



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PROBIÓTICO
BIOGAIA PRODENTIS EN LA ADHESIÓN DE
Streptococcus mutans A SUPERFICIES DEL
ESMALTE DENTAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

C I R U J A N O D E N T I S T A

P R E S E N T A:

EDUARDO URIEL LÓPEZ SOTELO

TUTOR: DR. VÍCTOR IRAHUEN GARCÍA PÉREZ

ASESORA: DRA. MIRYAM MARTÍNEZ HERNÁNDEZ



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 Y DEDICATORIAS

Agradezco al amor infinito de mi madre, sin su apoyo no hubiera podido realizar este objeto de vida.

A mi padre y sus consejos que me motivaron a seguir en la carrera cuando estaba a punto de abandonarla.

Al Dr. Víctor Irahuen García Pérez por su conocimiento, paciencia y guía para poder realizar esta investigación.

A la Dra. Miryam Martínez Hernández por su conocimiento y guía para poder realizar este trabajo de titulación.

Al laboratorio de Biointerfases por brindarme la oportunidad de realizar el experimento en sus instalaciones.

A la M. en C. Laura Elena Gómez Lizárraga del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM por el apoyo en la adquisición de imágenes de microscopía electrónica de barrido.

A mis grandes amigos de escuela y de vida: Jorge y Juan Daniel.

A Diana por guiarme y aportar su coherente conocimiento en la estructura de este proyecto.

A mis mascotas: Coco, Merlina y Domingo por darme su amor incondicional siempre que volvía a casa.

Y a dios y al universo, por darme la oportunidad de sentir estos momentos, los cuales llamamos vida.

“El tiempo pasa y te das cuenta de que ya no estás en el mismo lugar, que faltan muchos objetivos por cumplir y que el lugar en que naciste y creciste ya no lo echas de menos”

Eduardo

El presente proyecto de investigación fue realizado gracias a los recursos otorgados por el Programa de Apoyo a proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, claves: **IN229223**, **IN209324**.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. MARCO TEÓRICO	6
2.1 ECOLOGÍA ORAL	6
2.2 FUNCIÓN DE LA SALIVA EN EL MEDIO AMBIENTE ORAL.....	7
2.3 PELÍCULA ADQUIRIDA	9
2.4 BIOPELÍCULA DENTAL	11
2.5 FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA DENTAL	12
2.6 CARIES DENTAL	13
2.7 DEFINICIÓN	13
2.8 TEORÍA ECOLÓGICA DE LA CARIES DENTAL	13
2.9 MICROORGANISMOS ASOCIADOS AL DESARROLLO DE LA CARIES DENTAL	14
2.10 ESTRATEGIAS ASOCIADAS A LA PREVENCIÓN DE LA CARIES DENTAL	16
2.11 PROBIÓTICOS	17
2.12 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	17
2.13 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS PROBIÓTICOS.....	18
2.14 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS	19
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
4. JUSTIFICACIÓN	20
5. HIPÓTESIS	21
6. OBJETIVOS.....	21
6.1 GENERAL	21
6.2 ESPECÍFICOS	21
7. METODOLOGÍA	22
8. RESULTADOS.....	29
9. DISCUSIÓN	33
10. CONCLUSIONES.....	36
11. BIBLIOGRAFÍA.....	37

RESUMEN

BioGaia Prodentis es un probiótico que contiene las cepas de *L. reuteri* DSM 17938 y *L. reuteri* ATCC PTA 5289, las cuales tienen la capacidad para adherirse a las superficies orales e interactuar con las bacterias de la microbiota oral. Con el objetivo de evaluar el efecto de este probiótico en la adhesión de *S. mutans* a superficies de esmalte dental, en este estudio se cuantificó la adhesión de *S. mutans* en monocultivo y en cocultivo con las dos cepas contenidas en el probiótico BioGaia Prodentis mediante el conteo de UFC's.

La metodología empleada consistió en la obtención de 15 superficies de esmalte dental, las cuales fueron esterilizadas y distribuidas en una placa de cultivo celular de 48 pozos. *S. mutans* y *L. reuteri* (probiótico BioGaia Prodentis) fueron homogenizados a una concentración de 1×10^8 UFC/mL en 1000 μ L de infusión cerebro corazón.

Posteriormente, *S. mutans* fue cultivado de forma individual sobre 5 superficies de esmalte dental, y *L. reuteri* (probiótico BioGaia Prodentis) fueron cultivadas en otras 5 superficies de esmalte dental. Finalmente, otras 5 superficies de esmalte dental fueron cultivadas con el co-cultivo de *S. mutans* y las dos cepas de *L. reuteri* (DSM 17938/ATCC PTA 5289).

A continuación, la placa de cultivo celular fue incubada en la cámara de anaerobiosis durante 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, cada una de las superficies de esmalte dental fue sometida a 5 ciclos de 10 segundos de sonicación para desprender las células bacterianas adheridas, a continuación, se realizaron tres diluciones del medio recobrado para sembrar 100 μ L en los medios de cultivo agar Rogosa y agar Mitis Salivarius.

Las placas de agar fueron incubadas bajo anaerobiosis durante 24 horas, para posteriormente realizar el conteo visual de las UFC's; además 6 superficies de esmalte dental fueron preparadas para la evaluación de la adhesión de los microorganismos, mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Los resultados revelaron un valor promedio de adhesión de *S. mutans* de (1033 UFC/mL \pm 33.3) en contraste, con las superficies de esmalte que fueron incubadas con el co-cultivo de *S. mutans* y *L. reuteri* del probiótico BioGaia Prodentis el conteo fue de (373 UFC/mL. \pm 44.8).

En consecuencia, se concluye que el probiótico BioGaia Prodentis afecta la adhesión de *S. mutans*, disminuyendo las unidades formadoras de colonias cuando ambos interactúan. Estos hallazgos comprueban el efecto del probiótico BioGaia Prodentis en la prevención de la adhesión de *S. mutans* sobre las superficies del esmalte dental.

ABSTRACT

BioGaia Prodentis is a probiotic formed by *L. reuteri* DSM 17938 and *L. reuteri* ATCC PTA s5289, capable of adhering to oral surfaces and interacting with other oral microbiome bacteria.

To evaluate this probiotic's impact on *Streptococcus mutans* adherence to enamel surfaces, this study focused on quantifying *S. mutans* adherence by itself and under *L. reuteri* (co-culture) interaction through colony forming units count (CFU) on enamel surfaces.

The methodology used consisted on obtaining 15 enamel surfaces, distributed on three groups, each one made out of 5 surfaces. The first group corresponds to *S. mutans* culture, the second to *L. reuteri*, and the third one corresponds to the interaction between both. Two surfaces from each group were examined under scanning electron microscope (SEM).

L. reuteri y *S. mutans* microorganisms were homogenized under a 1×10^8 in 1000 microliters (μL) brain heart infusion concentration and introduced for 24 hours in an anaerobic chamber next to the enamel surfaces.

Subsequently, the surfaces went under 5 cycles of 10 seconds of sonicator vibration (Sonics Vibra-cell VC130) and three well culture medium dilutions were made to culture 100 μL on agar Rogosa and agar Mitis Salivarius culture medium.

Lastly, the cultures were introduced in the anaerobic chamber for 24 hours; once this period ended the culturing medium were taken out and a visual count was done on the colony forming units (CFU).

The results revealed an average growth of 1033 CFU on all three surfaces that interacted only with *S. mutans*. By contrast, the average growth value

on the three enamel surfaces with *S. mutans* under BioGaia Prodentis probiotic interaction was 373 CFU.

Therefore, it follows that BioGaia Prodentis probiotic affects *S. mutans* adhesion, diminishing the colony forming units when both interact. These findings prove BioGaia Prodentis probiotic's effect on preventing *S. mutans* adhesion to enamel surfaces.

1. INTRODUCCIÓN

La adhesión bacteriana es un factor de riesgo en el desarrollo de diferentes enfermedades orales como la caries dental, siendo *S. mutans* uno de los principales microorganismos implicados en su desarrollo. Por lo tanto, se han desarrollado diferentes tratamientos destinados a disminuir la adhesión de *S. mutans* a los diferentes tejidos del diente. Entre estos, los probióticos representan una estrategia eficaz al disminuir la adhesión de los microorganismos de la microbiota oral.

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, ofrecen beneficios para la salud del hospedero. BioGaia Prodentis es un probiótico el cual contiene las cepas de *L. reuteri* DSM 17938 y *L. reuteri* ATCC PTA 5289, estas cepas tienen la capacidad de disminuir la adhesión de *S. mutans* a las superficies de esmalte dental.

Por lo tanto, este proyecto evaluó la adhesión de las dos cepas de *L. reuteri* (DSM 17938/ ATCC PTA 5289) contenidas en el probiótico BioGaia Prodentis y su interacción en la adhesión de *S. mutans* en diferentes superficies de esmalte dental mediante el conteo visual de UFC's. Además, se evaluó la adhesión microbiana sobre las superficies de esmalte dental mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).

Por lo tanto, esta investigación se propone comprobar el efecto de las dos cepas contenidas en el probiótico BioGaia Prodentis en la disminución de la adhesión de *S. mutans* en las superficies de esmalte dental.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 ECOLOGÍA ORAL

Las bacterias son la forma de vida más antigua de la tierra. De acuerdo con la teoría endosimbiótica propuesta por Lynn Margullis en 1967, hace miles de años, algunas formas básicas de vida sin núcleo conocidas como organismos procariontes, desarrollaron una relación de simbiosis con otros organismos primitivos de vida libre capaces de aprovechar el oxígeno y producir energía de manera eficiente.

Esta teoría propone que, con el paso del tiempo, esta relación de endosimbiosis provocó la aparición de organismos complejos con organelos especializados en su interior, conocidos como células eucariontes.

Es a través de este mecanismo de evolución, así como la eventual aparición de organismos pluricelulares, que podemos estudiar la estrecha relación entre los seres vivos y las bacterias que pueden desarrollarse sobre sus superficies. En el caso de los seres humanos, esta relación es conocida como holobionte (5,21).

La colonización bacteriana de la cavidad oral es un ejemplo claro de una relación de simbiosis entre los microorganismos y el ser humano. El número, características y funciones de las comunidades bacterianas que colonizan las superficies orales están íntimamente relacionados con las propiedades físicas del medio oral, como la temperatura y la humedad (6,36).

