



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA  
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
ESPECIALIZACIÓN EN ORTODONCIA

**Inhibición de la colonización de *Streptococcus oralis* en aparatología  
ortodóncica *in vitro*.**

TESIS

Para obtener el grado de:

**ESPECIALISTA EN ORTODONCIA**

Presenta:

**C.D. AURORA CANALES GONZÁLEZ**

Tutor: Dra. Lia Alioth Hoz Rodríguez

Asesor: Dr. Enrique Romo Arévalo

Los Reyes Iztacala  
Edo. de México, 2019.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lia Alioth Hoz, Dr. Enrique Romo y al Dr. Higinio Arzate, por la oportunidad de aprendizaje que me han brindado.

A todos mis maestros de la especialidad por el conocimiento transmitido, en especial al Dr. Eduardo Llamosas Hernández por su apoyo y motivación.

A mi Madre Getzabel González y a mi compañero de vida Guillermo por su amor e incondicional apoyo en este transitar.

Al Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados de la FO, División de estudios de posgrado y a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, proyectos: IA202618 y IA203518.

***“Por mi raza hablará el espíritu”***

# ÍNDICE

Resumen	4
Abstract	5
Introducción	6
Marco teórico	8
Microbiota Oral	12
Biopelícula dental en pacientes ortodóncicos	15
<i>Streptococcus oralis</i>	21
Enfermedad Periodontal	22
Modulación de la microbiota oral	24
Probióticos	26
Bacteriocinas	27
Planteamiento del Problema	29
Justificación	29
Hipótesis	30
Objetivos	30
Metodología	31
Resultados	34
Discusión	46
Conclusiones	49
Referencias Bibliográficas	50

## RESUMEN

### **Inhibición de la colonización de *Streptococcus oralis* en aparatología ortodóncica *in vitro*.**

**Introducción.** El paciente que usa aparatología fija de ortodoncia es más susceptible a desarrollar caries, gingivitis o periodontitis debido a la retención que generan los propios aditamentos, fungiendo como nuevos nichos ecológicos. *Streptococcus oralis* coloniza la cavidad oral y sobrevive en las superficies blandas y duras de la boca, siendo uno de los colonizadores primarios de la biopelícula dental. Para controlar el sobrecrecimiento de dicho microorganismo decidimos investigar el uso del probiótico *Bacillus coagulans* como terapia para inhibir y/o regular su crecimiento. **Objetivo.-** Determinar si el uso del probiótico *Bacillus coagulans* inhibe el crecimiento del *S. oralis* en la aparatología ortodóncica (brackets metálicos y módulos elásticos) *in vitro*. **Materiales y métodos.-** El control negativo consistió en colocar los brackets y los módulos elásticos esterilizados en la superficie de placas de agar sangre cultivadas con *Streptococcus oralis*. En el grupo experimental los aditamentos de ortodoncia fueron incubados en un cultivo del probiótico (*Bacillus coagulans*) durante 15, 30 y 60 min a 37°. Posteriormente los aditamentos fueron lavados con PBS y se colocaron sobre placas de agar sangre cultivadas con *S. oralis*. Se realizaron las observaciones de las placas a las 24 horas y se midió el halo de inhibición del crecimiento de *S. oralis* alrededor de los aditamentos de ortodoncia. **Resultados.-** Los grupos experimentales incubados en *Bacillus coagulans* inhibieron el crecimiento de *S. oralis* alrededor de los aditamentos de ortodoncia, mientras que en el grupo control, no se presentó este fenómeno. **Conclusiones.-** Con este resultado, proponemos que el uso del probiótico *B. coagulans* puede ser una alternativa terapéutica coadyuvante en el control de la higiene oral en pacientes bajo tratamiento ortodóncico, ya que inhibe el crecimiento de uno de los principales colonizadores de la biopelícula dental.

**Palabras claves.-** Biopelícula dental, microorganismo, *Streptococcus oralis*, probiótico, *Bacillus coagulans*.

## ABSTRACT

### **Inhibition of colonization of *Streptococcus oralis* in orthodontic appliances *in vitro*.**

**Introduction.** The patient using fixed orthodontic appliances is more susceptible of developing caries, gingivitis or periodontitis due to the retention attachment of the appliances which serve as ecological niches. *Streptococcus oralis* colonizes the oral cavity and survives on soft and hard surfaces of the mouth, this leads to be one of the primary colonizers of the dental biofilm. To control the overgrowth of this microorganism, we decided to investigate the use of probiotic *Bacillus coagulans* as therapy to inhibit or control its growth. **Objective.-** Determine if the use of *Bacillus coagulans* probiotics inhibits the growth of *S. oralis* in orthodontic apparatus (brackets and elastic modules) *in vitro*. **Materials and methods.-** The negative control consisted of placing the sterilized braces and elastic modules on the surface of blood agar plates; grown with *Streptococcus oralis*. In the experimental group orthodontic fittings were incubated in a cultivation with *Bacillus coagulans* for 15, 30 and 60 min at 37°. Subsequently, the attachments were washed with PBS and placed on blood agar plates cultivated with *S. oralis*. The observation of the plates was done 24 hrs after, and the halo of inhibition of growth to *S. oralis* around orthodontic attachments was measured. **Results.-** The experimental groups that were incubated with *Bacillus coagulans* inhibited the growth of *S. oralis* around orthodontic attachments, while in the control group, this phenomenon did not occur. **Conclusions.-** With this result, we propose that the use of probiotic *B. coagulans* can be an adjuvant therapeutic alternative in the control of oral hygiene in patients under orthodontic treatment because it manages to inhibit the growth of one of the main colonizers of the dental biofilm.

**Keywords.-** Dental biofilm, microorganism, *Streptococcus oralis*, probiotic, *Bacillus coagulans*.

## Introducción

La microbiota oral está compuesta por más de 700 especies microbianas, entre ellos, aproximadamente el 54% ha sido cultivado y nombrado; el 14% es cultivado pero no tiene nombre y el 32% se conoce sólo como filotipos no cultivados (del microbioma oral humano).<sup>1</sup>

La biopelícula dental es una acumulación heterogénea de una diversa comunidad microbiana, aeróbica y anaeróbica; rodeada por una matriz extracelular de polímeros, microorganismos y saliva. Después de una profilaxis dental, el esmalte se cubre con una variedad de proteínas y glicoproteínas. Este recubrimiento se llama película adquirida, y los primeros colonizadores que se adhieren a ésta son los *Streptococcus*, seguidos por los *Lactobacilos*, que se encuentran en la superficie dental. Esta biopelícula está compuesta, principalmente, por microorganismos no patógenos; sin embargo, por la ingestión de sacarosa y otros hidratos de carbono se producen ácidos, y conduce a una desmineralización del esmalte y, posteriormente a la caries, gingivitis y periodontitis.<sup>2, 3</sup>

Anteriormente el paciente ortodóncico no se consideraba de riesgo para desarrollar enfermedad periodontal; sin embargo, se demostró que los aditamentos utilizados en el tratamiento se pueden asociar como un obstáculo en la higiene. Durante el tratamiento, se crean zonas remanentes que favorecen el crecimiento microbiano y uno de los mayores retos en la ortodoncia es mantener una higiene oral adecuada durante el tratamiento donde el cepillado regular no es suficiente; siendo la caries y complicaciones periodontales frecuentes debido a la acumulación de biopelícula dental.<sup>4</sup>

Existen muchos estudios donde se evalúa el impacto de la aparatología fija de ortodoncia en el balance general de la microbiota oral, debido a que las superficies de los aditamentos ortodóncicos actúan como nichos ecológicos, lo que resulta una mayor diversidad microbiana.<sup>5</sup>

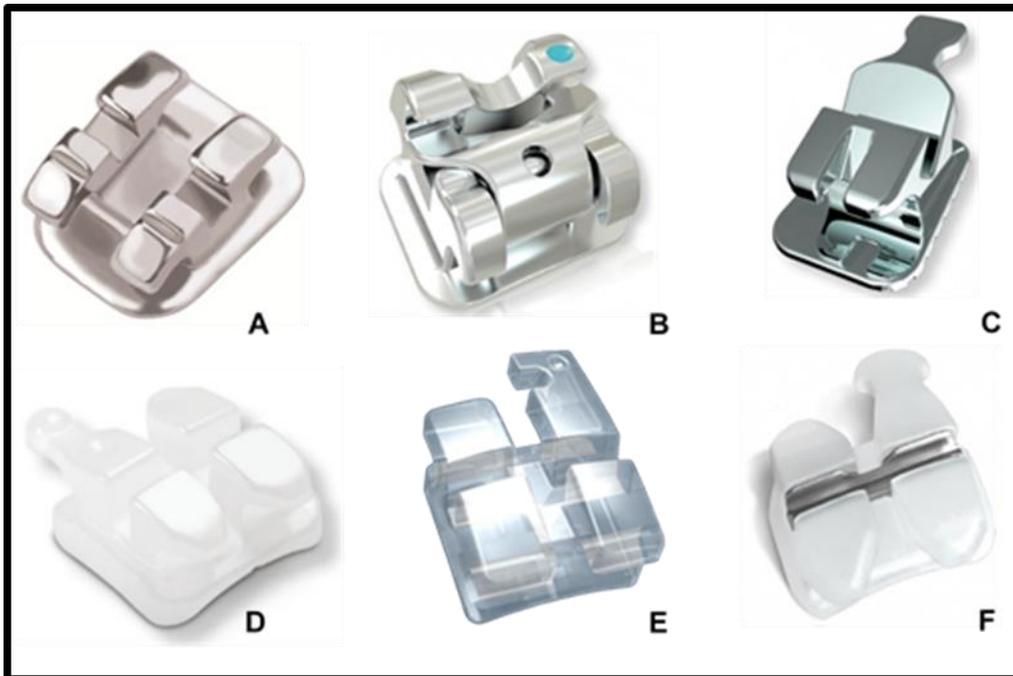
Recientemente se encontró un aumento en la carga microbiana en pacientes en tratamiento ortodóncico en comparación a los que no estaban bajo tratamiento, aislando con mayor frecuencia de la cavidad oral bacterias y hongos. Aún más se observó, que la superficie limpia de aparatología ortodóncica expuesta a la cavidad oral, inmediatamente fue cubierta por la película salival y colonizada por microorganismos, que favorecen la formación de biopelícula dental.<sup>5</sup>

El cuerpo humano contiene una microflora comensal como parte integral de las superficies mucosas, que ofrece protección contra organismos patógenos desempeñando un papel crucial en el mantenimiento de la salud bucal, sin embargo al instalar aditamentos fijos, se modifica dicho equilibrio en la diversidad microbiana. Es por eso la importancia, antes de iniciar un tratamiento de ortodoncia, fomentar correctos hábitos de higiene oral e informar al paciente que deberá someterse a mantenimientos de higiene por parte de su odontólogo y utilizar aditamentos complementarios que favorezcan a la reducción de formación de biopelícula dental.<sup>5</sup>

## Marco teórico

La aparatología empleada en el tratamiento de ortodoncia, favorece la retención de biopelícula dental y dificulta su eliminación por parte del paciente; una inadecuada higiene oral, puede hacerlos proclives a desarrollar enfermedades periodontales. Este riesgo está relacionado con los aparatos fijos y sus elementos complementarios durante el tratamiento ortodóncico (bandas, ligaduras, elásticos, etc.) constituyendo la retención mecánica que dificulta el cepillado y aumentan el número de superficies donde se retiene partículas de alimento propiciando la adhesión y crecimiento de microorganismos.<sup>6, 7</sup>

Los brackets son componentes pasivos que actúan como soportes del arco, y los hay de acero inoxidable, policarbonato y zafiro, y que pueden ser autoligables, linguales o convencionales.<sup>8</sup> (Figura 1).



**Figura 1.** Tipos de brackets. **A)** Bracket metálico, **B)** Bracket autoligable metálico, **C)** Bracket lingual metálico, **D)** Bracket de policarbonato, **E)** Bracket de zafiro, **F)** Bracket de autoligado estético.<sup>8, 9</sup>

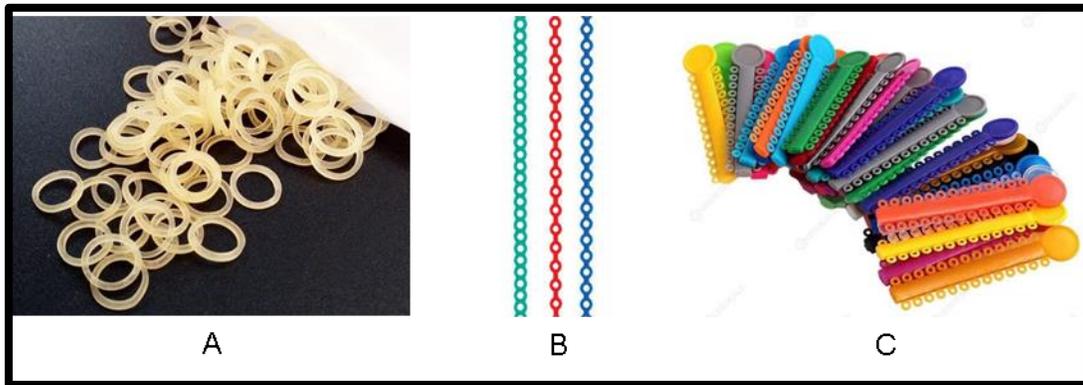
Algunos de los factores que facilitan la adhesión microbiana a la aparatología de ortodoncia son: rugosidad de la superficie, composición y flujo de la saliva, tiempo de incubación, la frecuencia de la ingestión de glucosa y la higiene oral.<sup>6, 7</sup>

Otro material de amplio uso en tratamientos de ortodoncia es el elastómero, un material que aumenta su longitud cuando se le aplica una determinada fuerza y recobra su tamaño original cuando la fuerza desaparece sin rebasar su módulo de elasticidad. El caucho natural fue el primer material con estas propiedades y fue empleado desde la civilización Inca y Maya; sin embargo su uso fue limitado porque la temperatura y la humedad hacia perder fácilmente sus propiedades. Con el descubrimiento del vulcanizado por Charles Goodyear en 1839, las propiedades del caucho natural mejoraron y sus usos se incrementaron; y pronto ortodoncistas como Baker, Case y Angle comenzaron a trabajar con este material en sus tratamientos.<sup>10, 11, 12</sup>

Los elásticos sintéticos fueron introducidos en 1920 gracias al desarrollo de la petroquímica siendo polímeros amorfos hechos de poliuretano, sin embargo; la composición exacta es información exclusiva del fabricante.

