no mótil, catalasa negativo. Esta bacteria fermenta glucosa, transformando la molécula en tres moles de acetato y dos de lactato. La vía metabólica que utiliza esta especie es la de hexosa fosfocetolasa y pentosa fosfocetolasa. Algunas especies producen exceso de ácido acético. ⁽³³⁾

El *Bifidobacterium bifidum* (*B. bifidum*) es el tipo más utilizado como probiótico. Protege al cuerpo de la invasión de patógenos como la *Salmonella* y rotavirus. Actualmente, es utilizado para la protección contra infecciones intestinales y diarreas y se está estudiando el rol que desempeña en la supresión de tumores y la reducción de inflamación. Este tipo de bacteria digiere lactosa, produce ácido láctico y acético, además de fermentar fibra indigerible, produciendo mayor energía. Ayuda a la síntesis de vitaminas y ayuda en la absorción de minerales como el calcio, magnesio y zinc. ⁽³³⁾

Entre las investigaciones realizadas para determinar el efecto de los probióticos en la cavidad oral, se puede encontrar la de Näse y cols. en el año 2001. Ellos realizaron un estudio aleatorio de doble ciego para examinar si el uso de leche con contenido de LGG tendría un efecto en la caries dental y el riesgo a padecerla. Para ello, participaron 594 niños de 1-6 años de edad, provenientes de 18 guarderías municipales. Los niños recibieron la leche por 5 días a la semana, durante 7 meses. Se comparó la salud oral de los niños antes y después del estudio. El riesgo de caries se determinó por medio de bases microbiológicas, midiendo el nivel de *S. mutans* de placa y saliva. Los resultados mostraron la disminución de lesiones de caries en el grupo que ingirió la leche con probióticos y menor conteo de *S. mutans*, concluyéndose que el probiótico LGG posee un efecto beneficioso sobre la salud oral de los niños. ⁽³⁴⁾

En el año 2002, Ahola y cols. analizaron si el consumo a corto plazo de queso con *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Lactobacillus rhamnosus* LC 705 podía ayudar a disminuir el conteo de bacterias asociadas a la caries dental. Para ello, 74 individuos de entre 18 y 35 años participaron del estudio aleatorio a doble-ciego, controlado contra placebo. La intervención fue de 3 semanas, proporcionándoles a los participantes 15 g de queso 5 veces al día. Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con lo que respecta al conteo de *S. mutans* al final de la intervención, pero sí durante el periodo post-tratamiento ($p=0.05$). Sin embargo, la disminución fue sólo del 20%.⁽³⁵⁾

Ese mismo año, Comelli y cols. llevaron a cabo un estudio para seleccionar los probióticos con las mejores propiedades para prevenir la caries dental. Se examinaron 23 microorganismos, identificando en el *S. thermophilus* y dos *L. lactis* la capacidad de adhesión a la hidroxiapatita recubierta por componentes salivales. Estas bacterias pudieron ser incorporadas con éxito en la biopelícula dental, creciendo con éxito junto con cinco bacterias naturales de la placa supragingival. Por otro lado, *L. lactis* NCC2211 pudo modular el crecimiento de las bacterias orales, disminuyendo la colonización de *S. oralis*, *V. dispar* y de *S. sobrinus* OMZ176.⁽³⁶⁾

Ampliando el conocimiento sobre el efecto de otras cepas probióticas sobre el *S. mutans*, Chung y cols. publicaron en el 2004 los resultados de la investigación en la que evaluaron si el *L. fermentum* podía inhibir la formación de glucanos insolubles por parte del *S. mutans*. Al mismo tiempo, evaluaron el efecto inhibitorio de la

bacteria oral S11 aislada de la saliva de niños sin caries dental y con poca o nada de placa dental supragingival. Esta bacteria demostró un 99,5% de similitud con la bacteria *L. fermentum*, identificada por medio de sus características bioquímicas y la secuencia 16S ADNr. Ambas bacterias inhibieron la formación de glucanos insolubles del *S. mutans* Ingbritt, de manera que se afectaba su adhesión, más no su multiplicación. ⁽³⁷⁾

Ese mismo año, Montalto y cols. evaluaron a 35 individuos, dividiéndolos en tres grupos de estudio, para recibir el probiótico *Lactobacillus* o un placebo durante 45 días. El grupo A (n=14) recibió probióticos en cápsulas y un placebo en medio líquido. El grupo B (n=16) recibió el probiótico en medio líquido y el placebo en cápsulas, mientras que el C (n=5) utilizó el placebo tanto en medio líquido como en cápsulas. Al final, se evaluaron las UFC/mL tanto del *Lactobacillus* como del *S. mutans*. Ellos observaron con sus resultados que el conteo de *Lactobacillus* aumentaba en la saliva sea con la administración con cápsulas o medio líquido ($p=0.005$ y $p=0.02$, respectivamente). La población del estreptococo oral se mantuvo invariable. ⁽³⁸⁾

Un año después, Caglar y cols. investigaron el efecto del *Bifidobacterium* DN-173010 sobre el número de *S. mutans* y *Lactobacillus* tras el consumo de corto plazo. El número total de participantes fue de 21 pacientes adultos evaluados en 4 periodos. Durante el 2° y 4° periodo (2 semanas entre ellos) se pidió a los participantes ingerir 200g de yogurt que contenía el probiótico mencionado una vez al día o un yogurt control sin esta bacteria. Los periodos 1 y 3 fueron de control y de

limpieza, respectivamente. Ellos encontraron una reducción estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de los estreptococos orales. También existió una reducción en el conteo de *Lactobacillus*, mas ésta no fue significativa. ⁽³⁹⁾

En el 2007, Stamatoya y cols. realizaron un estudio *in vitro* con el objetivo de determinar la habilidad de los probióticos *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* y *L. rhamnosus GG* para adherirse a superficies de hidroxiapatita cubiertas por componentes salivales. Los resultados demostraron que la adhesión del *L. rhamnosus GG* es mayor que la de la otra bacteria. Sin embargo, posee menor frecuencia de adhesión, por lo que se recomendaba el uso de *L. delbrueckii subsp bulgaricus* para futuras investigaciones en ambientes orales. Por otro lado, se encontró que estas bacterias producían un efecto inhibitorio de *P. gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* y especies de estreptococos. ⁽⁴⁰⁾

Al año siguiente, Caglar y cols. realizaron ensayo clínico aleatorio con 24 participantes (promedio de edad 20 años), los cuales fueron evaluados en 4 periodos. Durante el 2° y 4° periodo (10 días entre ellos), los participantes ingirieron una vez al día 100 mL de helado que contenía el probiótico *Bifidobacterium lactis* Bb-12 o un helado placebo. Los periodos 1 y 3 eran para control y limpieza. Ellos observaron una reducción estadísticamente significativa del conteo de *S. mutans* después del consumo del helado con probiótico. También observaron una reducción tras el consumo del helado control, mas no fue significativa. ⁽⁴¹⁾

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo General

Evaluar *in vitro* el efecto antimicrobiano de los probióticos *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) y *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 11863) contra cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

IV.2 Objetivos Específicos

1. Comparar el efecto antimicrobiano de la bacteria *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) y *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 11863) contra *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).
2. Comparar el efecto antimicrobiano de la bacteria *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) y *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 11863) contra *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).
3. Evaluar el potencial efecto inhibidor del *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y el *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) sobre el probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103).
4. Evaluar el potencial efecto inhibidor del *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y el *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) sobre el probiótico *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 11863).

V. HIPÓTESIS

Las bacterias probióticas *Lactobacillus rhamnosus GG* y *Bifidobacterium bifidum* poseen un efecto antimicrobiano contra el *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Diseño de estudio

El presente estudio fue de tipo experimental *in vitro*.

VI.2 Población y muestra

La unidad de análisis estuvo conformada por un pocillo en una placa Petri, la cual contenía el cultivo del microorganismo que se buscaba inhibir. Cada pocillo contuvo el inóculo de las bacterias seleccionadas para ser evaluadas de forma independiente como agentes antibacterianos biológicos.

Las muestras fueron divididas originalmente en dos grupos. El primero correspondió a las pruebas de inhibición de *S. mutans* por *L. rhamnosus GG* y *B. bifidum* y el segundo de *S. sanguinis* por *L. rhamnosus GG* y *B. bifidum*. No obstante, tras los resultados obtenidos con la prueba piloto, se decidió agregar los siguientes grupos de estudio: pruebas de inhibición de *L. rhamnosus GG* por *S. mutans* y *S. sanguinis* (**tercero**) y de *B. bifidum* por *S. mutans* y *S. sanguinis* (**cuarto**).

El tamaño muestral calculado fue de 8 pocillos por grupo. Este valor fue obtenido adicionando una unidad de análisis al resultado obtenido con el programa estadístico

Stata® versión 12, aplicando la fórmula de comparación de dos medias en base a los datos adquiridos en la prueba piloto. (Anexo 1)

VI.3 Operacionalización de variables

Variable	Definición operacional	Indicadores	Tipo	Escala de medición	Valores
Efecto antimicrobiano del probiótico	Capacidad de la bacteria de inhibir el crecimiento de las bacterias <i>S. mutans</i> o <i>S. sanguinis</i> .	Formación de halo de inhibición, los cuales evidencian la reducción de colonias bacterianas de <i>S. mutans</i> o <i>S. sanguinis</i> .	Cuantitativa continua	De razón	Milímetros (mm)
Tipo de probiótico	Microorganismos bacterianos con capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias <i>S. mutans</i> o <i>S. sanguinis</i> .	-----	Cualitativa dicotómica	Nominal	<i>L. rhamnosus</i> GG (ATCC 53103) <i>B. bifidum</i> (ATCC 11863)

Variable	Definición operacional	Indicadores	Tipo	Escala de medición	Valores
Tipo de <i>Streptococcus Viridans</i> oral	Estreptococos Gram positivos catalasa negativos, alfa hemolíticos característicos de la cavidad oral.	-----	Cualitativa dicotómica	Nominal	<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175) <i>Streptococcus sanguinis</i> (ATCC 10556)
Efecto antimicrobiano del <i>Streptococcus Viridans</i> oral	Capacidad de la bacteria de inhibir el crecimiento de las bacterias probióticas en estudio	Formación de halo de inhibición, los cuales evidencian la reducción de colonias bacterianas de <i>L. rhamnosus GG</i> y <i>B.bifidum</i>	Cuantitativa continua	De razón	Milímetros (mm)

VI.4 Técnicas y procedimientos

Las especies bacterianas *Lactobacillus rhamnosus GG* (ATCC 53103), *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 11863), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) fueron obtenidas de la casa comercial Genlab S.A.

Para el cultivo de *L. rhamnosus GG* y *B. bifidum* se utilizaron los medios sólido y líquido Mann Rogosa Sharpe (MRS). Para evaluar crecimiento, las muestras fueron incubadas a 37°C durante 72 horas en condiciones de anaerobiosis controlada.

Para el cultivo de *S. mutans* y *S. sanguinis* se utilizaron los medios sólido y líquido Brain Heart Infusión (BHI). Las muestras de ambas especies fueron incubadas a 37°C durante 72 horas en anaerobiosis controlada.

Preservación de las muestras

Las muestras seleccionadas fueron preservadas en leche desnatada estéril a -80°C hasta su uso.

División de muestras por grupos de trabajo

Las muestras fueron divididas en cuatro grupos de trabajo. El **primero** correspondió a las pruebas de inhibición de *S. mutans* por *L. rhamnosus GG* y *B. bifidum*, el **segundo** de *S. sanguinis* por *L. rhamnosus GG* y *B. bifidum*, el **tercero** de *L. rhamnosus GG* por *S. mutans* y *S. sanguinis* y el **cuarto** de *B. bifidum* por *S. mutans* y *S. sanguinis*.

Prueba de interferencia por método de difusión en agar variante de pocillo (*cup-plate diffusion method*) de *S. mutans* por *L. rhamnosus GG* y *B. bifidum* (grupo 1)

Cultivos probióticos

Para esta prueba se cultivaron *L. rhamnosus GG* (LGG) y *B. bifidum* de manera independiente en 3 mL de caldo MRS (dentro de la campana de flujo laminar tipo II en proximidad al mechero). Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 72 horas en condiciones de anaerobiosis controlada. Este experimento se realizó teniendo en cuenta 10 réplicas para cada probiótico. (**Anexo 2**)

Transcurrido el periodo de incubación, se evaluó el crecimiento bacteriano y las muestras fueron concentradas hasta alcanzar una Densidad Óptica (OD) de 0.5 (longitud de onda de 630 nm). Estas preparaciones fueron consideradas las concentraciones madres (stock). Para alcanzar la OD indicada, se adicionó medio líquido MRS estéril (medio autoclavado que pasó control de tres días antes de ser utilizado) en caso la OD de la muestra haya sido mayor. Caso contrario, se concentró

la muestra por centrifugación durante 10 minutos a 4000 rpm. Acto seguido, se procedió a eliminar la cantidad de sobrenadante requerida para luego homogenizar la muestra aplicando vórtex. Finalmente, se tomaron 100 μ L de la muestra para determinar nuevamente la OD. Cada paso descrito en el que se requirió la manipulación directa de la muestra fue realizado dentro de la campana de flujo laminar tipo II en proximidad al mechero. Estos procedimientos se repitieron hasta alcanzar la densidad óptima deseada. (**Anexo 3**)

Cultivo bacteriano de *S. mutans*

La especie bacteriana *S. mutans* fue inoculada en placas de BHI a 37°C durante 72 horas en condiciones de anaerobiosis controlada.

Cinco colonias de *S. mutans* fueron inoculadas en 3ml de BHI líquido. Las muestras fueron cultivadas a 37°C durante 72 horas en condiciones de anaerobiosis controlada. Este experimento se realizó teniendo en cuenta 16 réplicas.

Posteriormente, se evaluó el crecimiento bacteriano y la muestra fue concentrada hasta alcanzar una muestra con un volumen final de 8 mL y una OD de 0.5 (longitud de onda de 535 nm). Esta preparación fue considerada la concentración madre (stock). (**Anexo 4**)

Preparación de cultivos para el control del efecto inhibitorio de los probióticos LGG y *B. bifidum* (cultivos indicadores)

Se decidió trabajar con controles del efecto inhibitorio de los probióticos, seleccionando microorganismos bacterianos orales con los cuales ya se ha reportado en la literatura una actividad inhibitoria por parte de los probióticos. Para ello, se consideraron las cepas de *Actinomyces. spp*, *Rothia dentocariosa*, *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*; proporcionadas por el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas. La selección de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* se basó en los resultados del estudio de Zhu y cols., quienes demostraron que las cepas de *Bifidobacterium. spp.* aisladas de un yogurt comercial (Bright, Chengdu, China) inhiben el crecimiento de los microorganismos orales ya indicados. ⁽⁴²⁾ Por último, Teanpaisan y cols. reportaron en el 2011 la actividad antimicrobiana del *L. rhamnosus SD5* contra cepas de *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), convirtiendo a los microorganismos periodontales en adecuados cultivos indicadores. ⁽⁴³⁾

Cultivos en medio líquido BHI de las especies bacterianas *Actinomyces. spp*, *Rothia dentocariosa*, *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* fueron proporcionados para este estudio, por lo que se tomaron alícuotas (20 µL) de cada cultivo y fueron resuspendidas en 3 mL de medio líquido BHI fresco (autoclavado y controlado tres días antes de su uso). Las muestras fueron homogenizadas y cultivadas a 37°C durante 5 días en condiciones de anaerobiosis controlada. Este experimento se realizó teniendo en cuenta 4 réplicas por especie bacteriana.

Posteriormente, se evaluó el crecimiento bacteriano y la muestra fue concentrada hasta alcanzar una OD de 0.5 a una longitud de onda de 535 nm. Esta preparación fue considerada la concentración madre (stock). (**Anexo 5**)

Prueba de Interferencia

Se prepararon 500 mL de medio sólido BHI (siguiendo las instrucciones del fabricante). El medio se dejó enfriar hasta 50°C, aproximadamente, y, enseguida, fue repartido en 20 tubos para centrífuga de fondo cónico (Falcon- volumen total: 50 mL), destinando 25 mL para cada tubo. Inmediatamente, se procedió a adicionar los concentrados bacterianos correspondientes a *S. mutans* y a los microorganismos periopatógenos, teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

Se asignaron 4 tubos Falcon por bacteria, adicionando 2 mL del respectivo concentrado bacteriano en cada uno. Las muestras fueron homogenizadas suavemente, evitando formar burbujas. Posteriormente, éstas fueron vertidas en placas Petri estériles de 15 cm de diámetro y se dejó reposar durante 1 hora en condiciones de esterilidad (dentro de la campana de flujo laminar tipo II), para evitar contaminaciones. Se utilizó un total de 20 placas.

En cada placa se realizaron 5 pocillos equidistantes de 4 mm de profundidad con ayuda de un tip de 6 mm de diámetro (tip para 1000 µL, bordes lisos). El quinto pocillo fue realizado en el centro de la placa y en él se adicionaron 100 µL de clorhexidina (CHX) al 0,12% (control de crecimiento de bacterias difundidas en el agar). De los 4 pocillos restantes, 2 fueron designados para cada espécimen

probiótico, adicionando 100 μ L de concentrado bacteriano en ellos. Las muestras fueron cultivadas a 37°C, durante 72 horas en anaerobiosis controlada. Las placas fueron controladas cada 24 horas, evaluando el efecto antibacteriano mediante la medición de los halos de inhibición formados con ayuda de un vernier manual. Los diámetros fueron registrados en milímetros. (**Anexo 6**)

Prueba de interferencia por método de difusión en agar variante de pocillo (*cup-plate diffusion method*) de *S. sanguinis* por LGG y *B. bifidum* (grupo 2)

Cultivos probióticos

Para esta prueba se cultivaron LGG y *B. bifidum* de manera independiente en 3 mL de caldo MRS (dentro de la campana de flujo laminar tipo II en proximidad al mechero). Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 72 horas en condiciones de anaerobiosis controlada. Este experimento se realizó teniendo en cuenta 10 réplicas para cada probiótico. (**Anexo 2**)

Transcurrido el periodo de incubación, se evaluó el crecimiento bacteriano y las muestras fueron concentradas hasta alcanzar una Densidad Óptica (OD) de 0.5 (longitud de onda de 630 nm). Estas preparaciones fueron consideradas las concentraciones madres (stock). Para alcanzar la OD indicada, se adicionó medio líquido MRS estéril (medio autoclavado que pasó control de tres días antes de ser utilizado) en caso la OD de la muestra haya sido mayor. Caso contrario, se concentró la muestra por centrifugación durante 10 minutos a 4000 rpm. Acto seguido, se procedió a eliminar la cantidad de sobrenadante requerida para luego homogenizar la

muestra aplicando vórtex. Finalmente, se tomaron 100 μ L de la muestra para determinar nuevamente la OD. Cada paso descrito en el que se requirió la manipulación directa de la muestra fue realizado dentro de la campana de flujo laminar tipo II en proximidad al mechero. Estos procedimientos se repitieron hasta alcanzar la densidad óptima deseada. (**Anexo 3**)

Cultivo bacteriano de *S. sanguinis*

La especie bacteriana *S. sanguinis* fue inoculada en placas de BHI a 37°C durante 72 horas en condiciones de anaerobiosis controlada.