La cavidad oral de un adulto tiene un área aproximada de 215 cm² y provee un sustrato ideal para la deposición, adhesión, coagregación y desarrollo bacteriano. Según la base de datos del microbioma oral (eHOMD) se han identificado 774 especies de microorganismos que habitan en la cavidad

oral de las cuales el 58% tiene un nombre oficial y puede ser cultivada; el 16% no tiene un nombre oficial, pero son cultivables y el 26% restante son conocidas como filotipos no cultivables (6).

2.2 FUNCIÓN DE LA SALIVA EN EL MEDIO AMBIENTE ORAL

La saliva es un fluido biológico secretado por las glándulas mayores y menores de nuestra boca. Ésta tiene la característica de ser prístina (estéril) cuando se produce en sus unidades secretoras o adenómeros. Sin embargo, una vez que es expulsada hacia la boca a través de los conductos excretores de Wharton, Stenon y Bartholini, pierde la pureza al mezclarse con restos de alimentos, microorganismos, fluido crevicular y células descamadas del epitelio oral (6).

Este biofluido está formado por un 99% de agua, aminoácidos libres, proteínas, glucoproteínas, carbohidratos, lípidos, iones y pequeñas cantidades de metales. Estos componentes pueden tener ciertas ventajas y desventajas dentro de la microbiota oral, es decir pueden desempeñar un papel antimicrobiano y pueden servir de nutrientes para la adhesión, coagregación y desarrollo de los microorganismos orales patógenos (7).

Se han identificado por lo menos 3 600 proteínas diferentes en la saliva humana, entre las que destacan la amilasa salival, proteínas ricas en prolina, lisozima salival, histatinas, mucinas, estaterinas y cistatinas entre otras (6,8).

Estos componentes proteicos en su mayoría son glicosilados, es decir, poseen una molécula de carbohidratos en su estructura. Estas glicoproteínas son la principal fuente de nutrientes para la supervivencia y adhesión de las bacterias de la placa dentobacteriana.

Sin embargo, para poder metabolizar esta fuente de hidratos de carbono, las bacterias deben producir una serie de enzimas específicas denominadas glucosidasas, las cuales pueden romper enlaces glucosídicos y generar moléculas más simples y digeribles (8).

Las proteínas, glucoproteínas y aminoácidos libres presentes en la saliva tienen la capacidad de adsorberse y recubrir la superficie del esmalte dental dando como resultado la formación de una película orgánica adquirida, la cual sirve como medio de unión y nutrición a los diferentes microorganismos orales (7).

COMPONENTES	CONCENTRACIÓN APROXIMADA (MG L ⁻¹)
Urea	120–200
Glucosa	5–14
Sodio	0-800
Potasio	430–1,000
Amonio	18–72
Calcio	20–110
Magnesio	0.17–7.2
Cloruro	280–690
Fosfato	140–330
Bicarbonato	0–1,220
Nitrato	4.3–100
Nitrito	0–18
Sulfato	6.7–21
Tiocianato	7.6–34
Fluoruro	0.01–0.048
Lactato	0–5.4
Acetato	1.8–48
Propionato	0-10
Formiato	0-1.4
Alanina	0.57–1.9
Arginina	0.59–5.1
Glutamina	0–2.8
Glutamato	1.6–3.8
Glicina	1.1–5.8
Serina	0.92–3.0
Tirosina	1.1-10
Valina	0–1.4
Aluminio	0.0014
Cobre	0.0015–0.034
Hierro	0.12
Manganeso	0.0029–0.0045

Rubidio	0.064
Estroncio	0.0022
Zinc	0.014–0.08
Amilasas	3.000
Proteínas ricas en prolina	
Lisozimas	
Histatinas	
Mucinas	
Estaterinas	
Cistatinas	
Agglutininas	

Tabla 1. Componentes de la saliva. Tabla tomada y modificada de Jakubovics NS (7).

2.3 PELÍCULA ADQUIRIDA

En 1839 Alexander Nasmyth descubrió una estructura que recubría la superficie del esmalte dental formada principalmente por proteínas, glucoproteínas, carbohidratos y lípidos, a la cual denominó película adquirida. Esta película posee diferentes funciones en la nutrición, adhesión y coagregación entre los tejidos duros y los microorganismos comensales de la cavidad oral (8).

La formación de la película adquirida involucra un fenómeno de superficie mediante la adsorción específica de aminoácidos, glucoproteínas y carbohidratos de la saliva hacia los tejidos blandos y duros de la boca (8). Este fenómeno físico comienza cuando las proteínas precursoras de la saliva ricas en prolina, estatinas, y histatinas se unen mediante dominios a las superficies orales. Un dominio es la unidad modular de la proteína similar a un receptor, el cual lleva a cabo una función bioquímica determinada (7). Estas zonas de la proteína se unen al calcio de los cristales de hidroxiapatita del esmalte dental, generando así una película adquirida de 10 a 20 nm. de grosor en un estado inicial (8).

Posteriormente, macromoléculas de alto peso molecular, como las mucinas, se unen paulatinamente a estos andamios de proteínas hasta la formación de una película adquirida madura de aproximadamente 100 a 1000 nm, en un periodo de 90 a 120 minutos (5).

La composición de la película adquirida desempeña una función importante en la adhesión de los primeros colonizadores. La colonización comienza una vez que la película ha madurado. La película madura proporciona receptores específicos para que las bacterias se adhieran. Los microorganismos orales se adhieren selectivamente a la película salival debido a la presencia de receptores específicos en esta (8,40).

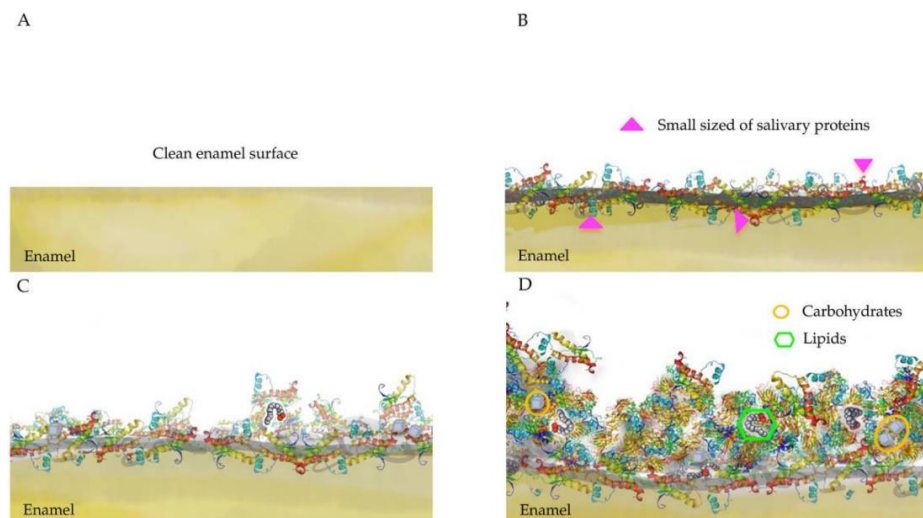


Figura 1. A) Esmalte dental libre de biopelícula **B)** Película adquirida inicial: **C)** Película en desarrollo **D)** Película madura. Imagen tomada de Chawhuaveang, D. D., et al (8).

2.4 BIOPELÍCULA DENTAL

La mayoría de las bacterias que se encuentran en la naturaleza se organizan en estructuras llamadas biopelículas. Las biopelículas son estructuras compuestas de microcolonias polimicrobianas envueltas en una matriz de exopolisacáridos. La presencia de estas estructuras aporta protección, nutrición, comunicación, e interacción genética entre las bacterias (6,38,39).

Las microcolonias bacterianas son la unidad estructural y funcional de las biopelículas. Estas están separadas por espacios intersticiales o canales los cuales son capaces de transportar nutrientes y desechos. Por otra parte, las bacterias en las biopelículas se comunican a través de un sistema denominado *Quórum Sensing*. Este mecanismo implica la modulación en la expresión de genes específicos a través de la señalización intercelular como respuesta a la densidad celular (6).

La biopelícula del cuerpo humano que ha recibido mayor atención es la placa dentobacteriana. Ésta posee una estructura polimicrobiana y su desarrollo ocurre por una colonización secuencial de diferentes microorganismos orales (6).

En 1990 Socransky y colaboradores llevaron a cabo estudios microbiológicos gracias a los cuales se identificaron un gran número de microorganismos orales, y observaron agrupaciones bacterianas específicas dentro de las biopelículas orales subgingivales, a los cuales denominaron complejos bacterianos. Estos fueron clasificados por color con base en su función.

Dichos complejos bacterianos sentaron las bases para poder entender la adhesión e interacción de los diferentes microorganismos orales. A los microorganismos pertenecientes al complejo amarillo y azul se les denominó colonizadores iniciales o primarios de las superficies bucales. Los

colonizadores puente o secundarios, formados por complejos morado, verde y naranja, interactúan con los colonizadores primarios y se unen a éstos. Finalmente, los microorganismos del complejo rojo, o colonizadores tardíos, se adhieren a los colonizadores secundarios (6,37).

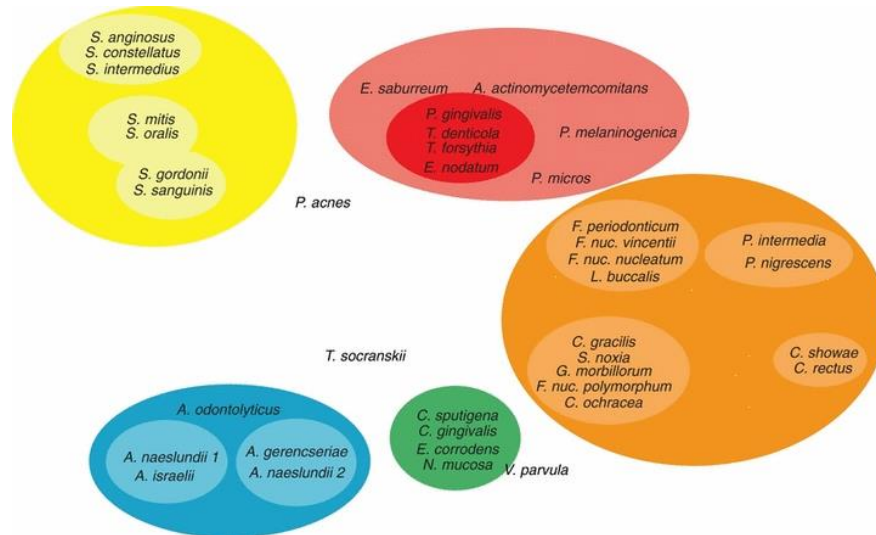


Figura 2. Representación esquemática de las relaciones de especies de los complejos microbianos. Imagen tomada de Haffajee AD et al (9).

