



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

INHIBICIÓN DE LA ADHESIÓN DE *Streptococcus mutans* AL
ESMALTE MEDIANTE PROBIÓTICOS IN VITRO.

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

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

P R E S E N T A:

SONIA CITLALI MORALES LÓPEZ

TUTOR: Dra. LIA ALIOTH HOZ RODRÍGUEZ

ASESOR: Dr. ENRIQUE ROMO ARÉVALO



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.



Este trabajo se lo dedico a las siguientes personas:

A mis padres, mi hermana, mis abuelos y a mi familia, por ser el pilar fundamental en mi vida y apoyarme incondicionalmente.

A mis amigos, mi novio y a todas aquellas personas que creyeron en mí, me impulsaron a cumplir mis objetivos y han formado una muy importante parte de mi vida.

A mis maestros por sus invaluable enseñanzas y consejos.

A mis tutores, gracias por su apoyo, paciencia y la enorme oportunidad de aprendizaje que me brindaron desde el día en que me recibieron en el laboratorio.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por cobijarme desde el bachillerato, por todas las experiencias que he vivido en ella y por permitirme lograr el sueño de convertirme en egresada de la mejor universidad de México.

“Por mi raza hablará el espíritu”



Agradezco de manera especial a:

El Laboratorio de Biología Periodontal y Tejidos Mineralizados de la Facultad de Odontología UNAM, por permitirme realizar el trabajo experimental en sus instalaciones.

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

A la Mtra. Adriana Patricia Hernández por proporcionar la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175TM y su asesoramiento técnico para el cultivo y manejo del microorganismo.



ÍNDICE

I. Introducción.....	5
II. Marco teórico.....	7
2.1. Microbiota Oral.....	7
2.2. Biopelículas.....	9
2.3. Esmalte Dental.....	14
2.4. Caries Dental.....	16
2.5. <i>Streptococcus mutans</i>.....	18
2.6. Probióticos.....	21
2.7. <i>Lactobacillus sporogenes</i> / <i>B. coagulans</i>.....	24
III. Planteamiento del problema.....	27
IV. Justificación.....	27
V. Objetivos.....	28
VI. Hipótesis.....	28
VII. Metodología.....	29
VIII. Resultados.....	34
IX. Discusión.....	46
X. Conclusiones.....	48
XI. Referencias Bibliográficas.....	49



I. Introducción

El *Streptococcus mutans* es una bacteria patógena de la cavidad oral. Dicho microorganismo se adhiere firmemente a la superficie del esmalte dental cuando se presenta un desequilibrio en el ecosistema bucal, siendo uno de sus primeros colonizadores y que da paso a la agregación de otros microorganismos que conforman la biopelícula supragingival. Estos microorganismos en conjunto, generan un proceso de desmineralización y posteriormente pueden dar lugar a una enfermedad bucodental, infectocontagiosa y multifactorial, con uno de los mayores índices de prevalencia en los seres humanos: la caries dental.¹

Una de las alternativas que se ha explorado para controlar a los microorganismos patógenos en el cuerpo humano es el uso de probióticos (microorganismos vivos que pueden regular y/o inhibir el crecimiento y colonización de los microorganismos patógenos, favoreciendo un equilibrio microbiológico).¹

Se han propuesto varios mecanismos de acción para probióticos, incluyendo una variedad de efectos locales, sistémicos o combinados que implican la adherencia, coagregación, competitividad, inhibición, producción de ácidos orgánicos, bacteriocinas y la modulación del sistema inmune.²

Han sido reportados los efectos benéficos que poseen los probióticos no sólo en tracto gastrointestinal sino también en cavidad oral, dado que algunos probióticos poseen la capacidad de integrarse en una biopelícula presente en la superficie del esmalte e interferir con el desarrollo de especies asociadas al desarrollo de patologías como la caries dental.²

Así mismo, se ha demostrado la capacidad de los probióticos para inhibir, tanto *in vitro* como *in vivo*, la formación de biopelículas por *S. mutans* en búsqueda de la



prevención de la proliferación de esta cepa bacteriana. Sin embargo, se trata de investigaciones recientes por lo que todavía continúan realizándose estudios al respecto. Más aún, han sido escasos los estudios relacionados con los *Bacillus coagulans* y su interacción con la especie *S. mutans*.²

Por lo tanto, comprobar si el uso de probióticos puede inhibir el crecimiento de *S. mutans* y su posterior adhesión al esmalte dental, establecerá un precedente que puede ayudar a postular una nueva opción terapéutica que ayude a reducir el desarrollo de caries dental.