Los materiales elásticos se han vuelto demandantes porque genera facilidad en la práctica clínica por su fácil uso y versatilidad, pero presentan la desventaja de ser pigmentados y oscurecidos en boca debido al acúmulo en las cavidades huecas de la matriz del elástico por fluidos y microorganismos.<sup>11, 12</sup>

Dentro de estos materiales tenemos los elásticos intermaxilares, cadenas de cierre, topes para derrotar dientes, los módulos elásticos, entre otros. (Figura 2).



**Figura 2.** Elásticos usados en ortodoncia. **A)** Elásticos intermaxilares, **B)** Cadena elástomérica, **C)** Módulos elásticos.<sup>13, 14, 15</sup>

Actualmente existen módulos que tienen una cubierta de polímero hidrogel, el cual se fabrica a través de una tecnología denominada metafasis. Al presentar una cubierta de polímero hidrogel transforma la superficie del poliuretano del elastómero en una superficie lisa, logrando una superficie pulida y lubricada que reduce la adherencia microbiana; pero se ha comprobado que esta propiedad se pierde en un 64.7% progresivamente con el tiempo que el elástico se mantiene en el medio bucal debido a la exposición a las enzimas salivales que además reducen la resistencia a la fatiga y aumenta la hidrólisis reduciendo el peso molecular del polímero.<sup>11,12,16</sup>

A comienzos del siglo XX se empiezan a utilizar microorganismos benéficos para la salud enfocada a curar enfermedades o apoyar la función inmune, siendo una alternativa para combatir las infecciones a través de la ingesta de bacterias inocuas que desplazan a los microorganismos patógenos, este tipo de microorganismos son llamados probióticos.<sup>17</sup>

El estudio de las bacterias benéficas en la salud se debe al bacteriólogo inmunólogo ruso Elie Metchnikoff a principios de 1900, quien introdujo la idea de que las bacterias del ácido láctico en el yogurt pueden neutralizar los efectos perjudiciales de los patógenos intestinales y por lo tanto extender la duración de la vida de los seres humanos.<sup>18</sup>

En 1965 Lilly y Stillwell introdujeron el término probiótico por primera vez, como “sustancias producidas por microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos”.<sup>17</sup>

En el 2001 la Organización para la agricultura y la alimentación y la organización mundial de la salud, establece la definición actual; “los probióticos son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren el beneficio de salud al huésped”, siendo los del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* las especies a las que más se le atribuyen dichas propiedades, teniendo más aplicaciones médicas, incluyendo el área odontológica.<sup>19</sup>

La biopelícula dental está en constante cambio y desarrolla una estructura cada vez más compleja a medida que madura, por la interacción entre las especies en la colonización. Existen métodos para combatir la colonización bacteriana en la cavidad oral, como, sistemas de liberación de flúor, limpieza dental, fosfato de calcio, enjuagues bucales, geles, así como terapia antimicrobiana con clorhexidina, iodopovidona o penicilinas.<sup>19</sup>

La necesidad de nuevos enfoques innovadores como los probióticos se han destacado en los últimos años, debido a su origen natural y los beneficios para la salud en general.<sup>19</sup>

## Microbiota Oral

La microbiota oral es una parte importante del microbioma humano. La cavidad oral contiene varios nichos significativamente diferentes con distintas comunidades microbianas. Una amplia gama de microorganismos habitan en ella, formando una comunidad ecológica compleja que influye en la salud oral y sistémica. Las enfermedades bucales más prevalentes, la caries dental y las enfermedades periodontales, son enfermedades asociadas al desequilibrio en la microbiota.<sup>20</sup>

Se desarrollan grandes cantidades de microorganismos en diferentes nichos ecológicos de la boca: en la superficie epitelial de la lengua, mejillas y los dientes (en especial en las fisuras oclusales y áreas interproximales y en superficies a lo largo del margen gingival). Las acumulaciones en la biopelícula contienen más de  $1 \times 10^{10}$  microorganismos por gramo de peso seco, en tanto que la saliva contiene aproximadamente  $1 \times 10^7$  microorganismos por mililitro. Los microorganismos presentes en la saliva no representan una población residente sino que son microorganismos que han sido desalojados de las superficies orales, en especial de la lengua.<sup>20</sup>

La cavidad oral en general es estéril en el momento del nacimiento, pero durante el primer día, la flora residente comienza a colonizar la boca. En una semana se detectan *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus mitis*, adquiridos de los progenitores o de las personas que cuidan a los neonatos, y poco después aparecen las *Veillonelas* y otras especies. Con la erupción de los dientes y la provisión de un medio ambiente anaerobio más adecuado se produce el aumento del número de los microorganismos anaerobios como aquellos de los géneros *Fusobacterium* y *Bacteroides*.<sup>20</sup>

Después de la erupción de los dientes también se detectan ciertos microorganismos facultativos característicos de la flora adulta el *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguis*; hacia el final del primer año de vida, la flora general de los lactantes es similar a la de los adultos, sin embargo dos grupos importantes: las espiroquetas orales y el *Bacteroides melaninogenicus* y las especies relacionadas

que colonizan los surcos gingivales habitualmente, no están presentes en la cavidad oral hasta la época de la pubertad.<sup>20</sup>

Una vez erupcionado los dientes de la segunda dentición la cavidad oral es un entorno complejo con distintos hábitats microbianos, que forman un sistema ecológico rico en especies.<sup>20</sup>

El *S. salivarius*, por ejemplo coloniza de forma preferencial la superficie dorsal de la lengua, mientras que el *S. oralis* coloniza las superficies lisas de los dientes, el *S. mitis* es el microorganismo predominante en la mucosa bucal y el *S. mutans* coloniza las fosetas y fisuras oclusales de las coronas.<sup>20</sup>

Entre los hongos, el más común en cavidad oral es *Candida albicans*, es neutro cuando la microbiota oral es normal; sin embargo, cuando se rompe el equilibrio de la microbiota oral, *Candida albicans* buscará la oportunidad colonizar el tejido oral, formando una biopelícula con *Streptococcus* para desempeñar un papel patógeno. La ecología y la distribución intraoral de los diversos tipos de bacterias de la boca están reguladas por cierto número de factores físicos, químicos y mecánicos.<sup>20</sup>

La boca es similar a otros ecosistemas del cuerpo en tener una comunidad microbiana característica que beneficia al hospedador, es muy adecuada para la supervivencia microbiana, es tibia y húmeda, lo que proporciona buenas condiciones para la proliferación y el crecimiento de microorganismos. La boca conserva una temperatura de 35-37°C, apropiada para la proliferación de una gran variedad de microorganismos. La temperatura asciende en los sitios subgingivales durante la inflamación y esto puede alterar la expresión génica bacteriana, lo que a su vez esto puede afectar la capacidad de competencia entre las bacterias dentro de la comunidad microbiana y favorecer la proliferación y actividad proteolítica de algunos patógenos periodontales.<sup>21</sup>

EL pH es un determinante importante de la distribución y el metabolismo microbiano en la boca. La actividad amortiguadora de la saliva desempeña un papel importante en el mantenimiento del pH intrabucal cercano a la neutralidad, lo que favorece la proliferación de los miembros residentes de la microbiota bucal.<sup>21</sup>

Los cambios del pH ambiental son frecuentes y cuando lo hacen, provocan grandes modificaciones en las proporciones de las bacterias en el interior de las biopelículas. Después del consumo de carbohidratos, el pH de la saliva cae rápidamente debajo de 5 como consecuencia de la producción de derivados ácidos de la fermentación. Según la frecuencia de la ingesta de azúcar, las bacterias de la biopelícula quedarán expuestas a diversas agresiones asociadas con el pH bajo. Muchas de las bacterias predominantes en la biopelícula, que se hallan en sitios sanos pueden tolerar periodos breves de pH bajo, pero las exposiciones más frecuentes o prolongadas a condiciones de acidez las inhiben o las matan. Esto puede provocar el enriquecimiento de especies que toleran ácidos (acidúricas), en especial *Streptococcus mutans*.<sup>21</sup>

De este modo, la modificación de la composición bacteriana predispone la superficie a la caries dental. El pH del surco gingival sano es de aproximadamente 6,9 pero durante la inflamación se llega a encontrar con un pH de 5 y en presencia de bolsa periodontal pH de 3 a 4. La inflamación aumenta el flujo del líquido crevicular en el hábitat subgingival y el pH es una consecuencia de la mayor proteólisis bacteriana de las proteínas y las glucoproteínas del líquido crevicular. Incluso cambios ligeros del pH puede alterar la tasa y el patrón de crecimiento de la expresión génica de las bacterias subgingivales y aumentar la competitividad de algunos patógenos anaerobios Gram negativos a expensas de las especies habituales en un ecosistema periodontal sano.<sup>21</sup>

La saliva y el líquido del surco gingival también tienen una influencia importante en la distribución bacteriana porque ellos proveen una variedad de moléculas del hospedador que son potenciales nutrientes para los microorganismos. Los nutrientes primarios como los aminoácidos, proteínas y las glucoproteínas, los obtienen de la saliva y el líquido del surco gingival. La mayoría de las bacterias bucales son anaerobias facultativas o estrictas. Estos microorganismos colonizan la mucosa y las superficies dentales en la boca para formar comunidades tridimensionales, estructuradas con especies múltiples, lo que se le conoce como biopelícula dental.<sup>16, 21</sup>

## Biopelícula dental en pacientes ortodóncicos

El acúmulo de biopelícula dental en los pacientes es algo que constantemente tiene que ser controlado por la proliferación de microorganismos patógenos. Este control se vuelve más complejo en pacientes que tienen aparatología ortodóncica, ya que crea áreas de retención que predisponen a un mayor almacenamiento de biopelícula supra gingival, la cual altera las condiciones normales del medio oral cambiando la composición de la flora bacteriana, haciéndolos más susceptibles a desarrollar gingivitis, enfermedad periodontal, hiperplasias gingivales y manchas blancas, a pesar del cepillado y uso de aditamentos de higiene.<sup>22</sup> (Figura 3).



**Figura 3.** Inflamación gingival en paciente con aparatología ortodóncica. **A)** Inflamación gingival en fase de asentamiento del tratamiento, **B)** Inflamación gingival en cierre de espacios usando cadenas elásticas, **C)** Tinción de la biopelícula dental en paciente bajo tratamiento de ortodoncia, **D)** Agrandamiento gingival durante tratamiento de ortodoncia. Fuente directa.

El conocimiento de la anatomía, biología y la función de los tejidos periodontales es de vital importancia, ya que junto con los dientes, el sistema neuromuscular y la articulación temporomandibular conforman un sistema en funcionamiento dinámico.<sup>23</sup>

La encía insertada cumple la función de mantener firmemente unidos los tejidos gingivales al diente y al hueso alveolar subyacente, y también les confiere rigidez y resistencia biomecánica. Esto lo logra mediante un sistema de haces de fibras supra-alveolares contenidas dentro de su tejido conectivo, este sistema de fibras gingivales por su disposición también controla la posición de los dientes en la arcada.<sup>23</sup>

Entre el margen gingival y la superficie dental se encuentra el surco gingival. Un surco sano mide clínicamente de 1 a 2 mm en caras libres y de 2 a 4mm en caras proximales y no debe presentar hemorragia. Ésta cubierto por el epitelio del surco, una continuación no queratinizada del epitelio oral, y el fondo lo forma la porción coronaria del epitelio de unión, el cual constituye el sistema de unión de la encía y el diente. En este surco gingival se producirá el intercambio entre las bacterias y sus productos tóxicos de defensa del huésped. El control de su profundidad y principalmente del sangrado al sondaje nos permitirá evaluar el riesgo de que presente enfermedad periodontal.<sup>23</sup>

El diagnóstico precoz de los problemas periodontales que pueden presentar un paciente que se realizará ortodoncia, es fundamental para evitar resultados no deseados, por lo que no se pueden realizar movimientos ortodóncicos en presencia de bolsas periodontales activas, ya que darán como resultado una rápida pérdida adicional de inserción de carácter irreversible, mayor predisposición a la recesión gingival comprometiendo la longevidad de la pieza dentaria, limitación a la regeneración tisular y aumento de la pérdida ósea.<sup>23</sup>

En pacientes que se encuentran bajo un tratamiento de ortodoncia se presenta mayor inflamación y desmineralización del esmalte cerca del margen gingival, en el área interproximal y alrededor de aditamentos fijos. La encía tiene una respuesta

inflamatoria ante las bacterias presentes en la biopelícula dental, resultando en agrandamiento gingival.<sup>24, 25</sup>

La desmineralización es una etapa temprana de la caries dental que se produce cuando se permite que la biopelícula permanezca en la superficie del diente en una longitud crítica de tiempo. Varios estudios han informado de un aumento significativo en la prevalencia y la gravedad de la desmineralización en los pacientes en tratamiento de ortodoncia. La incidencia en la literatura varía de 30% a 65% sin diferencia significativa en el sexo y cuadrante donde se presenta. En los pacientes de ortodoncia, la desmineralización se manifiesta comúnmente como manchas blancas o marrones en el esmalte alrededor de las bandas y brackets, que generalmente ocurren en las superficies labiales o bucales de los dientes y pueden conducir a la cavitación.<sup>24, 25, 26.</sup>

Expósito y Clos, mencionaron la incidencia de la mala higiene bucal de 76,5% en pacientes portadores de aparatología fija, prevaleciendo significativamente en los adolescentes.<sup>27</sup>

La edad y etapa de vida del paciente es un factor de riesgo, en pacientes adolescentes por ejemplo además del acumulo de biopelícula dental, presentan cambios hormonales que pueden potenciar los fenómenos inflamatorios. Al tratar pacientes adultos, el ortodoncista tendrá nuevos retos, como tratar a los pacientes periodontalmente comprometidos, complicando el tratamiento ortodóncico por los objetivos terapéuticos más limitados en los cuales las condiciones muchas veces, no son las más favorables porque habrán perdido elementos o tienen soporte reducido, defectos infraóseos, dehiscencias y triángulos negros interproximales, por lo que es ampliamente aceptado que se deben emplear fuerzas menores para prevenir efectos adversos, incluyendo reabsorción radicular y daño adicional al ligamento periodontal, que pueden desencadenar una movilidad dental excesiva.<sup>27</sup>

Sin embargo, a pesar de estos problemas, se ha demostrado que el tratamiento ortodóncico ya no es una contraindicación para pacientes con enfermedad periodontal controlada, sin inflamación, porque mejora las posibilidades de restaurar

la dentición, logrando un equilibrio entre la tensión mecánica y la capacidad del tejido óseo de soportar fuerzas.<sup>27</sup>

Hay casos en que se debe suspender el tratamiento ortodóncico y tratar el problema periodontal hasta que se logre su control total (Figura 4), por lo que es fundamental que antes de que se inicie el tratamiento de ortodoncia, la inflamación activa de los tejidos de soporte se haya eliminado y se mantenga inactiva durante y después del tratamiento de ortodoncia por lo que se debe tomar en cuenta la colaboración de especialistas para la realización de un plan de tratamiento multidisciplinario para el manejo de estos casos.<sup>27</sup>



**Figura 4.** Paciente con enfermedad periodontal activada durante el tratamiento ortodóncico. Fuente directa.

La biopelícula es una estructura organizada compuesta por microcolonias de bacterias en una matriz con forma de glucocáliz, siendo un entramado orgánico formado por restos de la destrucción de bacterias y polisacáridos sintetizados por las propias bacterias a partir de los azúcares de la dieta. En la parte superior de la capa inferior, aparece una capa más laxa que suele tener una apariencia irregular y puede extenderse hacia el medio circundante (los dientes y saliva).