2.5 FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA DENTAL

La adhesión bacteriana a superficies orales depende de factores inespecíficos y específicos. Los factores inespecíficos representan el primer acontecimiento para que se lleve a cabo el acercamiento y la adhesión irreversible de las bacterias hacia la superficie dentales mediante fuerzas fisicoquímicas y electroquímicas. Por otro lado, los factores específicos proveen una adhesión irreversible mediante uniones proteína-receptor (10).

La adhesión bacteriana a las superficies dentales se explica por la teoría denominada DLVO, denominada así por las iniciales de sus autores Derjaguin, Landauerwey y Overbeek. Esta teoría consiste en una primera

fase de adhesión celular reversible mediante el acercamiento de 50 nm por parte de las bacterias hacia la superficie dental.

Cuando los microorganismos se acercan a esa distancia se genera una atracción intermolecular a través de las fuerzas de Van der Waals (10).

Cuando las bacterias llegan a una distancia de 2 nm la adhesión se torna irreversible mediante fuerzas de corto alcance de carácter iónico y covalentes. Posteriormente se produce la fijación de las bacterias a las superficies dentales mediante adhesinas específicas. Estas adhesinas se unen a receptores de las glicoproteínas que conforman la película adquirida para su unión irreversible (10).

2.6 CARIES DENTAL

2.7 DEFINICIÓN

Según Fejerskov 1997; Pitts et al., 2017 la caries dental es una enfermedad dinámica mediada por biopelícula y modulada por la dieta, de carácter multifactorial, que resulta en la pérdida mineral neta de tejidos duros dentales. Esta patología ocurre cuando los miembros acidogénicos de la microbiota oral residente obtienen ventaja ecológica selectiva sobre otras especies, interrumpiendo el equilibrio homeostático de la biopelícula dental (11).

2.8 TEORÍA ECOLÓGICA DE LA CARIES DENTAL

En la actualidad, la comprensión de la caries dental se basa en la teoría ecológica formulada por Philip Marsh en 1994. Esta filosofía ofrece una visión integral de la enfermedad al reconocer que todos los microorganismos presentes en la microbiota oral interactúan, coexisten y se desarrollan dentro de la boca (12).

La teoría se basa en la idea de que la cavidad oral es un ecosistema complejo en el que además de existir interacciones microbianas, factores ambientales y dietéticos también influyen en el desarrollo de esta enfermedad.

Los factores incluyen el flujo, el pH salival, así como el consumo elevado de carbohidratos y la duración de la exposición a estos. Además, se tienen en cuenta aspectos como la higiene bucal y la anatomía dental (12).

La caries dental se comprende ahora desde una perspectiva más holística, que tiene en cuenta las interacciones entre microorganismos, factores ambientales y los factores intrínsecos del hospedero (12).

2.9 MICROORGANISMOS ASOCIADOS AL DESARROLLO DE LA CARIES DENTAL

La caries dental es una enfermedad que ha sido objeto de estudio en relación con su origen microbiano. Los estudios han permitido identificar una amplia variedad de microorganismos que desempeñan un papel crucial en su desarrollo, caracterizándose por su elevado índice de virulencia.

Según las investigaciones, se estima que el número de microorganismos metabólicamente activos involucrados en el proceso de caries dental puede oscilar entre 70 y 400, dependiendo del tejido en el que se encuentren (13,33).

El desarrollo de la caries dental se asocia principalmente a la presencia de bacterias acidogénicas en la placa dentobacteriana, como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* y *Lactobacillus*. Sin embargo, es importante destacar que estos no son los únicos microorganismos que participan en el desarrollo de esta enfermedad (13,33).

Se identificaron una cantidad significativa de microorganismos pertenecientes a los géneros *Streptococcus*, *Veillonella* y *Lactobacillus* en las lesiones cariosas. Para comprender la variación en la composición de microorganismos asociados al desarrollo de la caries dental, es esencial analizar las distintas etapas que atraviesa esta enfermedad.

En la fase inicial, donde la caries afecta únicamente el esmalte dental, se observa que aproximadamente el 40% de los microorganismos presentes pertenecen a la especie *Streptococcus*. Dentro de este grupo, *S. sanguinis* constituye cerca de la mitad de esta población, seguido en prevalencia por *S. mitis* y *S. oralis* (13,35).

En una fase intermedia, cuando la caries se extiende desde el esmalte sin llegar a exponer la dentina, es decir, sin formar una cavidad clínica evidente, se nota un cambio significativo en la composición microbiana. En este punto, alrededor del 30% de los microorganismos son *Lactobacillus*, seguidos por un 20% de *Streptococcus* y un 10% de *Veillonella* (13). Esta variación indica una adaptación de la microbiota hacia microorganismos capaces de sobrevivir y prosperar en ambientes más ácidos y menos oxigenados.

En la tercera fase, cuando la dentina está expuesta al medio oral, se observa otro cambio notorio en la población microbiana. En este punto, el 30% de los microorganismos pertenecen a la especie *Veillonella*, mientras que un 20% corresponde a *Streptococcus*. Esta diferencia en la composición microbiana en comparación con la fase inicial resalta la adaptabilidad de los microorganismos al entorno ácido y desafiante de la cavidad oral (13).

2.10 ESTRATEGIAS ASOCIADAS A LA PREVENCIÓN DE LA CARIES DENTAL

La caries dental es una enfermedad compleja, con múltiples factores involucrados, que incluyen aspectos anatómicos, dietéticos e higiénicos del huésped. Esta afección está bien documentada y se asocia principalmente con la presencia de una biopelícula endógena disbiótica. Por lo tanto, para reducir su prevalencia, es esencial abordar y mantener un equilibrio en todos los factores involucrados (17,30).

Históricamente, la introducción del fluoruro en la odontología marcó un hito significativo en este campo. El fluoruro sigue siendo el principal agente preventivo utilizado, en gran parte debido a su accesibilidad y costos económicos. Sin embargo, aunque el fluoruro tiene propiedades fisicoquímicas que pueden inhibir la desmineralización del esmalte dental, por sí solo no es suficiente para contrarrestar el desarrollo de la caries dental (17).

En la actualidad, se han desarrollado estrategias y productos con enfoques más ecológicos para abordar la caries dental, y cuando se combinan con el fluoruro, pueden producir resultados más efectivos. Un ejemplo claro de estas estrategias son los péptidos antimicrobianos, moléculas producidas tanto por el cuerpo como por algunos microorganismos bacterianos, que poseen propiedades antimicrobianas, antivirales y antifúngicas. Sin embargo, es importante destacar que estos péptidos tienen limitaciones en su capacidad para combatir ciertos microorganismos patógenos (17,30).

Otra estrategia es la utilización de probióticos, que implica la introducción de microorganismos específicos en la cavidad oral. Estos microorganismos compiten por nutrientes y la adhesión con los microorganismos patógenos responsables de la enfermedad dental (27,31). Además, existe un enfoque ecológico dietético conocido como prebióticos, que implica alimentar la microbiota oral con nutrientes específicos para crear un ambiente favorable

para el crecimiento y predominio de bacterias beneficiosas para el hospedero. Los prebióticos más comunes en la cavidad oral son la urea y la arginina, ya que, cuando se metabolizan, generan efectos alcalinizantes que contrarrestan el ambiente ácido creado por las bacterias cariogénicas (17,28,34).

En resumen, la prevención efectiva de la caries dental requiere un enfoque integral que combine el uso del fluoruro con estrategias ecológicas como péptidos antimicrobianos, probióticos y prebióticos. Esta sinergia entre diferentes enfoques puede ofrecer resultados más eficientes en la prevención de esta enfermedad oral multifactorial (34).

2.11 PROBIÓTICOS

2.12 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El origen de los probióticos se remonta a tiempos antiguos, específicamente al descubrimiento del uso de productos fermentados durante la era neolítica. En este período, las comunidades humanas que se asentaron comenzaron a involucrarse en la ganadería y la agricultura, lo que dio lugar a la producción de una variedad de productos derivados de estas actividades. Estos productos fermentados, como el yogur y otros alimentos, se convirtieron en un componente importante de la dieta y la nutrición de estas poblaciones (14).

No fue sino hasta 1892 cuando Albert Döderlein descubrió una relación directa de simbiosis entre microorganismos, encontrando que estos microorganismos son responsables de inhibir el crecimiento de otras bacterias patógenas, marcando así uno de los primeros hallazgos científicos relacionados con los probióticos (14).

A principios del siglo XX, se llevó a cabo una investigación significativa sobre la microbiota intestinal, con la participación destacada de dos

investigadores, Ernst Moro y Martinus Willem Beijerinck. Estos científicos se encargaron de aislar y nombrar la especie *Lactobacillus acidophilus*, identificada en las heces infantiles. Este hallazgo marcó un hito importante en la comprensión de los microorganismos beneficiosos en el intestino (14).

En 1906, Henry Tissier publicó resultados alentadores sobre la regulación de la microbiota intestinal mediante la terapia de sustitución de bacterias patógenas. En el mismo año, Michel Cohendy llevó a cabo experimentos con el yogur y llegó a la conclusión de que las personas que consumían yogur con regularidad experimentaban una mejora en su digestión (14).

En 1907, el científico Ilya Ilyich Metchnikoff fue el primero en señalar la relevancia de los *Lactobacillus* spp. presentes en el yogur para la salud humana y la longevidad, destacando su potencial beneficioso para el organismo (14).

2.13 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS PROBIÓTICOS

Los probióticos han sido definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO por sus siglas en inglés) (2002) como “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del hospedero” (15,28).

Estos se caracterizan por ser capaces de adherirse eficaz y transitoriamente a los epitelios de revestimiento del ser humano sin generar ninguna alteración genética en las células y se clasifican de acuerdo con el grupo taxonómico al que pertenecen. Es decir, se identifican de acuerdo con su género, especie, subespecie y una denominación alfanumérica que se designa a una determinada cepa. Producen varios agentes antimicrobianos como las bacteriocinas.

Las bacteriocinas son péptidos que tienen una función de antagonismo hacia ciertas bacterias que facilita la colonización de ciertos nichos específicos de microorganismos, inhibiendo directamente a los microorganismos patógenos. Además, sirven como medios de señalización dentro de las biopelículas orales y el sistema inmune del hospedero (4, ,22-25).