Cinco colonias de *S. sanguinis* fueron inoculadas en 3ml de BHI líquido. Las muestras fueron cultivadas a 37°C durante 72 horas en condiciones de anaerobiosis controlada. Este experimento se realizó teniendo en cuenta 16 réplicas.

Posteriormente, se evaluó el crecimiento bacteriano y la muestra fue concentrada hasta alcanzar una muestra con un volumen final de 8 mL y una OD de 0.5 (longitud de onda de 535 nm). Esta preparación fue considerada la concentración madre (stock). (**Anexo 4**)

Prueba de Interferencia

Se prepararon 100 mL de medio sólido BHI (siguiendo las instrucciones del fabricante). El medio se dejó enfriar hasta 50°C, aproximadamente, y, enseguida, fue repartido en 4 tubos para centrífuga de fondo cónico (Falcon- volumen total: 50 mL),

destinando 25 mL para cada tubo. Inmediatamente, se procedió a adicionar los concentrados bacterianos correspondientes a *S. sanguinis*. No se consideró la preparación de placas con cultivos de bacterias periopatógenas (controles del efecto antibacteriano de los probióticos en estudio) debido a que éstas ya fueron realizadas para las pruebas del grupo 1, las cuales se llevaron a cabo los mismo días que las de este grupo para tener el mismo control de las variables para ambos casos. Para la realización de este experimento se tuvo en cuenta lo siguiente :

Se adicionaron 2 mL del concentrado de *S. sanguinis* en cada tubo Falcon. Las muestras fueron homogenizadas suavemente, evitando formar burbujas. Posteriormente, éstas fueron vertidas en placas Petri estériles de 15 cm de diámetro y se dejó reposar durante 1 hora en condiciones de esterilidad (dentro de la campana de flujo laminar tipo II), para evitar contaminaciones. Se utilizó un total de 4 placas.

En cada placa se realizaron 5 pocillos equidistantes de 4 mm de profundidad con ayuda de un tip de 6 mm de diámetro (tip para 1000 µL, bordes lisos). El quinto pocillo fue realizado en el centro de la placa y en él se adicionaron 100 µL de CHX al 0,12% (control de crecimiento de bacterias difundidas en el agar). De los 4 pocillos restantes, 2 fueron designados para cada espécimen probiótico, adicionando 100 µL de concentrado bacteriano en ellos. Las muestras fueron cultivadas a 37°C, durante 72 horas en anaerobiosis controlada. Las placas fueron controladas cada 24 horas, evaluando el efecto antibacteriano mediante la medición de los halos de inhibición formados con ayuda de un vernier manual. Los diámetros fueron registrados en milímetros. (**Anexo 6**)

Prueba de interferencia por método de difusión en agar variante de pocillo (*cup-plate diffusion method*) de LGG o *B. bifidum* por *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) o *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) (grupos 3 y 4)

Cultivos probióticos

Para esta prueba se cultivaron LGG y *B. bifidum* de manera independiente en 3 mL de caldo MRS (dentro de la campana de flujo laminar tipo II en proximidad al mechero). Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 72 horas en condiciones de anaerobiosis controlada. Este experimento se realizó teniendo en cuenta 10 réplicas para cada probiótico.

Transcurrido el periodo de incubación, se evaluó el crecimiento bacteriano y las muestras fueron concentradas hasta alcanzar una Densidad Óptica (OD) de 0.5 (longitud de onda de 630 nm). Estas preparaciones fueron consideradas las concentraciones madres (stock). Para alcanzar la OD indicada, se realizaron los procedimientos descritos para las pruebas del grupo 1 y 2.

Cultivo bacteriano de *S. sanguinis* y *S. mutans*

Las muestras de las especies bacterianas *S. sanguinis* y *S. mutans* fueron preparadas de acuerdo al mismo procedimiento descrito en los apartados de las pruebas del grupo 1 y 2. La única diferencia fue que estas muestras sólo se realizaron por triplicado.

Preparación de cultivos indicadores

Cultivos en medio líquido BHI de las especies bacterianas *Actinomyces. spp*, *Rothia dentocariosa*, *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* fueron proporcionados para este estudio, por lo que se tomaron alícuotas (20 µL) de cada cultivo y fueron resuspendidas en 3 mL de medio líquido BHI fresco (autoclavado y controlado tres días antes de su uso). Las muestras fueron homogenizadas y cultivadas a 37°C durante 5 días en condiciones de anaerobiosis controlada. Este experimento se realizó por duplicado por cada especie bacteriana.

Posteriormente, se evaluó el crecimiento bacteriano y la muestra fue concentrada hasta alcanzar una OD de 0.5 a una longitud de onda de 535 nm. Esta preparación fue considerada la concentración madre (stock). (**Anexo 5**)

Prueba de Interferencia

Se prepararon 600 mL de medio sólido MRS (siguiendo las instrucciones del fabricante). El medio se dejó enfriar hasta 50°C, aproximadamente, y, enseguida, fue repartido en 24 tubos para centrifuga de fondo cónico (Falcon- volumen total: 50 mL), destinando 25 mL para cada tubo. Inmediatamente, se procedió a adicionar los concentrados bacterianos de LGG y *B. bifidum*, teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

Se asignaron 12 tubos Falcon por bacteria, adicionando 2 mL del respectivo concentrado bacteriano en cada tubo. Las muestras fueron homogenizadas suavemente, evitando formar burbujas. Posteriormente, estas fueron vertidas en

placas Petri estériles de 15 cm de diámetro y se dejó reposar durante 1 hora en condiciones de esterilidad (dentro de la campana de flujo laminar tipo II), para evitar contaminaciones. Se utilizó un total de 20 placas.

En cada placa se realizaron 5 pocillos equidistantes de 4 mm de profundidad con ayuda de un tip de 6 mm de diámetro (tip para 1000 μL , bordes lisos). El quinto pocillo fue realizado en el centro de la placa y en él se adicionaron 100 μL de CHX al 0,12% (control de crecimiento de bacterias difundidas en el agar). De los 4 pocillos restantes, 2 fueron designados para cada espécimen oral, adicionando 100 μL de concentrado bacteriano en ellos. Las muestras fueron cultivadas a 37°C, durante 72 horas en anaerobiosis controlada. Las placas fueron controladas cada 24 horas, evaluando la inhibición bacteriana mediante la medición de los halos de inhibición formados con ayuda de un vernier manual. Los diámetros fueron registrados en milímetros.

VI.5 Plan de análisis

Para el análisis univariado, se planificó inicialmente proceder a obtener la estadística descriptiva (media y desviación estándar) de las variables en estudio, registradas en una tabla de frecuencia y realizando un gráfico de barras para un mayor entendimiento.

Además, se estableció que se determinaría si la muestra tenía distribución normal mediante la prueba de Shapiro-Wilk.

Para el análisis bivariado, se planificó utilizar la prueba de t-Student de presentar distribución normal. De no ser así, se utilizaría la prueba de U de Mann Whitney.

Sin embargo, debido a que en ningún grupo de estudio se observó la formación de halos, no se pudo realizar el análisis estadístico programado. Respecto a los valores registrados de los diámetros de los halos de inhibición generados por la CHX, estos valores no fueron utilizados para análisis estadístico de ningún tipo, debido a que sólo eran referenciales del crecimiento bacteriano de las especies difundidas en el agar. Además, nunca se consideró comparar el efecto inhibitorio de la CHX con el de las bacterias en estudio, debido a su naturaleza química.

VI.6 Consideraciones éticas

El presente estudio no tuvo implicancias éticas, debido a que se trabajó con muestras liofilizadas de bacterias de una ATCC específica y adquiridas comercialmente.

Se procedió a solicitar la revisión y aprobación del Comité de Ética de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas. Posteriormente, se solicitó la aprobación de la oficina de Grados y Títulos de la universidad. (**Anexo 7 y 8**)

VII. RESULTADOS

El presente estudio se basó en la evaluación *in vitro* del efecto antimicrobiano de los probióticos *Lactobacillus rhamnosus GG* (ATCC 53103) y *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 11863) contra especies de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556).

Se trabajó originalmente con dos grupos de estudio. Cada grupo correspondió a la prueba de difusión en agar variante de pocillo para evaluar independientemente la inhibición de los *Streptococcus viridans* orales generada por los probióticos en estudio (grupo 1 y 2), demostrándose que las cepas *Lactobacillus rhamnosus GG* (ATCC 53103) y *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 11863) no poseen efecto antibacteriano frente a las cepas de *S. mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). Estos resultados fueron también observados en los cultivos indicadores de actividad antibacterial. Ninguno de las cepas probióticas mostró la capacidad de inhibir el crecimiento de las cepas de *Actinomyces. spp*, *Rothia dentocariosa*, *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*. Sólo se evidenció la formación de halos de inhibición con la CHX (control positivo de crecimiento). Estos resultados fueron constantes en las evaluaciones a las 24, 48 y 72 horas. **(Anexo 9)**

Debido a estos resultados, se decidió adicionar dos grupos de estudio para analizar el efecto de las bacterias de la cavidad oral sobre las cepas probióticas (grupos 3 y 4).

Al igual que los resultados descritos para los grupos 1 y 2, ninguna de las bacterias orales, sean cariogénicas o periopatógenas, mostró un efecto antimicrobiano contra el LGG o el *B. bifidum*. Esto fue observado tanto a las 24, a las 48 como a las 72 horas. Sin embargo, en el caso de la CHX vs *B. bifidum*, se observó a las 48 horas la formación de un doble halo de inhibición alrededor de cada pocillo con la muestra del agente químico, sugiriendo el desarrollo de resistencia de ciertas cepas del probiótico a la CHX. En la evaluación de las 72 horas, los diámetros de los halos se mantuvieron estables, preservándose el doble halo de inhibición. (**Anexo 10**)

VIII. DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como finalidad evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio de los probióticos *Lactobacillus rhamnosus GG* (ATCC 53103), *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 11863) contra *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). Debido a que los probióticos se han convertido en las dos últimas décadas en un tema de interés para la investigación científica en salud; se pretendió con esta investigación extender este campo de estudio a la odontología para evaluar si estos microorganismos pueden inhibir de forma selectiva el crecimiento de las bacterias de la cavidad oral. ⁽²⁾ La literatura actual describe que los probióticos, definidos por la Organización Mundial de la Salud en el año 2001 como “microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del huésped”, poseen un mecanismo de acción que modula la respuesta inmune, producen sustancias antimicrobianas y aumentan la respuesta del individuo a la invasión de microorganismos patógenos. ⁽²⁾ Las cepas probióticas más utilizadas por la industria alimentaria para la elaboración de productos lácteos fermentados son las *Bifidobacterias* y *Lactobacillus*. Se escogió para este estudio al *Lactobacillus rhamnosus GG* debido a que, tal como lo demostraran Hauikioja y cols., puede persistir en la cavidad oral entre uno y cinco días después del término del consumo de productos que lo poseen y posee una mejor adhesión a superficies cubiertas por saliva y a las células epiteliales orales que otros probióticos, inclusive el *Bifidobacterium*.⁽⁴⁴⁾ Esto se debería a las adhesinas de superficie que están adosadas a la membrana o embebidas en la pared celular, mediando la adhesión a superficies recubiertas por mucina. ⁽³³⁾ No obstante, en el caso del *Bifidobacterium* se conoce que posee una enzima glucosidasa (codificada por los genes *afcA* y *engBF*)

capaz de degradar mucina y favorecería el contacto de la bacteria a la superficie de la mucosa oral, permitiendo su permanencia y sobrevivencia. ^(33,45) Por otro lado, posee un alto factor de auto-agregación que podría asegurar su persistencia en la cavidad oral, además de ser éste un factor promotor importante de la co-agregación con microorganismos patógenos. ^(33,46) Esta información es relevante debido a que se ha observado *in vitro* que la co-agregación de esta bacteria con la *F. nucleatum* favorece su adhesión a superficies de hidroxiapatita (HA) cubiertas por saliva. ⁽⁴⁴⁾ Así mismo, al co-agregarse a este microorganismo periopatógeno evita que disminuya el potencial de adherencia del *Lactobacillus* a la hidroxiapatita, funcionando como un agente protector de este probiótico en la cavidad oral. ⁽⁴⁴⁾

Se escogieron como bacterias de la cavidad oral al *Streptococcus mutans* y al *Streptococcus sanguinis* debido a que la primera está relacionada con el proceso de iniciación de la caries dental y, respecto a la segunda, se ha demostrado que es antagónica al *S. mutans*. Es decir, interfiere con su crecimiento. ⁽⁴⁷⁾ De esta forma, este estudio pudo proporcionar mayor conocimiento del impacto del *Lactobacillus rhamnosus GG* y del *Bifidobacterium bifidum* sobre la microbiota oral conformada por *Streptococcus*.

El efecto antibacteriano ha sido medido en diversos estudios mediante técnicas diferentes. ^(42,43,49) La técnica estándar aprobada por el CLSI es la de Kirby-Bauer. Sin embargo, se optó por la técnica de difusión en agar variante de pocillo debido a que se buscaba analizar el efecto de inhibición de una bacteria sobre otra, por lo que la manipulación de los cultivos bacterianos para impregnar los discos podría haber

llevado a una contaminación de los mismos con otras cepas del estudio, además de no poder asegurar que cada disco de papel Whatman posea la misma concentración bacteriana. Por otro lado, el protocolo establece el uso de la escala de McFarland para determinar la concentración de microorganismos del inóculo a cultivar en el agar base Muller-Hilton. El problema con el uso de esta escala es que ofrece un rango aproximado de la concentración bacteriana en base al grado de turbidez, mas no se considera que este valor está determinado por el tamaño y masa de la bacteria.

Si se tiene en cuenta que cada microorganismo posee características propias en estos aspectos, entonces los valores proporcionados con la escala no son extrapolables a todo tipo de cultivo. Además, la interpretación del grado de turbidez es subjetiva, por lo que es aconsejable establecer parámetros cuantitativos, como la medición de la OD, para estandarizar la concentración. ⁽⁴⁸⁾ La técnica de difusión en agar variante de pocillo fue también utilizada por Saha y cols. en el 2012, permitiéndoles evaluar el efecto inhibitorio de la misma cepa de *Lactobacillus* empleada en este estudio sobre el *S. mutans* (ATCC 702062). ⁽⁴⁹⁾ Debido a que no se conoce el mecanismo exacto de cada cepa probiótica para inhibir a otro microorganismo, no podría descartarse una relación entre el tipo de técnica utilizada para evaluar la actividad antibacteriana y los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación. Si el LGG y el *B. bifidum* sintetizan compuestos apolares o moléculas de alto peso molecular para inhibir el crecimiento o interferir en la formación de la biopelícula de los microorganismos patógenos considerado en esta investigación, estos no habrían podido difundirse por el agar, interpretándose los resultados como ausencia de

capacidad inhibitoria de los probióticos. Esta situación podría haber sido contrarrestada mediante el empleo de técnicas de macro o microdilución en medio líquido. Sin embargo, éstas no fueron utilizadas en el estudio debido a que se hubieran requerido medios de cultivo selectivos para cada especie de la cavidad oral evaluada, elevando el costo y tiempo del estudio. ⁽⁵⁰⁾

Respecto a los resultados obtenidos, se demostró que el LGG y el *B. bifidum* no tendrían un efecto antibacteriano contra cepas de *S. mutans* (ATCC 25175) y *S. sanguinis* (ATCC 10556). Estos resultados difieren de los obtenidos en algunos estudios experimentales *in vitro* y ensayos clínicos. Respecto al *S. mutans* (ATCC 25175), debido a que este fue un estudio de tipo experimental *in vitro*, los resultados podrían compararse con los resultados obtenidos por Saha y cols., considerando especialmente que las técnicas empleadas y la cepa probiótica fueron las mismas. ⁽⁴⁹⁾

El promedio de los halos de inhibición no fue mostrado en el estudio, mas establecieron una relación directamente proporcional entre la concentración del probiótico, trabajando con porcentajes de 100%, 10%, 1% y 0,1%, y la medida del halo. La diferencia entre los resultados obtenidos por estos investigadores y los mostrados en esta investigación podría deberse al hecho que ellos estudiaron el efecto inhibitorio sobre una cepa de *S. mutans* distinta (ATCC 702062). Esta situación es también evidenciada en el caso de la evaluación del efecto inhibitorio contra *S. sanguinis* e, inclusive, en el grupo de cultivos de bacterias periopatógenas, designado originalmente como indicadores del efecto antibacteriano de los probióticos tras reportarse en la literatura inhibición de los primeros por este tipo de agentes biológicos. Esta contradicción en los resultados demostraría la especificidad

de los probióticos para controlar el desarrollo de otros microorganismos. Esta idea estaría apoyada por los resultados obtenidos en las investigaciones de Teanpaisan y cols.⁽⁴³⁾ y Zhu y cols.⁽⁴²⁾ El primer grupo de investigadores analizó la capacidad antibacteriana del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* SD5 contra el *S. mutans* (ATCC 25175) (la misma cepa que en el estudio), obteniendo halos de inhibición con un promedio de 15,00 mm. Sus resultados extenderían la aplicación del concepto de especificidad no sólo al agente biológico inhibidor, sino también al microorganismo a ser inhibido. Es decir, sí el LGG SD5 inhibe al *S. mutans* (ATCC 25175), esto no significa que todas las cepas de *Lactobacillus* puedan inhibir a esta bacteria, al igual que el hecho de inhibir a una cepa de *S. mutans* no equivaldrá a que este probiótico pueda inhibir a todas las cepas de este microorganismo oral.⁽⁴³⁾