La capa de líquido que rodea la biopelícula tiene una subcapa muy estable y una capa de líquido en movimiento. Los componentes nutricionales penetran este medio líquido mediante la difusión molecular. Existen gradientes de difusión excesivos sobre todo para el oxígeno, en las regiones inferiores más compactas de la biopelícula, lo que explica aún más los cambios en la composición microbiana.<sup>28</sup> (Figura 5).

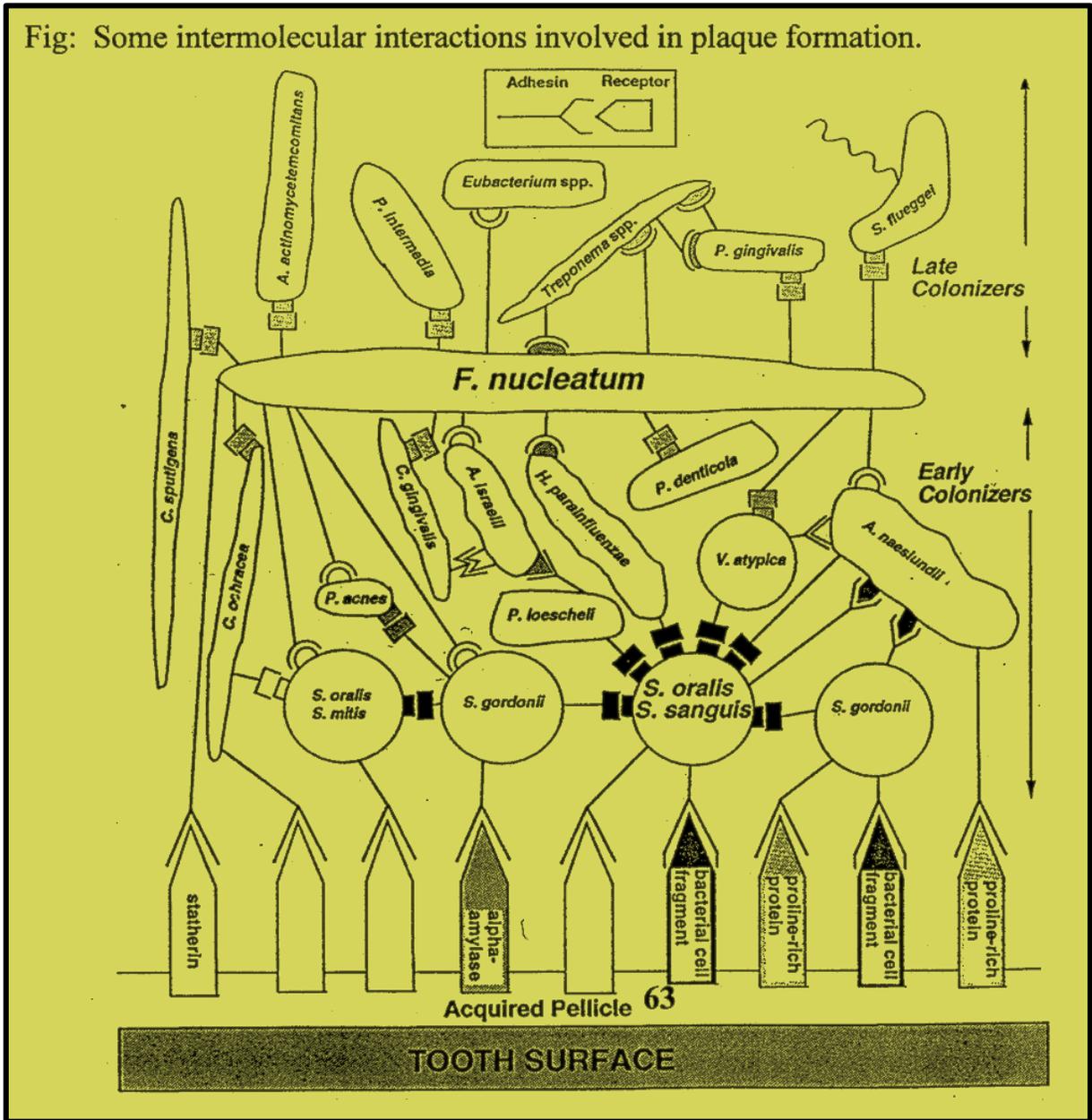


Figura 5. Diagrama de la formación de biopelícula dental.<sup>29</sup>

**Los diferentes pasos de formación de la biopelícula son (Figura 6):**

6.1. Asociación de la película acondicionante (película adquirida).

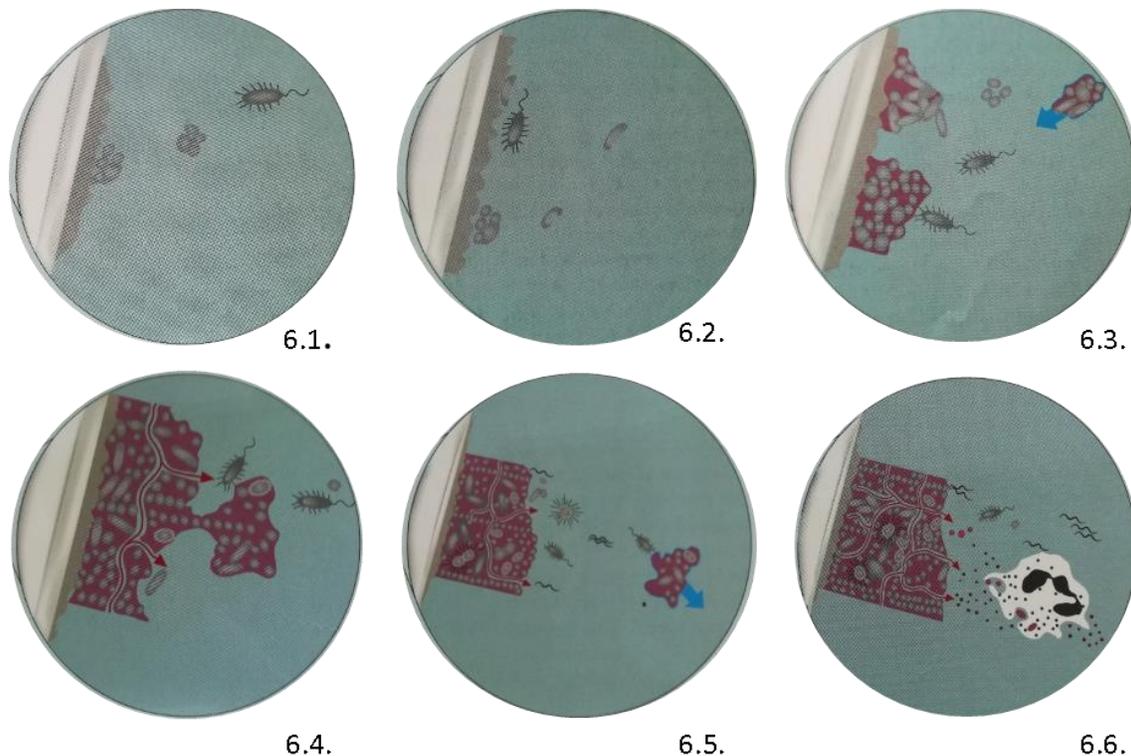
6.2. Adhesión reversible entre las células microbianas y la superficie de la película adquirida.

6.3. Proliferación. Adhesión más estable mediante interacciones entre moléculas específicas de la superficie microbiana (adhesinas) y las moléculas complementarias (receptoras) de la película acondicionante salival.

6.4. Coadhesión, en la cual los colonizadores secundarios se adhieren a los receptores de las bacterias presentes lo que induce a un incremento de la diversidad microbiana.

6.5. Multiplicación de las células adheridas que aumenta la biomasa y la síntesis de exopolímeros para formar la matriz de la biopelícula (maduración de la placa).

6.6. Desprendimiento de células adheridas para promover la colonización a distancia.<sup>21</sup>



**Figura 6.** Formación de la biopelícula dental.<sup>21</sup>

## ***Streptococcus oralis***

El género *Streptococcus* está formado por bacterias esféricas que crecen en cadenas de longitud variable. La mayoría son anaerobios facultativos, existiendo algunas especies anaerobios obligados. Cuando los *Streptococcus* son cultivados en agar sangre se puede observar su morfología macroscópica característica de la cepa.

Los *Streptococcus* del grupo *mitis* colonizan preferentemente la cavidad oral y sobreviven en las superficies blandas y duras de la boca.<sup>30</sup>

El *Streptococcus mitis* se clasifica en varios grupos filogenéticos, entre ellos *Streptococcus oralis*, *Streptococcus dentisani*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pseudopneumoniae*, *Streptococcus dentisani*, *Streptococcus Tigurinus*, *Streptococcus infantis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus massiliensis*, *Streptococcus rubneri*, *Streptococcus Lactarius*, *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus oricebi* y *Streptococcus panodentis*.

Es una de las especies bacterianas que puede ser potencialmente patógena y causar infecciones oportunistas como la endocarditis y la septicemia en individuos predispuestos. Generalmente se considera que son habitantes comensales de la cavidad oral y del tracto respiratorio superior, causando gingivitis y periodontitis. A excepción es *S. pneumoniae*, que es uno de los principales patógenos bacterianos a escala mundial, que causa infecciones como neumonía, meningitis, septicemia e infecciones del oído medio.<sup>30, 31, 32.</sup>

*S. oralis* es un colonizador temprano en la formación de la biopelícula dental. Esta especie se adhiere al esmalte dental mediante la formación de polisacáridos extracelulares y crece en estrecha asociación con las fimbrias de *Actinomyces*, factor patogénico con otros miembros de la biopelícula dental jugando un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad periodontal.<sup>34, 35</sup>

La capacidad de *S. oralis* para producir sialidasa (neuraminidasa) y otras enzimas hidrolíticas es un factor que contribuye a su patogenicidad. Además, el hecho de que esta y otras especies de *Streptococcus* en la flora de la biopelícula dental se unan y activen a plasminógenos, constituye otro factor importante para el inicio de la infección y su propagación en todo el cuerpo.<sup>34, 35</sup>

En la cavidad bucal se han descrito varios micronichos ecológicos complejos que tienen condiciones ambientales y nutricionales muy diferentes, como la lengua, la superficie de los dientes, y el surco gingival. *S. oralis* coexiste y compite con una amplia variedad de otras especies microbianas en cada uno de estos nichos y, por lo tanto, presenta una gran plasticidad fenotípica para adaptarse a diferentes entornos, experimentando cambios metabólicos y fenotípicos que confieren mayor resistencia a los agentes antimicrobianos.<sup>35, 36</sup>

### **Enfermedad periodontal**

Cuando no se controla la microbiota oral provoca inflamación gingival, conocida como gingivitis con afectación del tejido conjuntivo y el epitelio, pero sin afectar la barrera de las fibras supracrestales.<sup>36</sup>

La gingivitis es la forma inicial de la enfermedad periodontal; siendo una enfermedad inflamatoria reversible causada por una biopelícula dental residente que se forma en el margen gingival.<sup>36</sup>

Ocho taxones predominantes encontrados en la microbiota de biopelícula dental; *Streptococcus*, *Leptotrichia*, *Selenomonas*, *Veillonella*, *Prevotella*, *Lautropia* y *Haemophilus*, están asociados con la gingivitis y pueden servir como biomarcadores.<sup>36</sup>

Si no se controla, la gingivitis progresará a periodontitis. La periodontitis es una enfermedad inflamatoria crónica e irreversible, durante la cual el infiltrado crónico de las células inmunes induce la destrucción del tejido conectivo, la proliferación vascular y la destrucción del hueso alveolar.<sup>36</sup>

La enfermedad periodontal es la infección producida por bacterias localizadas en la interfase encía-diente que afectan a los tejidos que rodean y soportan los dientes (encía, hueso alveolar, cemento y ligamento periodontal). Cuando se presenta enfermedad periodontal hay un aumento indiscriminado de las bacterias a nivel del surco gingival siendo la causa principal una deficiente higiene oral.