2.14 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS

Los tres mecanismos principales a través de los cuales actúan los probióticos son:

Modulación en el sistema inmunológico del hospedero: los probióticos y sus subproductos promueven la actividad fagocítica de los macrófagos, neutrófilos y linfocitos (15,4,26,32)

Eliminación directa de los patógenos mediante producción de moléculas específicas: las bacterias probióticas producen sustancias antibacterianas como bacteriocinas, ácidos orgánicos, ácidos grasos, péptidos y peróxido de hidrógeno (15,4,19,20,22-,25,29,)

Inhibición indirecta por competencia en la adhesión: los probióticos compiten por los nutrientes y los diferentes sitios de unión presentes en la cavidad oral (15,4,32)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La adhesión y metabolismo de carbohidratos por parte de *S. mutans* en la cavidad oral es un factor importante en la formación y el desarrollo de la caries dental. En este contexto, el uso de probióticos ha sido objeto de investigación debido a su efecto en la disminución de la adhesión de *S. mutans* a las diferentes superficies orales. Por lo tanto, este estudio experimental evaluará la adhesión de *S. mutans* en interacción con las dos cepas de *L. reuteri* (DSM 17938 y ATCC PTA 5289), contenidas en el probiótico BioGaia Prodentis.

4. JUSTIFICACIÓN

BioGaia Prodentis representan una alternativa para la capacidad de la adhesión de *S. mutans* al esmalte dental. Sin embargo, la falta de consenso y la variabilidad en los resultados de los estudios existentes sugieren la necesidad de una investigación más detallada. Por lo tanto, este estudio experimental cuantificará y evaluará la adhesión de *S. mutans* en interacción con las dos cepas de *L. reuteri* (DSM 17938 y ATCC PTA 5289), contenidas en el probiótico BioGaia Prodentis.

5. HIPÓTESIS

El probiótico BioGaia Prodentis que contiene las cepas *L. reuteri* DSM 17938 y *L. reuteri* ATCC PTA 5289 afectará la adhesión de *S. mutans* a superficies del esmalte dental.

6. OBJETIVOS

6.1 GENERAL

Evaluar el efecto del probiótico BioGaia Prodentis en la adhesión de *S. mutans* a superficies de esmalte dental.

6.2 ESPECÍFICOS

- Obtener las superficies de esmalte dental para la realización de los ensayos microbiológicos.
- Evaluar la adhesión de *S. mutans* a las muestras de esmalte dental en un entorno de interacción con las cepas contenidas en el probiótico BioGaia Prodentis mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).
- Observar el comportamiento de adhesión del co-cultivo de *L. reuteri* DSM 17938 y *L. reuteri* ATCC PTA 5289 en interacción con *S. mutans* a las superficies de esmalte dental utilizando microscopía electrónica de barrido (MEB).

7. METODOLOGÍA

Materiales

- Dientes anteriores bovinos
- Lija de agua #400, #600 #800, #1200, #1500
- Infusión cerebro corazón
- Agar Rogosa
- Agar Mitis Salivarius
- BioGaia Prodentis Comprimidos
- Placas Petri
- Tubos Eppendorf de 1.5 ml
- Tubos Falcón de 50 ml
- Puntas para micropipeta
- Agua bidestilada estéril
- Glutaraldehído al 2%
- Placa para cultivo celular de 36 pozos
- Pipetas Pasteur
- Alcohol isopropílico
- Hipoclorito de sodio al 3%
- Agar Soya Tripticasa (enriquecido con hemina y vitamina K)

Equipo

- Sonicador (Sonics Vibra-cell VC130)
- Micropipetas
- Mechero
- Vortex (Daigger Vortex Genie 2)
- Pulidora (Ultrapol Basic Ultra Tec)
- Cámara de anaerobiosis
- Espectrofotómetro (Eppendorf D30)
- Agitador orbital (Thermo scientific MaxQ2500)
- Entrecruzador UV (BIO-RAD)
- Lentes de protección
- Bata para laboratorio

Instrumentos

- Aguja
- Encendedor
- Pinzas de curación
- Trefina de 6 mm
- Pieza de mano de baja velocidad (Alegra W&H AM- 20 E BC, WE-56)
- Asa bacteriológica (grande, mediana y pequeña)

7.1 PROBIÓTICO BIOGAIA PRODENTIS

La fórmula de BioGaia Prodentis se basa en la incorporación de las cepas de *L. reuteri* DSM 17938 y *L. reuteri* ATCC PTA 5289 (16). Además de estas cepas probióticas, incluye otros componentes, como aceite vegetal hidrogenado, aceite de menta, saborizante de menta y sucralosa como endulzante (16). Este suplemento se administra de manera oral y la recomendación general indica consumir de 1 a 2 tabletas al día, de preferencia después del cepillado dental (16).

7.2 PREPARACIÓN DE LAS SUPERFICIES DE ESMALTE

Se seleccionaron 15 incisivos centrales superiores e inferiores bovinos. Estos se preservaron en un contenedor con agua purificada. Posteriormente, se cortaron en superficies circulares de 6x6 mm mediante el uso de una trefina de la superficie labial de cada uno de los dientes. Una vez obtenidas las 15 superficies necesarias para el estudio se eliminó la dentina y las rugosidades del esmalte.

Para llevar a cabo esta tarea, se utilizaron lijas con granulometrías específicas que van desde #400 hasta #1500.

Este proceso se realizó utilizando la pulidora de precisión Ultrapol Basic Ultra Tec, que asegura un acabado uniforme y óptimo en las superficies de estudio. Después se lavaron las superficies de esmalte dental con 10 mL de hipoclorito de sodio al 3% durante 3 minutos sobre el agitador orbital (Thermo scientific, MAXQ2500).

En seguida, las superficies se enjuagaron manualmente en tres ciclos con agua bidestilada estéril hasta que se disminuyó o se quitó el olor de cloro. Posteriormente se realizó un segundo lavado en agitación con 10 mL de agua bidestilada estéril durante 5 minutos. Luego se procedió a realizar un tercer lavado con 10 mL de alcohol isopropílico (2-propanol) al 70% durante

15 minutos. Ahora bien, se realizó un último lavado dividido en dos ciclos de 5 minutos cada uno con 10 mL de agua bidestilada estéril.

Finalmente, las superficies de esmalte se almacenaron en un tubo Falcon con 10 mL de agua bidestilada estéril en el refrigerador a 4° C. durante 6 hrs y no más de 72 hrs.

7.3 OBTENCIÓN Y CULTIVO DE LOS MICROORGANISMOS

Se descongeló y se cultivó la especie de *S. mutans* en agar soya tripticasa. Esta especie se obtuvo del cepario del laboratorio de BioInterfases de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM. En seguida se introdujo el cultivo a la cámara de anaerobios y se mantuvo en un ambiente húmedo y sin oxígeno durante 24 hrs. Una vez que se cumplió las 24 hrs se retiró la placa de cultivo y se realizó la transferencia de *S. mutans* mediante la técnica de estría triple a una nueva placa de agar soya tripticasa.

Este nuevo cultivo se mantuvo durante 48 hrs dentro de la cámara de anaerobios. Posteriormente, para poder obtener los microorganismos de *L. reuteri* (DSM 17938/ ATCC PTA 5289) se disolvió una tableta de BioGaia Prodentis en 1 mL de infusión cerebro corazón. De este modo se obtuvo una concentración de 2×10^8 UFC/mL de ambas cepas de *L. reuteri* contenidas en el probiótico.

7.4 HOMOGENIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

En esta fase del proceso, se vertió 1 mL de infusión cerebro corazón inoculado con *S. mutans* en la celdilla del espectrofotómetro (Eppendorf D30). Luego, se llevó a cabo la medición de la concentración bacteriana utilizando el mismo espectrofotómetro. Se tomó como referencia un valor de absorbancia lo más cercano a 1 lo cual equivale a una concentración de 1×10^9 UFC/mL.

Después se hizo una dilución de *S. mutans* a partir de la concentración obtenida vertiendo 100 µL del medio inoculado y 900 µL de infusión cerebro corazón estéril en un tubo Eppendorf. De esta manera se obtuvo una concentración final de 1×10^8 UFC/mL de *S. mutans*.

Posteriormente, se procedió a igualar la concentración de las cepas de *L. reuteri* (DSM 17938/ ATCC PTA 5289) con respecto a la concentración de *S. mutans*. Para poder homogenizar las dos cepas de *L. reuteri* (DSM 17938/ ATCC PTA 5289) se tomó 500 µL de la dilución de la tableta BioGaia Prodentis y se vertió en un nuevo tubo Eppendorf. De esta forma se obtuvo una densidad de 1×10^8 UFC/mL de este microorganismo.

Una vez que se homogenizó las concentraciones de los microorganismos se realizó la solución del cocultivo el cual se preparó tomando 250 µL con *S. mutans* y 250 µL de la dilución de la tableta con las cepas de *L. reuteri* (DSM 17938/ ATCC PTA 5289).

7.5 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA EVALUACIÓN EFECTO DEL PROBIÓTICO BIOGAIA PRODENTIS EN LA ADHESIÓN DE *S. mutans* A SUPERFICIES DE ESMALTE DENTAL.

En la placa de pozos para cultivo celular se colocaron 15 superficies de esmalte dental, las cuales se replicaron por triplicado ($n=3$) para su conteo visual de UFC's; además se reservaron 6 superficies de esmalte para su posterior examinación en el MEB. Las primeras 5 superficies, se destinaron al cultivo de *S. mutans*; las siguientes 5 se cultivaron con *L. reuteri* (probiótico BioGaia Prodentis) y las últimas 5 superficies se cultivaron en interacción de estos dos microorganismos (co-cultivo).

Siguiendo el orden anterior se preparó las primeras 5 superficies añadiendo 100 µL con *S. mutans* y 900 µL de infusión estéril. En seguida se prepararon las siguientes 5 superficies, añadiendo 100 µL con las dos cepas de *L. reuteri* (DSM 17938/ATCC PTA 5289) y 900 µL de infusión estéril, y

finalmente se preparó las ultimas 5 superficies añadiendo 100 μ L de la solución con *S. mutans* y 100 μ L con las dos cepas de *L. reuteri* (DSM 17938/ATCC PTA 5289) más 900 μ L de solución estéril. Una vez preparadas las superficies del esmalte dental con sus respectivos microorganismos se introdujeron a la cámara de anaerobiosis durante 48 hrs.