El segundo grupo de investigadores evaluó el efecto de inhibición de los probióticos *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* sobre el *S. sanguinis* (la misma cepa considerada para esta investigación, ATCC 10556) y *F. nucleatum* (ATCC 25586) y *P. gingivalis* (ATCC 33277), siendo las dos últimas cepas distintas a las del estudio. Ellos incluyeron la variable tiempo dividiendo las muestras en tres grupos, uno en el que se inoculó en la placa primero el probiótico y después de 24 horas el espécimen oral, uno en el que primero se inoculó la bacteria oral y luego el probiótico y el último en el que ambas bacterias fueron inoculadas al mismo tiempo. Es importante indicar esta información porque ellos encontraron, al igual que en este trabajo experimental, que el *Bifidobacterium* no inhibía al *S. sanguinis* al ser inoculados al mismo tiempo. Respecto a la *P. gingivalis*, el *L. acidophilus* no la inhibía al ser inoculado después ni al mismo tiempo que la primera y sólo lo hacía al ser cultivado

primero. Por último, en el caso de la *F. nucleatum*, el *Bifidobacterium* no mostró inhibirla al ser cultivada al mismo tiempo, resultados que concuerdan con los registrados en este estudio. Sólo mostró un efecto antibacteriano al ser cultivado 24 horas antes que la bacteria periopatógena. Por otro lado, ninguna de las bacterias orales mencionadas mostró poseer una capacidad inhibitoria sobre las cepas probióticas al ser cultivadas simultáneamente, lo cual también concuerda con los resultados hallados en los grupos 3 y 4 de esta investigación. De esta forma, se hace notoriamente relevante incluir la variable tiempo si se desea ampliar este estudio, debido a que el orden de colonización parece influir en el potencial antimicrobiano de las bacterias. ⁽⁴²⁾

La discrepancia de los resultados de esta investigación con los obtenidos en los ensayos clínicos con los cuales se evidencia, por medio de la disminución de las UFC/ml de *S. mutans*, ^(34,35,38,39,41) el efecto antibacteriano de los probióticos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, podría explicarse por múltiples razones. La primera sería la diferencia entre las cepas probióticas estudiadas que, como ya ha sido mencionado en el párrafo anterior, estaría relacionado a un patrón de especificidad. Por ejemplo, Caglar y cols. utilizaron en su estudio del 2008 a la cepa *B. lactis* Bb12, mientras que en el del 2005 a la cepa *Bifidobacterium* DN-173010. Así mismo, Näse y cols., Ahola y cols. y Montalto y cols. analizaron el efecto del LGG. ^(41, 39, 34, 35, 38)

La segunda razón estaría relacionada con el medio o vehículo de administración del probiótico al paciente. De esta forma, en algunos casos se consideró el queso como

vehículo, mientras que en otros la leche, el helado, el yogurt o cápsulas. (35, 34, 41, 39, 38)

Al respecto, Petti y cols. concluyeron en su estudio que la disminución de bacterias patógenas en la cavidad oral no estaba relacionada con los microorganismos probióticos, sino con la caseína que poseía el yogurt que ofrecieron al grupo experimental, debido a que ningún probiótico fue identificado en las muestras tomadas a los participantes después de las 12 semanas que duró la prueba. Se sabe que la caseína evita la adhesión de las bacterias a las superficies dentarias, comprometiendo la formación de la biopelícula y puede ser encontrada en la leche y sus derivados, como el helado o el queso. (51) Esto podría explicar por qué no se encontró inhibición de estreptococos orales, debido a que en este estudio *in vitro* la relación entre el probiótico y la bacteria oral es directa y en un medio en el que se respetan las condiciones que cada una requiere, sin la intervención de vehículos de administración cuyos componentes sean realmente los que generen el efecto antibacteriano. Esto influye incluso entre los resultados de los ensayos clínicos en los que se muestra actividad antibacterial por parte del mismo probiótico, pero en menor o mayor grado, debido a que en cada estudio se utilizaron medios diferentes de administración.

Por último, la tercera razón que explicaría la diferencia entre los resultados de este estudio y los de los ensayos clínicos es la compleja relación que existe entre los microorganismos que colonizan la boca, la cual revela que el concepto de efecto antibacteriano es una visión parcial del verdadero impacto que poseerían los probióticos en la cavidad oral. La disminución de las UFC/mL de los *S. mutans* en

los ensayos clínicos podría no estar exclusivamente relacionada a la síntesis y secreción de compuestos al medio por parte del probiótico que posean una acción bacteriostática o bactericida (las bacteriocinas, por ejemplo), tal como se propone en una prueba de susceptibilidad como la empleada en este estudio, sino que puede ser el resultado de la intervención del probiótico en la respuesta inmune del huésped, propiciando la liberación de interleucinas o el aumento Ig A en saliva. También podría ser que el probiótico degrade polisacáridos extracelulares requeridos para la auto o co-agregación bacteriana, afectando la formación de la biopelícula patógena o podría presentarse una competencia entre estos agentes biológicos y las bacterias orales por nutrientes, como es el caso reportado entre *Bifidobacterium* y *P. gingivalis* por la vitamina K. ⁽⁵²⁾ Los conceptos recién expuestos nos llevarían a modificar el término efecto antimicrobiano por efecto antibiopelícula, el cual nos alertaría que, al igual que los probióticos pueden actuar como factores protectores del huésped, el control sobre los diversos componentes de la flora oral también podría favorecer el desarrollo de otras patologías.

Es esta complicada relación entre las bacterias que conforman la microbiota oral la que ha llevado al desarrollo de nuevas investigaciones en odontología que permitan descubrir innovadoras terapias de prevención de las enfermedades más prevalentes, entre ellas la caries dental. El nuevo objetivo es inhibir de forma selectiva el desarrollo y las funciones normales de las bacterias cariogénicas, asegurando la supervivencia de aquellos microorganismos que, por el contrario, actúen como factor protector de la cavidad oral. ⁽²⁾ De esta manera, tras el éxito del uso de los probióticos en el campo de la medicina, el consumo y el interés por analizar sus

efectos sobre la flora oral han aumentado. Sin embargo, gran parte de las propuestas de investigación se enfocan en el desarrollo de ensayos clínicos, sin proponer primero la realización de estudios *in vitro* que permitan entender a profundidad el mecanismo de acción que los probióticos ejercerían al instaurarse en el medio bucal. Esta realidad fue una de las principales limitantes del estudio, especialmente en el caso del *S. sanguinis*, debido a que no existe un significativo número de referencias que hayan podido servir para planificar el estudio o comparar los resultados. Cabe resaltar que este es el primer estudio a nivel nacional sobre el efecto antibacteriano *in vitro* del LGG sobre bacterias de la cavidad oral, no existiendo una experiencia previa en el ámbito nacional que haya podido ser consultada durante el desarrollo del trabajo.

Ante esta situación, los hallazgos presentados son de gran relevancia clínica porque permiten exponer la necesidad de profundizar en la investigación sobre los probióticos, debido a que la discrepancia de estos resultados con aquellos reportados en la literatura nos revelaría que la acción de estos agentes biológicos va más allá de la inhibición del desarrollo de otros microorganismos, sino que se extiende hasta su intervención en la configuración de la biopelícula. Por ello, este estudio también sería importante porque al incluir al *S. sanguinis*, una bacteria que actúa como agente protector contra el *S. mutans*, rescata la posibilidad de que los probióticos no sólo actúen sobre microorganismos considerados patógenos. Por último, brinda un mayor alcance sobre las técnicas más convenientes para poder llevar a cabo futuros estudios de inhibición de las bacterias de la cavidad oral, sea por el LGG, el *B. bifidum* o por otras cepas, extendiendo el objetivo de las investigaciones al análisis de las

concentraciones mínimas de cada probiótico, el efecto potenciador de la inhibición entre estas especies y las características de los medios o productos comerciales que servirían como vehículos para proporcionar al paciente estos microorganismos sin la presencia del algún compuesto en el medio que pueda afectar la acción probiótica.

Los resultados presentados justifican al mismo tiempo la necesidad de realizar más estudios que permitan descifrar los mecanismos moleculares que podrían ser responsables del efecto directo de los probióticos en la cavidad oral, sea mediando la respuesta inmune o modificando los compuestos proteicos salivales (entiéndase como lisozima, lactoferrina, histatina, peroxidasa, cistatina e IgA), extendiéndose el objetivo de las investigaciones al análisis molecular del mecanismo de acción de estas bacterias.

IX. CONCLUSIONES

1. Los probióticos *Lactobacillus rhamnosus GG* (ATCC 53103) y *B. bifidum* (ATCC 11863) no poseen un efecto inhibitorio *in vitro* contra el *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) al ser cultivados simultáneamente.
2. Los probióticos *Lactobacillus rhamnosus GG* (ATCC 53103) y *B. bifidum* (ATCC 11863) no poseen un efecto inhibitorio *in vitro* contra el *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) al ser cultivados simultáneamente.
3. El *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y el *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) no mostraron una capacidad antibacteriana contra los probióticos *Lactobacillus rhamnosus GG* (ATCC 53103) y *B. bifidum* (ATCC 11863) al ser cultivados simultáneamente.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anusha RL, Umar D, Basheer B, Baroudi K. The magic of magic bugs in oral cavity: Probiotics. *J Adv Pharm Technol Res.* 2015; 6(2):43-7.
2. Vuotto C, Longo F, Donelli G. Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. *Int J Oral Sci.* 2014; 6: 189-94.
3. González Y, Sexto N, Francisco S, Vázquez A. Comportamiento de la caries dental en el primer molar permanente en escolares. *Medisur.* 2009; 7(1); 90-4.
4. Ashwin D, KE V, Taranath M, Ramagoni NK, Nara A, Sarpangala M. Effect of Probiotic Containing Ice-cream on Salivary *Mutans Streptococci* (SMS) Levels in Children of 6-12 Years of Age: A Randomized Controlled Double Blind Study with Six-months Follow Up. *JCDR.* 2015; 9(2):ZC06-ZC09.
5. Bhalla M, Ingle NA, Kaur N, Yadav P. *Mutans streptococci* estimation in saliva before and after consumption of probiotic curd among schoolchildren. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015; 5(1):31-4.
6. Teanpaisan R, Piwat S, Dahle G. Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. *Lett Appl Microbiol.* 2011; 53(4): 452-9.
7. Twetman S, Keller M. Probiotics for Caries Prevention and Control. *Adv Dent Res.* 2012; 24(2): 98-102.
8. Lang C, Böttner M, Holz C, Veen M, Ryser M, Reindl A, Pompeju M, Tanzer J.M. Specific *Lactobacillus/Mutans Streptococcus* Co-aggregation. *J Dent Res.* 2010; 89(2):175-9.
9. Montoya H. *Microbiología básica para el área de la salud y afines.* 2a ed. Medellín: Universidad de Antioquía; 2008.

10. Vasanthakumari R. Practical Microbiology. 1ra ed. Nueva Deli: BI Publications; 2009.
11. Parija S. Textbook of Microbiology and Immunology. Haryana: Elsevier; 2009.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. CLSI. 2007; 27(1): 1-182.
13. Ahmad I, Owais M, Aqil F. Combating Fungal Infections: Problems and Remedy. Springer Science & Business Media; 2010. 539 p.
14. Taylor M. Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality. Elsevier; 2014. 442 p.
15. Loesche W. Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay. MR. 1986; 50(4): 353-80.
16. Rocha R, Lozano P, Martínez Y. Mecanismos de Patogenicidad e Interacción: Parásito-Hospedero. BUAP. 2004.
17. Shimamura A, Yoshio N, Mukasa H, Howard K. Identification of Amino Acid Residues in *Streptococcus mutans* Glucosyltransferases Influencing the Structure of the Glucan Product. J. Bacteriol. 1994; 176(16): 4845-50.
18. Yung-Hua L, Aspiras M, Lau P, Lee J, Ellen R, Cvitkovich D. A Quorum-Sensing Signaling System Essential for Genetic Competence in *Streptococcus mutans* is Involved in Biofilm Formation. Bacteriol. 2002; 184(10): 2699–2708.
19. Banas J. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. Front Biosci. 2004; 9: 1267-77.

20. Bowen W, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*- Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. *Caries Res.* 2011; 45: 69–86.
21. Gomez A, Pascal H, Yung-Hua L, Xiao-Lin T, Gaofeng D, Tianlei L, Zubelda A. MecA Protein Acts as a Negative Regulator of Genetic Competence in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 2013. 195(22): 5196.
22. Kohler B, Bratthall D. Practical Method to facilitate estimation of *Streptococcus mutans* levels in saliva. *JCM.* 1979; 9(5): 584-88.
23. Guo Q, Ahn S, Kaspar J, Zhou X, Burne R. Growth Phase and pH Influence Peptide Signaling for Competence Development in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 2013; 196(2): 227-36.
24. Rodriguez A, Callahan J, Fawcett P, Xiunchun G, Xu P, Kitten T. Physiological and molecular characterization of genetic competence in *Streptococcus sanguinis*. *Mol Oral Microbiol.* 2011; 26(2): 99–116.
25. Chen Lei, Xiunchun G, Yuetan Dou, Xiaojing W, Jenishkumar Patel, Ping X. Identification of hydrogen peroxide production related genes in *Streptococcus sanguinis* and their functional relationship with pyruvate oxidase. *Microbiology.* 2011; 157: 13–20.
26. Cotter P, Hill C. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003; 67(3): 429-53.
27. Fan J, Zhang Y, Chuang-Smith O, Frank K, Guenther B, Kem M, Schlievert P, Herzberg M. Ecto-5'-Nucleotidase: A Candidate Virulence Factor in *Streptococcus sanguinis* Experimental Endocarditis. *Plos ONE.* 2012; 7(6): 38059.

28. Ranganathan J, Vaidya R. Preventing dental caries. The probiotic approach. JADCH. 2012; 2(2): 60-3.
29. Stamatova I, Meurman J. Probiotics: Health benefits in the mouth. Am J Dent. 2009; 22 (6); 329-38.
30. Nishant T, Sathish Kumar D, Arun Kumar R, Hima Bindu K, Raviteja Y (2011) Bacteriocin Producing Probiotic Lactic acid Bacteria. J Microbial Biochem Technol 3: 121-4.
31. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker S. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. Microbiol. Mol. Biol. Ver. 2008; 72 (4): 729-64.
32. Lebeer S, Verhoeven T, Perea M, Vanderleyden J, De keersmaecker S. Impact of Environmental and genetic factor on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus GG*. Appl Environ Microbiol. 2007; 73(21): 6768-75.
33. González- Rodríguez I, Sánchez L, Turróni F, Ventura M, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A. Role of Extracellular Transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in Mucin Adhesion and Aggregation. Appl Environ Microbiol. 2012; 78(11): 3992-8.
34. Nase L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Ponka A, Poussa T, Korpela R, Meurman J. Effect of Long-Term Consumption of a Probiotic Bacterium, *Lactobacillus rhamnosus GG*, in Milk on Dental Caries and Caries Risk in Children. Caries Res. 2001; 35:412-20.
35. Ahola AJ, Yli-Knuutila H, Suomalainen T, Poussa T, Ahlström A, Meurman JH, Korpela R. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. Arch Oral Biol. 2002; 47(11): 799-804.

36. Comelli E, Guggenheim B, Stingele F, Neeser J. Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. *Eur J Oral Sci.* 2002; 110(3):218-24.
37. Chung J, Ha E, Parka H, Kim S. Isolation and characterization of *Lactobacillus* species inhibiting the formation of *Streptococcus mutans* biofilm. *Oral Microbiol Immunol*, 19(3): 214-6.
38. Montalto M, Vastola M, Marigo L, Covino M, Graziosetto R, Curigliano V, Santoro L, Cuoco L, Manna R, Gasbarrini G. Probiotic treatment increases salivary counts of *Lactobacilli*: a double-blind, randomized, controlled study. *Digestion.* 2004; 69(1):53-6.
39. Caglar E, Sandalli N, Twetman S, Kavaloglu S, Ergenli S, Selvi S. Effect of yogurt with *Bifidobacterium* DN-173 010 on salivary *Mutans Streptococci* and *Lactobacilli* in young adults. *Acta Odontol Scand.* 2005; 63(6): 317-20.
40. Stamatova I, Kari K, Vladimirov S, Meurman J. *In vitro* evaluation of yoghurt starter *Lactobacilli* and *Lactobacillus rhamnosus GG* adhesion to saliva-coated surfaces. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; 24(3): 218-23.
41. Caglar E, Kuscu O, Selvi S, Kavaloglu C, Sandalli N., Twetman S. Short-term effect of ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb-12 on the number of salivary *Mutans Streptococci* and *Lactobacilli*. *Acta Odontol Scand.* 2008; 66(3): 154-8.
42. Zhu Y, Xiao L, Shen D, Hao Y. Competition between yogurt probiotics and periodontal pathogens in vitro. *Acta Odontol Scand.* 2010; 68: 261-8.
43. Teanpaisan R, Piwat S, Dahle G. Inhibitory effect of oral *Lactobacillus* against oral pathogens. *Lett Appl Microbiol.* 2011; 53: 452-9.