II. Marco Teórico

2.1. Microbiota Oral

Los humanos son supraorganismos compuestos de sus propias células y células microbianas. La cantidad de microorganismos que residen en el cuerpo humano es diez veces más que el de las propias células del cuerpo. Estos microorganismos comensales contribuyen a la salud del hospedero resistiendo los patógenos, manteniendo la homeostasis y modulando el sistema inmune.³

El microbioma humano es definido como el genoma colectivo de una población compuesta por bacterias, hongos, virus y protozoos que residen en los diferentes nichos ecológicos del cuerpo humano. El microbioma oral es una de las partes más importantes del microbioma humano, y se refiere específicamente a los microorganismos que residen en la cavidad oral humana (en la **Figura 1**, se muestra una microfotografía electrónica de barrido de una muestra de microbiota bucal). Se ha considerado que la cavidad oral posee el segundo microbioma más complejo en el cuerpo humano, solo detrás del colon.^{3,4}

El microbioma oral es muy diverso, ya que está conformado por bacterias, hongos, virus, arqueas y protozoos. Aproximadamente 700 especies están presentes en la cavidad oral, entre ellos aproximadamente el 54% han sido cultivadas y nombradas, el 14% son cultivadas, pero sin nombre, y 32% son conocidos solo como filotipos incultos. Un número creciente de estudios ha demostrado que la microbiota oral juega un papel vital en la patogenia y desarrollo de muchas enfermedades orales y sistémicas.^{3, 5}

Este complejo sistema puede ser alterado por diversos factores: higiene deficiente, el tipo de alimentación, tabaquismo, estrés y enfermedades sistémicas. Todos estos factores favorecen la colonización por microorganismos patógenos y la formación de biopelículas (estructuras heterogéneas que contienen microcolonias de microorganismos encapsuladas en una matriz de sustancia polimérica extracelular), que son factores etiológicos de las enfermedades orales.^{3, 6}

Las bacterias representan la principal población de microorganismos orales y el conocimiento de su composición proviene, principalmente, de métodos dependientes de cultivo microbiológico. Estas técnicas, llevaron a la identificación de microorganismos específicos que se sabe tienen un papel importante como efecto causal en la caries y la periodontitis.^{3,7}

Sin embargo, estos datos sustancialmente subestimaron la composición del microbioma oral. El desarrollo de métodos independientes de cultivo, particularmente el ARN ribosomal de la porción 16s, ha ampliado nuestra conciencia de la gran riqueza y diversidad del microbioma oral.⁷

El ecosistema oral es muy intrincado debido a que posee múltiples variedades de nichos, entre los cuales se incluye la saliva, las superficies de tejido blando de la mucosa oral, lengua y superficies de los tejidos duros y materiales implantados. Dependiendo del tipo de superficie, son atraídas comunidades microbianas distintas, ya que cada nicho proporciona un ecosistema único con las condiciones óptimas y nutrientes para sus microbios pobladores. Por lo tanto, microbiomas pertenecientes al mismo sitio de diferentes individuos, son más similares que aquellos de diferentes sitios del mismo individuo.⁷

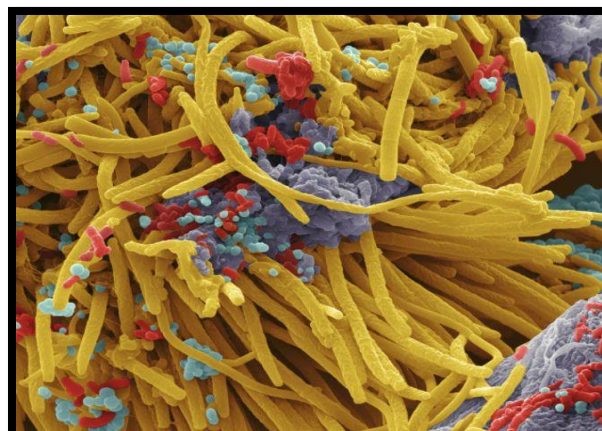


Figura 1. Microfotografía por microscopía electrónica de barrido representativa de una muestra de la microbiota oral. Se puede observar la complejidad de la comunidad microbiana y los diferentes tipos de microorganismos que forman parte del microbioma ⁴

2.2. Biopelículas

Las biopelículas son estructuras heterogéneas que contienen microcolonias de microorganismos encapsuladas en una matriz de sustancia polimérica extracelular o EPS (por sus siglas en inglés Extraellular Polymeric Substance). Las microcolonias de las biopelículas están separadas unas de otras por espacios intersticiales o canales de agua, los cuales son capaces de transportar nutrientes y desechos.⁵

La EPS de las biopelículas contiene entre el 50 al 90% del carbono orgánico total de la estructura y es componente principal de éstas. Esta matriz de polimérica puede variar en sus propiedades químicas y físicas, pero está compuesta principalmente por polisacáridos. Las microcolonias forman la unidad estructural básica de las biopelículas, mientras que la proximidad de las células microbianas dentro de la microcolonia (o entre las microcolonias) provee del medio ambiente ideal para la formación de gradientes de nutrición e intercambio genético. En la **Figura 2**, se esquematiza la estructura de una biopelícula⁶.