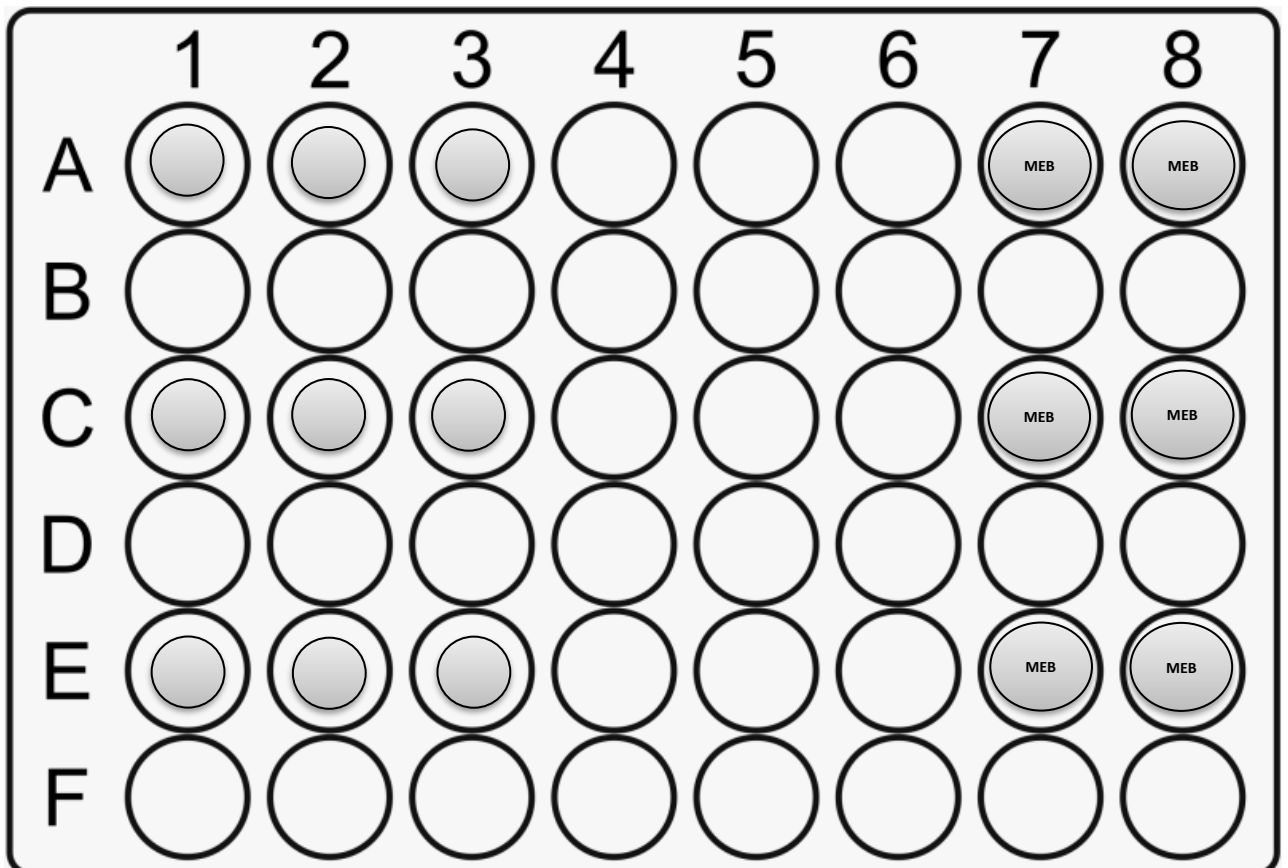


Figura 3. Distribución de las superficies de esmalte dental con sus respectivos cultivos de microorganismos en una placa para cultivo celular de 48 pozos. **Fila A:** superficies de esmalte dental que interactuaron exclusivamente con *S. mutans*. **Fila B:** Superficies de esmalte dental que estuvieron en contacto con *L. reuteri* (probiótico BioGaia Prodentis). **Fila E:** superficies de esmalte dental incubadas con el co-cultivo de *S. mutans* y *L. reuteri* (probiótico BioGaia Prodentis). Las superficies de esmalte colocadas en la columna 7 y 8 fueron utilizadas para la evaluación mediante MEB (18).

7.7 EVALUACIÓN DE LA ADHESIÓN DE LOS MICROORGANISMOS A LAS SUPERFICIES DE ESMALTE MEDIANTE EL CONTEO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC'S)

Se retiró la placa de pozos de la cámara de anaerobios y se retiró la infusión cerebro corazón a las superficies del grupo MEB. Las seis muestras de esmalte que pertenecían a este grupo se colocaron en una nueva placa de pozos donde se agregaron 500 μ L de glutaraldehído al 2% y se dejó actuar durante 24 horas como tiempo mínimo para su examinación.

Después, se retiró la infusión cerebro corazón de los otros grupos que se estaban estudiando. Para garantizar la integridad de las superficies y evitar contaminaciones, se realizaron dos lavados de los pozos con 500 μ L de medio de infusión cerebro corazón. En seguida, se llevó a cabo un lavado adicional de 500 μ L utilizando agua bidestilada estéril. Posteriormente se realizó un proceso de sonicación a las nueve superficies de esmalte. Para poder realizar el proceso anterior, se añadieron 1000 μ L de medio infusión cerebro corazón a cada uno de los pozos.

Las superficies fueron sometidas a sonicación mediante 5 ciclos, cada uno de 10 segundos de duración. Se tuvo especial cuidado en limpiar la punta entre cada ciclo de vibración antes de proceder con la siguiente superficie. Luego, se tomó 1000 μ L de cada pozo y se realizaron las siguientes diluciones: -1, -2 y -3. Luego, se procedió a sembrar 100 μ L de la dilución -3 obtenida de cada una de las tres superficies pertenecientes a los distintos grupos en medios de cultivo específicos, ideales para el crecimiento de cada tipo de microorganismo.

En este sentido, el microorganismo *S. mutans* se cultivó en medio agar salivarius, mientras que el microorganismo *L. reuteri* se desarrolló en un medio agar Rogosa. En el caso del grupo en el que se estudió la interacción

entre *S. mutans* con *L. reuteri* (probiótico BioGaia Prodentis), se llevó a cabo su cultivo en medio agar Mitis Salivarius.

Finalmente, los cultivos se introdujeron a la cámara de anaerobiosis, durante un período de 24 horas. Una vez, que se cumplió este periodo de tiempo se retiraron y se llevó a cabo un conteo visual UFC´s adheridas al esmalte dental en cada uno de los tres grupos de superficies.

Microorganismos	Superficie	Dilución	Microorganismo cuantificado	Medio
<i>L. reuteri</i>	#1	-3	<i>L. reuteri</i>	Agar Rogosa
<i>L. reuteri</i>	#2	-3	<i>L. reuteri</i>	Agar Rogosa
<i>L. reuteri</i>	#3	-3	<i>L. reuteri</i>	Agar Rogosa
<i>S. mutans</i>	#1	-3	<i>S. mutans</i>	Agar Mitis Salivarius
<i>S. mutans</i>	#2	-3	<i>S. mutans</i>	Agar Mitis Salivarius
<i>S. mutans</i>	#3	-3	<i>S. mutans</i>	Agar Mitis Salivarius
Cocultivo	#1	-3	<i>L. reuteri</i>	Agar Rogosa
Cocultivo	#2	-3	<i>L. reuteri</i>	Agar Rogosa
Cocultivo	#3	-3	<i>L. reuteri</i>	Agar Rogosa
Cocultivo	#1	-3	<i>S. mutans</i>	Agar Mitis Salivarius
Cocultivo	#2	-3	<i>S. mutans</i>	Agar Mitis Salivarius
Cocultivo	#3	-3	<i>S. mutans</i>	Agar Mitis Salivarius

Tabla 2. Tabla representativa de la organización de las superficies de esmalte con sus respectivos microorganismos y medios de cultivo. Nota: el término cocultivo hace referencia al cocultivo de *S. mutans* con *L. reuteri* (probiótico BioGaia Prodentis).

8. RESULTADOS

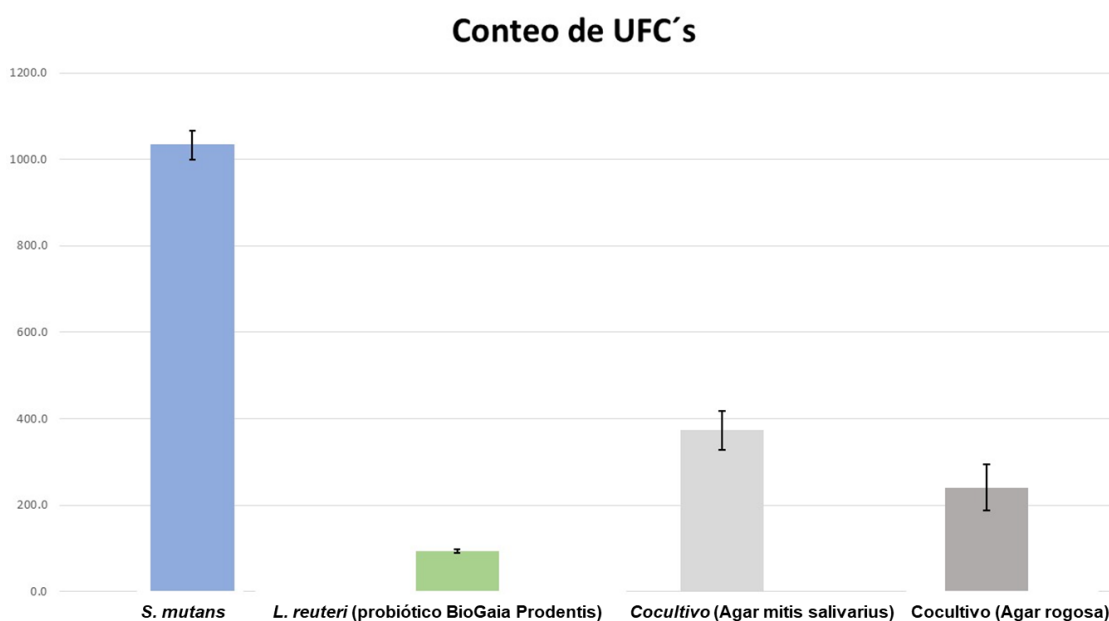


Figura 4. Conteo promedio de UFC's en diferentes medios de cultivo.

Este estudio cuantifico la adhesión de *S. mutans* y *L. reuteri* (probiótico BioGaia Prodentis), de manera individual y en co-cultivo, sobre superficies de esmalte dental.