44. Haukioja A, Yli-Knuuttila H, Loimaranta V, Kari k, Ouwehand A, Meurman JH, Tenovuo J. Oral adhesion and survival of probiotic and other *Lactobacilli* and *Bifidobacteria in vitro*. *Oral Microbiol Immunol*. 2006; 21:326-32.
45. Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Fernández-García M, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A. Mucin Degradation by *Bifidobacterium* Strains Isolated from the Human Intestinal Microbiota . *AEM*. 2008;74(6):1936-1940.
46. Guglielmetti S, Tamagnini I, Mora D, Minuzzo M, Scarafoni A, Ariolli S, Hellman J, Karp M, Parini C. Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008. 74:4695–702.
47. Kreth J, Zhang Y, Herzberg M. Streptococcal Antagonism in Oral Biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* Interference with *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol*. 2008; 190(3): 4632-40.
48. Sutton S. Measurement of Microbial Cells by Optical Density. *JVT*. 2011; 17(1): 46-9.
49. Saha S, Tomaro-Duchesneau C, Malhotra M, Tabrizian M, Prakash S. Suppression of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* by Probiotics: an *In vitro* Study. *Dentistry*. 2012; 2(6): 1-8.
50. Schwalbe R, Steele-Moore L, Goodwin A. Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols. Florida: CRC Press. 2007. 432p.
51. Petti S, Tarsitani G, Simonetti A. A randomized clinical trial of the effect of yoghurt on the human salivary microbiota. *Arch Oral Biol*. 2001; 46: 705-12.
52. Hojo K, Nagaoka S, Murata S, Takemoto N, Ohshima T, Maeda N. Reduction of vitamin K concentration by salivary *Bifidobacterium* strains and their possible

nutritional competition with *Porphyromonas gingivalis*. J Appl Microbiol. 2007; 103(5): 1969-74.

GLOSARIO

1. ATCC: Siglas de la American Type Culture Collection, una organización dedicada a la investigación en ciencias biológicas que autentifica y caracteriza a los microorganismos y diversas líneas celulares, además de administrar la conservación a largo plazo de los cultivos (repositorio mundial de cultivos) y su respectiva distribución a la comunidad científica.
2. Campana de flujo laminar tipo II: Cámara de circulación forzada (emplea un ventilador para forzar el paso del aire por un filtro HEPA o High Efficiency Particulate Air), proporcionando aire libre a la zona interna de la campana (zona de trabajo). El flujo de aire puede ser horizontal o vertical, pero sólo mantiene libre de contaminación a las muestras manipuladas en el interior de la campana, más no al operador.
3. Clorhexidina (CHX): Bisbiguanida catiónica que desestabiliza y penetra las membranas de las células bacterianas. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de oxígeno, disminuyendo el nivel de ATP y generando posterior muerte celular. En el caso de las bacterias Gram negativas, afecta la membrana externa, liberándose las enzimas periplasmáticas, las cuales impiden la absorción de ciertas moléculas.

4. Densidad óptica (OD): Magnitud física que mide la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia teniendo en cuenta una longitud de onda preestablecida.

5. *Fusobacterium nucleatum*: Bacteria Gram negativa, anaerobia estricta, no esporulada, relacionada con la etiopatogenia de la enfermedad periodontal. Es parte de los microorganismos listados en el complejo naranja o puente de la pirámide de Socransky.

6. Medio Brain Heart Infusion (BHI): Medio de cultivo para bacterias y hongos que posee infusión de cerebro de ternera, infusión de corazón de vacuno y peptona, los cuales son fuentes de carbono nitrógeno y vitaminas. También contiene glucosa como hidrato de carbono fermentable, cloruro de sodio como compuesto que mantiene el balance osmótico y fosfato disódico que proporciona la capacidad buffer del medio.

7. Medio Man Rogosa Sharpe (MRS): Medio de cultivo selectivo para lactobacilos y otras bacterias ácido lácticas. Posee peptona y glucosa como fuentes de nitrógeno y carbono, respectivamente. Cuenta con citrato de amonio para inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas, además de monoleato de sorbitán, magnesio, manganeso y acetato, los cuales actúan como cofactores y pueden inhibir el desarrollo de ciertos microorganismos.

8. Mucina: Proteína altamente glucosilada sintetizada por las células de los tejidos epiteliales (en el caso de la cavidad oral, la mucosa oral). Debido a la presencia de un dominio hidrófobo, posee cierta retención en las membranas plasmáticas. Esta proteína al ser secretada se convierte en elemento de la saliva, favoreciendo la formación del bolo alimenticio, el gusto, la agregación de microorganismos y la actividad antimicrobiana.

9. *Porphyromonas gingivalis*: Bacteria Gram negativa, anaerobia estricta, no esporulada y relacionada con la etiopatogenia de la enfermedad periodontal. Se identifica en las placas de agar sangre por formar colonias de color negro. Es parte de los microorganismos listados en el complejo rojo de la pirámide de Socransky.

10. *Rothia dentocariosa*: Bacteria Gram positiva, no hemolítica, no mótil, catalasa negativa que produce ácido láctico y acético y no forma esporas.



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

ANEXO 1

DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL

COMPARACIÓN DE DOS MEDIAS

```
. sampsi 15 17, sd1(1) sd2(1) power(.95)
```

Estimated sample size for two-sample comparison of means

Test Ho: $m_1 = m_2$, where m_1 is the mean in population 1
and m_2 is the mean in population 2

Assumptions:

```
alpha = 0.0500 (two-sided)
power = 0.9500
m1 = 15
m2 = 17
sd1 = 1
sd2 = 1
n2/n1 = 1.00
```

Estimated required sample sizes:

```
n1 = 7
n2 = 7
```



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

ANEXO 2

PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE *Lactobacillus rhmanosus* GG (ATCC 53103) Y *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 11863) PARA LAS PRUEBAS DE INTERFERENCIA DE *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) Y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)



1. Limpieza de la campana de flujo laminar tipo II



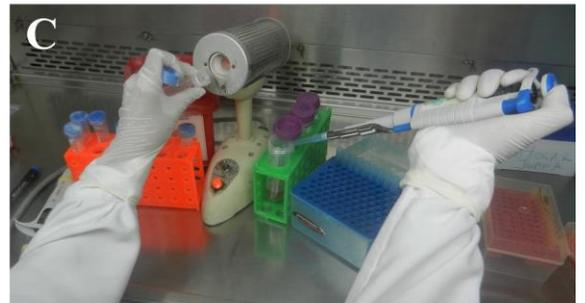
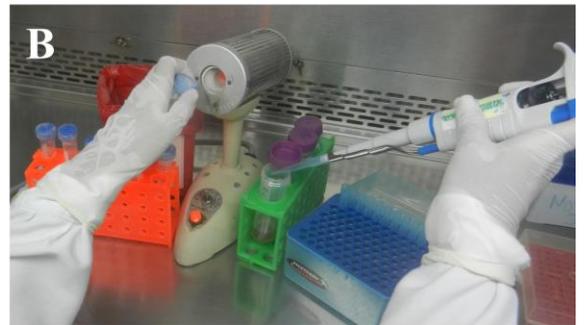
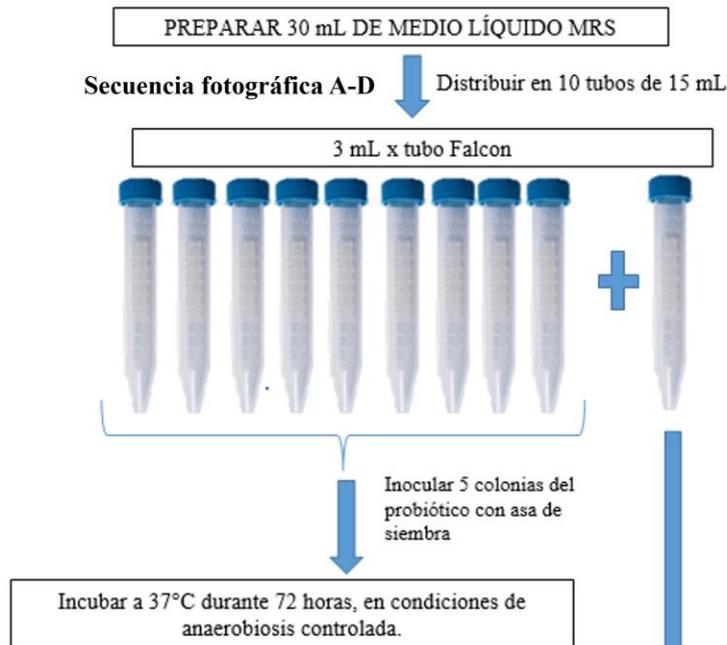
UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA



2. Aplicar luz UV por dos horas



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA



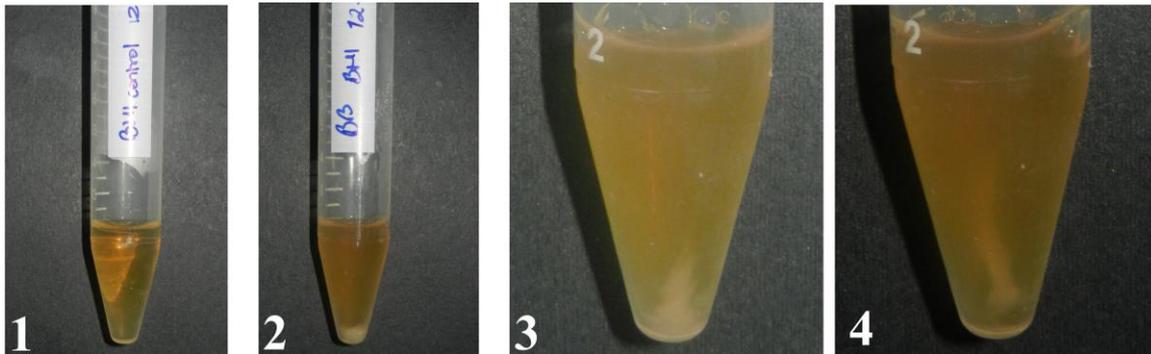
3. Preparación de los tubos de cultivos probióticos



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

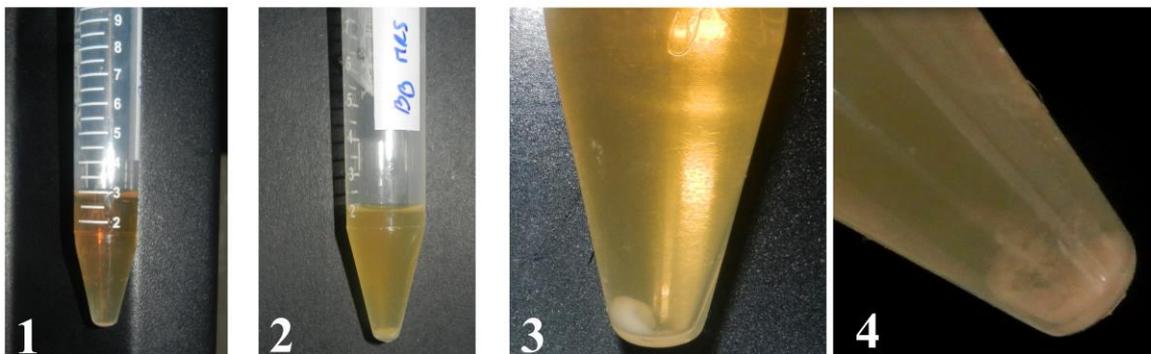
ANEXO 3

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA MADRE (STOCK) DE *Lactobacillus rhmanosus* GG (ATCC 53103) Y *Bididobacterium bifidum* (ATCC 11863) PARA LAS PRUEBAS DE INTERFERENCIA DE *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) Y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)



1. Medio BHI control negativo

2. *B. bifidum*: Evidenciar crecimiento por sedimentación (indica bacteria anaerobia)
3,4. Al perturbar el medio, observar desprendimiento total del sedimentación (filamentosa)



1. Medio MRS control negativo

2. *B. bifidum*: Evidenciar crecimiento por sedimentación (indica bacteria anaerobia)
3,4. Al perturbar el medio, observar desprendimiento de pequeñas masas de células (no filamentosa)

1. Evaluación del crecimiento del probiótico *B. bifidum*



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA



**1. Medio MRS
control negativo**



2. *L. rhamnosus* GG: Evidenciar crecimiento por sedimento, (indica bacteria anaerobia)

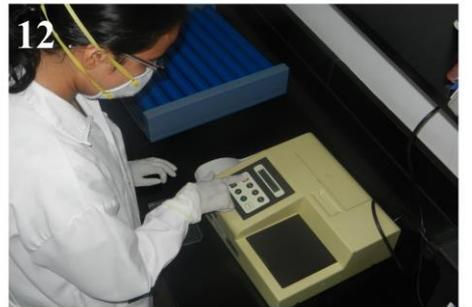
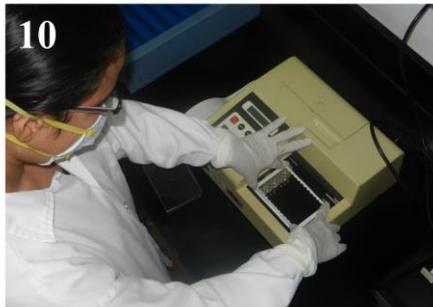
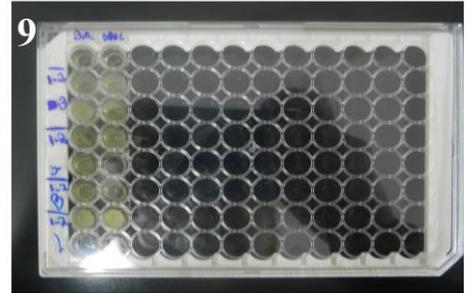
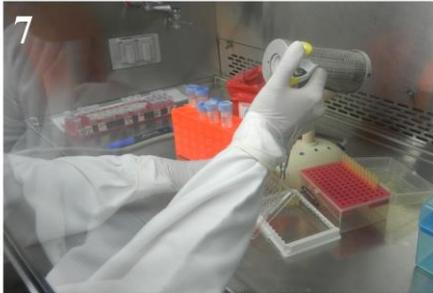
3. Al perturbar el medio, observar desprendimiento de pequeñas masas de células (no filamentosa)



2. Evaluación del crecimiento del probiótico LGG



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA



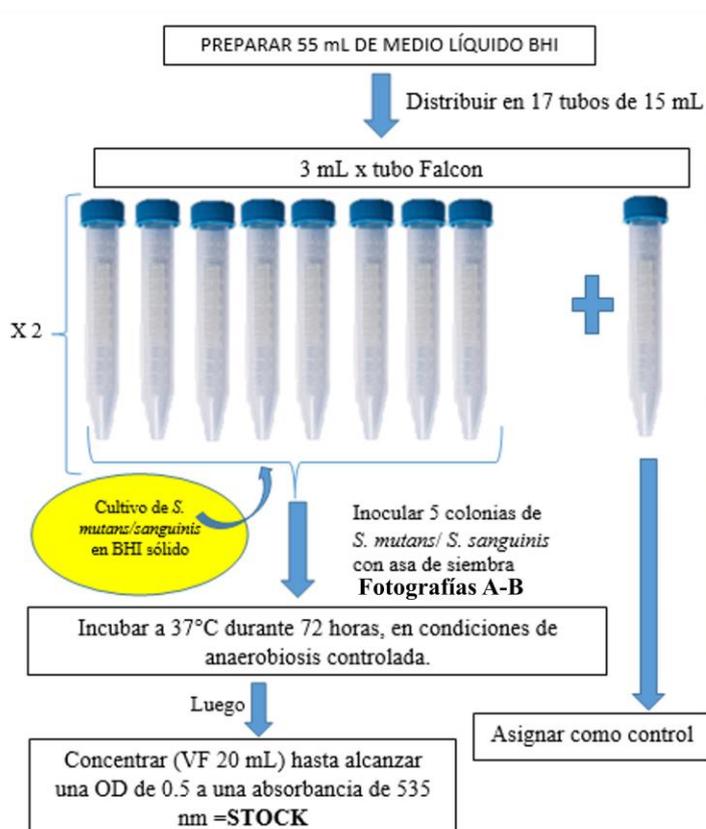
3. En caso la OD de las muestras sea mayor a 0.5 a 630 nm, centrifugar las muestras a 4000 rpm durante 10 minutos para concentrarlas (1, 2, 3). Posteriormente, retirar el sobrenadante (4, 5), homogenizar la muestra (6) aplicando vórtex y extraer 100 μ L (7, 8, 9) para analizar nuevamente la OD (10, 11, 12). Repetir el procedimiento hasta alcanzar la densidad óptica deseada.