Además, los microorganismos en las biopelículas poseen un mecanismo de comunicación llamado Quorum sensing, que involucra la producción y detección de moléculas de señalización involucradas en la regulación de la expresión de genes y que regula a su vez el crecimiento de la población y los procesos de sobrevivencia (adhesión, desprendimiento y protección a cambios químicos y físicos).⁵

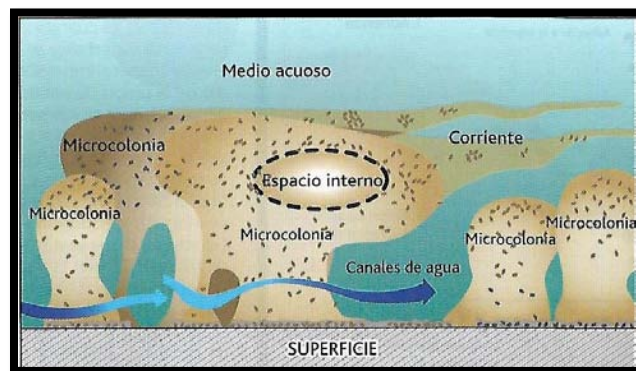


Figura 2. Estructura de la biopelícula⁶



Las biopelículas son un sitio ideal para que ocurra el intercambio de información genética entre las células bacterianas. Uno de los principales mecanismos de intercambio genético es el proceso de conjugación, que es el mecanismo mediante el cual se transfiere información genética por contacto físico.⁶

Estos procesos ocurren con mayor frecuencia entre las células cuando están en estado de biopelícula que cuando están en estado plantónico (vida libre). También se ha sugerido, que las cepas bacterianas de relevancia médica que contienen plásmidos de conjugación (elementos genéticos de una bacteria que se transmiten a otras bacterias y que pueden ser expresados), tienen la capacidad de desarrollar con mayor facilidad la estructura de biopelícula.⁶

Factores de adhesión, agregación y coagregación bacteriana

La colonización secuencial y la formación de biopelículas son procesos altamente organizados. La adhesión a una superficie (natural o artificial) es el primer paso esencial para el desarrollo de una biopelícula. La primera fase es la adhesión de los microorganismos en estado plantónico a la superficie. Esta fase es reversible y está controlada por diversas variables fisicoquímicas que determinan la interacción entre la superficie de las bacterias y la superficie acondicionada.⁸

Todas las zonas de la boca, entre ellas las superficies de los tejidos blandos, los dientes y las de restauraciones fijas y removibles, están cubiertas por una película de glucoproteínas, la cual está constituida por componentes salivales, del líquido gingival, desechos, productos bacterianos y de células de los tejidos del huésped. Los mecanismos que intervienen en la formación de la película del esmalte incluyen fuerzas electrostáticas, de Van der Waals e hidrófobas.⁸

Algunos microorganismos que ingresan de manera constante pueden quedar retenidos en algunas zonas de la cavidad oral como fosas y fisuras, para otros este mecanismo no es suficiente para vencer las fuerzas de eliminación como son el flujo salival, la descamación de las células epiteliales, la masticación, la deglución o la



higiene bucal. Por ello, muchos microorganismos deben desarrollar sistemas para permanecer en los diferentes ecosistemas de la cavidad oral.⁸

Entre los mecanismos que permiten la supervivencia microbiana en la cavidad oral se encuentran la adhesión, la agregación y la coagregación. La adhesión consiste en la unión de los microorganismos a los tejidos del hospedero, la agregación permite la adhesión de los microorganismos a otros de su misma especie, mientras que la coagregación se refiere a la adhesión entre microorganismos de diferente especie.⁹

Todos estos mecanismos permiten la formación de acúmulos microbianos adheridos a la superficie de la cavidad oral. Estos mecanismos son especialmente importantes en un ambiente sometido a mecanismos de limpieza. Estos procesos de adhesión, agregación y coagregación contribuyen a la especificidad y diversidad bacteriana en algunos ecosistemas, así como a la formación de la biopelícula y al desarrollo de algunas de las enfermedades de la cavidad oral como la caries, la gingivitis y la periodontitis.⁹

Los microorganismos se adhieren a las superficies del hospedero por la interacción específica entre dos moléculas, una del microorganismo denominada adhesina y otra del hospedero conocida como receptor. Las adhesinas son moléculas superficiales que permiten su fijación a los receptores de las superficies, como tejidos, superficie dental, materiales artificiales u otros microorganismos.⁹

Dichas adhesinas, pueden ser residuos de hidratos de carbono, proteínas superficiales, glucanos solubles e insolubles del glicocálix, glucosiltransferasas, proteínas que unen o fijan glucanos, proteínas que se fijan a la película adquirida, moléculas proteicas contenidas en las fimbrias y/o ácidos lipoteicoicos.⁹

Con estas adhesinas interactúan algunos compuestos que actúan como receptores, estos pueden ser carbohidratos del glicocálix, glucoproteínas como la fibronectina



de células epiteliales o de proteínas y glucoproteínas salivales absorbidas al esmalte o materiales artificiales formando la película adquirida.⁹

Entre los principales mecanismos de adhesión, agregación y coagregación destacan los siguientes:

Uniones mediadas por glucanos: En estas uniones intervienen glucanos, principalmente insolubles ya que los solubles son fácilmente degradables, proteínas superficiales que fijan glucanos y las enzimas glucosiltransferasas. Las enzimas glucosiltransferasas sintetizan los glucanos, pudiendo quedar unidas a las superficies bacterianas o ser excretadas al medio circundante. Los glucanos liberados al medio pueden fijarse a proteínas superficiales y actuar de punto de unión. Un ejemplo de este tipo de unión es la que lleva a cabo *Streptococcus mutans*.¹⁰