Como se puede observar en la **Figura 4**, la adhesión de *S. mutans* a las superficies de esmalte mostró el mayor conteo de UFC's (1033 UFC/ml \pm 33.3), en comparación con la adhesión de *L. reuteri* (probiótico BioGaia Prodentis) a dichas superficies (93 UFC/ml \pm 4). Además, se encontró que cuando se evaluó la adhesión de *S. mutans* en co-cultivo con *L. reuteri* (probiótico BioGaia Prodentis), los conteo de UFC's disminuyeron de forma importante, esto cuando se recobraron las células bacterianas del cocultivo en medio agar Mitis Salivarius (373 UFC/ml \pm 44.8) y en agar Rogosa (240 UFC/ml \pm 53.3). A continuación, se muestran microfotografías representativas sobre la adhesión de *S. mutans* y *L. reuteri* (probiótico BioGaia Prodentis) a diferentes superficies de esmalte dental.

8.6 EVALUACIÓN MEDIANTE MEB DE LA ADHESIÓN DE *S. mutans* A LAS SUPERFICIES DE ESMALTE DENTAL

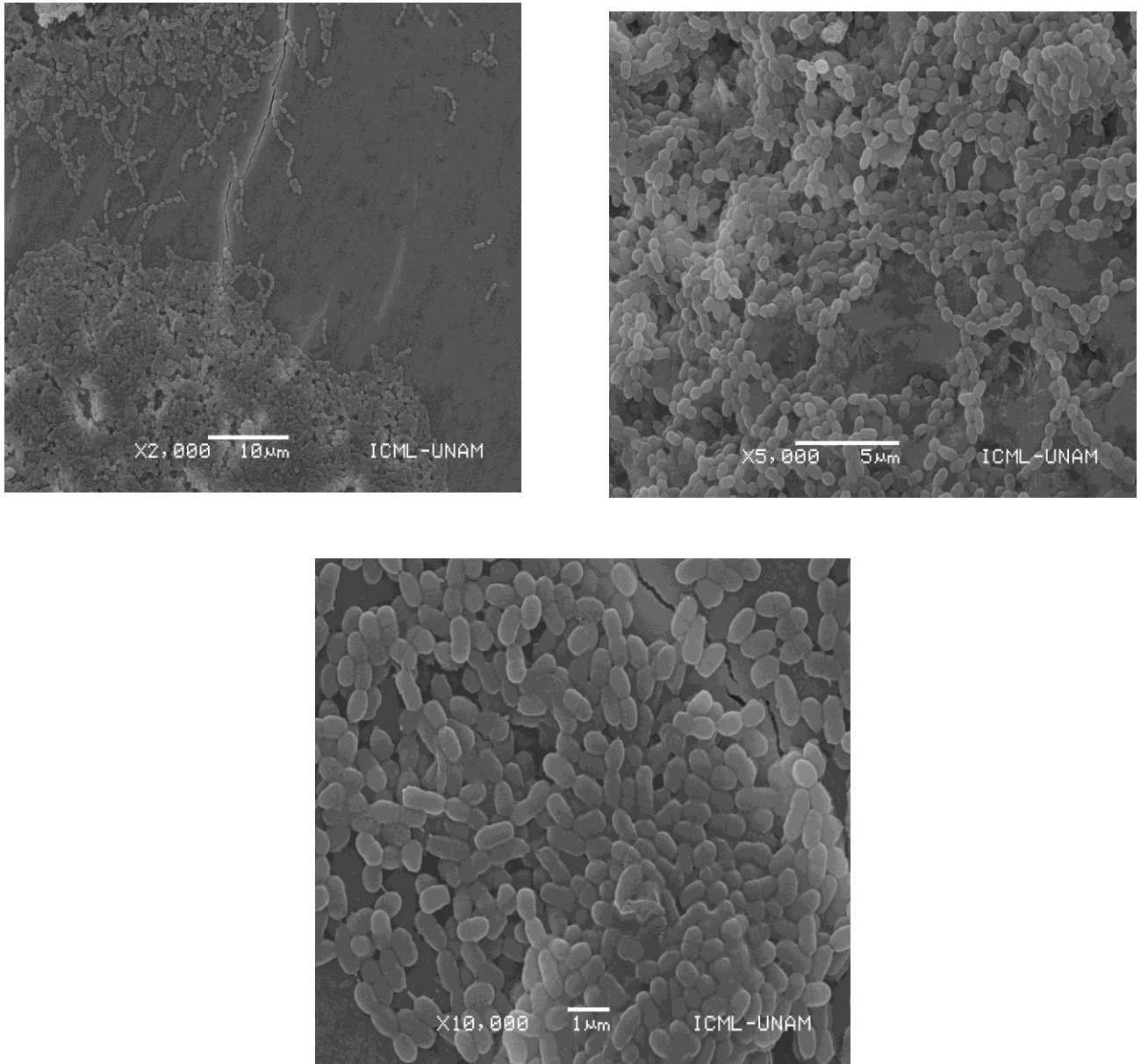


Figura 8. Micrografías obtenidas mediante el microscopio electrónico de barrido (MEB) en las cuales se puede observar la adhesión de *S. mutans* sobre superficies de esmalte dental.

8.7 EVALUACIÓN MEDIANTE MEB DE LA ADHESIÓN DE *L. reuteri* (PROBIÓTICO BIOGAIA PRODENTIS) A LAS SUPERFICIES DE ESMALTE DENTAL

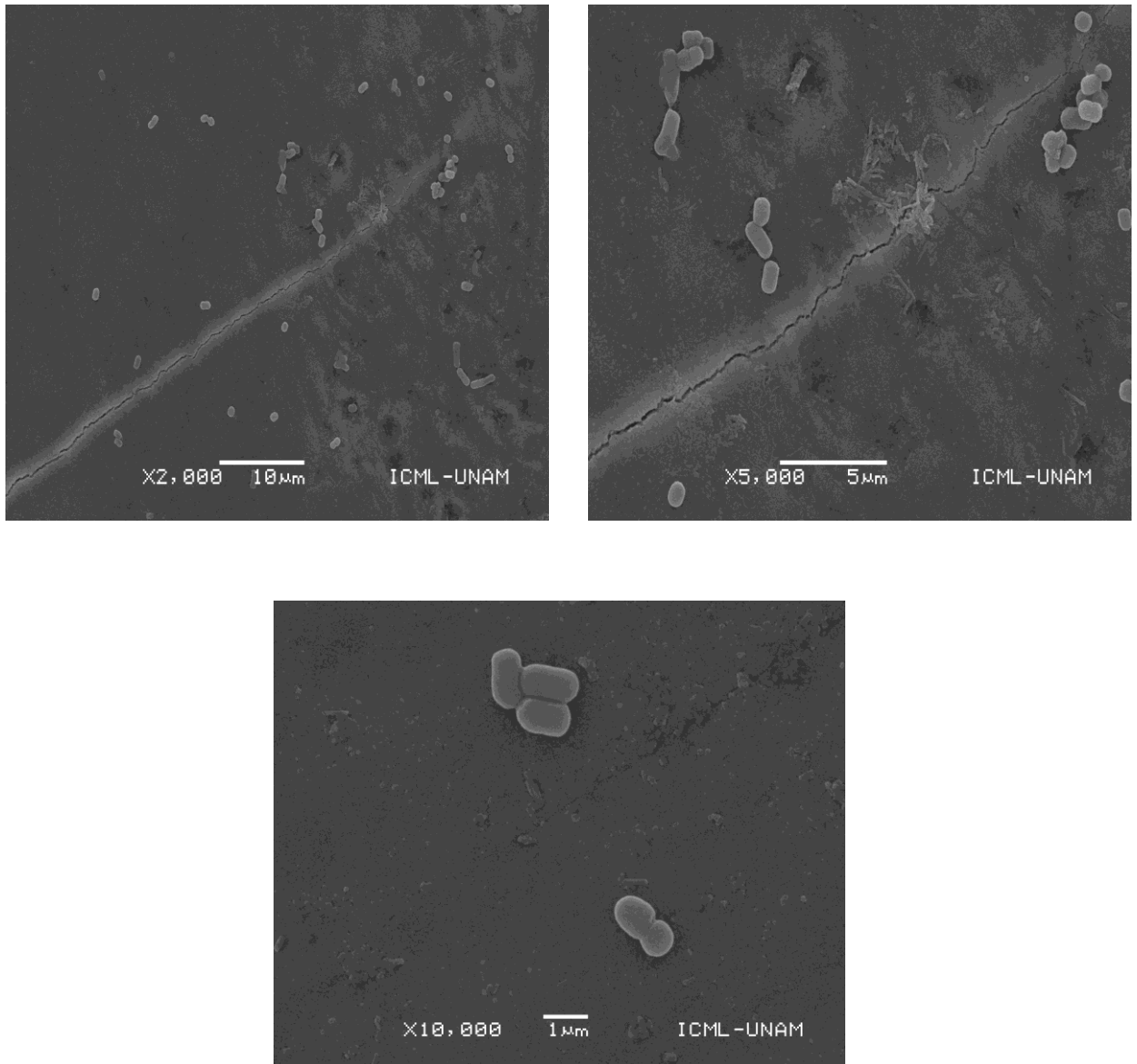
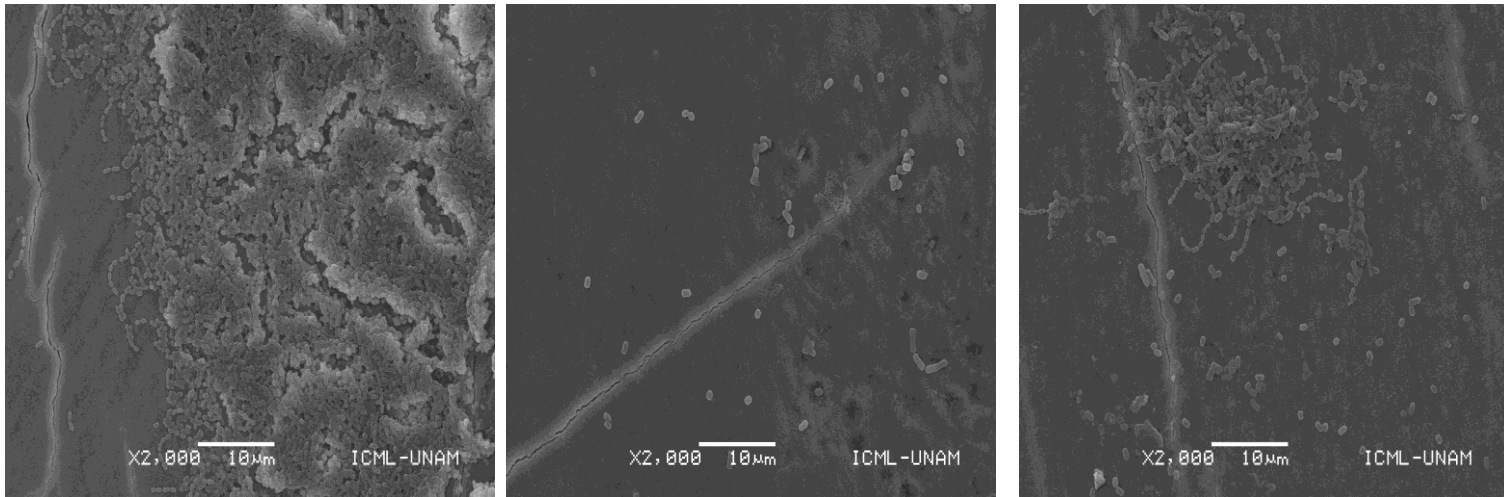


Figura 9. Micrografías obtenidas mediante el microscopio electrónico de barrido (MEB) en las cuales se puede observar la adhesión de *L. reuteri* (probiótico BioGaia Prodentis) a las superficies de esmalte dental.