Las interacciones entre el huésped y la microbiota determinan la manera, la gravedad y la tasa de progresión de la enfermedad.<sup>36</sup>

Se considera un problema de salud pública debido a la alta prevalencia de destrucción periodontal en la población mundial. En México se ha reportado una incidencia del 70% de la población considerándose como una causa significativa de pérdida dentaria, teniendo un impacto negativo en la calidad de vida de la población.<sup>37, 38</sup>

La lesión típica de la periodontitis es la bolsa periodontal (profundización patológica del surco gingival), siendo un objetivo fundamental del tratamiento su eliminación y el control de la infección, eliminando los organismos patogénicos mediante diferentes procedimientos, como el alisado y pulido radicular y en otros casos de forma quirúrgica y posteriormente se requiere la supervisión profesional periódica a lo largo de la vida. Este tratamiento ha permanecido vigente con pocos cambios durante muchas décadas y siguen siendo el estándar en la inmensa mayoría de los casos, ya que sin duda ha demostrado su efectividad en numerosos estudios clínicos controlados y en análisis retrospectivos significativos. Sin embargo, no siempre es efectivo como tratamiento único en la mejoría de los parámetros clínicos, por lo que se puede asociar a la prescripción de antibioterapia sistémica.<sup>37, 38</sup>

Esta modalidad de tratamiento elimina toda la microbiota, independiente de su patogenicidad, además de asociarse con el incremento de la resistencia antibiótica y la frecuente recolonización de los sitios tratados. Por este motivo ha sido necesaria la búsqueda de nuevos paradigmas de tratamiento periodontal.<sup>39, 40</sup>

## **Modulación de la microbiota oral.**

Debido a la relación de los microorganismos patogénicos y las enfermedades orales, es crucial mejorar la protección contra los patógenos y mantener el equilibrio dinámico de la microecología oral. Comprender las interacciones entre las comunidades microbianas es clave para combatir los patógenos orales.<sup>41</sup>

Se podría excluir un potencial patógeno si los receptores de adhesión no están disponibles y si las bacterias asociadas no están presentes para la cooperación metabólica, ya sea en la utilización de nutrientes o en la gestión ambiental. La coexistencia de grupos de microorganismos confiere una mayor virulencia y un mayor riesgo para el desarrollo de enfermedades orales.<sup>41</sup>

La terapia actual está orientada principalmente a reducir el número de microorganismos patógenos por métodos mecánicos. La eliminación automática de la biopelícula, como la profilaxis dental, mejora el nivel de la misma y baja sus niveles de patogenicidad.<sup>42</sup>

Se han empleado varios métodos para disminuir la carga microbiana con base en la administración sistémica y tópica de agentes antimicrobianos, pero el uso prolongado de antimicrobianos sistémicos puede aumentar la resistencia a los antibióticos, náuseas y diarrea; por lo tanto, los investigadores ahora se centran en el desarrollo de sistemas de administración de fármacos localizados que pueden permitir la máxima concentración en el sitio objetivo, minimizando así los posibles efectos sistémicos.<sup>42</sup>

Los antibióticos están diseñados para atacar bacterias patógenas específicas en animales y humanos. Las indicaciones para el uso de antibióticos en odontología son limitadas porque la mayoría de las enfermedades orales se manejan mejor, eliminando el agente causal, realizando intervenciones quirúrgicas y medidas de higiene oral.<sup>43</sup>

El uso local de antibióticos generalmente se prefiere a la administración sistémica en odontología debido a una concentración de fármaco aumentada y sostenida en el líquido crevicular. Los antibióticos orales en algunos casos se utilizan como

complementos de la terapia mecánica para tratar periodontitis o en enfermedades más agresivas.<sup>44</sup>

Cuando los tratamientos manuales se complementan con el uso de antibióticos locales y sistémicos, la cavidad bucal sufre un cambio en la composición y la abundancia de diversas bacterias.<sup>44</sup>

Winkel y col., informaron que el grupo de amoxicilina / metronidazol después realizar raspados y alisados de la raíz mostraron parámetros periodontales significativamente mejorados y redujeron los niveles de *Porphyromonas gingivalis*.<sup>45</sup>

Sin embargo, se debe tener en cuenta que el uso de antibióticos en la práctica dental se caracteriza por una prescripción basada en factores epidemiológicos, clínicos y bacteriológicos, dando como resultado el uso de un rango muy estrecho de antibióticos de amplio espectro durante un período corto. Este procedimiento ha conducido al desarrollo de resistencia antimicrobiana y a la consiguiente ineficacia de los antibióticos de uso común.<sup>45</sup>

El uso efectivo de antibióticos puede requerir un análisis genómico del microbioma oral del paciente para identificar los microorganismos presentes y determinar si responderán a tratamientos específicos.<sup>45</sup>

El metronidazol ha sido utilizado por varios investigadores debido a su actividad antimicrobiana selectiva contra los anaerobios obligados. Se ha utilizado con éxito para el tratamiento de la periodontitis reduciendo significativamente el recuento total de bacterias en el fluido crevicular gingival. El gel de metronidazol como el de clorhexidina son efectivos en el tratamiento de la gingivitis. Se han comparado varios agentes quimioterapéuticos en busca de la modalidad de tratamiento más eficaz para curar diversos tipos de periodontitis.<sup>45</sup>

Los colutorio se limitan al ámbito supragingival, el gluconato de clorhexidina a concentraciones de 0,12% es un agente de uso supragingival muy efectivo, pero por sus efectos colaterales solo debe utilizarse a corto plazo. En algunos casos es

necesario realizar una terapia a nivel subgingival que los colutorios no logran darnos, en este caso, el objetivo puede alcanzarse mediante la administración de fármacos introducidos subgingivalmente o por vía sistémica. En los últimos años, cientos de estudios, han permitido conocer las indicaciones actuales de los fármacos en la prevención y el tratamiento de las infecciones periodontales, pero se siguen teniendo efectos adversos como consecuencia del uso de dichos fármacos.

Para superar limitaciones de los métodos de intervención, se han desarrollado nuevas terapias alternativas, como el uso de probióticos.<sup>45</sup>

## Probióticos

Los probióticos contienen microorganismos viables definidos en número suficiente que alteran la microflora (por implantación o colonización) en un compartimiento del huésped ejerciendo efectos benéficos para la salud.<sup>46</sup>

En todo el mundo, existen numerosas cepas de probióticos que se usan en suplementos alimenticios, pero la mayoría son inestables a temperatura ambiente y deben liofilizarse mediante procesos especiales para permanecer viables durante la fabricación y el almacenamiento.<sup>46</sup>

*Bacillus coagulans* es un bacilo grampositivo, formador de esporas y productor de ácido láctico. Originalmente fue aislado y descrito en 1932 por Horowitz y Wlassowa llamado *Lactobacillus sporogenes*. En 1997, el organismo fue reclasificado en el Manual Internacional de Bacteriología en función de sus propiedades bioquímicas y fue nombrado *Bacillus coagulans* siendo esta la nomenclatura actual y correcta.<sup>47</sup>

*Bacillus coagulans* debido a su forma esporulada, sobrevive sin un manejo especial y prolifera en el ambiente gastrointestinal. Es único entre los probióticos, ya que posee un recubrimiento proteico que le permite sobrevivir al ácido del estómago, llegar al intestino delgado y multiplicarse. El organismo requiere una mezcla de sustratos orgánicos y péptidos fermentables para su crecimiento.<sup>47</sup>

Son resistentes al calor con una temperatura óptima de crecimiento de 35-60° y el pH de crecimiento óptimo de 5,7 a 6,7. Debido a estas características, los microorganismos probióticos actúan contra potenciales patógenos para conseguir nutrientes o sitios de adhesión inhibiendo su crecimiento.

A pesar de la naturaleza transitoria de este microorganismo, produce un cambio en el ambiente intestinal en apoyo de una flora preexistente compleja y da como resultado la mejora de la ecología gastrointestinal al reponer la cantidad de microorganismos obligados deseables y antagonizar los microorganismos patógenos.<sup>48</sup>

Los métodos probióticos han sido utilizados para tratar caries principalmente por interferencia con la colonización de patógenos cariogénicos, por el mecanismo de acción en la boca, similar a lo observado en otras partes del cuerpo.<sup>49</sup>

El antagonismo de los probióticos hacia los patógenos se debe a la suma de diferentes estrategias entre las que destacan: la competencia por receptores de adhesión al epitelio, el desplazamiento de los sitios de adhesión, la competencia por los nutrientes y la inhibición de crecimiento de los patógenos por la producción de sustancias antimicrobianas por parte de los probióticos.<sup>49</sup>

## **Bacteriocinas**

Se ha demostrado que *B. coagulans* produce bacteriocinas, y ácidos grasos de cadena corta que nutren la mucosa. Las bacteriocinas son polipéptidos consideradas metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de otras bacterias, sintetizados por ribosomas que proporcionan al organismo una ventaja selectiva sobre otras cepas.<sup>47</sup>

Las bacteriocinas en bacterias Gram positivas son generalmente péptidos catiónicos, estables, con baja toxicidad y amplio espectro de acción, realizando efectos locales, sistémicos o combinados que implican la adherencia, coagregación

y competitividad contra bacterias, virus y hongos; eliminando o reduciendo significativamente la competencia por los nutrientes disponibles.<sup>48</sup>

Tienen una carga positiva neta, que favorece su interacción con la carga negativa de los lipopolisacáridos de la membrana de las bacterias Gram negativas, o con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias Gram positivas. La hidrofobicidad es otra característica para la inserción de la bacteriocina en la membrana celular. Estas características varían de molécula a molécula; no obstante, todas son importantes para la actividad antimicrobiana.<sup>48</sup>

La función de las bacteriocinas dentro de la célula productora no es el de mantenerla viva, sino que actúan como defensa para sobrevivir en un nicho ecológico, controlando el crecimiento de microorganismos y confiriéndole protección lo que le da una ventaja durante la colonización.<sup>48</sup>

Los *Bacillus coagulans* son microorganismos muy versátiles, productores de bacteriocinas; *coagulin* y *lactosporin*. *Coagulin* se ha aislado de heces de los bovinos y es una sustancia antibacteriana sensible a la proteasa producida por *Bacillus coagulans*. Es estable a 60° C y a un pH que oscila entre 4 y 8. Tiene un peso molecular de 81,654 kDa. Presenta un mecanismo de acción bacteriolítico contra células indicadoras y parece no verse afectada por solventes orgánicos como la alfa-amilasa o lipasa.<sup>47</sup>

*Lactosporin*, es una proteína antimicrobiana nueva, aislada de un suplemento dietético probiótico llamado Lactospore®, con peso moléculas de 30 a 40 kDa. La pérdida de actividad después de la exposición a un número de enzimas proteolíticas y de la lipasa sugiere que el lactosporin puede poseer una molécula de lípido que contribuye a su actividad inhibitora.<sup>47</sup>

## **Planteamiento del Problema**

Es muy común que se presente un desarrollo excesivo de microorganismos en pacientes bajo tratamiento ortodóncico, debido por la retención de biopelícula dental en la aparatología fija y removible, aunado a un cepillado deficiente.

Por la alta incidencia de pacientes que requieren tratamiento ortodóncico, es de suma importancia abordar de manera preventiva dichos factores, controlando el crecimiento de bacterias orales asociadas en la formación inicial de la biopelícula dental (*Streptococcus oralis*) y su adhesión a la superficie de la aparatología ortodóncica.

## **Justificación**

Las maloclusiones dentales conllevan al uso de aparatología de ortodoncia fija, siendo factores de riesgo que favorecen a la presencia de gingivitis y el desarrollo de enfermedad periodontal.

Se ha observado que el uso de probióticos puede controlar de manera significativa la proliferación de microorganismos patógenos en el tracto gastrointestinal, por lo tanto, su uso en cavidad bucal puede favorecer a la inhibición del desarrollo de *Streptococcus oralis* en la superficie de la aparatología ortodóncica siendo éste de los principales colonizadores de la película adquirida.

## Hipótesis

Los *Bacillus coagulans* al ser aplicados en módulos elástoméricos y brackets de ortodoncia inhibirán el crecimiento de colonias de *Streptococcus oralis in vitro*.

## Objetivos

### General

Determinar si el uso de probióticos *Bacillus coagulans* inhibe el crecimiento del *S. oralis* en la aparatología ortodóncica (brackets y ligas) *in vitro*.

### Específicos:

- Obtener un cultivo viable de *Bacilos coagulans* a partir de una pastilla de uso comercial (Sinuberase®).
- Determinar mediante halos de inhibición, si la incubación de los aparatos de ortodoncia (brackets y ligas) en un cultivo de probióticos inhibe el crecimiento de *S. oralis in vitro*.
- Determinar si el tiempo de incubación de la aparatología en el cultivo de los probióticos tiene un efecto en la inhibición del crecimiento de *S. oralis in vitro*.

## Metodología

Se utilizaron brackets de una aleación de acero inoxidable y módulos elásticos metafásix los cuales se esterilizan en autoclave a 15 libras de presión, 120° C, durante 15 min, dentro de un tubo Eppendorf con 1ml de agua bidestilada.

- Preparación de medio de cultivo para *Bacillus coagulans*.

En un matraz de Elenmeyer de 500ml se prepararon 100ml de medio de cultivo Luria Bertani (LB) (Pectona 10g, extrato de levadura 10g y cloruro de sodio 5g para un litro de agua). El medio fue esterilizado por autoclave previo a su uso.

Se le agregó un comprimido de Sinuberase® (*Lactobacillus sporogenes*) en el medio de cultivo y se mantuvo en agitación de 200 rpm a 37°C para comprobar la viabilidad de los microorganismos de la tableta y favorecer su crecimiento. Este cultivo, se ajustó una densidad óptica de 1 a 600nm y se preservó a -80°C en glicerol hasta su uso en las pruebas de inhibición de *S. oralis*.

Mediante espectrofotometría (DU 640 BECKMAN) se tomó la lectura del crecimiento del cultivo del probiótico a las 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 24 hrs, para ello se utilizó luz visible a 600 nm para realizar la cinética de crecimiento.

Para realizar la incubación en los aditamentos ortodóncicos con los probióticos se realizó un cultivo en medio LB usando como inóculo inicial los bacilos del criopreservado (se tomaron 160µL que fueron agregados a 100ml de medio LB estéril) y mediante el espectrofotómetro se tomaron lecturas hasta que el cultivo alcanza una densidad óptica (O.D.) de 0.6 a 600nm.

- Cultivo de *Streptococcus oralis*

Se cultivó *S. oralis* (ATCC 35037) con técnica de estría triple en una placa de agar sangre, y se dejó en incubación durante 72hrs en condiciones de anaerobiosis, empleando una jarra de anaerobiosis y un sobre del sistema gas pack.

- Ensayos de inhibición

Se dividió en 2 grupos: brackets, módulos y elásticos, los cuales se subdividieron en 4 subgrupos, donde cada uno contenía 3 módulos y 3 brackets respectivamente en cada tubo Eppendorf, donde 3 de ellos fueron tomados como experimental y 1 como control respectivamente los cuales solamente se mantuvieron inoculados con agua bidestilada con la que fueron esterilizados. (Tabla 1)

	Tiempo	Agar sangre	Control
1	15min	3 módulos (+probiótico)	3 módulos (+H <sub>2</sub> O)
	30 min	3 módulos (+probiótico)	
	60 min	3 módulos (+probiótico)	
2	15min	3 brackets (+probiótico)	3 brackets (+H <sub>2</sub> O)
	30 min	3 brackets (+probiótico)	
	60 min	3 brackets (+probiótico)	

**Tabla 1.** Organización de la distribución de los grupos de ensayo.

Cuando el medio de cultivo alcanzo su fase media logarítmica (O.D. 0.6), se tomó 1ml del medio con *bacilos* y se colocó con micropipeta a todos los tubos experimentales de los 2 grupos, y se mantuvieron a 37°C de temperatura en agitación de 200 rpm.