Uniones tipo lectina-carbohidratos: Las lectinas constituyen un grupo de proteínas de origen no inmune que comparten en común la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas. Tienen la propiedad de combinarse con varios tipos de glicoconjugados presentes en las superficies y es necesaria una complementariedad entre las superficies con las que interactúan. En la película adquirida se forman estas uniones entre las fimbrias y proteínas superficiales de algunas bacterias y residuos de galactosa por ejemplo, en el caso de unión a proteínas de *Streptococcus mutans* o residuos de ácido siálico en el caso de *Streptococcus sanguis*. Este tipo de uniones se pueden dar en los fenómenos de coagregación bacteriana.¹⁰

Uniones tipo proteína-proteína: Intervienen principalmente proteínas de la película adquirida ricas en prolina que se unen a proteínas microbianas como las que forman parte de las fimbrias. Además de participar en la adhesión estas uniones son importantes en los fenómenos de coagregación. En los coagregados participan



especies distintas dando lugar a masas microbianas heterogéneas. Uniones por ácidos lipoteicoicos (ALT). Estos ácidos son polímeros aniónicos de la pared celular de bacterias Grampositivas. La carga negativa de los extremos hidrófilos de estos compuestos permite al microorganismo adherirse a los iones calcio y fosfato o a los grupos sulfato de las glucoproteínas de la película adquirida.¹⁰

Adhesión a superficies epiteliales: La fibronectina es una glucoproteína de la saliva que recubre las células epiteliales y que actúa como receptor de adhesinas bacterianas. Las bacterias habituales de la cavidad oral se adhieren a esta glucoproteína que bloquea receptores de adhesinas de otro tipo de microorganismos que no se localizan habitualmente en la boca, con lo que tiene un papel protector frente a microorganismos más patógenos que los comunes.¹⁰

Unión física por retención: Muchos microorganismos quedan retenidos en la cavidad oral en fosas, en fisuras, en áreas interproximales de los dientes, alrededor de prótesis, en el surco gingival, en bolsas periodontales o en lesiones producidas por la caries. Otros pueden quedar retenidos entre otros microorganismos que forman parte de biopelículas sin poseer mecanismos de adhesión o coagregación.¹⁰

La estructura de una biopelícula y sus mecanismos de formación se ejemplifican en la **Figura 3**.

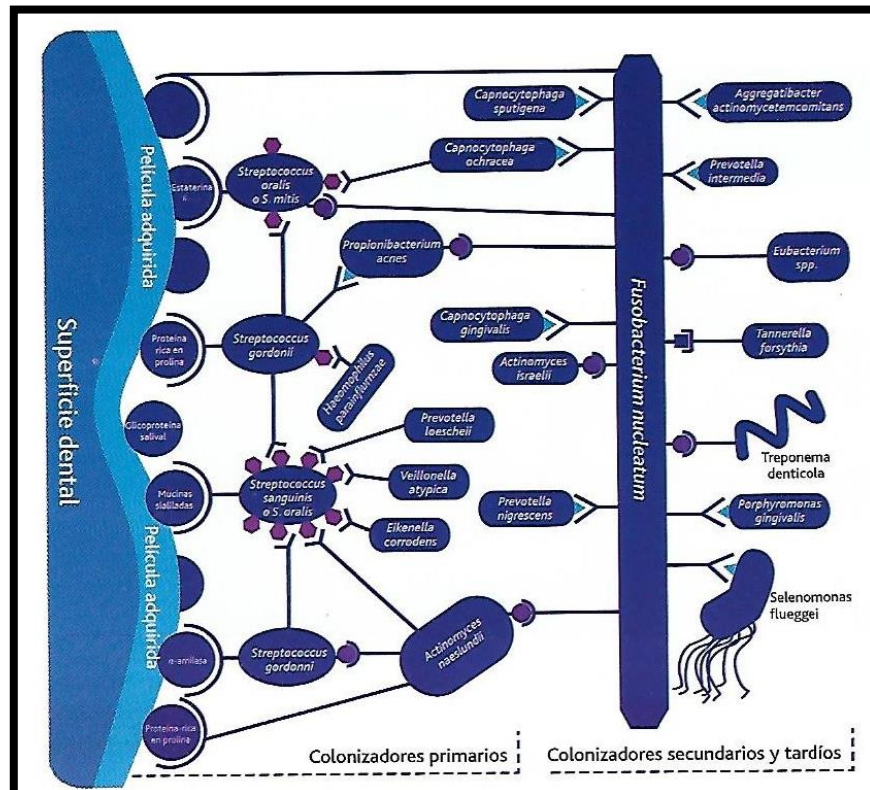


Figura 3. Diagrama representativo de la formación de la biopelícula dental, se muestran las adhesinas asociadas al esmalte y receptores en microorganismos. ⁶

2.3. Esmalte Dental

El esmalte dental es el tejido mineralizado más duro encontrado en los mamíferos. Tiene una alta organización y densidad mineral, y a su vez presenta un alto módulo elástico y otras propiedades mecánicas que le permiten prevenir ciertas fracturas. La clave para alcanzar tan precisa organización en su arquitectura, se da gracias a su alto control de las proteínas e interacciones en la formación del mineral.⁶