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

ANEXO 4

PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) Y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) PARA LAS PRUEBAS DE INTERFERENCIA CON *Lactobacillus rhmanosus* GG (ATCC 53103) Y *Bididobacterium bifidum* (ATCC 11863)



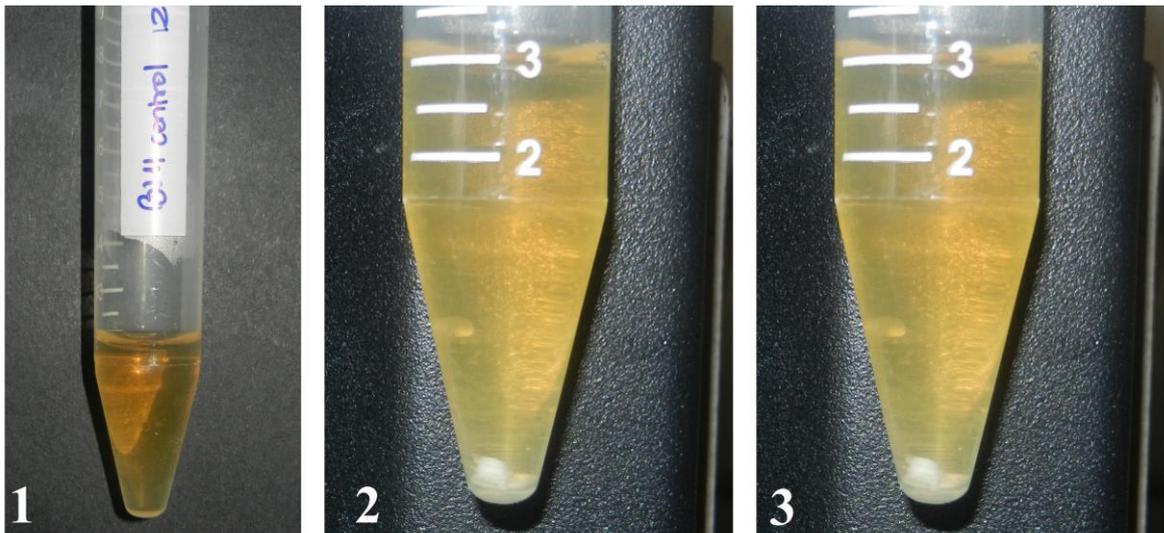
3. Preparación de los tubos de cultivo de *Streptococcus Viridans* orales



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA



2. Preparación del Anaerocult (35 mL de agua destilada), armado de jarra para anaerobiosis y colocación de jarra con tubos de cultivo en incubadora (37°C)



1. Medio BHI
control negativo

2. *S. mutans*: Evidenciar crecimiento por sedimento y turbidez, (indica bacteria anaerobia facultativa)

3. *S. sanguinis*: Evidenciar crecimiento por sedimento y turbidez, (indica bacteria anaerobia facultativa)

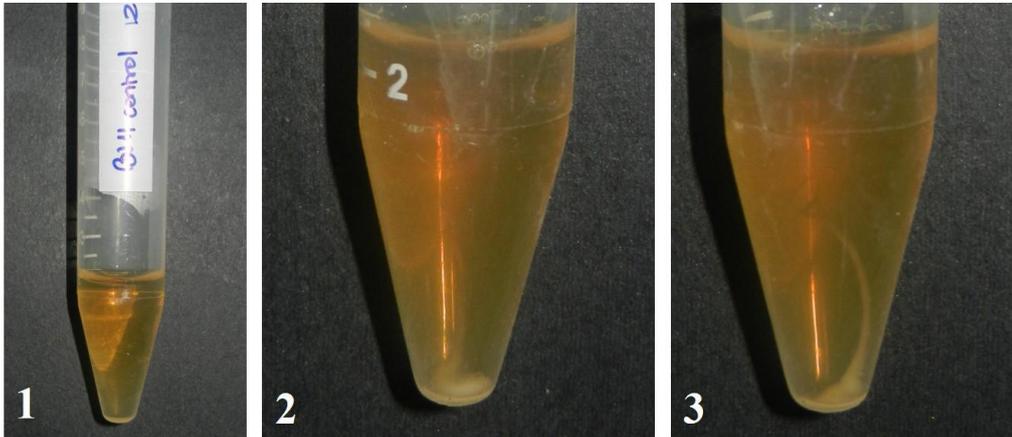
3. Después de 72 horas, control de cultivos de *Streptococcus Viridans* orales.



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

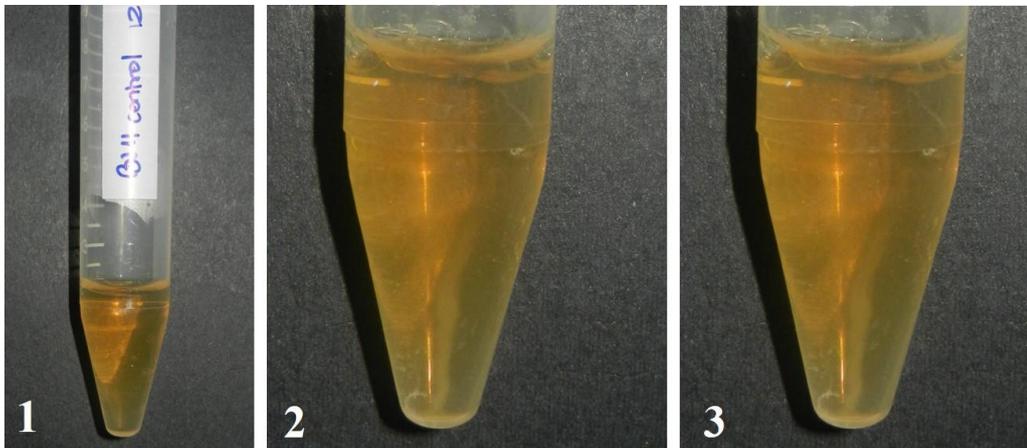
ANEXO 5

CONTROL DE CULTIVOS DE *Actinomyces. spp*, *Rothia dentocariosa*, *Porphyromonas gingivalis* Y *Fusobacterium nucleatum* (CULTIVOS INDICADORES DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS PROBIÓTICOS)



1. Medio BHI
control negativo

2. *P. gingivalis*: Evidenciar crecimiento por sedimento (indica bacteria anaerobia)
3. Al perturbar el medio, observar desprendimiento de una estructura organizada en filamento.

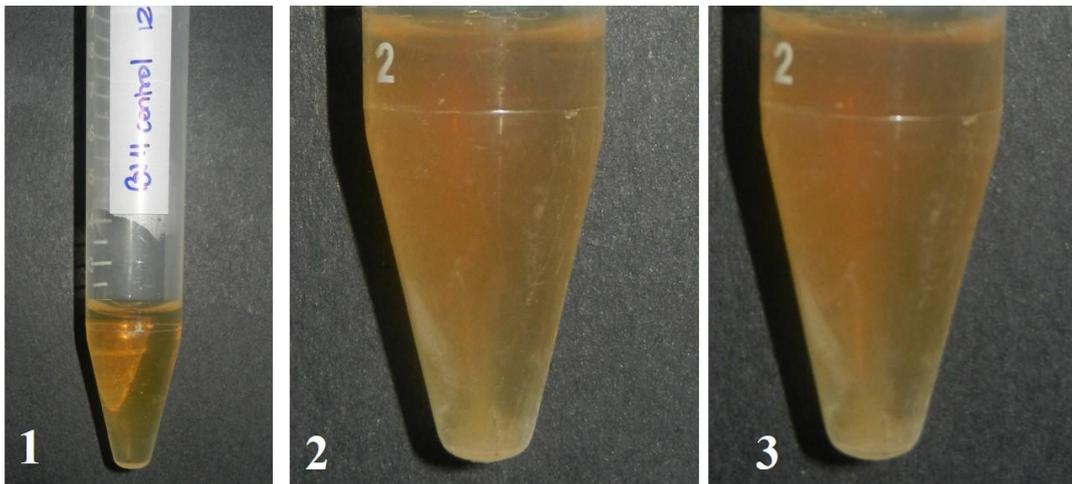


1. Medio BHI
control negativo

2. *Rothia dentocariosa*: Evidenciar crecimiento por sedimento (indica bacteria anaerobia)
3. Al perturbar el medio, observar desprendimiento de una estructura organizada en filamento.

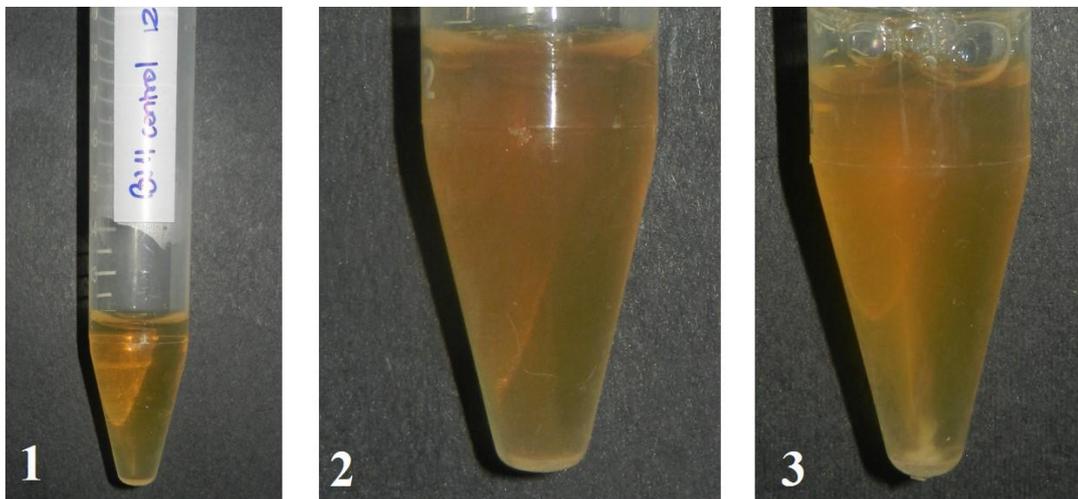


UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA



1. Medio BHI
control negativo

2. *Actinomyces. spp*: Evidenciar crecimiento por sedimento (indica bacteria anaerobia)
3. Al perturbar el medio, observar desprendimiento de una estructura organizada en filamento.



1. Medio BHI
control negativo

2. *F. nucleatum*: Evidenciar crecimiento por sedimento (indica bacteria anaerobia)
3. Al perturbar el medio, observar desprendimiento de una estructura organizada en filamento.



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

ANEXO 6

SECUENCIA PARA LA PRUEBA DE INTERFERENCIA DE *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) O *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) POR *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) Y *Bifidobacterium bifidum* (ATCC 11863) (GRUPO 1)



1. Pesar el medio de cultivo: A-Frascos de medio de cultivo sólido BHI, B- Materiales e instrumentos requeridos para pesar el medio, C- Preparación del papel liviano para pesar el medio, D- Colocación del papel para pesar en la balanza y estimación de su peso en gramos.



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA



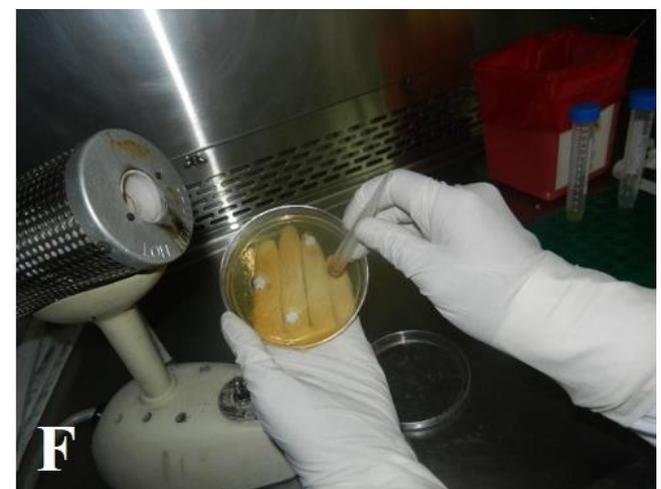
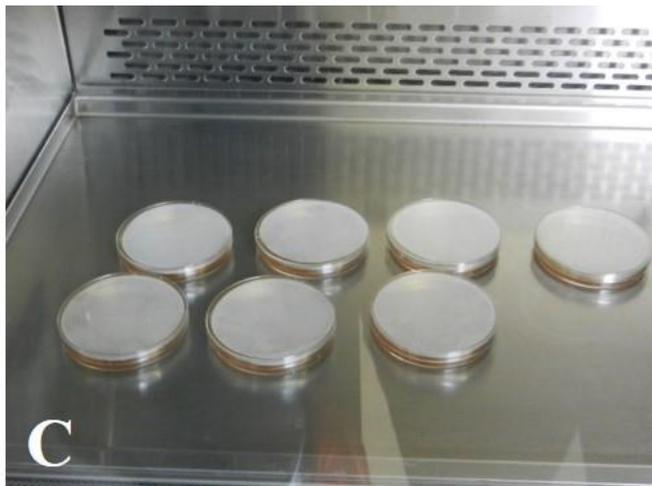
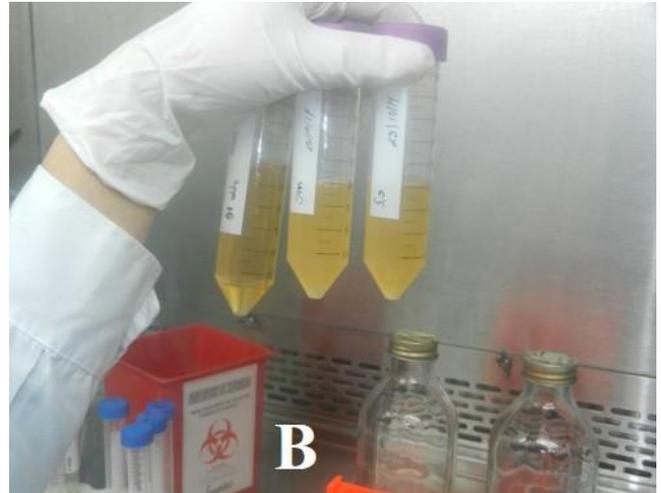
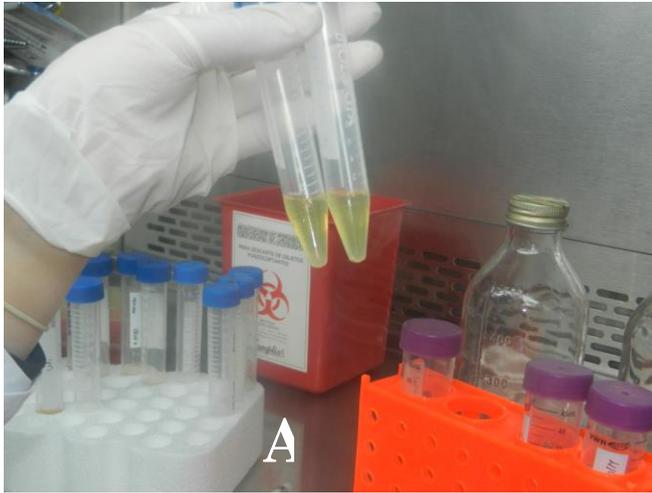
1. Pesar el medio de cultivo: G y H-Depreciación del peso del papel, I y J- Pesar cantidad indicada por el fabricante para el volumen final deseado del medio sólido BHI y transportar a la botella estéril autoclavable.



2. Adicionar agua destilada y enrasar hasta el volumen final deseado. K- Tapar la botella y llevar a la autoclave por 15 minutos a 127°C.



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA



3. Preparación de muestras para plaquear: A - Selección de tubos con concentración madre de *S. mutans* y *S. sanguinis*, B- Adición del concentrado bacteriano a 1 medio BHI sólido y homogenización, C - Plaquear y dejar solidificar por una hora, D -F: Preparación de pocillo en el agar con ayuda de un tip para 1000 μ L.



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

ANEXO 7

CARTA DE APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA



CEI/477-12-14

UPC

Universidad Peruana de
Ciencias Aplicadas

Chorrillos, 17 de diciembre de 2014

Avenida Alameda
San Marcos cuadra 2
Chorrillos
Lima 9 – Perú
T 511 313 3333
www.upc.edu.pe

Señorita alumna
María del Carmen De Lama Odría
Estudiante de la Escuela de Odontología
Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas
Presente.-

exígete, innova

Ref.: **Evaluación *in vitro* del efecto antimicrobiano de los probióticos *Lactobacillus Rhamnosus GG* (ATCC 53103) y *Bifidobacterium Bifidum* (ATCC 11863) contra *Streptococcus Mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus Sanguinis* (ATCC 10556)**

Estimada alumna:

En atención a la remisión del Protocolo de la referencia, tengo a bien hacer de su conocimiento que el Comité de Ética e Investigación (CEI) ha determinado que debido a que es un estudio "in vitro" sin participación de seres humanos o animales no aplica la revisión por el CEI.

En tal sentido, se considera al presente estudio exonerado y deberá seguir el trámite regular según lo indica el artículo 5.4 del Reglamento de Grados y Títulos para Ciencias de la Salud

Sin otro particular, quedo de ustedes.

Atentamente.

Dr. Aldo Vivar Mendoza
Presidente del Comité de Ética
Facultad de Ciencias de la Salud



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

ANEXO 8

CARTA DE APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA



CAR-GYT-628-2015

UPC
Universidad Peruana
de Ciencias Aplicadas

Prolongación Primavera 2390
Monterrico, Surco
Lima 33 - Perú
T 511 313 3333
www.upc.edu.pe

Monterrico, 02 de mayo de 2015

exígete, innova

Señorita
Maria Del Carmen Elizabeth De Lama Odría
Presente.-

Estimada Señorita

Me es grato comunicarle, que con fecha 31 de marzo de 2015 se reunió la Comisión de Aprobación de Temas de Tesis o Proyecto Profesional, para evaluar el tema de tesis titulado: "Evaluación in vitro del efecto antimicrobiano de los probióticos Lactobacillus Rhamnosus GG (ATCC 53103) y Bifidobacterium Bifidum (ATCC 11863) Contra Streptococcus Mutans (ATCC 25175) y Streptococcus Sanguinis (ATCC 10556)", el cual fue aprobado, por lo que se le hace de su conocimiento que, a partir de dicha fecha tiene usted un año para la sustentación correspondiente, es decir hasta el 31 de marzo de 2016.

Sin otro particular, quedo de Ud.