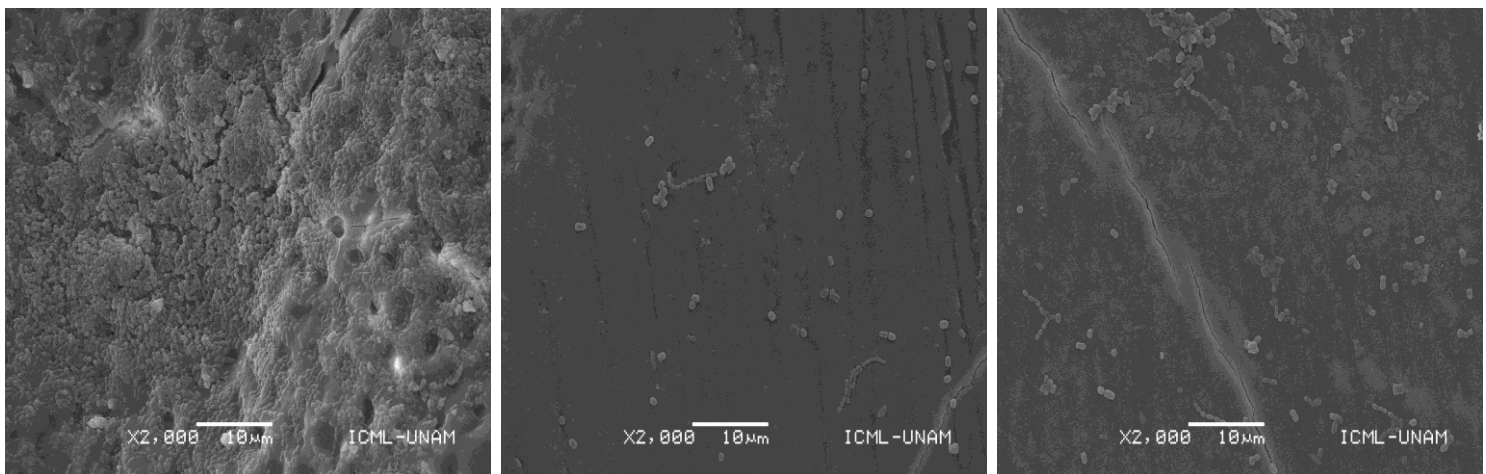
8.8 EVALUACIÓN MEDIANTE MEB DE LA ADHESIÓN DEL COCULTIVO DE *S. mutans* CON *L. reuteri* (PROBIÓTICO BIOGAIA PRODENTIS) A LAS SUPERFICIES DE ESMALTE DENTAL



A

B

C



A

B

C

Figura 10. Micrografías obtenidas mediante el microscopio electrónico de barrido (MEB) en las cuales se puede observar el comparativo de la adhesión de los microorganismos: **A)** *S. mutans* **B)** *L. reuteri* (probiótico BioGaia Prodentis) **C)** Cocultivo

9. DISCUSIÓN

La bacteria *S. mutans*, está principalmente relacionada con el desarrollo de la caries dental debido a su producción de ácidos orgánicos y tolerancia a medios ácidos (41).

Por lo tanto, su adhesión desempeña un factor de riesgo en el desarrollo de esta enfermedad (41). En respuesta a esto, se han desarrollado diferentes tratamientos como el uso de probióticos destinados a disminuir la adhesión de *S. mutans* a las diferentes superficies orales (30).

El concepto de utilizar probióticos como una estrategia para controlar la carga de *S. mutans* se remonta a la investigación pionera de Ishihara y colaboradores en 1945. (42). Estos autores aislaron cepas de *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. faecium* y *S. equinus* en heces de personas sanas.

Posteriormente obtuvieron de estos microorganismos extractos solubles en agua los cuales mezclaron más adelante con saliva de individuos sanos mediante un estudio *in vitro*. De esta forma demostraron que estas bacterias procedentes del intestino tienen la capacidad de disminuir la cantidad de *S. mutans* en la saliva.

Además autores como Galvin M, Silva M, Vicent JG, Barefoot SF, Hamdam IY y cols. (43) documentaron como diferentes especies de *Lactobacillus* son capaces de producir sustancias con capacidad antimicrobiana.

Por su parte Talarico y cols. (47) descubrieron en 1988 una sustancia inhibitoria producida por *L. reuteri*, a la que llamaron reuterina. Su poder de inhibición fue demostrado sobre diversas especies bacterianas

Siguiendo esta línea de investigación el presente estudio evaluó el efecto de *L. reuteri* (BioGaia Prodentis) en la adhesión de *S. mutans* a diferentes

superficies de esmalte dental. Para poder cumplir con este objetivo, se cuantifico la adhesión de cada uno de los microorganismos en monocultivo y co-cultivo.

A partir de los resultados obtenidos por medio del conteo visual de UFC's y la evaluación mediante el microscopio electrónico de barrido se pudo cuantificar una reducción en la adhesión de *S. mutans* cuando estuvo en co-cultivo con el probiótico BioGaia Prodentis, en comparación con el conteo de UFC's cuando *S. mutans* estuvo en monocultivo.

Estos resultados concuerdan con las investigaciones realizadas por Aino M. y cols. (46) los cuales realizaron un estudio en el cual evaluaron los efectos de *Lactobacillus reuteri* PTA 5289 y *L. paracasei* DSMZ16671 sobre la adhesión y la formación de biopelículas de *Streptococcus mutans*. Este estudio consistió en la evaluación de la adhesión de *S. mutans* a 9 superficies de hidroxiapatita en interacción con *L. reuteri* y *L. paracasei*. Los resultados de su estudio demostraron un efecto inhibitorio por parte de los microorganismos probióticos sobre la cepa *S. mutans*.

Además, nuestro estudio también concuerda con la investigación de Nikawa y cols. (44). Ellos realizaron un estudio *in vivo* en el cual participaron 40 mujeres, divididas en dos grupos de 20 personas, todas ellas sin incidencia de caries dental, gingivitis o enfermedad periodontal. Este estudio consistió en dar a ingerir al primer grupo un yogurt placebo mientras que el segundo grupo el yogurt contenía *L. reuteri*. Los resultados demostraron un efecto inhibitorio de *S. mutans* causado por *L. reuteri*.

Estudios posteriores, como los de Çaglar y cols. (48) también demostraron el efecto inhibitorio por parte de *L. reuteri* ATCC 55730 contenido en una tableta del probiótico Life Top Straw® sobre el recuento salival de *S. mutans* en 120 adultos jóvenes (21-24 años). Esta tableta con *Lactobacillus*

ATCC 55730 mostro una reducción significativa de *S. mutans* en saliva en comparación al grupo placebo.

En 2008, obteniendo también una disminución de *S. mutans* significativa en presencia de *L. reuteri*, Çaglar y cols. (45) utilizaron como forma de administración del probiótico un nuevo producto sanitario. Consiste en un chupete, en cuyo interior insertaron la pastilla probiótica. El chupete tenía unos pequeños orificios de 0,5 mm de diámetro, a través de los cuales la pastilla se disuelve totalmente en la cavidad oral en unos 10-12 minutos.

En conclusión, el resultado obtenido en este estudio confirma el efecto inhibitor de *L. reuteri* (BioGaia Prodentis) sobre la adhesión de *Streptococcus mutans* a las superficies del esmalte dental, lo cual concuerda con los estudios realizados por Aino M, Ishihara K, Silva M, Nikawa H y Çaglar E (41-46)

10. CONCLUSIONES

La presente investigación demostró que *S. mutans* tiene una mayor afinidad para adherirse a las superficies de esmalte dental, en contraste con *L. reuteri* (probiótico BioGaia Prodentis); Además, se cuantificó una disminución en la adhesión de *S. mutans* sobre las superficies de esmalte dental cuando estuvo en interacción con *L. reuteri* (probiótico BioGaia Prodentis).

Por lo tanto, con base en los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que la adhesión de *S. mutans* se vio significativamente disminuida en presencia *L. reuteri* (probiótico BioGaia Prodentis), lo cual indica una competencia en la adhesión a las superficies de esmalte dental entre *S. mutans* y el probiótico evaluado (*L. reuteri*).

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Global, Regional, and National Levels and Trends in Burden of Oral Conditions from 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease 2017 Study. *Journal of Dental Research* [Internet]. [consultado el 11 enero 2023]; 2020;99(4):362. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7088322/>
2. Abikshyeet P, Mishra P, Bhuyan L et al. Probiotics: Dawn of a New Era in Dental Caries Management, *J Pharm Bioallied Sci* [Internet]. [consultado el 11 enero 2023]; 2022; 14(Suppl 1): S34-S38. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9469361/>
3. Kavita RP, Suresh RN, Babu VV. Probiotics, Prebiotics, and symbiotics-a review, *J Food Sci Technol* [Internet]. [consultado el 12 enero 2023];2015;52(12):7577-7587. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4648921/>
4. Rad AH, Pourjafar H, Mirzakhani E. A comprehensive review of the application of probiotics and postbiotics in oral health, *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. [consultado el 12 enero 2023]; 2023; 13:1120995. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10031100/>
5. John M. Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution, *Current Biology* [Internet]. [consultado el 13 enero 2023]. 2015; 19(25):911-921 Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.055>
6. Almaguer A. Biopelículas en el medio ambiente oral. En José Luis MS director. *Ecología Oral*. 1st ed. Ciudad de México: Editorial El Manual Moderno; 2017. p. 55–70.