Una vez concluidos los tiempos de los grupos experimentales (15min, 30min, 60min), con una micropipeta se les retiro el medio con bacilos y se realizó un lavado con PBS (Phosphate Buffered Saline), utilizando un agitador vortex durante 30 segundos

Se utilizaron 2 cajas de Petri sembradas con 50µL de la cepa de *Streptococcus oralis* con técnica de estría múltiple, con el fin de llenar por completo la superficie del agar.

Posteriormente se le colocaron los brackets y los módulos elásticos pertenecientes de cada grupo, donde la primera hilera se colocó el grupo control, en la segunda hilera el grupo de 15min, la tercera el grupo de 30min y la cuarta de 60min.

Utilizando otro medio de cultivo agar sangre en caja petri, se colocaron solamente 10µL de medio de cultivo de *B. coagulans* sobre toda la superficie.

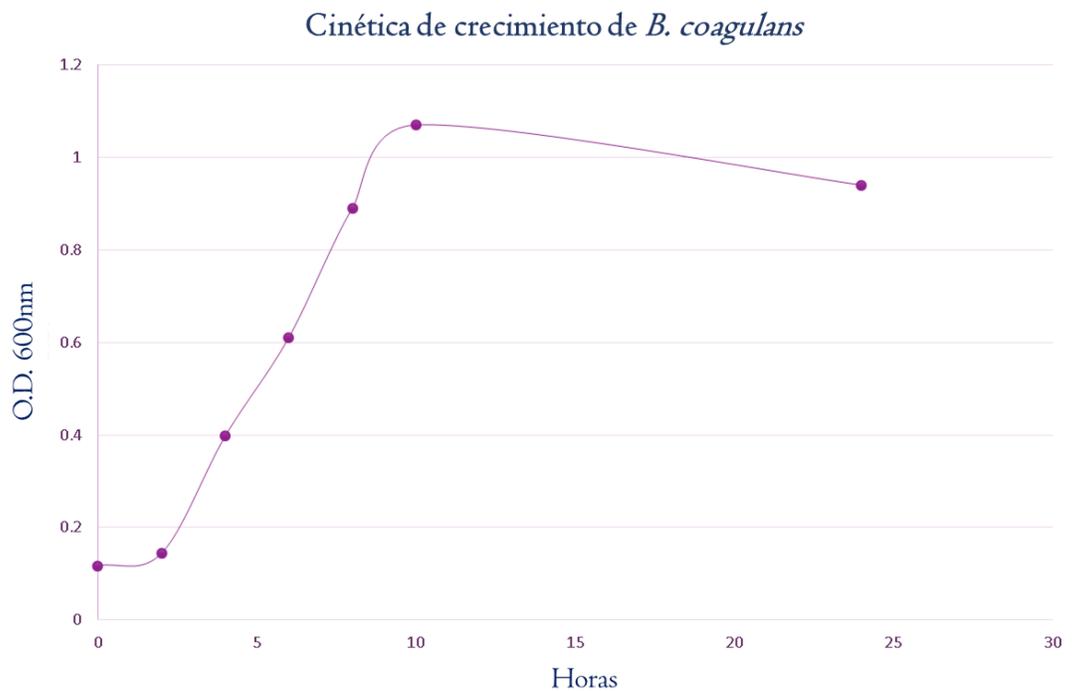
Una vez terminado la colocación las muestras, las placas se dejaron incubar en condiciones de anaerobiosis a 37°C de temperatura durante 24hrs.

## Resultados

- A las 6 hrs el cultivo alcanzo una densidad óptica (O.D.) de 0.6 a 600nm.

Tiempo (horas)	O.D. 600nm
0	0.1174
2	0.1442
4	0.3971
6	0.6103
8	0.89
10	1.07
24	0.94

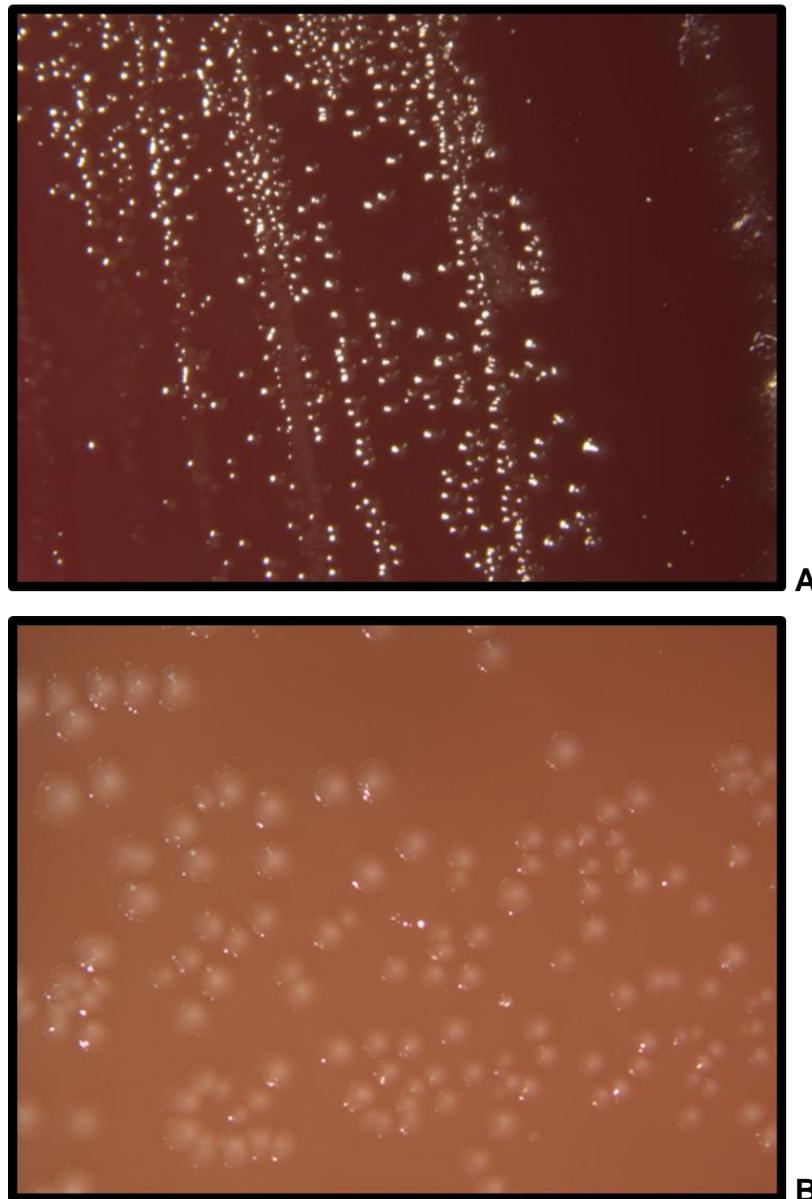
**Tabla 2.** Cinética de crecimiento de *Bacillus coagulans*.



**Gráfica 1.** Elaborada a partir de los datos obtenidos en las lecturas de densidad óptica y la relación entre el tiempo (horas) y el crecimiento obtenido.

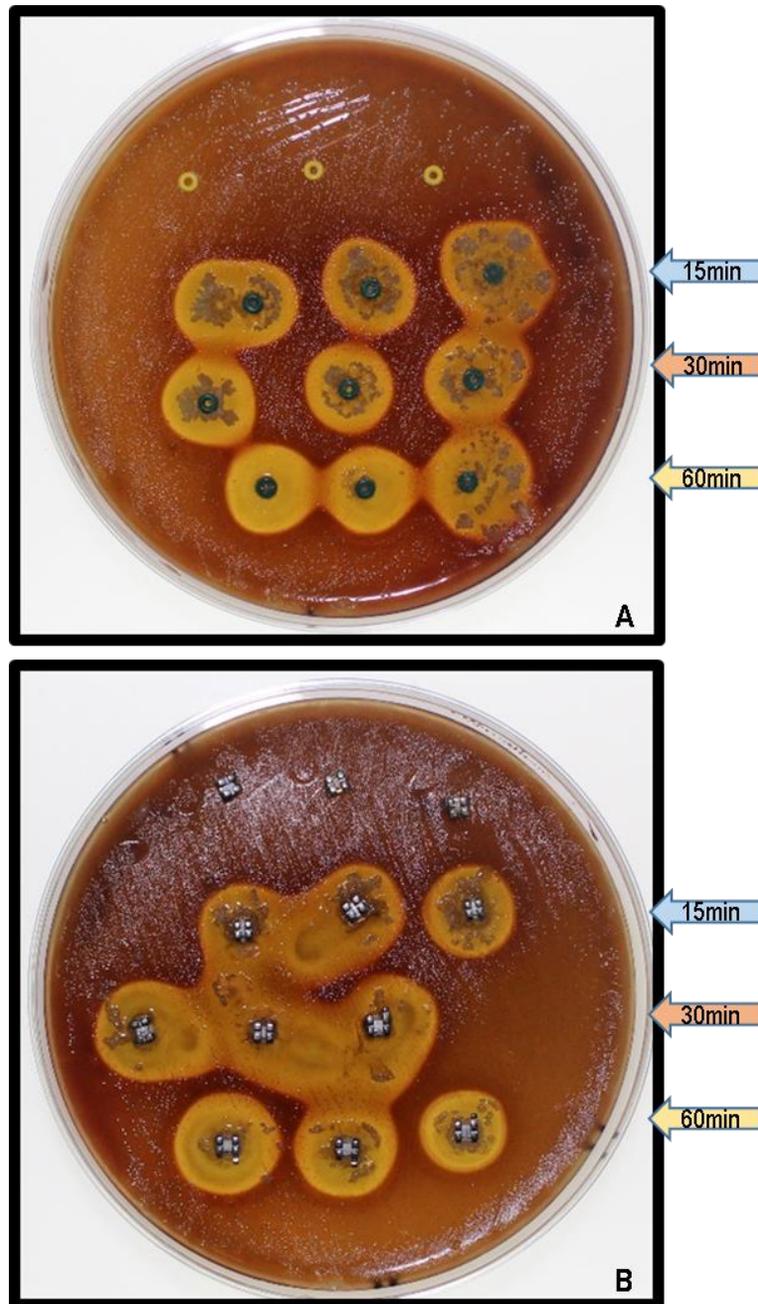
- Se comprobó las características morfológicas de las colonias de *S. oralis* en las placas de agar sangre.

Se observaron colonias esféricas de 0.2 a 0.5mm de diámetro formadoras de cadenas de longitud variable, de color blanco-grisáceo (Figura 7).



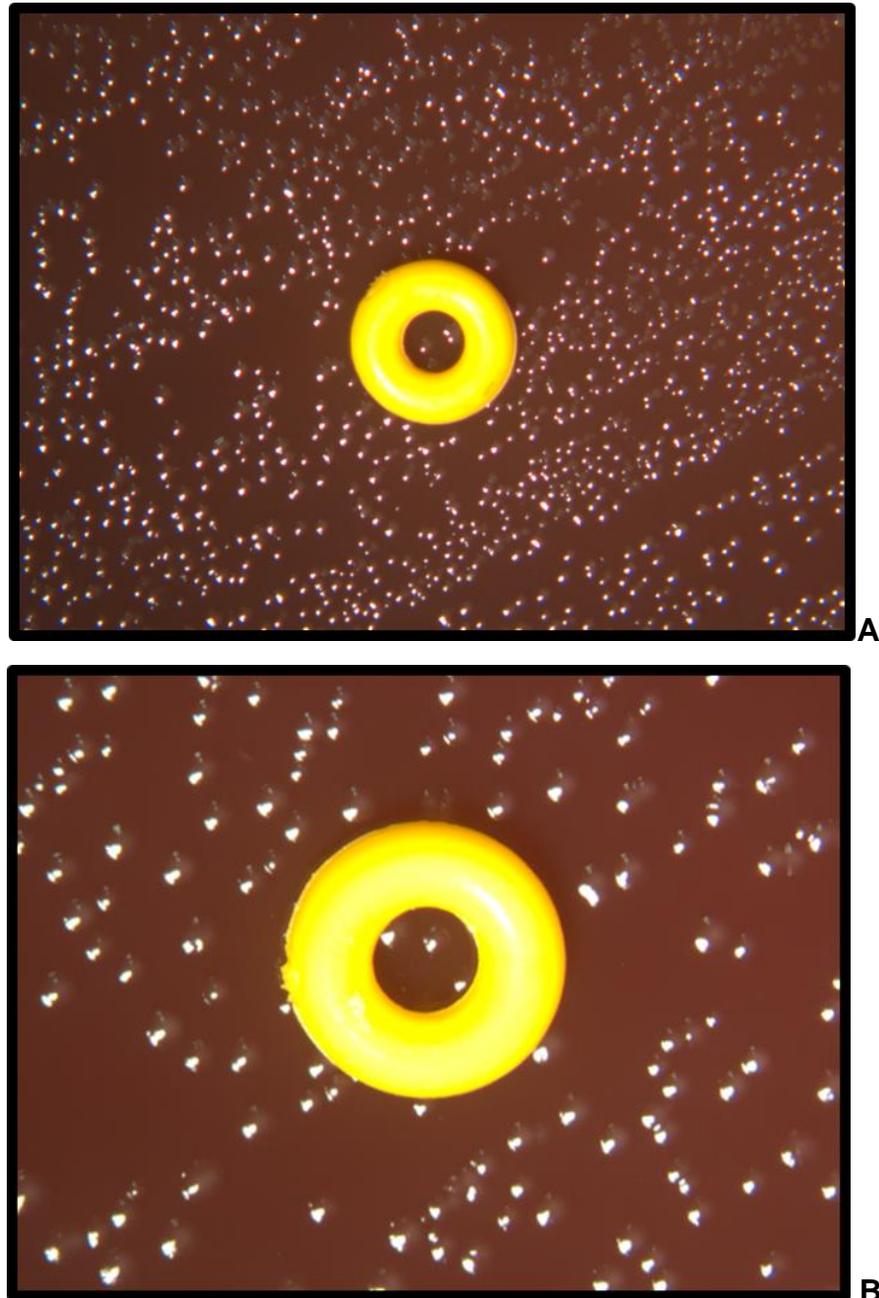
**Figura 7.** *Streptococcus oralis* ATCC 35037 en condiciones de anaerobiosis. Microfotografía tomada con microscopio óptico **A)** 20x **B)** 100x (Fuente directa).