Muy atentamente,

Oficina de Grados y Títulos





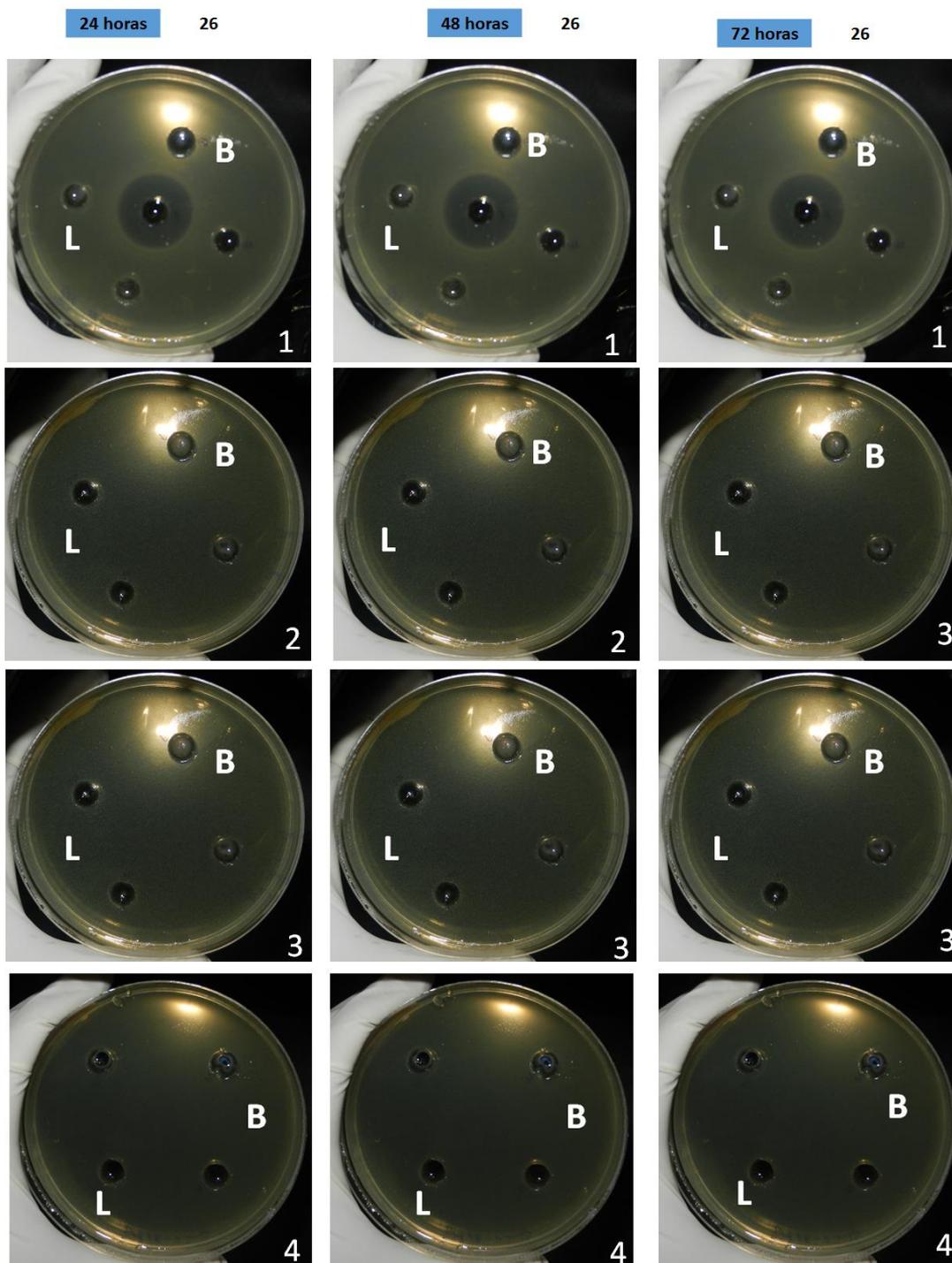
UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

ANEXO 9

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INTERFERENCIA DE LOS GRUPOS

1 Y 2 A LAS 24, 48 Y 72 HORAS (COMPOSICIÓN FOTOGRÁFICA)

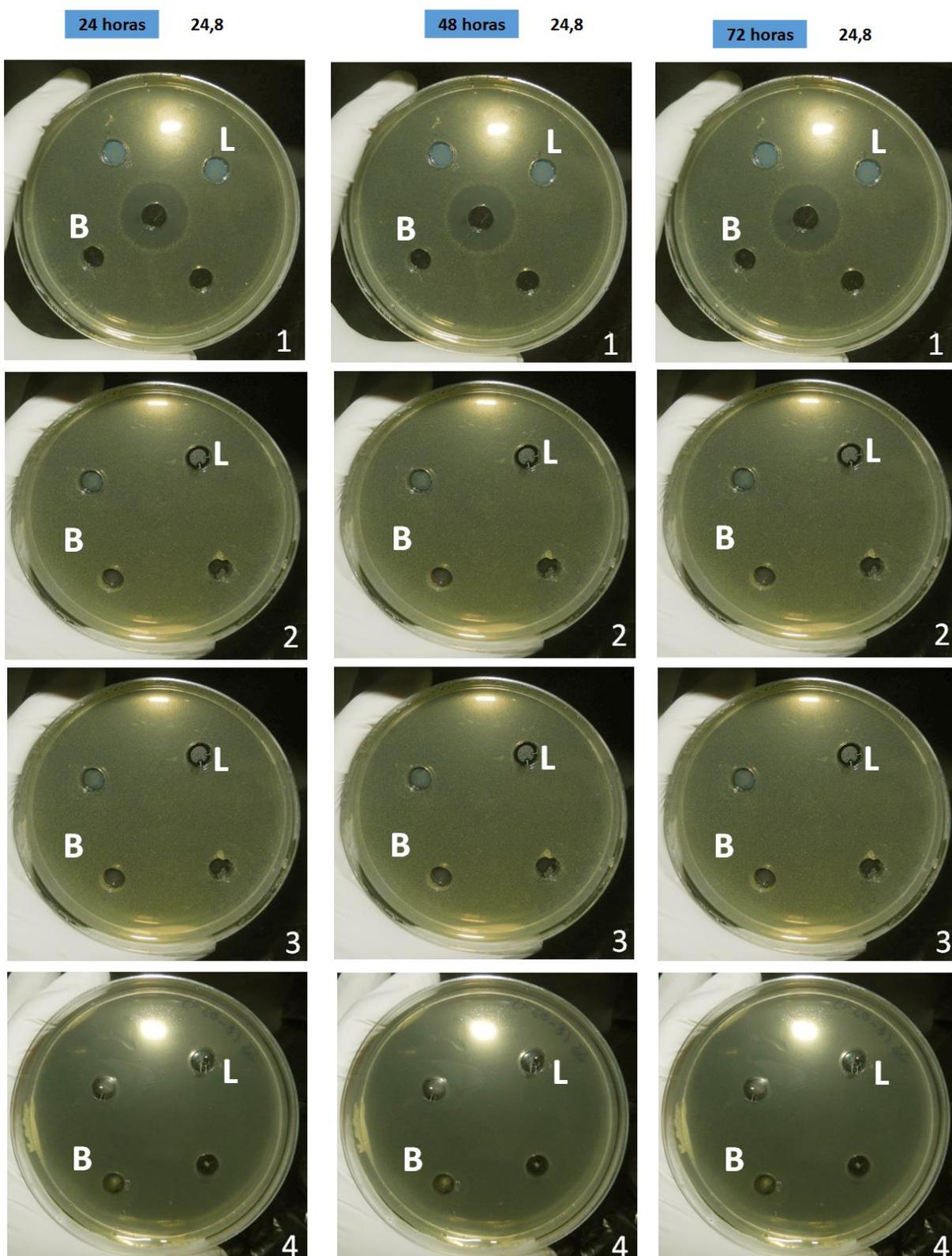
Prueba de interferencia de *S. mutans* por LGG (L) y *B. bifidum* (B) . Placa 1-4 a las 24, 48 y 72 horas





UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

Prueba de interferencia de *S. sanguinis* por LGG (L) y *B. bifidum* (B) . Placa 1-4 a las 24, 48 y 72 horas





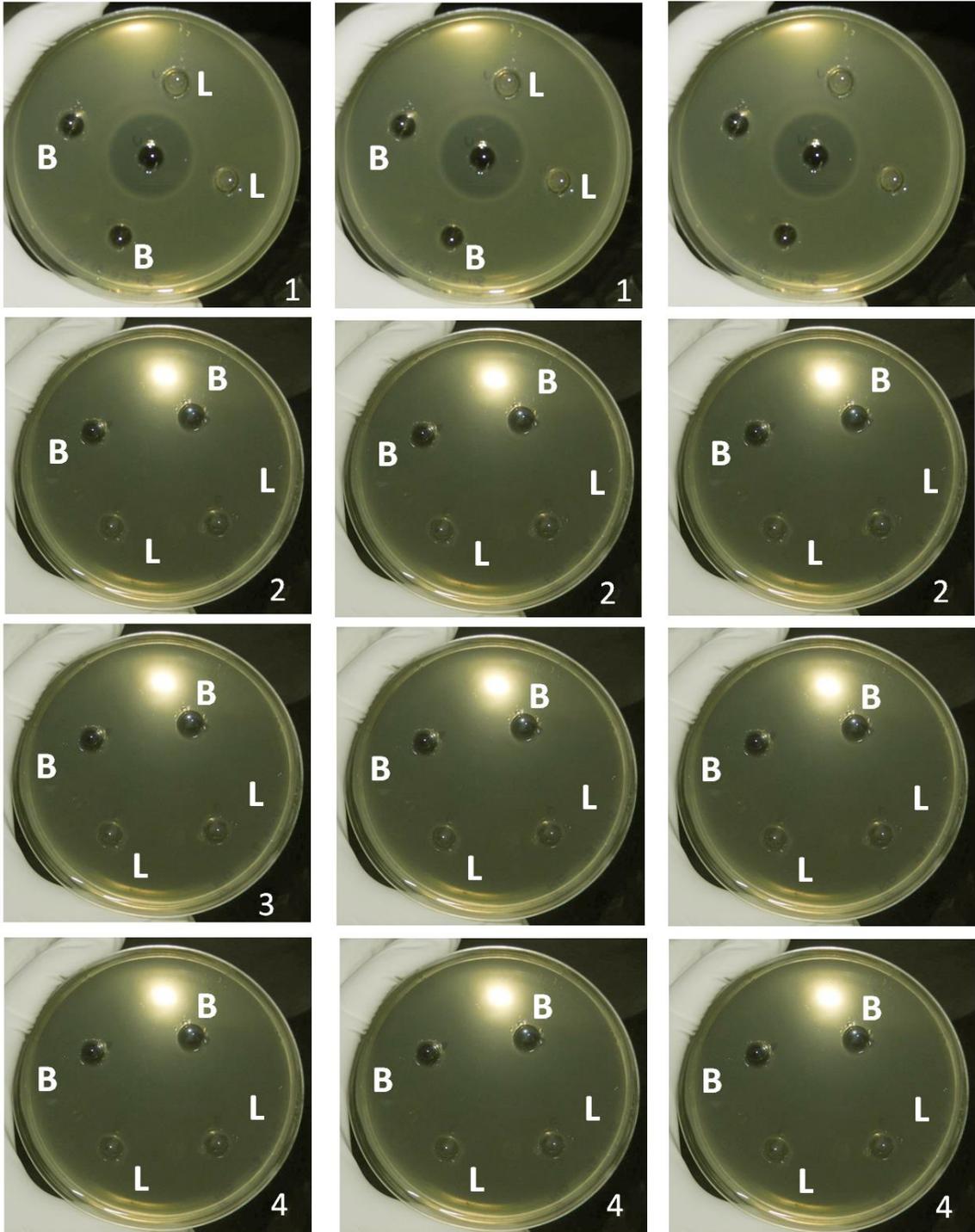
UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

Prueba de interferencia de *R. dentocariosa* por LGG (L) y *B. bifidum* (B) . Placa 1-4 a las 24, 48 y 72 horas

24 horas 25,0 mm

48 horas 25,0 mm

72 horas 25,0 mm





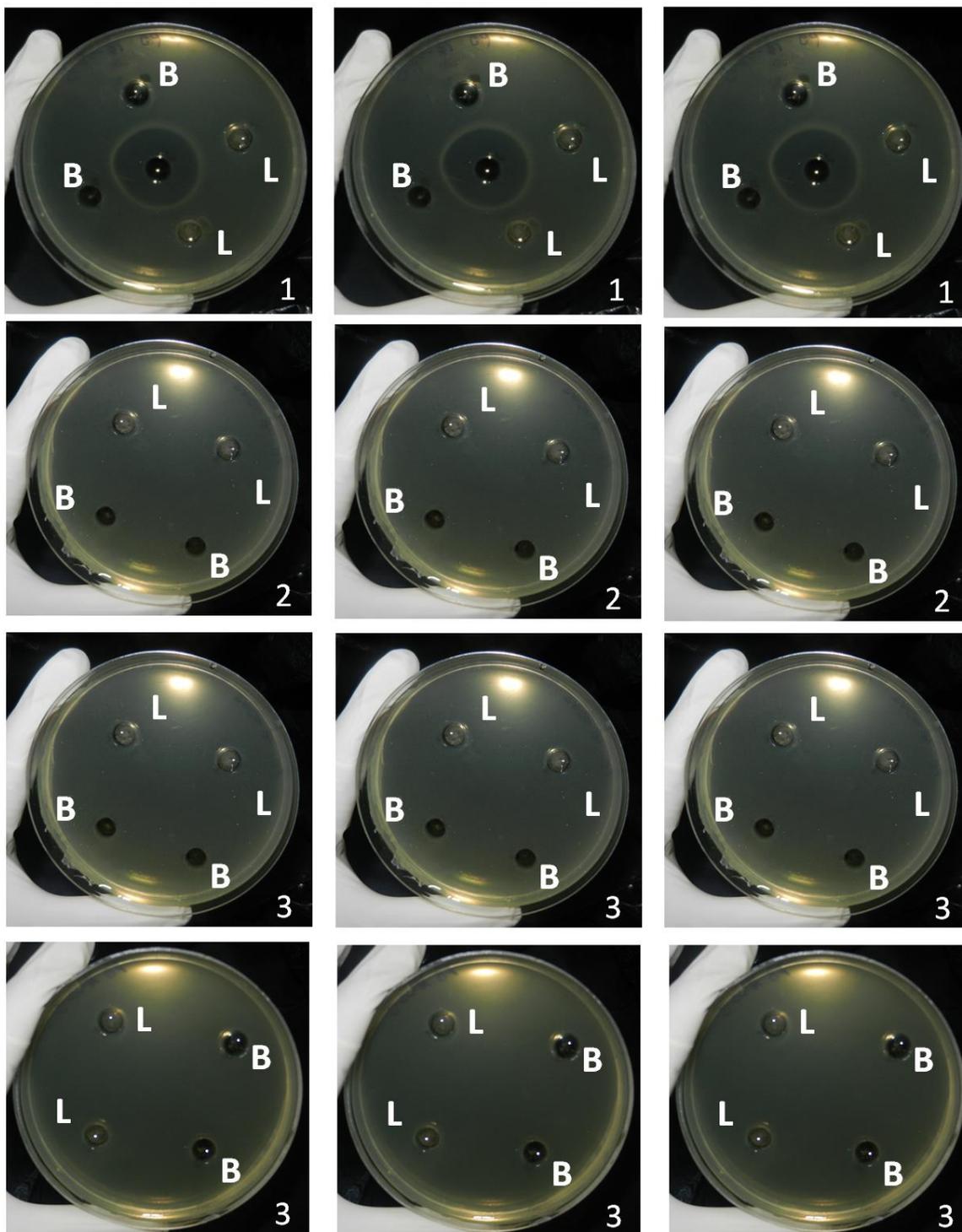
UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

Prueba de interferencia de *P. gingivalis* por LGG (L) y *B. bifidum* (B). Placa 1-4 a las 24, 48 y 72 horas

24 horas 29,8 mm

48 horas 29,8 mm

72 horas 29,8 mm





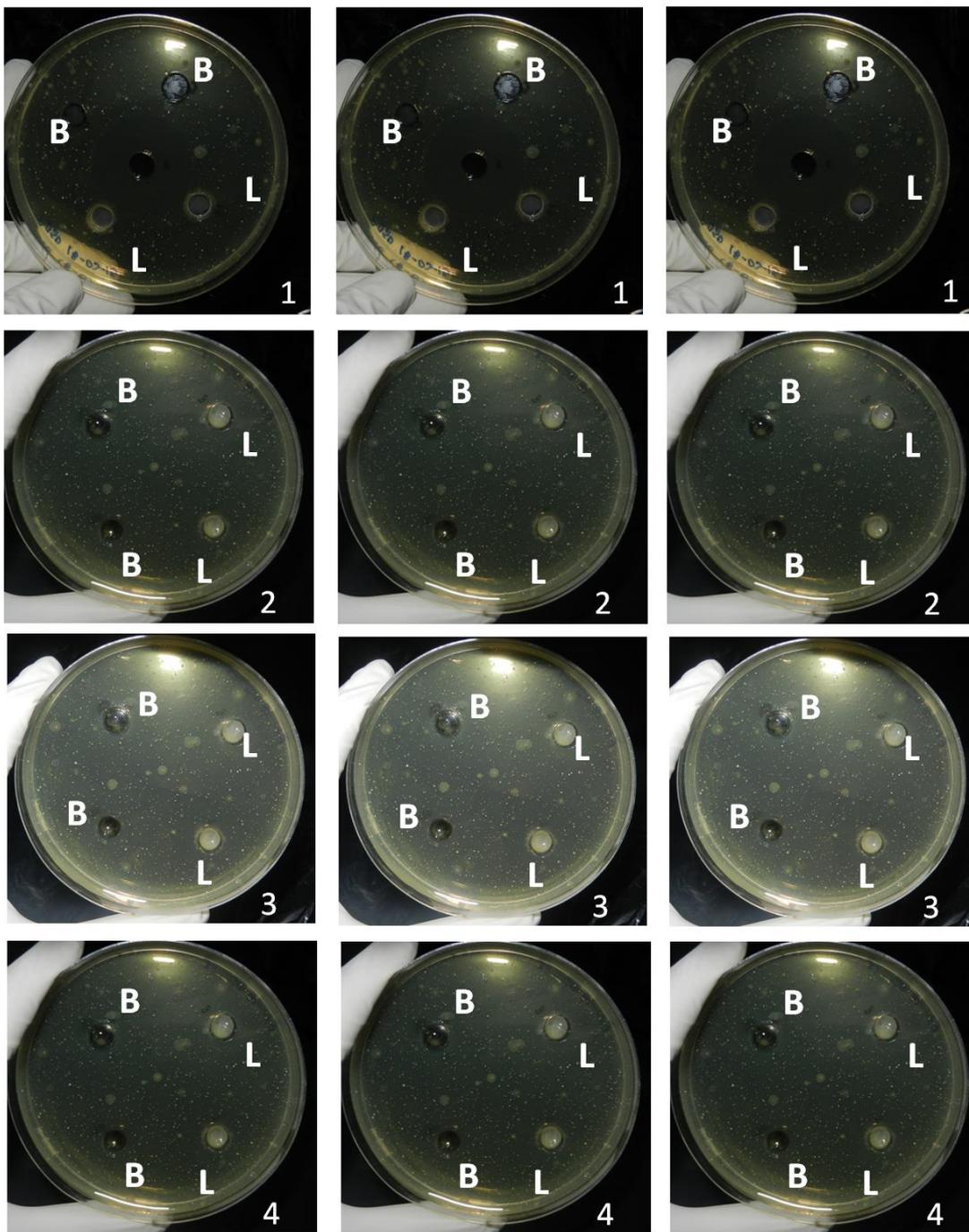
UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

Prueba de interferencia de *F. nucleatum* por LGG (L) y *B. bifidum* (B). Placa 1-4 a las 24, 48 y 72 horas