7. Jakubovics NS. Saliva as the Sole Nutritional Source in the Development of Multispecies Communities in Dental Plaque, *Microbiol Spectr* [Internet]. [consultado el 13 enero 2023]. 2015; 3(3). Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.MBP-0013-2014>
8. Chawhuaveang DD, Yu OY, Yin I et al. Acquired salivary pellicle and oral diseases: A literature review, *J Dent Sci* [Internet]. [consultado el 13 enero 2023]. 2021; 16(1):523-529. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7770358/>
9. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR et al. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* [Internet]. [consultado el 15 enero 2023]. 2008 ;23(3):196–205. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-302X.2007.00411.x>
10. Ábalos C. Adhesión bacteriana a biomateriales Adhesión bacteriana a biomateriales, *Av. Odontoestomatol* [Internet]. [consultado el 15 enero 2023]. 2005; 21(1):347-353. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S021312852005000100003&lng=es&nrm=iso. ISSN 2340-3152.
11. Rathee M, Sapro A. Dental Caries, *StatPearls* [Internet]. [consultado el 18 enero 2023]. 2019. PMID: 31869163. Disponible en: <https://europepmc.org/article/nbk/nbk551699>
12. Takahashi N, Nyvad B. Ecological hypothesis of dentin and root caries, *Caries Res* [Internet]. [consultado el 18 enero 2023]. 2016; 50 (4): 422–431. Disponible en: <https://doi.org/10.1159/000447309>

13. Simón A, Guillen M, Mira A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *J Oral Microbiol* [Internet]. [consultado el 19 enero 2023]. 2014 ;6(1): PMC4247497/. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4247497/>
14. Santa L, Charitos IA, Bottalico L. A successful history: Probiotics and their potential as antimicrobials. *Expert Review of Anti-infective Therapy* [Internet]. [consultado el 19 enero 2023]. 2019;8 (17):635-645. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/14787210.2019.1645597>
15. Amargianitakis M, Antoniadou M, Rahiotis C et al. Probiotics, Prebiotics, Synbiotics and Dental Caries. New Perspectives, Suggestions, and Patient Coaching Approach for a Cavity-Free Mouth, *Appl Sci* [Internet]. [consultado el 20 enero 2023]. 2021; 11(12):5472. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-3417/11/12/5472>
16. BioGaia [internet]. [consultado 15/02/2023]. Disponible en: <https://www.biogaia.es/product/biogaia-protectis-comprimidos/#>
17. Nebu P, Bharat S, Laurence J. Walsh. Ecological Approaches to dental Caries Prevention: Paradigm shift or Shibboleth?, *Caries Res* [Internet]. [consultado el 15 febrero 2023]. 2018 52 (1-2): 153–165. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29320767/>
18. Hemko. 48 Well Microtiter Plate. [internet]. [consultado 18 oct 2023]. Disponible en: <http://www.clipartkey.com/view/Twhibb48-well-microtiter-plate/>

19. Messauodi S, M Manai, G Kergourlay et al. Lactobacillus salivarius: Bacteriocin and probiotic activity. Food Microbiol [Internet]. 2013[consultado el 20 noviembre 2023];36(2):296-304. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.05.010>
20. Dobson A, Cotter PD, Paul Ross R et al. Bacteriocin production : a probiotic trait ? Appl Environ Microbiol [Internet]. 2012 [consultado el 03 febrero 2023] ;78(1) :1-6. Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3255625/>
21. Kilian M. The oral microbiome- friend or foe? Eur J Oral Sci [Internet]. 2018[consultado el 03 febrero 2023]; 126(1):5-12. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/eos.12527>
22. Gänzle MG. Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential applications. Appl Microbiol Biotechnol [Internet]. 2004[consultado el 03 febrero 2023]; 64: 326-332. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00253-003-1536-8>
23. Michael G. Gänzle, Vogel RF. Studies on the Mode of Action of Reutericyclin. ASM Journals [Internet]. 2003[consultado el 05 febrero 2023]; 69 (2). Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.69.2.1305-1307.2003>
24. Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S et al. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by Lactobacillus reuteri against intestinal bacteria. BMC Microbiology [Internet]. 2007[consultado el 05 febrero 2023]; 7:101. Disponible en: <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-7-101>

25. Spinler J, Taweechotipatr M, Rognerud C et al. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* [Internet]. 2008[consultado el 05 febrero 2023] ;14 (13): 166-171. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.02.001>
26. Wang H, Zhou C, Huang et al. The potential therapeutic role of *Lactobacillus reuteri* for treatment of inflammatory bowel disease. *Am J Transl Res* [Internet]. 2020[consultado el 06 febrero 2023]; 12 (5): 1569-1589. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7270012/>
27. Zeng Y, Fadaak A, Alomeir N et al. Effect of Probiotic *Lactobacillus Plantarum* on *Streptococcus mutans* and Clinical Isolates from Children with Early Childhood Caries. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2023[consultado el 06 febrero 2023]; 24 (3): 2991. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/3/2991/htm>
28. Guarner F, Ellen Sanders M, Eliakin R et al. Probióticos y Prebióticos. Guías Mundiales de la organización Mundial de Gastroenterología. [Internet]. 2017[consultado el 07 febrero 2023]. Disponible en: https://www.academia.edu/37041202/Gu%C3%ADas_Mundiales_de_la_Organizaci%C3%B3n_Mundial_de_Gastroenterolog%C3%ADa_Probi%C3%B3ticos_y_prebi%C3%B3ticos

29. Hammami R, Fernandez B, Lacroix C et al. Anti-infective properties of bacteriocin: an update. *Cellular and Molecular Life Sciences* [Internet]. 2012[consultado el 07 febrero 2023]; 70 (16): 2947-2967. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-012-1202-3>
30. Pitts N. Understanding Dental caries-from pathogenesis to prevention and therapy. *Understanding Dental Caries*: [Internet]. 2016[consultado el 08 febrero 2023]; 41-52. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-30552-3_1
31. Lyn Y, Chen J, Zhou X et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by strategies targeting the metabolism of exopolysaccharides. *Critical Reviews in microbiology* [Internet]. 2021[consultado el 08 febrero 2023]; 47 (5): 667-677. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1915959>
32. Meurman JH. Probiotics: do they have a role in oral medicine and dentistry. *Eur J Oral Sci* [Internet]. 2005 [consultado el 09 febrero 2023]; 113: 188-196. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2005.00191.x>
33. Solbiati J, Frias-López J. Metatranscriptome of the oral Microbiome in health and disease. *Journal of Dental Research* [Internet]. 2018 [consultado el 09 febrero 2023]; 97(5): 492-500. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5958373/>

34. N. Philips, B. Suneja, L. Walsh. Beyond Streptococcus mutans: clinical implications of the evolving dental caries aetiological paradigms and its associated microbiome. British dental journal [Internet]. 2018 [consultado el 10 febrero 2023]; 224(4): 219-225. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/sj.bdj.2018.81>
35. Zhang J, Chu C, Yu O et al. Oral microbiome and Dental Caries Development. Dent J [Internet]. 2022 [consultado el 10 febrero 2024];10(10):184. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9601200/>
36. Marcelle M. Approaches to Modulate Biofilm Ecology. Dental Clinics of North America [Internet]. 2019 [consultado el 11 febrero 2023];63(4):581-594. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6980328/>
37. Aruni W, Dou Y, Mishra A et al. The Biofilm Community- Rebel with a Cause. Curr Oral Health Rep [Internet]. 2015 [consultado el 11 febrero 2023];2(1):48-56. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4478205/>
38. Karygianni L, Ren Z, Koo H et al. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. Trends in Microbiology [Internet]. 2020 [consultado el 11 febrero 2023];28(8):668-681. Disponible en: [https://www.cell.com/trends/microbiology/abstract/S0966-842X\(20\)30087-1](https://www.cell.com/trends/microbiology/abstract/S0966-842X(20)30087-1)

39. Jakubovics NS, Goodman SD, Mashburn L et al. The dental plaque biofilm matrix. *Periodontology 2000*[Internet].2021[consultado el 13 febrero 2023];86(1):32-86. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9413593/>
40. Heoa S, Ruhla S, Scannapieco F. Implication of salivary protein binding to commensal and pathogenic bacteria. *Journal of oral biosciencias* [Internet].2013[consultado el 13 febrero 2023];55(4):169. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3974197/>
41. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D et al. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Apr;33(4):499-515. [consultado el 15 febrero 2023]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3953549/>
42. Ishihara K, Miyakawa H, Hasegawa A et al. Growth inhibition of *Streptococcus mutans* by cellular extracts of human intestinal lactic acid bacteria. *Infect Immun* 1985; 49(3): 692-4. [consultado el 15 febrero 2023]; Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4030098/>
43. Silva M, Jacobus NV, Deneke C et al. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31(8): 1231-3. [consultado el 15 febrero 2023]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC174909/>
44. Nikawa H, Makihira S, Fukushima H et al. *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of *mutans streptococci*. *Int J Food Microbiol* 2004; 95(2): 219-23. [consultado el 15 febrero 2023]; Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15282133/>

45. Çaglar E, Kuscu OO, Cildir SK et al. A probiotic lozenge administered medical device and its effect on salivary mutans streptococci and lactobacilli. *Int J Paediatr Dent* 2008; 18(1): 35-9. [consultado el 15 febrero 2023]; Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18086024/>
46. Marttinen AM, Haukioja AL, Keskin M, et al. Effects of *Lactobacillus reuteri* PTA 5289 and *L. paracasei* DSMZ16671 on the adhesion and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Curr Microbiol.* 2013 Aug;67(2):193-9. [consultado el 15 febrero 2023]; Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23503788/>
47. Talarico TL, Casas IA, Chung TC et al. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32(12): 1854-8 [consultado el 15 febrero 2023]; Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3245697/>
48. Caglar E, Kavaloglu S, Ergeneli S, et al. Salivary mutans streptococci and lactobacilli levels after ingestion of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 by straws or tablets. *Acta odontologica Scandinavica*; 64(5) *Acta Odontologica Scandinavica*, 64(5):314-318 [consultado el 15 febrero 2023]; Disponible en: <https://doi.org/10.1080/00016350600801709>