En la formación del esmalte dental, los ameloblastos depositan la matriz del esmalte sobre la pre-dentina formada, este proceso dinámico ocurre en el espacio extracelular entre el ameloblasto pre-secretor y la dentina mineralizada. Este tejido crece continuamente con la secreción de matriz extracelular del esmalte, hasta que el ameloblasto ha secretado todo el espesor de la matriz. En esta fase, los ameloblastos producen y secretan la mayor cantidad de proteínas, que



determinarán el grosor final del esmalte, aunque la matriz orgánica no se encuentra mineralizada en su totalidad.⁶

Una vez terminada esta fase, las células incrementan las síntesis de proteínas; mismas que participan en la degradación y resolución de la lámina basal que las separa de la dentina. En esta fase de maduración, se produce la degradación casi completa de proteínas y un rápido crecimiento cristalino, gracias a que los ameloblastos regulan el transporte de iones (calcio, fosfato, carbonato) y el pH, hasta alcanzar la mineralización completa del tejido.⁶

El esmalte dental se compone 96% de material inorgánico, 4% de material orgánico y 1% de agua. La parte inorgánica de un diente humano, se conforma principalmente por la hidroxiapatita (HAp) la cual es un biocristal, formado por átomos de calcio, fósforo, e hidrógeno, cuya fórmula es: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. La HAp está presente en los tejidos mineralizados como esmalte, dentina, cemento radicular y hueso, confiriéndoles su dureza característica. Pertenece a la familia de las apatitas, presenta una estructura hexagonal, con el grupo espacial P63 /m.¹¹

En la **Figura 4**, se presenta una microfotografía de microscopía electrónica de transmisión, donde puede observarse la orientación de cristales de hidroxiapatita en el esmalte dental.¹¹

En el tejido óseo está siempre acompañada de estructuras orgánicas como la colágena. Otras apatitas de importancia biológica son la fluorapatita y la cloroapatita. Los principales componentes químicos de la hidroxiapatita son el calcio y el fosfato. Sin embargo, la HAp natural contiene porcentajes mínimos de sodio, cloro, carbonatos y magnesio, los cuales juegan un papel preponderante en la función remodeladora del hueso.¹¹

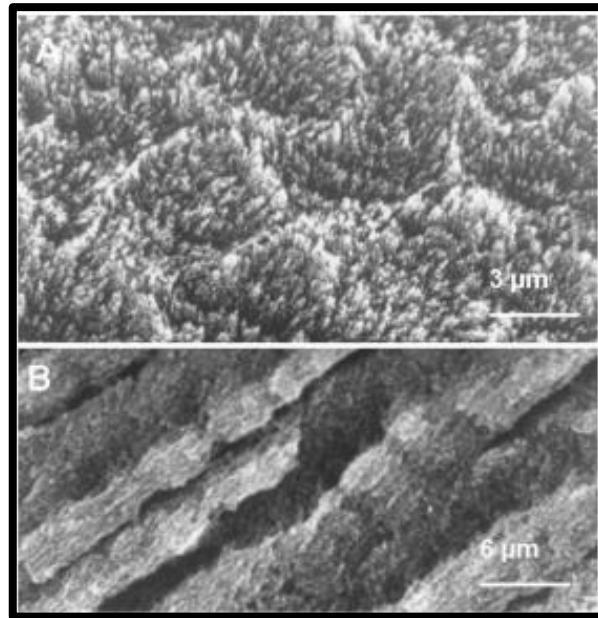


Figura 4. Microfotografía MEB de los prismas del esmalte dental humano. (A) Sección transversal. (B) Sección longitudinal.¹¹

2.4. Caries dental

La caries dental es un proceso o enfermedad dinámica crónica, que ocurre en la estructura dentaria en contacto con los depósitos microbianos, debido al desequilibrio entre las cantidades de microorganismos cariogénicos y no cariogénicos, así como la interacción entre agentes protectores y patológicos en saliva y biopelícula, dando como resultado una pérdida de mineral de la superficie dental, cuyo signo es la destrucción localizada de tejidos duros. Se clasifica como una enfermedad transmisible e irreversible.¹²

La caries dental es el resultado de la interacción compleja entre microorganismos productores de ácido y carbohidratos fermentables, con frecuencia la ingesta de altos niveles de carbohidratos conduce a una mayor producción de ácido, disminución de la amortiguación salival capacidad y un entorno de bajo pH. Aunque la ingesta de carbohidratos fermentables y los microorganismos productores de ácidos es uno de los factores etiológicos principales de la caries, no es el único, ya

que se considera que la caries es una enfermedad multifactorial. En la **Figura 5**, se muestran los diversos factores asociados al desarrollo y progresión de la caries dental.¹²