24 horas 32,8 mm

48 horas 32,8 mm

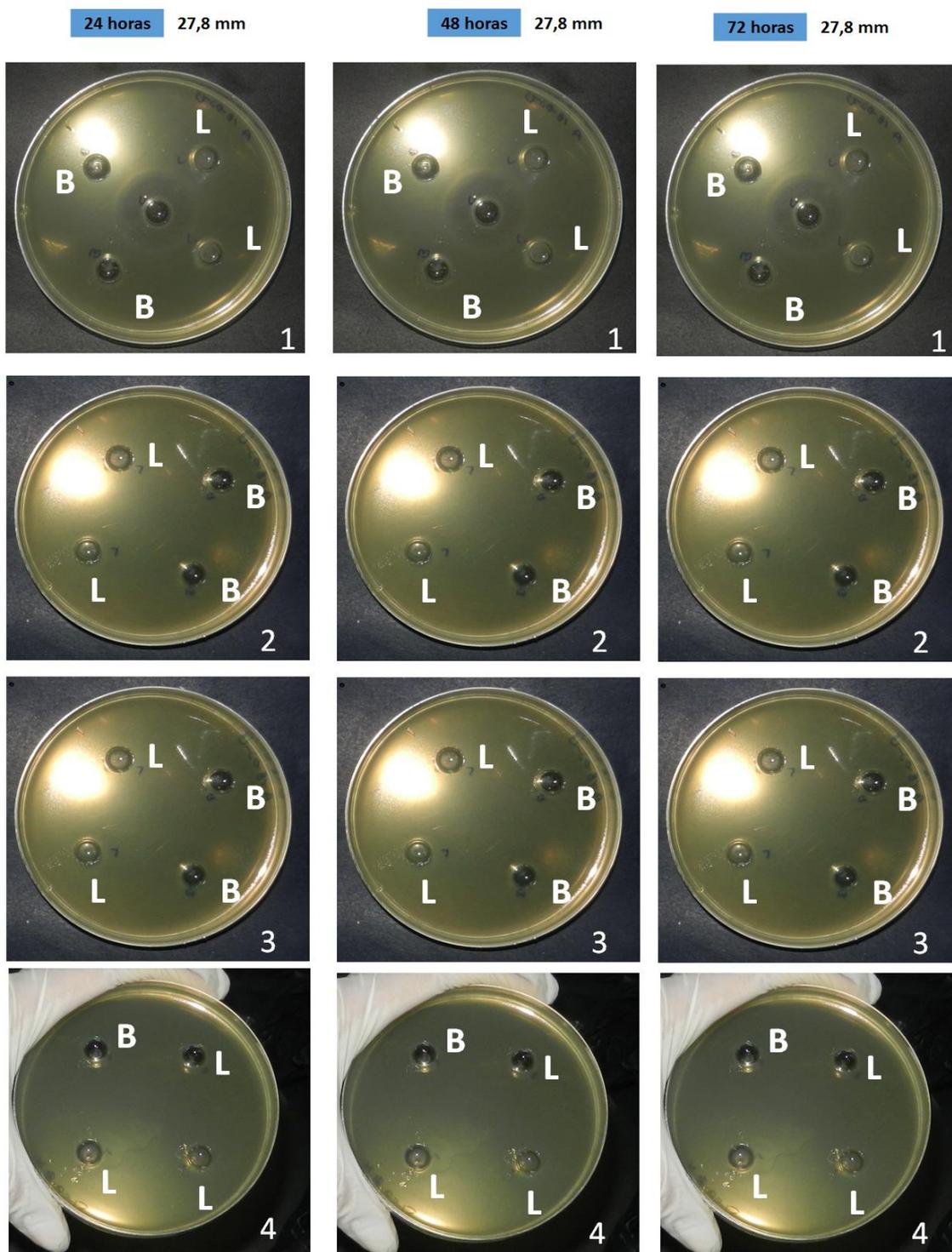
72 horas 32,8 mm





UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

Prueba de interferencia de *Actinomyces* spp. por LGG (L) y *B. bifidum* (B). Placa 1-4 a las 24, 48 y 72 horas



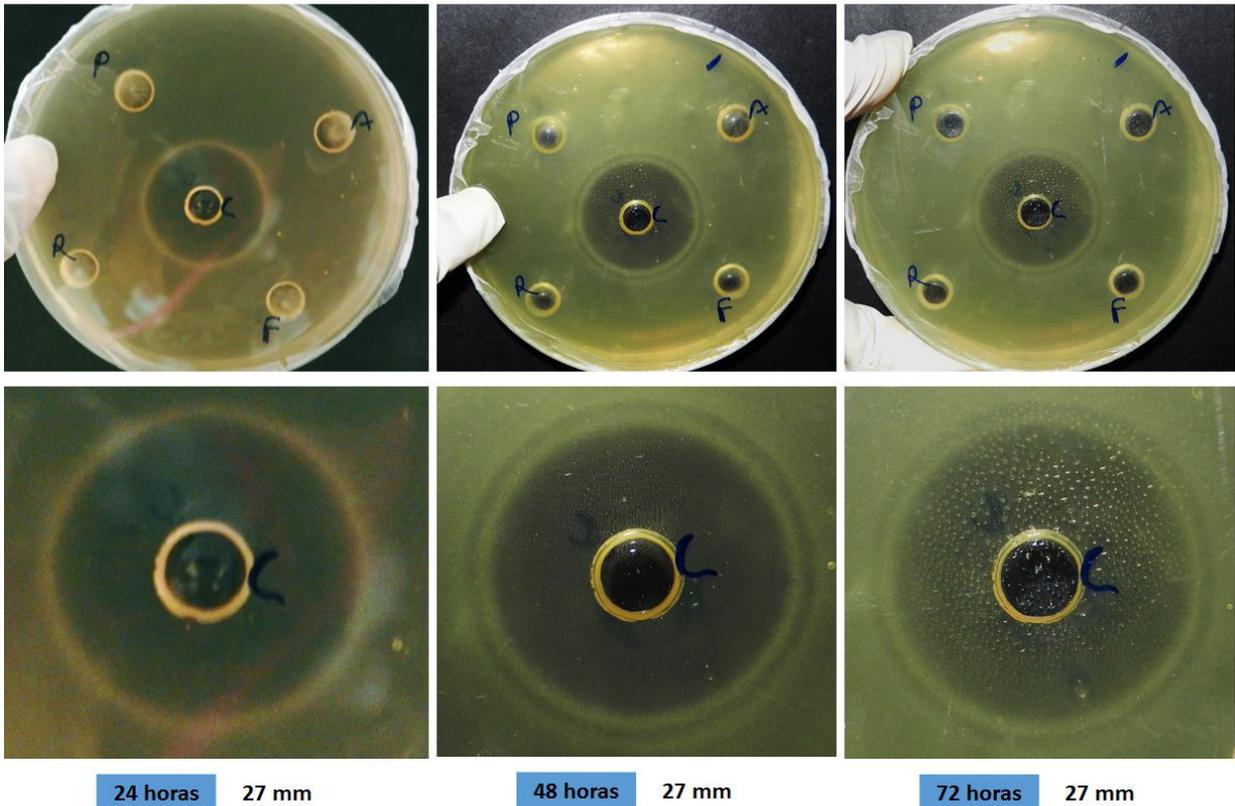


UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

ANEXO 10

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE INTERFERENCIA DE LOS GRUPOS 3 Y 4 A LAS 24, 48 Y 72 HORAS (COMPOSICIÓN FOTOGRÁFICA)

Prueba de interferencia de *B. bifidum* por *P. orphyromonas gingivalis* (P), *Actinomyces. Spp* (A), *Rothia dentocariosa* (R), *Fusobacterium nucleatum* (F). Placa 1 a las 24, 48 y 72 horas

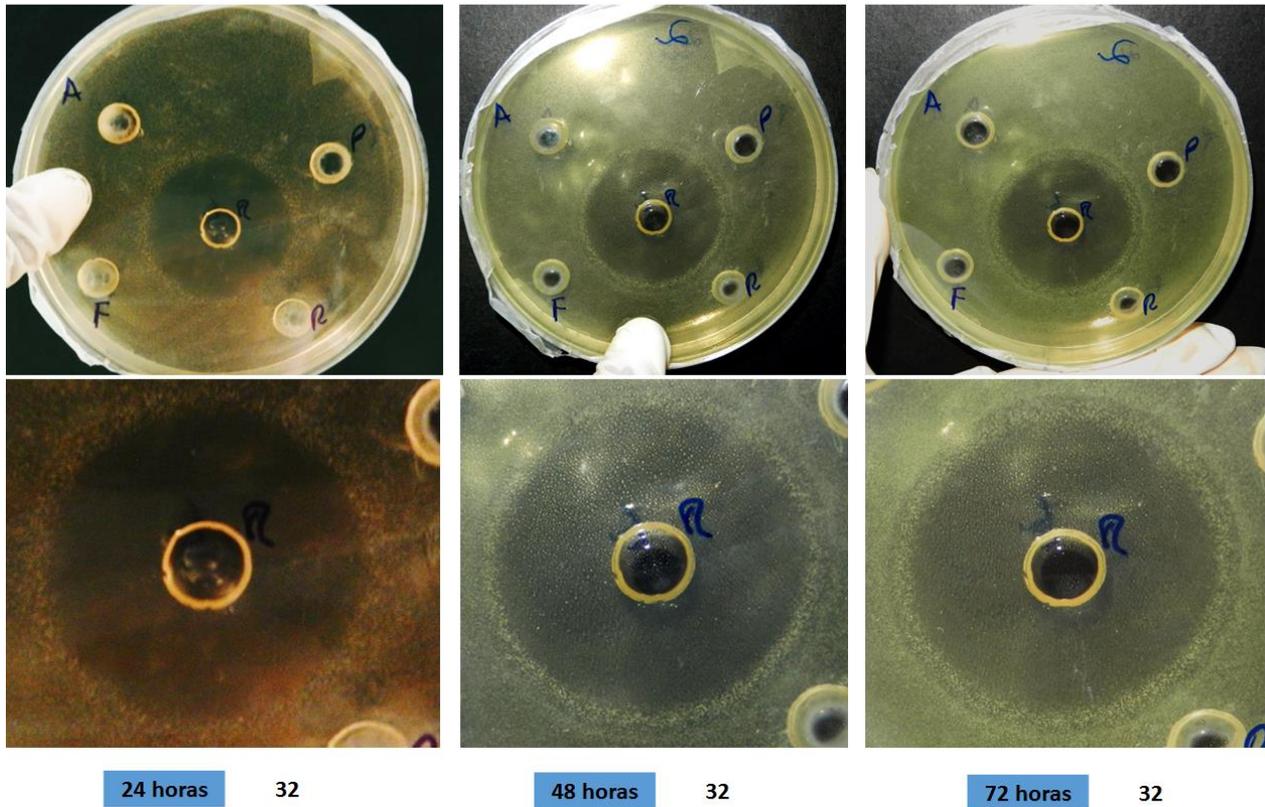


No se considera el halo externo para la medida del diámetro del halo por presentarse una zona con cepas resistentes al agente



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

Prueba de interferencia de *B. bifidum* por *Porphyromonas gingivalis* (P), *Actinomyces. Spp* (A), *Rothia dentocariosa* (R), *Fusobacterium nucleatum* (F). Placa 1 a las 24, 48 y 72 horas

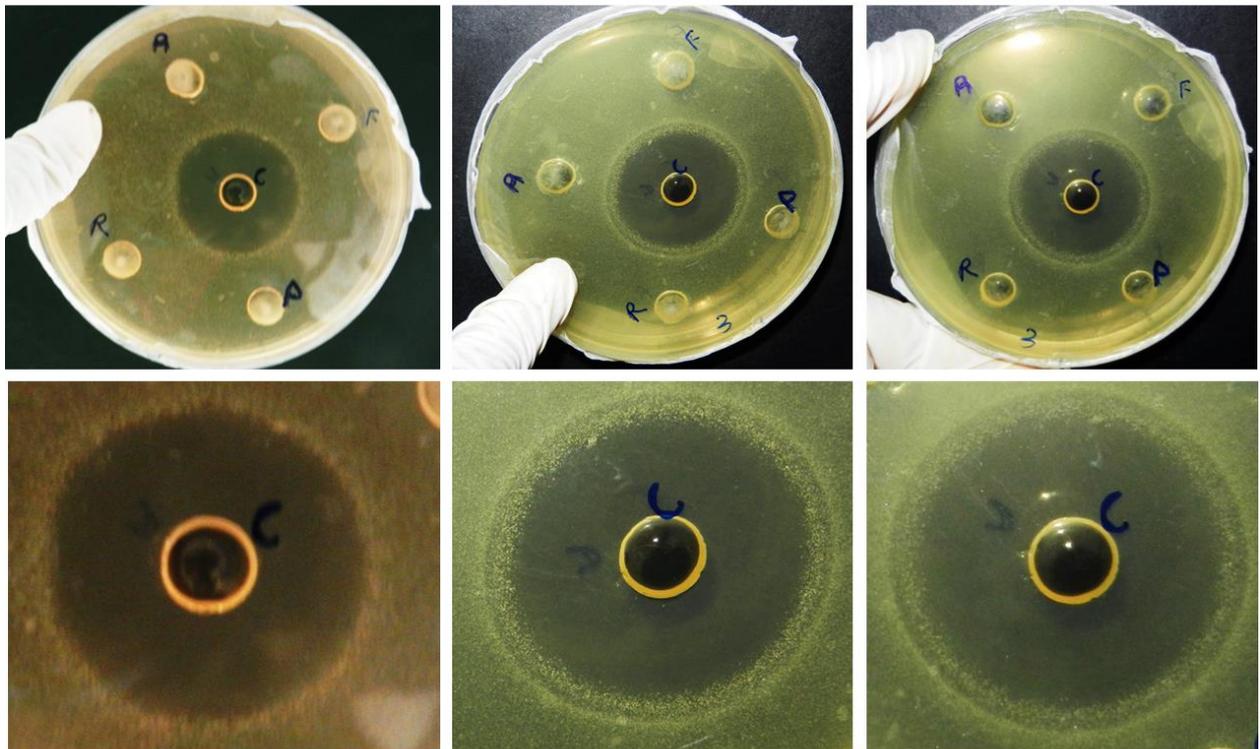


No se considera el halo externo para la medida del diámetro del halo por presentarse una zona con cepas resistentes al agente



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

Prueba de interferencia de *B. bifidum* por *P.orphyromonas gingivalis* (P), *Actinomyces. spp* (A), *Rothia dentocariosa* (R), *Fusobacterium nucleatum* (F). Placa 3 a las 24, 48 y 72 horas



24 horas

28,60

48 horas

28,8

72 horas

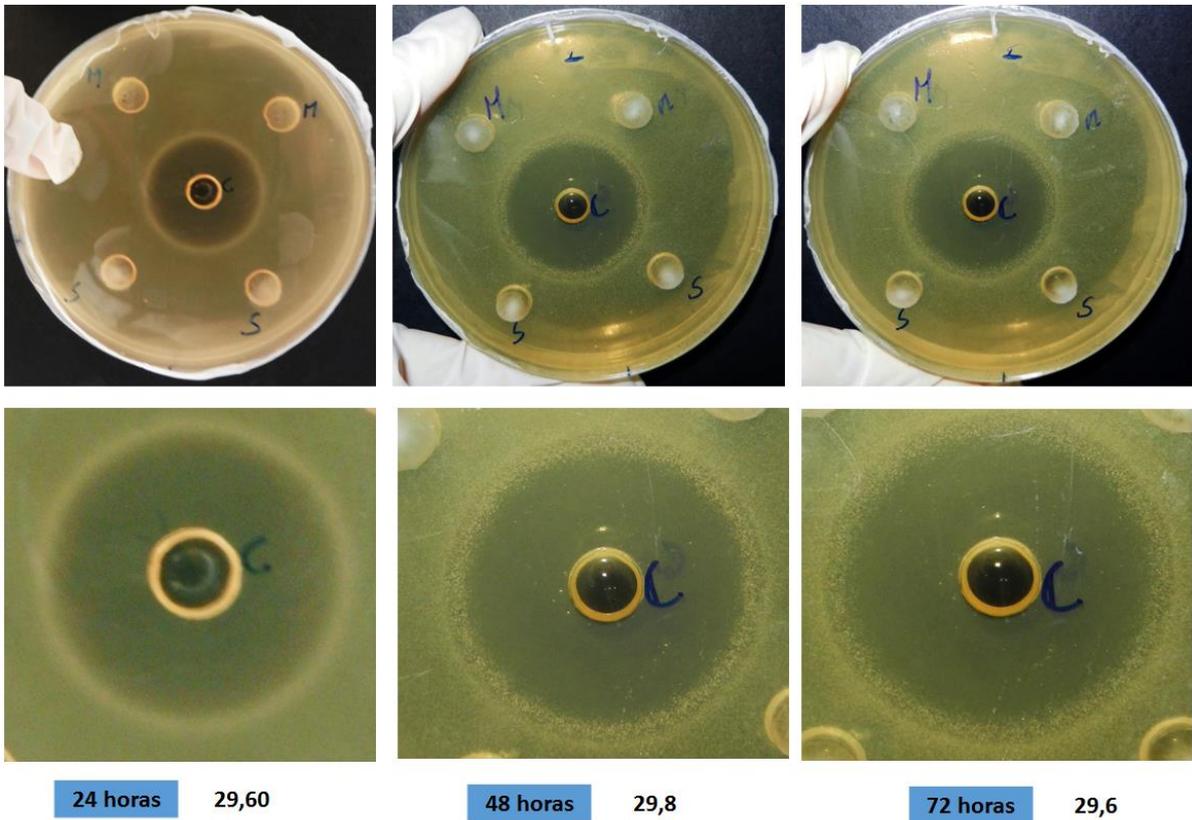
29

No se considera el halo externo para la medida del diámetro del halo por presentarse una zona con cepas resistentes al agente



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

Prueba de interferencia de *B. bifidum* por *S. mutans* (M) y *S. sanguinis* (S). Placa 1 a las 24, 48 y 72 horas