- Los 2 grupos experimentales que estuvieron con *Bacillus coagulans* generaron zonas de halos de inhibición.



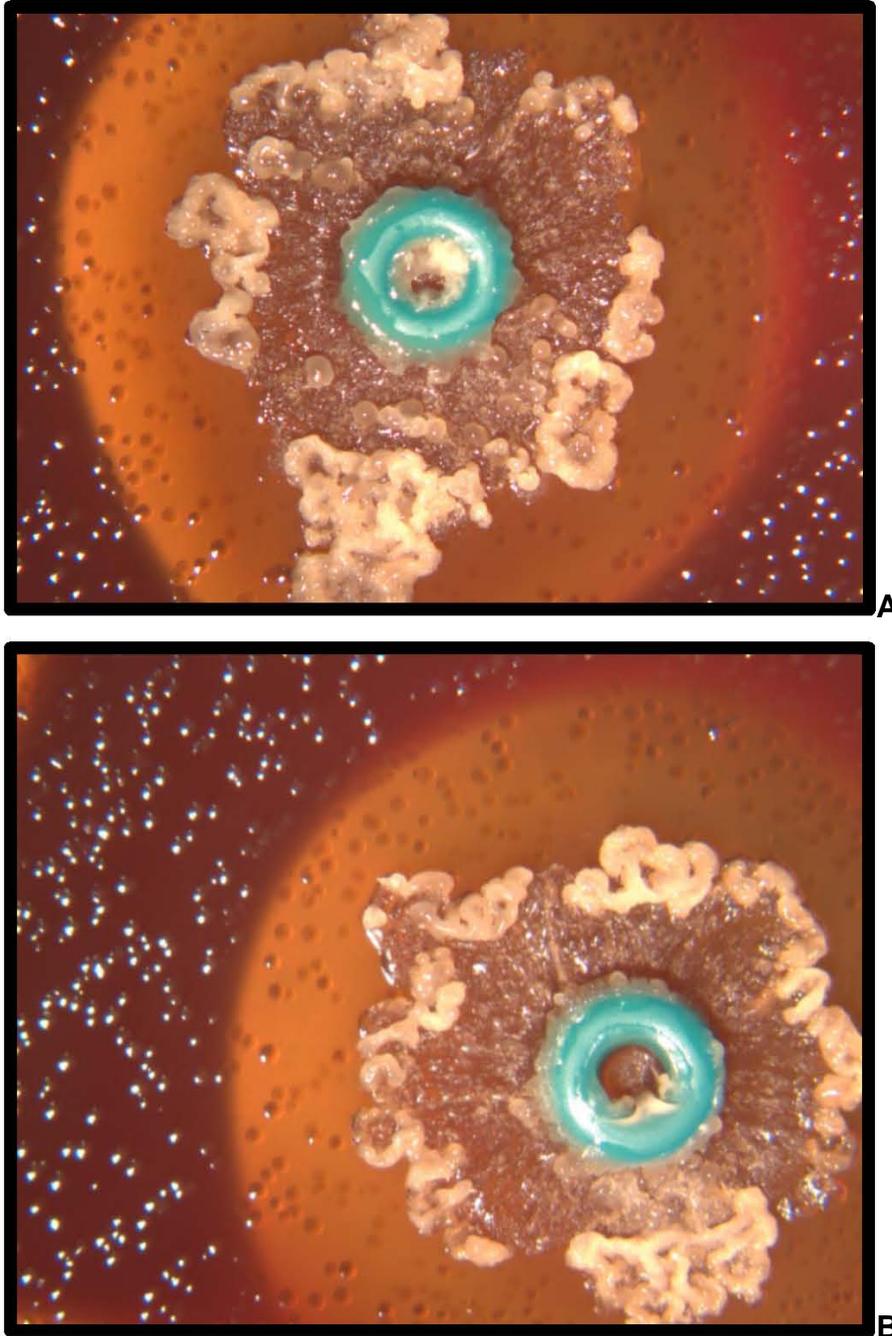
**Figura 8.** Cultivos en agar sangre, **A)** Módulos elásticos, grupo control y experimental; 15, 30, 60min (grupo 1). **B)** Brackets, grupo control y experimental; 15, 30, 60min (grupo2). En ambos grupos experimentales se observaron halos inhibitorios de 12, 15 y 18mm de diámetro aleatoriamente. (Fuente directa).

- En los grupos controles que fueron inoculadas solamente con agua bidestilada, hubo crecimiento de colonias de *S. oralis* en los aditamentos.
- No se mostraron diferencias entre los tiempos de los 3 grupos experimentales.

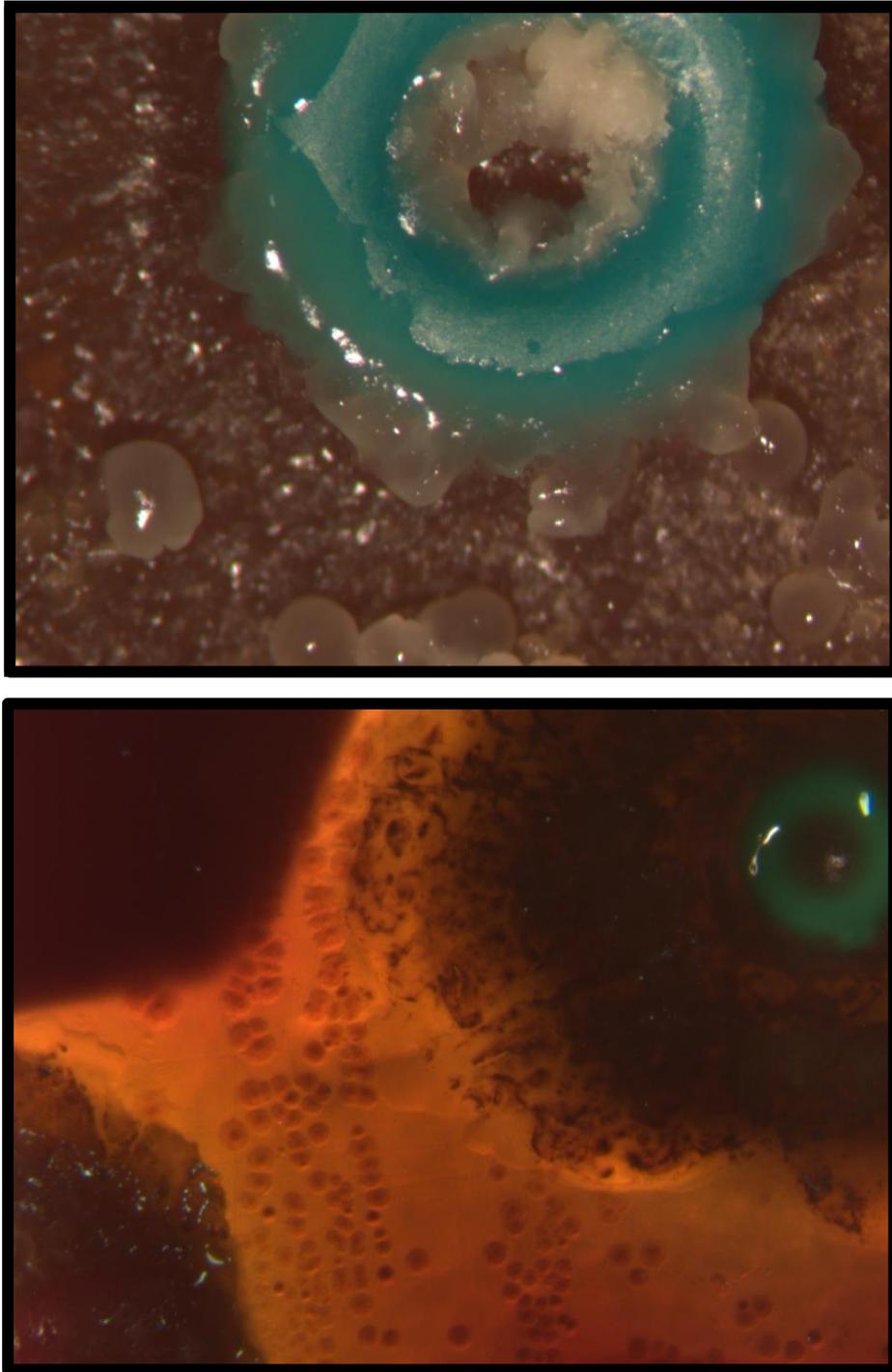


**Figura 9. A)** Muestra control con crecimiento de *S. oralis* en cultivo agar sangre después de 24hrs de incubación (grupo1). Acercamiento de muestra control. Microfotografía tomada con microscopio óptico **A)** 10x **B)** 100x. (Fuente directa).

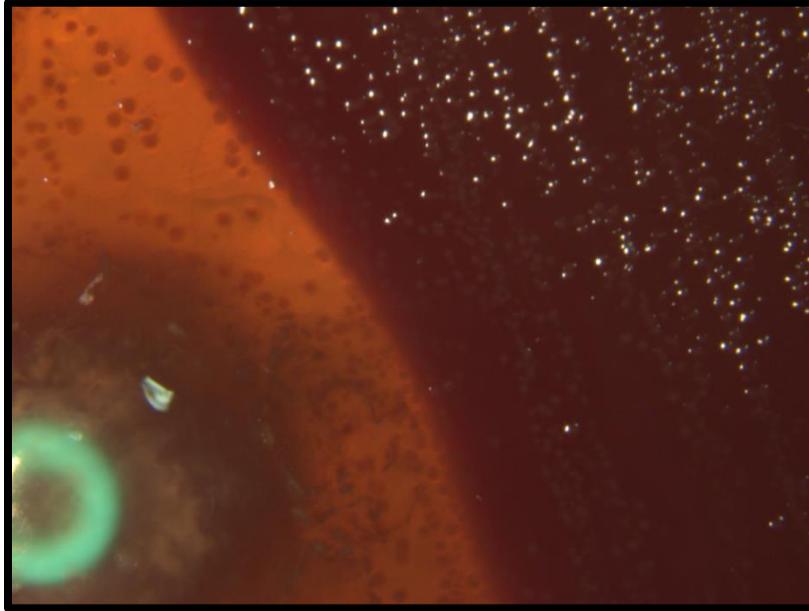
- A partir de los 15min ya es evidente que existe crecimiento de *Bacillus coagulans* en la superficie de los aditamentos, tanto en los brackets como en los módulos, que inhiben el crecimiento de los *Streptococcus oralis*.



**Figura 10.** Muestra experimental del grupo 1 con visible halo de inhibición de 15mm de diámetro, en cultivo agar sangre después de 24hrs de incubación **A)** 15min **B)** 30min. Microfotografía tomada con microscopio óptico (Fuente directa).



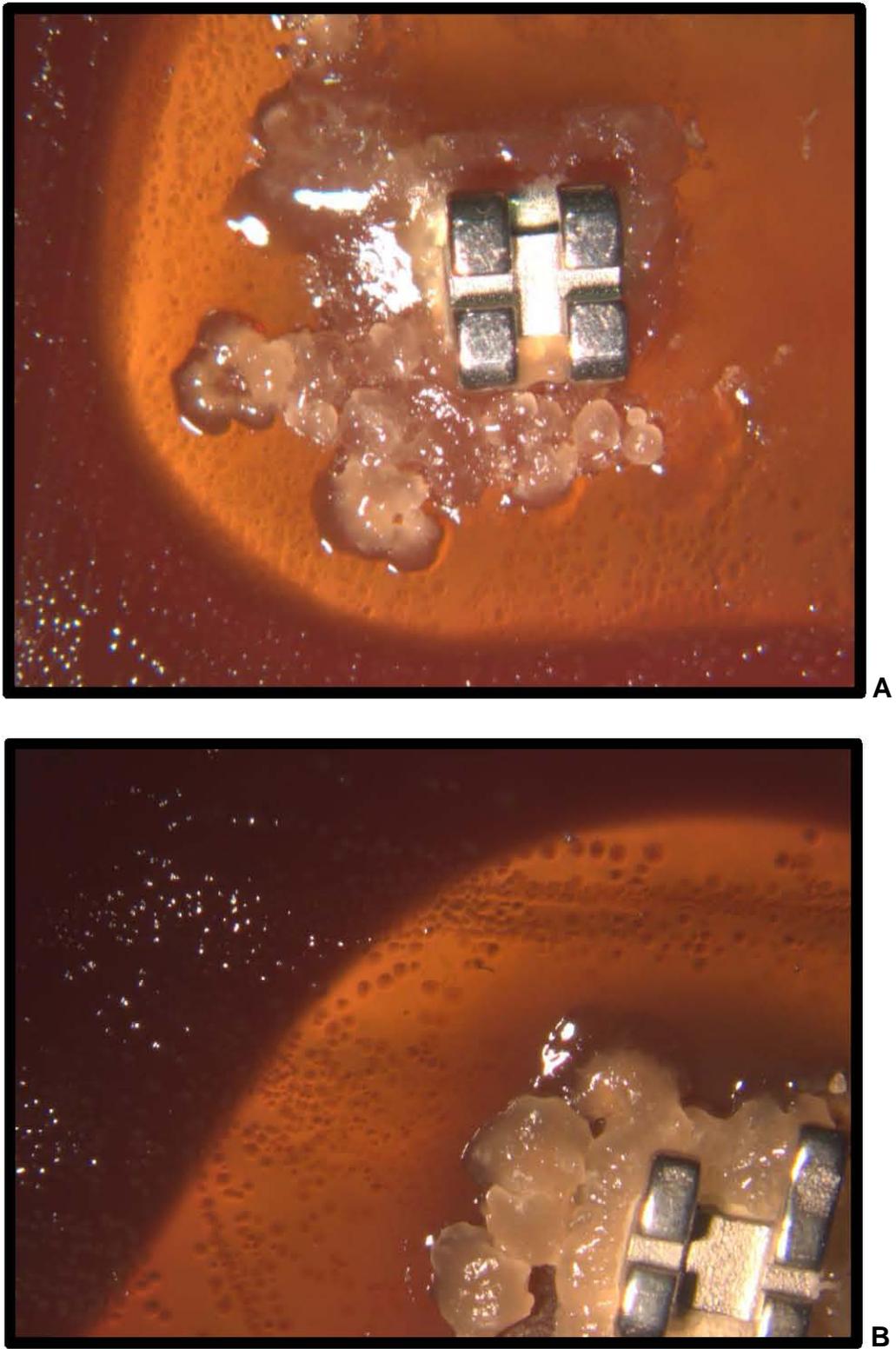
**Figura 11.** Acercamiento de muestra experimental del grupo 1 con halo de inhibición, en cultivo agar sangre después de 24hrs de incubación (60min). Microfotografía tomada con estereomicroscopio (Fuente directa).