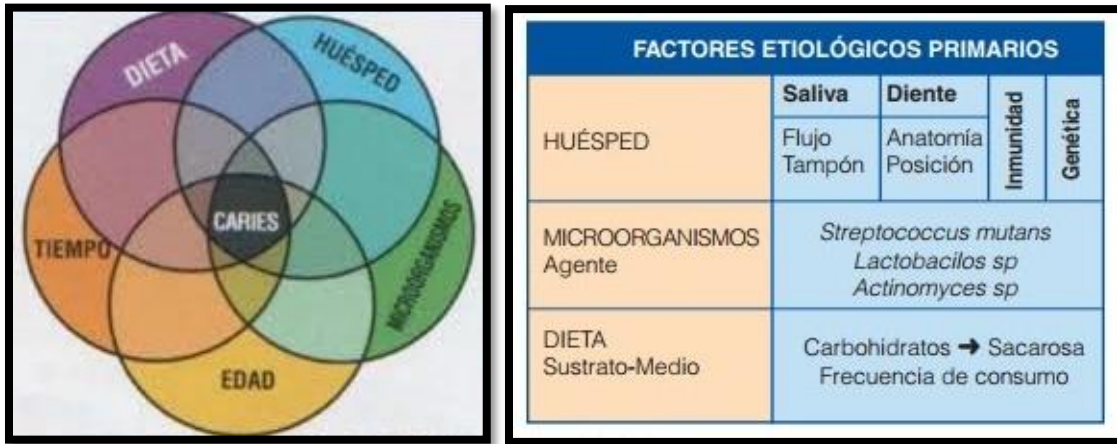


Figura 5. Etiología multifactorial de la caries dental.¹²

La acidificación ambiental es la principal causa de los cambios fenotípicos y genotípicos en la microflora durante la progresión de la caries. *El Streptococcus mutans* ha sido estudiado profundamente y considerado como uno de los patógenos específicos y de mayor importancia para el desarrollo de la caries dental.¹²



2.5. *Streptococcus mutans*

Pertenece a un grupo fenotípico llamado *Streptococcus mutans* que incluyen *S. sobrinus*, *S. ferus*, *S. cricetus*, *S. rattus* y el serotipo "h". Filogenéticamente distinto de otras especies de *Streptococcus*. Se trata de cocos Grampositivos, anaeróbicos facultativos de 0,5 a 0,75 μm de diámetro que se presentan en pares o cadenas cortas.⁵

Las cepas de *S. mutans* pueden distinguirse serológicamente. El peptidoglicano contiene ácido glutámico, alanina, lisina, glucosamina y ácido muranémico. Las colonias son blanquecinas de 0.5 a 1 mm y se adhieren firmemente al agar.⁵

Comúnmente detectado en dientes humanos en la biopelícula supragingival, y generalmente asociado como la principal causa de caries, también se asocia con lesiones endodónticas, infecciones odontogénicas, endocarditis infecciosa y enfermedad cardiovascular. También es cariogénico en animales de experimentación (ratas, hámsters, jerbos, ratones y monos).⁵

Su capacidad para controlar procesos específicos, tales como, adhesión a una superficie sólida, expresión de factores de virulencia y patogenicidad, producción de metabolitos secundarios y mecanismos de resistencia al estrés, es fundamental en la vida bacteriana de *S. mutans*. La superficie dental es un hábitat natural indispensable para *S. mutans* y el tropismo (afinidad que tienen las bacterias por un tejido específico del hospedero), por la biopelícula dental se refleja por su adaptación para sintetizar glucanos, fijar compuestos y adaptar su aciduricidad.¹⁴

La competitividad por este nicho ecológico está en relación con un sistema de regulación de un proceso denominado Respuesta de Tolerancia al Ácido (RTA) dependiente de la densidad celular.¹³

Este proceso de RTA forma parte de los sistemas de señalización de Quorum sensing desarrollado por algunas bacterias al formar la biopelícula y el



Streptococcus mutans ha evolucionado para que su desarrollo, sobrevivencia y persistencia en la cavidad oral dependa de su crecimiento en la biopelícula y de la densidad celular que alcance en ella.¹³

Streptococcus mutans produce ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético y ácido fórmico cuando metaboliza carbohidratos fermentables como la sacarosa, glucosa y fructosa. Estos ácidos circulan a través de la biopelícula hacia el esmalte poroso, disociándose y liberando hidrogeniones, los cuales disuelven rápidamente el mineral del esmalte, generando calcio y fosfato, que a su vez, difunden fuera del esmalte. Este proceso se conoce como desmineralización.¹³

Los factores de virulencia de *Streptococcus mutans* más involucrados en la producción de caries son:

1. Acidogenicidad: El *Streptococcus mutans* puede fermentar los azúcares de la dieta para originar principalmente ácido láctico como producto final del metabolismo. Esto hace que disminuya el pH y se desmineralice el esmalte dental.¹⁴
2. Aciduricidad: Es la capacidad de producir ácido en un medio con pH bajo.¹⁴
3. Acidofilicidad: El *Streptococcus mutans* puede resistir la acidez del medio bombeando protones (H⁺) fuera de la célula.¹⁴
4. Síntesis de glucanos y fructanos: Por medio de enzimas como glucosil y fructosiltransferasas (GTF y FTF), se producen los polímeros glucano y fructano a partir de la sacarosa. Los glucanos insolubles pueden ayudar a la bacteria a adherirse al diente y ser usados como reserva de nutrientes.¹⁴