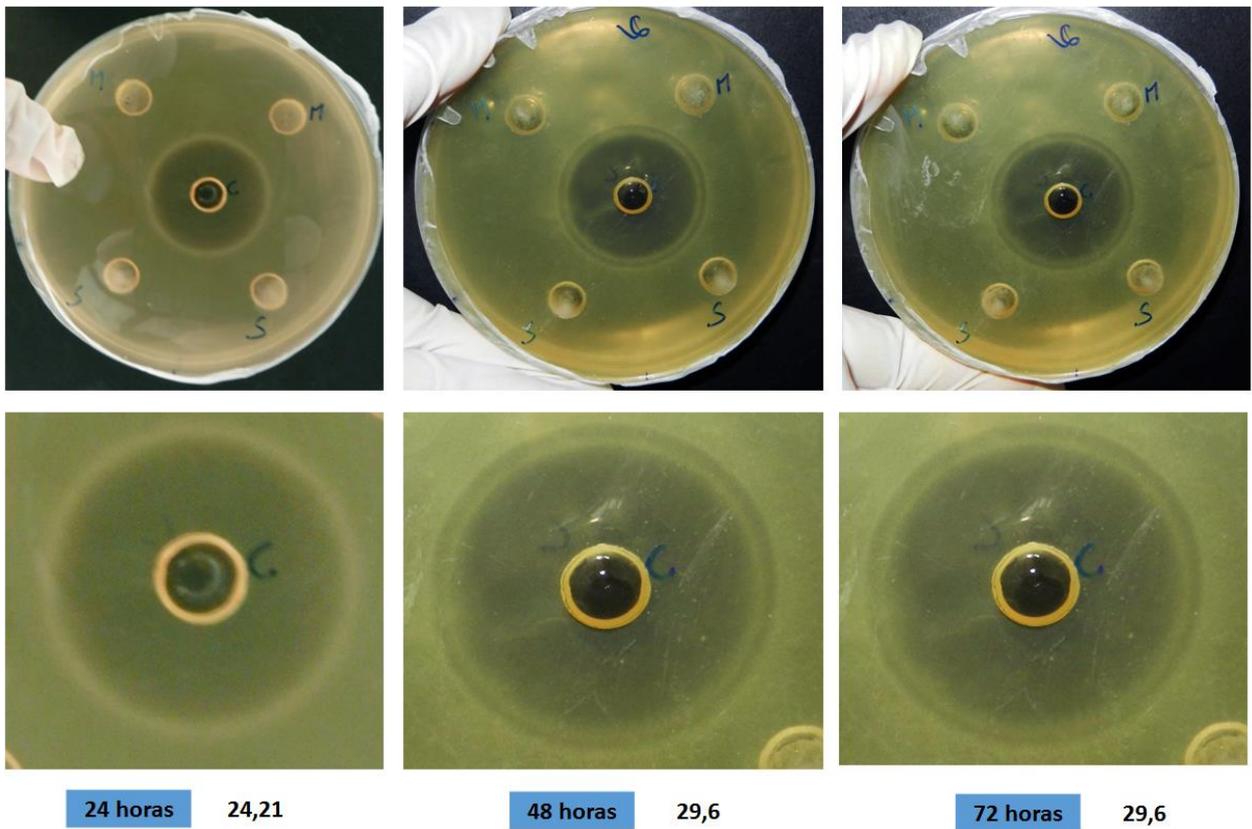


No se considera el halo externo para la medida del diámetro del halo por presentarse una zona con cepas resistentes al agente



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

Prueba de interferencia de *B. bifidum* por *S. mutans* (M) y *S. sanguinis* (S). Placa 2 a las 24, 48 y 72 horas

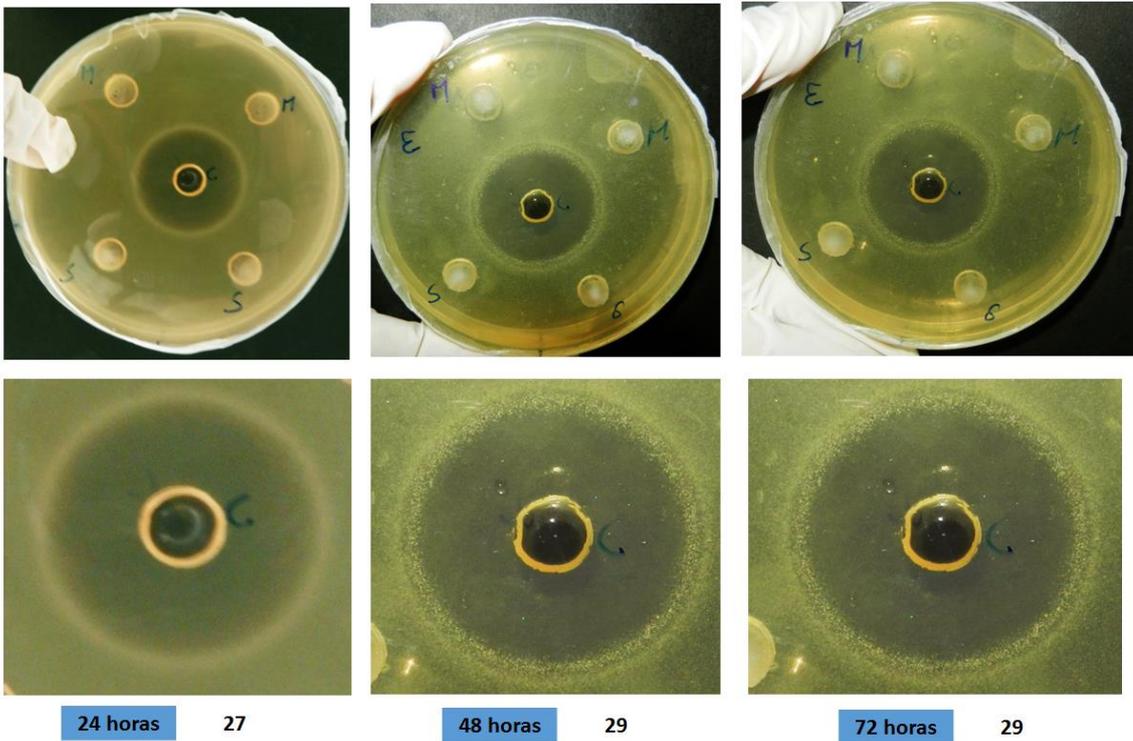


No se considera el halo externo para la medida del diámetro del halo por presentarse una zona con cepas resistentes al agente



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

Prueba de interferencia de *B. bifidum* por *S. mutans* (M) y *S. sanguinis* (S). Placa 3 a las 24, 48 y 72 horas

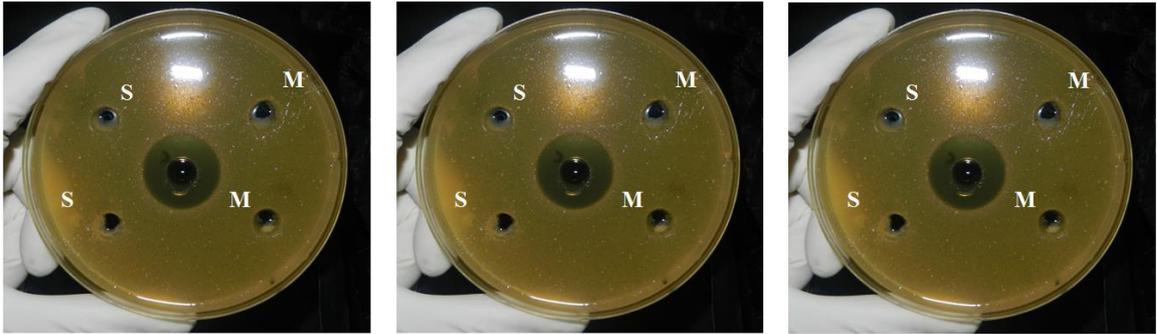


No se considera el halo externo para la medida del diámetro del halo por presentarse una zona con cepas resistentes al agente



UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

**Prueba de interferencia de LGG por *S. mutans* (S) y *S. sanguinis* (S)
Placa 1 a las 24,48 y 72 horas.**



Fotografías a contraluz para evidenciar el desarrollo de las bacterias orales en los pocillos



24 horas

22 mm

48 horas

22 mm

**Prueba de interferencia de LGG por *S. mutans* (S) y *S. sanguinis* (S)
Placa 2 a las 24,48 y 72 horas.**



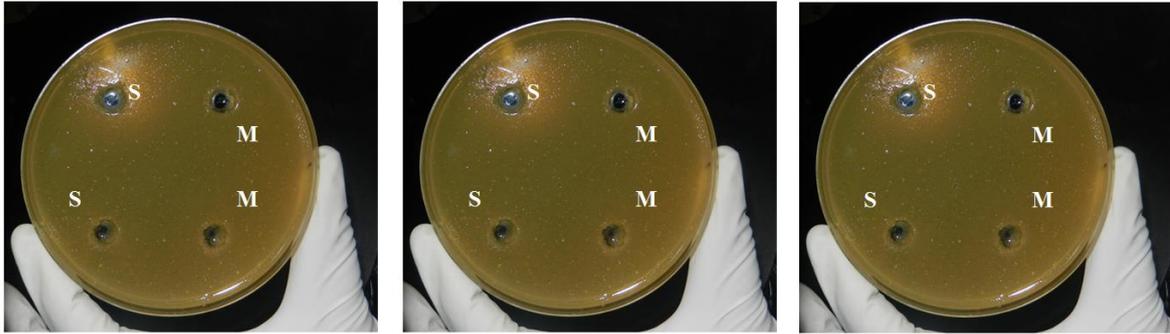
Fotografías a contraluz para evidenciar el desarrollo de las bacterias orales en los pocillos





UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

**Prueba de interferencia de LGG por *S. mutans* (S) y *S. sanguinis* (S)
Placa 3 a las 24,48 y 72 horas.**



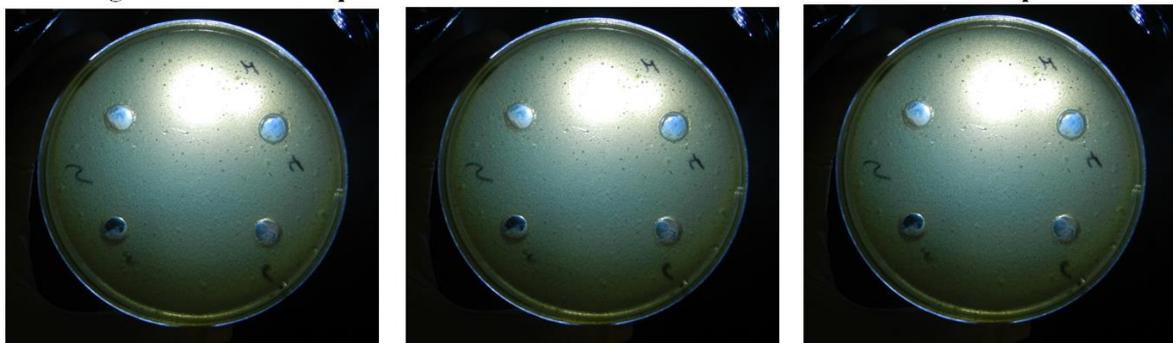
Fotografías a contraluz para evidenciar el desarrollo de las bacterias orales en los pocillos



**Prueba de interferencia de LGG por *S. mutans* (S) y *S. sanguinis* (S)
Placa 4 a las 24,48 y 72 horas.**



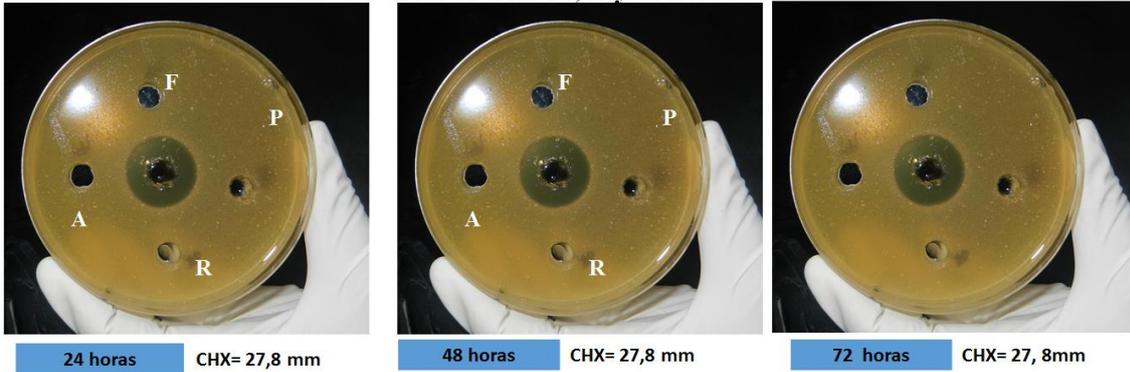
Fotografías a contraluz para evidenciar el desarrollo de las bacterias orales en los pocillos





UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

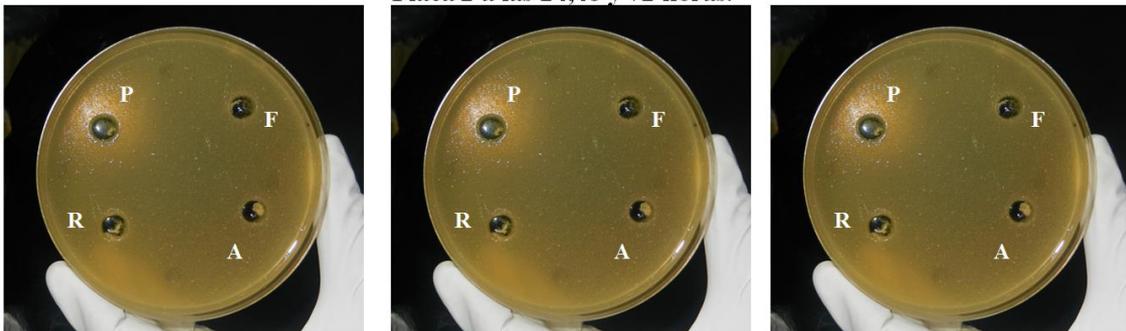
**Prueba de interferencia de LGG por *P. gingivalis* (P), *Actinomyces spp.* (A), *F. nucleatum* (F) y *R. dentocariosa* (R)
Placa 1 a las 24,48 y 72 horas.**



Fotografías a contraluz para evidenciar el desarrollo de las bacterias orales en los pocillos



**Prueba de interferencia de LGG por *P. gingivalis* (P), *Actinomyces spp.* (A), *F. nucleatum* (F) y *R. dentocariosa* (R)
Placa 2 a las 24,48 y 72 horas.**



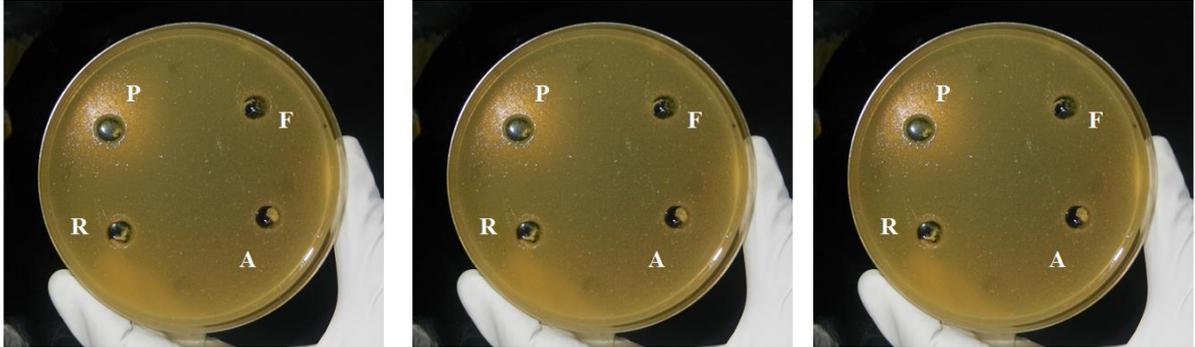
Fotografías a contraluz para evidenciar el desarrollo de las bacterias orales en los pocillos





UNIVERSIDAD PERUANA DE CIENCIAS APLICADAS
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE ODONTOLOGIA

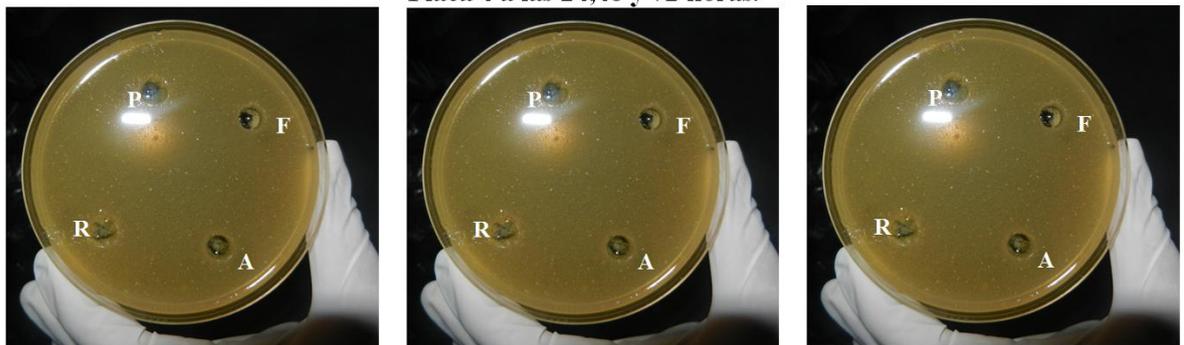
**Prueba de interferencia de LGG por *P. gingivalis* (P), *Actinomyces spp.* (A), *F. nucleatum* (F) y *R. dentocariosa* (R)
Placa 3 a las 24,48 y 72 horas.**



Fotografías a contraluz para evidenciar el desarrollo de las bacterias orales en los pocillos



**Prueba de interferencia de LGG por *P. gingivalis* (P), *Actinomyces spp.* (A), *F. nucleatum* (F) y *R. dentocariosa* (R)
Placa 4 a las 24,48 y 72 horas.**



Fotografías a contraluz para evidenciar el desarrollo de las bacterias orales en los pocillos