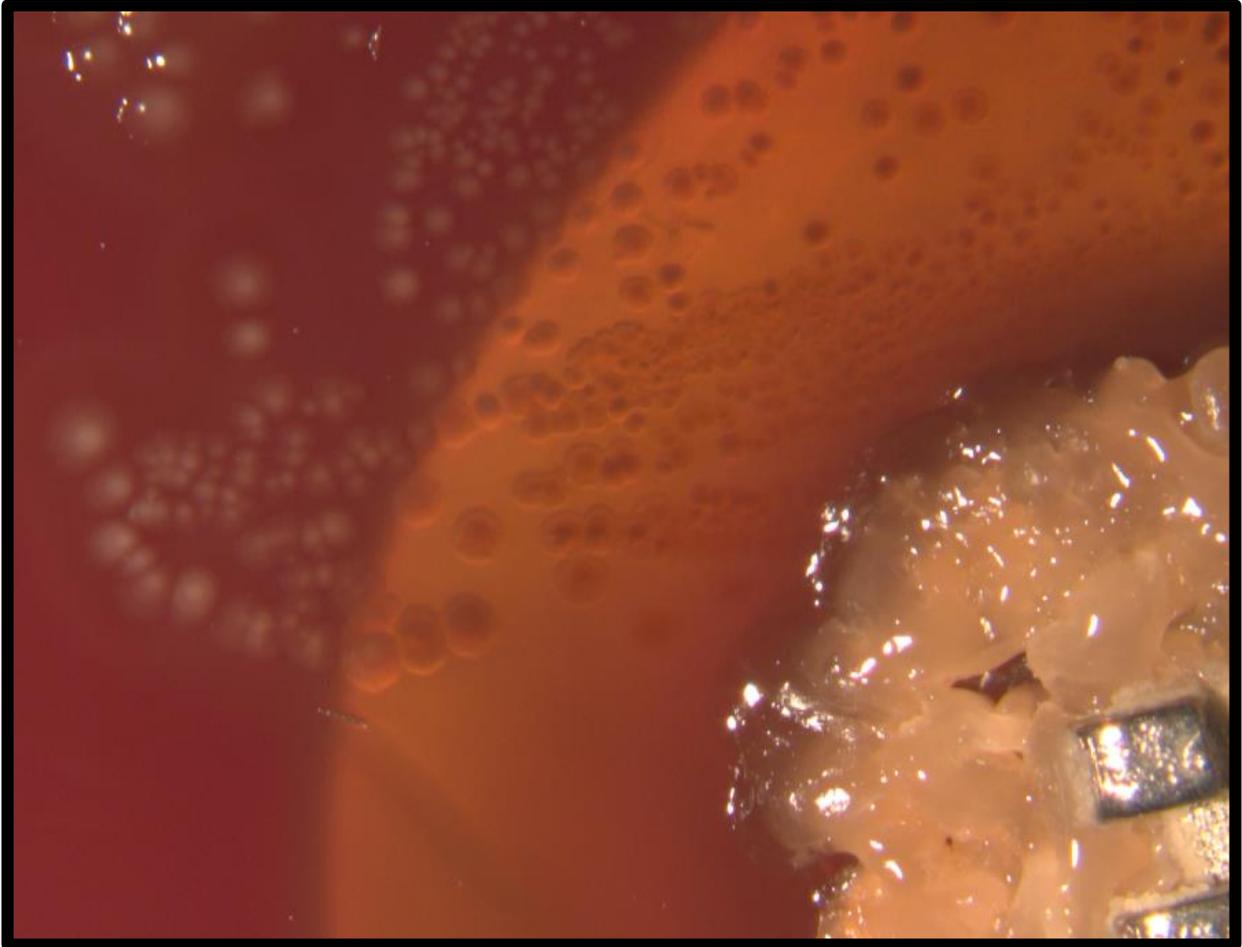
**Figura 12.** Muestra experimental grupo1 en cultivo agar sangre después de 24hrs de incubación, se observa el crecimiento inhibido de *S. oralis*. Microfotografía tomada con estereomicroscopio (Fuente directa).



**Figura 13.** Muestra control del grupo2 con crecimiento de *S. oralis* en cultivo agar sangre después de 24hrs de incubación. Microfotografía tomada con microscopio óptico. (Fuente directa).



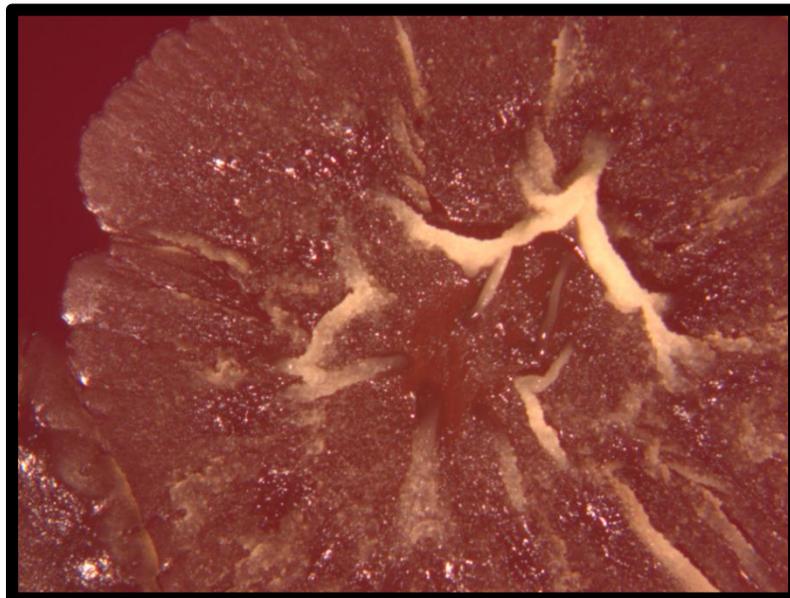
**Figura 14.** Muestra experimental del grupo 2 con halo de inhibición, en cultivo agar sangre, **A)** 15min, **B)** 30min. Microfotografía tomada con estereomicroscopio. (Fuente directa)



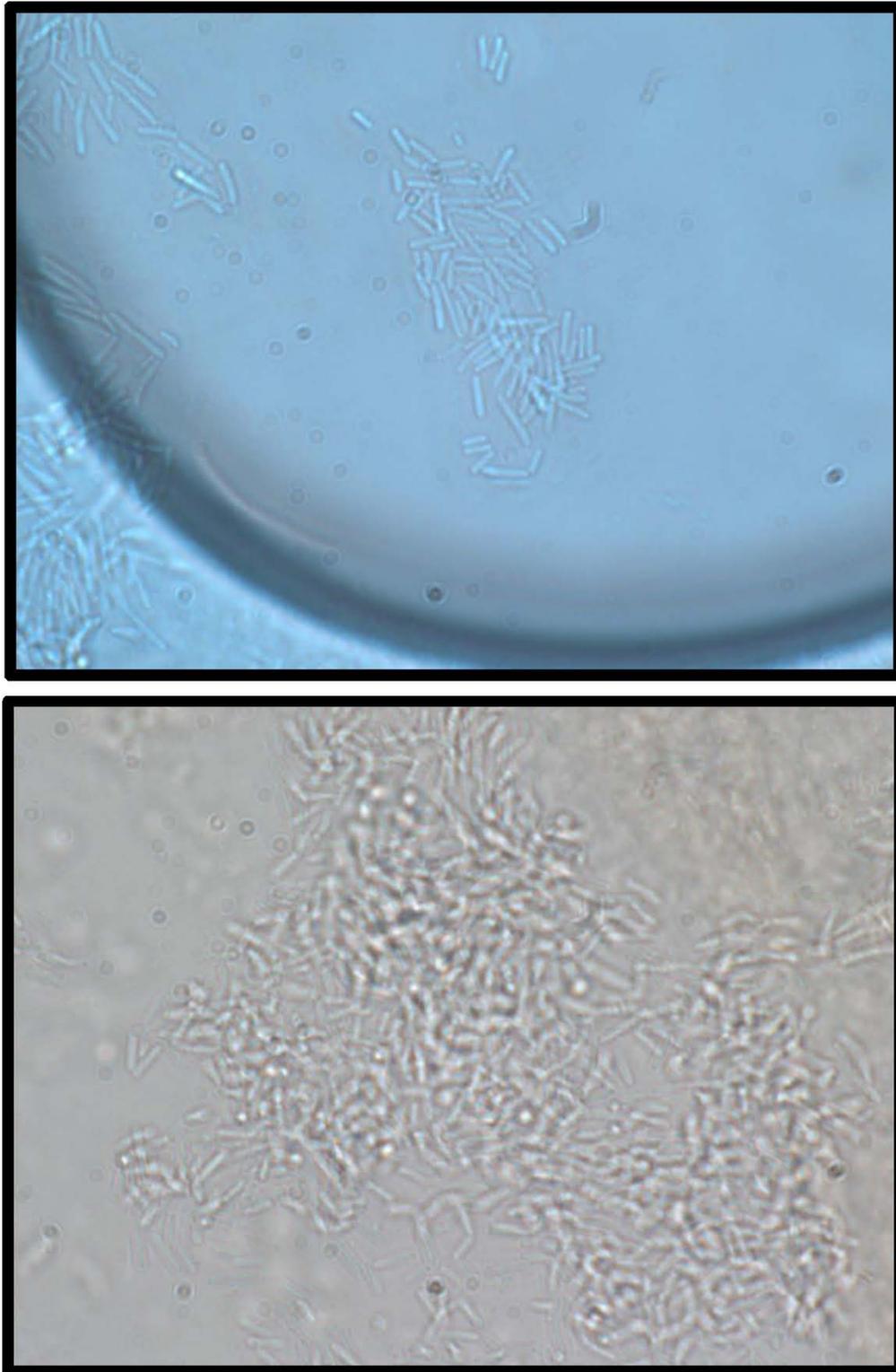
**Figura 15.** Acercamiento de muestra experimental con visible halo de inhibición, en cultivo agar sangre después de 24hrs de incubación (60min, grupo2). Microfotografía tomada con estereomicroscopio. (Fuente directa).



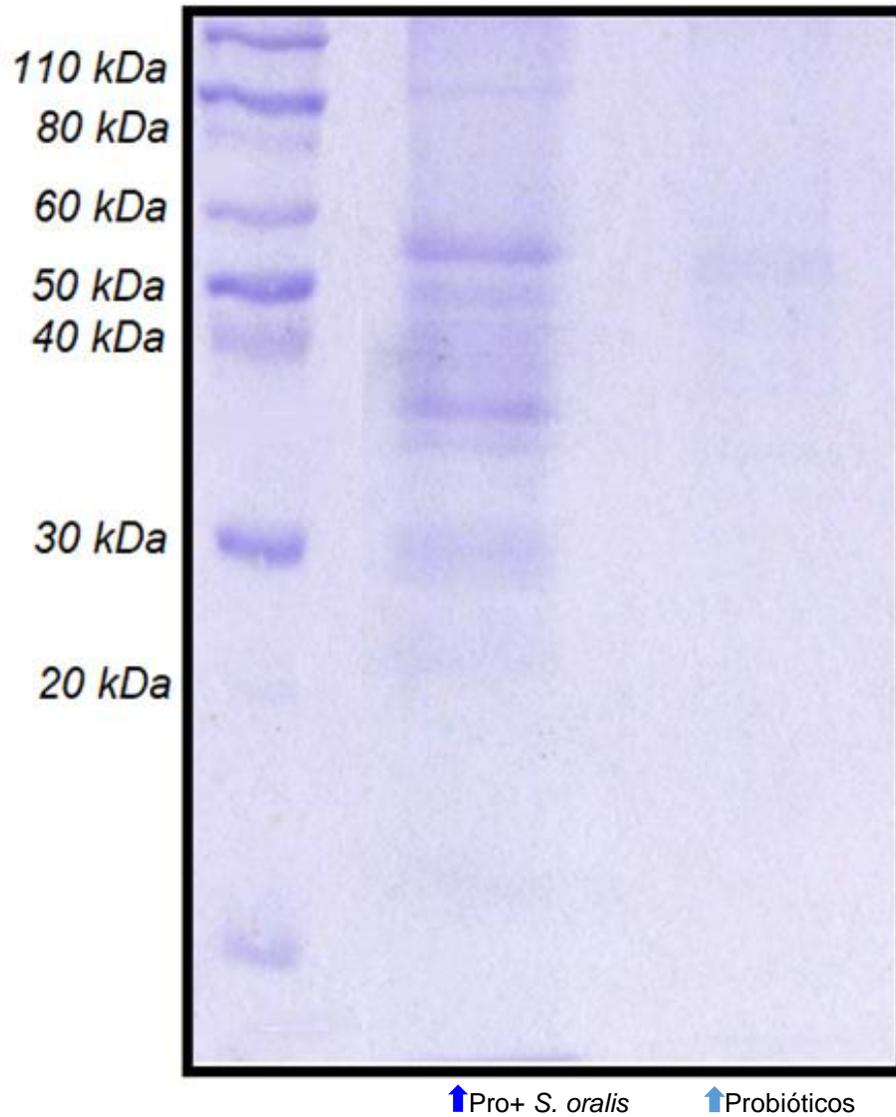
**Figura 16.** Cultivo en agar sangre con 10 $\mu$ L de medio de cultivo de *B. coagulans* donde se observa su comportamiento. Fotografía tomada con aCOLyte 3HD-Synbiosis. (Fuente directa).



**Figura 17.** Acercamiento de cultivo *B. coagulans* después de 24hrs de incubación. Microfotografía tomada con estereomicroscopio (Fuente directa).



**Figura 18.** Acercamientos de cultivo *B. coagulans* después de 24hrs de incubación donde se observan las colonias de los *Bacillus*. Microfotografía tomada con microscopio óptico 100x (Fuente directa).



**Figura 19.** Electroforesis de proteínas SDS-PAGE 12%. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular (Novex Sharp). Segundo carril, 10 ug de proteínas extraídas de un cultivo en mezcla de *S. oralis* y *B. coagulans* durante 24 hrs (medio condicionante). Tercer carril: 10 ug de proteína del medio condicionante del cultivo de *B. coagulans*. (Fuente directa).