Las glucosiltransferasas catalizan la hidrólisis de dos moléculas de sacarosa en sus monosacáridos constituyentes: la alfa-D-glucosa y la beta-D-fructuosa. Las moléculas de glucosa resultantes son polimerizadas por enlaces alfa (1-6), alfa (1-4) o alfa (1-3) que forman los glucanos extracelulares bacterianos y se liberan dos moléculas de fructuosa.¹⁴

De acuerdo con las características de solubilidad de su producto, las glucosiltransferasas se clasifican en:

GTF-S, las que sintetizan el dextrano, un glucano que posee predominantemente uniones lineales alfa (1-6), es soluble en agua y de aspecto globular, GTF-I, sintetiza un glucano insoluble y fibrilar con predominio de uniones alfa (1-3) y la GTF-SI, sintetiza ambos tipos de glucanos.¹⁴

El *Streptococcus mutans* secreta los tres tipos de glucosiltransferasas. Al producto de la GTF-I y la GTF-SI, con predominio alfa (1-3), se le denomina mutano. Su insolubilidad en agua, viscosidad y aspecto fibrilar, lo involucra en los fenómenos de adherencia, agregación y acumulación bacteriana en la biopelícula, de esta manera la capacidad de producir mutano, está involucrada en el poder cariogénico del *Streptococcus mutans*.¹⁴ (Figura 6)⁶

5. Producción de dextranasa: Las bacterias tienen la posibilidad de sintetizar y liberar enzimas glucanohidrolasas, como la dextranasa y la mutanasa, estas se disponen en la superficie de las células bacterianas en contacto con el glucano, lo hidrolizan y facilitan así el paso de los productos de la hidrólisis hacia el interior de esta.¹⁴

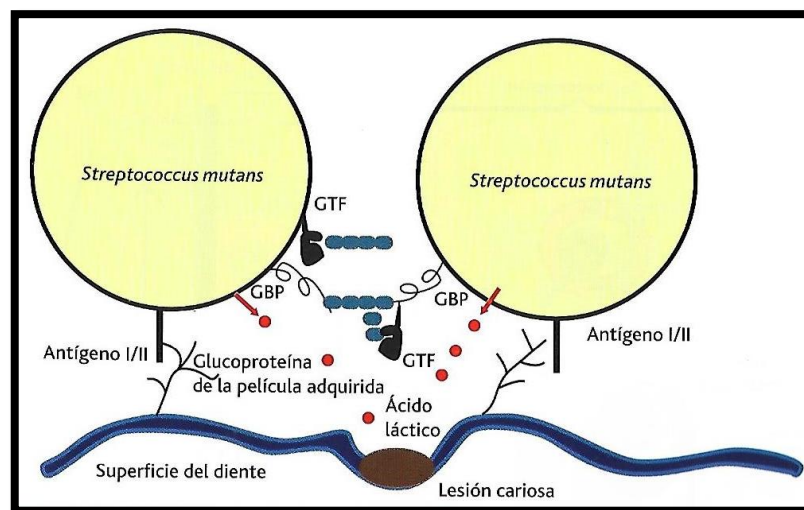


Figura 6. Patología molecular de la caries dental relacionada con *Streptococcus mutans*.⁶



2.6. Probióticos

Originalmente fueron definidos como microorganismos que promueven el crecimiento de otros microorganismos. La definición de los probióticos se ha cambiado y ampliado en diversas ocasiones y hoy son definidos como: microorganismos viables que al ser consumidos por humanos o animales provocan un efecto benéfico al huésped mejorando las propiedades de la microflora nativa.^{3,6}

El concepto de los probióticos apareció hace más de 100 años, cuando Döderlain y posteriormente Elie Metchnikoff (conocido como el padre de la inmunidad natural), reportó que el consumo de yogurt búlgaro que contiene bacterias vivas como *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, es decir bacterias productoras de ácido láctico a partir de azúcares, poseían algunos efectos benéficos para la salud.^{3,6}

Los probióticos han sido utilizados como una nueva estrategia en la promoción de la salud y han sido estudiados extensamente. Se presume que el mecanismo de acción de los probióticos en la boca es similar a lo observado en otras partes del cuerpo, ya que existe evidencia de que cepas de *Lactobacillus* orales aisladas de sujetos con salud y enfermedad periodontal, ejercen actividad antimicrobiana contra bacterias periodontopatógenas como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *Prevotella intermedia*.^{3,6}

Sin embargo, se sabe poco sobre los efectos de estas cepas en infecciones orales comunes como la caries dental. Estudios previos sugirieron que el consumo de productos dietéticos que contienen *Lactobacillus* inhibe el crecimiento y la formación de biopelícula de agentes patógenos, reduciendo la cantidad de células de *Streptococcus mutans* en la saliva. Así mismo pueden liberar sustancias bioactivas (ácidos orgánicos y bacteriocinas), incluyendo una variedad de efectos locales, sistémicos o combinados que implican la adherencia, coagregación y competitividad.¹⁵