## Discusión

El desequilibrio biológico causado por la presencia de aditamentos de ortodoncia en la cavidad oral ha sido objeto de varios estudios. La microflora oral comprende más de 700 especies microbianas y el desequilibrio de ésta puede conducir a enfermedades como la caries dental, la periodontitis y el mal aliento.<sup>1</sup>

La mayoría de los tratamientos de ortodoncia implica el uso de aparatología fija para poder corregir las maloclusiones dentales. A partir de los primeros instantes posteriores a la cementación de la aparatología, las áreas para la retención de los alimentos y acumulación de la biopelícula dental se incrementan considerablemente facilitando su retención, haciendo a los pacientes proclives a desarrollar enfermedad periodontal.<sup>50</sup>

Dado que los factores etiológicos para el desarrollo de la enfermedad periodontal son las bacterias en la biopelícula supra y subgingival, los esfuerzos para la prevención y tratamiento de la enfermedad se centran principalmente en la reducción de patógenos y el fortalecimiento de la barra epitelial, contribuyendo así a la disminución de la susceptibilidad a la enfermedad.<sup>50</sup>

Se han realizado múltiples estudios clínicos donde se ha demostrado que los probióticos principalmente los del género de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son útiles en la prevención y tratamiento de diversas condiciones de salud y enfermedades como son: infecciones gastrointestinales, enfermedad inflamatoria intestinal, intolerancia a la lactosa y alergias, porque poseen un mecanismo de antagonismo que impiden la multiplicación de los patógenos, crean competencia de nutrientes y sitios de adhesión, producen toxinas que imposibilitan su acción patogénica, protegiendo al huésped aumentando la producción de inmunoglobulinas, activación de las células mononucleares y de linfocitos.<sup>14</sup>

Debido a su origen natural y por los efectos benéficos observados en el microbiota gastrointestinal, se realizan investigaciones en el área odontológica y estudios clínicos que apoyan la idea de los efectos favorables que poseen los probióticos sobre la salud bucal.<sup>51</sup>

Eva M Söderling evaluó efectos de los probióticos sobre *S. mutans*, y mencionó que la formación de biopelícula fue inhibida por todos los tipos de *Lactobacillus* estudiados.<sup>49</sup>

Por otra parte Mette Kirstine Keller quien utilizó cepas aisladas de *S. mutans* de adultos jóvenes, las cuales fueron procesadas con cepas de *Lactobacillus*, y reportó que todos los *Lactobacillus* inhibieron el crecimiento de *S. mutans*.<sup>52</sup>

En diversas investigaciones realizadas se emplea el uso de *Lactobacillus reuteri* por su amplio espectro antimicrobiano, demostrando que el tratamiento oral con este microorganismo mejora la respuesta inmune a nivel sistémico y mucoso, pero presenta desventajas significativas en la aplicación en el área odontológica ya que el producto metabólico de las bacterias presentes en boca es el ácido láctico provocando que el pH de la biopelícula disminuya y la actividad microbiana en presencia de carbohidratos puedan conducir al daño del esmalte por su medio de crecimiento compuesto principalmente de sacarosa, además de que es de difícil acceso y de alto costo en el mercado latinoamericano.<sup>52</sup>

Siendo las investigaciones previas encaminadas al agente causal de la caries, surge la duda del efecto que tendrán en la formación de biopelícula dental y si se podrá emplear en aparatología ortodóncica, estudiando como alternativa a los *Bacillus coagulans* por su estructura esporulada versus producción ácido láctico.<sup>52</sup>

Tomando en cuenta que el control de la biopelícula es una de las claves para la prevención de las complicaciones periodontales que se pueden presentar durante el tratamiento ortodóncico por lo que es decisivo motivar y concientizar a los pacientes de la importancia de una buena higiene oral durante el tratamiento y ofrecer alternativas coadyuvantes para su control donde preferentemente no sea terapias antibiótica debido al aumento de resistencia que presenta la población.

En este estudio *in vitro* se observó la inhibición del crecimiento del *S. oralis* a través de *B. coagulans* en brackets y módulos elásticos, observándose la interacción entre los principales colonizadores de la biopelícula dental, sin embargo al ser un estudio realizado de manera *in vitro* no se tuvo variables constantes como la saliva, tipo de alimentación, higiene, etc. Por lo que esta investigación nos brinda un panorama general del efecto que tienen el uso de estos probióticos dando una pauta relevante, para una nueva área de investigación o bien una nueva estrategia alternativa durante el tratamiento ortodóncico.

## Conclusiones

El acúmulo de biopelícula dental es el problema más constante al que se presentan los pacientes, y ésta aumenta si tienen aparatología en boca, por lo cual el refuerzo de hábitos correctos de higiene y uso de coadyuvantes servirá para mantener bajo control la salud periodontal del paciente.

En este trabajo fue posible comprobar que *B. coagulans* posee un mecanismo de inhibición muy eficiente a la superficie de brackets y módulos elásticos siendo su posterior crecimiento el que impide el crecimiento del *Streptococcus oralis*, posiblemente mediante la secreción de bacteriocinas, comprobadas en la electroforesis donde se puede presumir sean *coagulin* y *lactosporine*.

La colonización por *B. coagulans* en la cavidad oral puede proporcionar una condición favorable que regule la colonización de microorganismos patógenos en aparatología de ortodoncia.

La modulación de la microbiota por *B. coagulans* puede mejorar la salud de los pacientes de ortodoncia, siendo una opción coadyuvante en el control de la higiene bucal por inhibir el crecimiento de uno de los principales colonizadores de la biopelícula dental.

## REFERENCIAS

1. Jongsma M.A., Pelser F, Atema-Smit, Van de Belt-Gritter B., Busscher H., Ren Y., *Biofilm formation on stainless steel and gold wires for bonded retainers in vitro and in vivo and their susceptibility to oral antimicrobials*, Clinical. Oral Invest., 2013. 1209–1218.
2. Gaard G., *White spot lesions during orthodontic treatment: mechanisms and fluoride preventive aspects*, Semin. Orthodontics. 2008. 183–193.
3. Sawhney R. Berry V. *Bacterial biofilm formation, pathogenicity diagnostics and control: an overview*. Indian J. Med Sci, 2009; 63-70
4. Sharma M, Yadav S. *Biofilms microbes and disease*. Braz J Infect Dis., 2008, 6-12.
5. Hagg, P. Kaveewatcharanont, Y.H. Samaranayake, L.P. Samaranayake, *The effect of fixed orthodontic appliances on the oral carriage of Candida species and Enterobacteriaceae*, Eur. J. Orthod., 2004. 623–629.
6. Lara C. Montiel B. Sánchez L. Alanís J. *Effect of orthodontic treatment on saliva, plaque and the levels of Streptococcus mutans and Lactobacillus*. Med Oral Patol Oral Cirugía Bucal, 2010
7. Martignon S, Ekstrad KR, Lemos M. Lozano M. *Plaque, caeries level and oral higiene habits in Young patients receiving orthodontic treatment*. Community dent Health. 2010. 59-64
8. <https://www.orthodepot.es/ortodoncia-orthodepot/brackets-metalicos>
9. <https://www.orthodepot.es/ortodoncia-orthodepot/brackets-esteticos>
10. Taloumis LJ, Smith TM, Hondrum SO, Lorton L. *Force decay and deformation of orthodontic elastomeric ligatures*. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2007; 1-11.
11. Eliades T, Eliades G, Silikas N, Watts DC. *In vitro degradation of polyurethane orthodontic elastomeric modules*. J Oral Rehabil. 2005. 32(1):72.
12. David L., Baty DL, Volz JE, von Fraunhofer JA. *Force delivery properties of colored elastomeric modules*. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 1994; 106(1):40-6.
13. <https://www.orthodepot.es/ortodoncia-orthodepot/elastomeros>
14. <https://www.medicaexpo.es/prod/all-star-orthodontics>
15. <https://es.allexpress.com/popular/orthodontic-elastics>
16. Wang T, Zhou G, Tan X, Dong Y. *Evaluation of force degradation characteristics of orthodontic latex elastics in vitro and in vivo*. Angle Orthod. 2007; 77(4):688-93
17. Nobuko, M Tamoko O, Kein D. *Probiotic bacteria improve human oral microbiota oral ther pharmacol* 2006: 25 (3): 61-8
18. <http://sqpwe.ist.uam.mx/files/users/aumi/crl/microbiología/16P/PDF>
19. Jakubovics N, Palmer Jr., Robert J. *Oral microbial ecology; current research and new perspectives*. Portland: Caister academic press; 2013
20. Zinsser, *Microbiología* 20ª edición, editorial médica panamericana, buenos aires, 2000.
21. Lindhe J., Lang P. *Periodoncia clínica e implantología odontológica*, 6º edición, tomo 1. Editorial panamericana, 2017.
22. Tortolini P., Fernández E. *Ortodoncia y periodoncia*. Av Odontoestomatol, 27 (4) (2011), pp. 197-206

23. Harfin J, Tratamiento ortodóntico en el adulto, editorial medica panamericana. Argentina, 2009.
24. Emad F, Al Maaitaha, Adejumo A, Adeyemi B, Susan M, Higham C, Neil Pender D, Harrison J. *Factors affecting demineralization during orthodontic treatment: A post-hoc analysis of RCT recruits*. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 2011; 139 (2).
25. Enaia M, Bock N, Rufc S. *White-spot lesions during multibracket appliance treatment: A challenge for clinical excellence*. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 2011; 140(1).
26. Chapman J, Roberts W, Eckert G, Kula K, González-Cabezase C. *Risk factors for incidence and severity of white spot lesions during treatment with fixed orthodontic appliances*. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics. 2008; 138(2).
27. Expósito-Martín I, Cuan-Corrales M, Estrada-Verdeja V, Martín-Zaldívar L. *Factores de riesgo a caries en pacientes con aparatos ortodónticos fijos*. AMC. 2010.
28. Newman, Takei, Carranza. *Periodontología clínica*. McGraw-Hill, 10 ed. 2010.
29. <https://mikrolife.blogspot.com/2007/11/plaque-biofilm-formation.html>.
30. Jensen A, Christian F. Scholz A., Mogens K. *Re-evaluation of the taxonomy of the Mitis group of the genus Streptococcus based on whole genome phylogenetic analyses, and proposed reclassification of Streptococcus dentisani as Streptococcus oralis subsp. dentisani comb. nov., Streptococcus tigurinus as Streptococcus oralis subsp. tigurinus comb. nov., and Streptococcus oligofermentans as a later synonym of Streptococcus cristatus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2016. 66, 4803–4820
31. Whiley R.A., Beighton D., *Clasificación actual de los Streptococcus orales* *Microbiología Oral e Inmunología*, 2008, 13 (4). 195–216.
32. Vera J., Gómez ML. *Profilaxis antimicrobiana en cirugía oral y procedimientos dentales*. Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal, 2007. 12(1) E44-E52.
33. Colville A., Davies W., Heneghan M., Goodwin A., Griffiths T., *A rare complication of dental treatment: meningitis due to Streptococcus oralis* British Dental Journal, (1993), 175(4). 133-134.
34. Gaudreau C., Delage G., Rousseau D., *Bacteremia caused by Streptococcus viridans in 71 children*. Canadian Medical Association Journal, 2001, 125 (11) 1246 – 1249.
35. Beighton D., *Activity of Sialidasa de Streptococcus milleri group another estreptococos del grupo viridans*. Journal of Clinical Microbiology, 2000. 28 (6). 1431–1433.
36. Nowicki E.M., Shroff R., Singleton J, Renaud D., Wallace D., Drury J, Zirnheld J., Colleti B., Ellington A, Lamont R, Scott D.A., Whiteley M., *Microbiota and metatranscriptome changes that accompany the onset of gingivitis*. MBio. 2018. 2-9.
37. Baelum V., López R. *Periodontal disease epidemiology-learned and unlearned*. Periodontol 2000. 2013. 37-58.

38. Taboada O., Cerón J., Rodríguez A. *Frequency and distribution of periodontal diseases associated to dental plaque in patients who come to a university clinic.* Revista ADM; 2018. 75 (3): 147-152.
39. Feres M., Figueiredo L., Soares G, Faveri M. *Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis.* Periodontol 2000, 67 (2015), 131-186.
40. Rams T, Degener J., Van Winkelhof J. *Antibiotic resistance in human chronic periodontitis microbiota.* J Periodontol 2000, (2014), pp. 160-169
41. Jenkinson H., Lamont R., *Oral microbial communities in sickness and in health.* Trends Microbiol. 2005. 13 (12). 589–595.
42. Petersilka G., Ehmke B., Flemmig T., *Antimicrobial effects of mechanical debridement.* Periodontology. 2002. 28. 56–71.
43. Nathan C., *Antibiotics at the crossroads,* Department of Microbiology & Immunology. Nature. (2004). 431 899–902.
44. Rodrigues R., Goncalves C., SoutoR., Feres E., Uzeda M., *Antibiotic resistance profile of the subgingival microbiota following systemic or local tetracycline therapy.,* J. Clin. Periodontol. 2005, 23-26.
45. Winkel E., Van Winkelhoff A., Timmerman M., Van der Velden U., Van der Weijden G., *Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study,* J. Clin. Periodontol. 2001. 28 (4) 296–305.
46. Drago L. *Should Lactobacillus sporogenes and Bacillus coagulans Have a future?* Journal of chemotherapy, 2009. Vol. 21. 371-377.
47. Le Marrec C. Hyronimus B. *Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by Bacillus coagulans.* Ap. Environ Microbiol, 2010, Vol 12. 66 (12).
48. Riazi S. *Characterization of lactosporin, a novel antimicrobial protein produced by Bacillus coagulans ATT 7050.* J. Appl Microbiol. 2009 Vol.4.13.
49. Söderling EM. *Probiotic Lactobacilli interfere with Streptococcus mutans Biofilm formation in vitro.* Curr Microbiol. 2011. Vol. 618-622.
50. Vargas J, Palomino H. *Lesiones de mancha blanca en ortodoncia. Conceptos actuales.* Av. Odontoestomatol 2016; 32 (4) 215.221.
51. Divya Pandya. *Benefits of probiotics in oral cavity- A Detailed review.* Annals of international medical and dental research. 2016: 5 (2). 10-17.
52. Keller M.K. *Co-aggregation and growth inhibition of probiotic lactobacilli and clinical isolates of mutans streptococci: AN in vitro study.* Ac odontológica, 2011. Vol. 69. 263-268.