Mecanismo de acción

Se piensa que los microorganismos probióticos actúan principalmente a través de las siguientes vías: competencia contra potenciales patógenos para conseguir nutrientes o sitios de adhesión, inhibiendo el crecimiento de patógenos a través de la producción de bacteriocinas u otros productos, mejora de la integridad de la barrera intestinal mediante la regulación positiva de producción de mucina, modulación de la proliferación celular, apoptosis, estimulación y modulación del sistema inmune de la mucosa.¹⁵

Sin embargo, existen características específicas con las que debe contar los probióticos que serán empleados en la cavidad oral. (**Tabla 1**)¹⁷ Estos deben poder adherirse y colonizar el tejido oral, incluidas las superficies duras que no se desprenden y se convierten en parte de la biopelícula, además no debe fermentar azúcares; de lo contrario, ello disminuirá el pH y hará más propenso el desarrollo de caries.¹⁵

Los métodos probióticos han sido estudiados para tratar la caries principalmente por interferencia con la colonización oral de patógenos cariogénicos. Näse y colaboradores demostraron la capacidad de inhibición de *L. rhamnosus* GG de la caries *in vivo* y encontraron una disminución de la caries dental y de la unidades formadoras de colonias de *S. mutans* en el grupo experimental.¹⁶

Además de *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus reuteri*, *B. animalis*, *L. paracasei* y *Lactobacillus casei* han sido verificados para disminuir el número de bacterias cariogénicas y así prevenir la caries dental. Sólo en las últimas dos décadas los probióticos han comenzado a recibir mayor atención de los investigadores. Se han llevado a cabo varios estudios sobre los efectos que tienen los probióticos sobre los microorganismos utilizando diferentes cepas, con el objetivo de prevenir o tratar enfermedades de la cavidad oral. De acuerdo con las



definiciones anteriores, una amplia gama de bacterias ha sido propuesta como probiótico.¹⁷

Sin embargo, sólo los clasificados como bacterias del ácido láctico han recibido importantes consideraciones con respecto a los alimentos y nutrición, a pesar de que existe evidencia clara de actividad probiótica solo para algunos de ellos. Su papel potencial en la modificación bioecológica de condiciones patológicas y / o anormales está bajo evaluación.¹⁷

Actualmente, los probióticos están disponibles en forma única o en cepas microbianas (por ejemplo, *Bacillus clausii*, *Lactobacillus*) o como una mezcla de múltiples cepas de *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. reuteri*, *L. GG* y *L. plantarum*), *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*), *Streptococcus* (*S. thermophilus*, *S. lactis*, *S. fecalis*), *Saccharomyces boulardii*, *L. sporogenes* /*B. coagulans*.¹⁷

Criterios de selección para microorganismos probióticos de acuerdo con FAO/WHO 2002
Resistencia al ácido gástrico.
Resistencia a ácidos biliares.
Adherencia a la mucosa y/o células epiteliales humanas.
Actividad hidrolasa de sales biliares.
Actividad antimicrobiana contra bacterias potencialmente patógenas.
Capacidad para reducir la adhesión de patógenos a las superficies.
Determinación de patrones de resistencia a antibióticos.
Evaluación de efectos secundarios durante estudios en humanos.
Ausencia de producción de toxinas.
Ausencia de actividad hemolítica.

Tabla 1. Criterios de selección para probióticos.¹⁷



2.7. *Lactobacillus sporogenes* / *Bacillus coagulans*

Los *Bacillus coagulans* son bacterias grampositivas, anaerobias facultativas, no patógenas, que forman esporas y producen ácido láctico. Son resistentes al calor; la temperatura óptima de crecimiento para *B. coagulans* es de 35 a 50°C y el pH de crecimiento óptimo es de 5,5 a 6,5. Tiene las características de los microorganismos utilizados como probióticos (**Tabla 1**)¹⁷, algunas cepas de *B. coagulans* han sido reportadas como bacterias termófilas, capaces de crecer hasta 60 – 65 ° C.¹⁸

La especie *L. sporogenes* fue originalmente aislada y descrito en 1933 por Horowitz-Wlassowa y Nowotelnow y posteriormente reclasificado como *Bacillus esporogenes*. Más recientemente, se ha demostrado que *B. esporogenes* comparten las mismas características que *B. coagulans*, y por eso se ha trasladado al grupo de los *B. coagulans*.(**Tabla 2**)¹⁷

Según la 8ª edición del Manual de Bergey de Bacteriología Determinativa, menciona que los portadores de esporas productoras de ácido láctico, facultativo o aeróbico y catalasa positiva se clasifican dentro del género Bacilo. Varios estudios sobre *B. coagulans* han informaron diferentes morfologías celulares, superficies de esporas y esporangios, lo que lleva a la creación de muchos sinónimos.¹⁷

Las esporas son bien conocidas por ser más resistentes que las células vegetativas, son resistentes condiciones ambientales adversas, esta característica permite a las esporas sobrevivir a la fabricación industrial y asegura una viabilidad a largo plazo, mientras que los lactobacilos que no cuenta con esa capacidad tienden a ser más lábiles. Datos disponibles sobre *B. coagulans* se refieren principalmente a la cepa CnCM i-1061, la cual que ha sido demostrado que permanece sin cambios en su contenido de esporas incluso después de 5 años de almacenamiento.¹⁷



La localización de endoesporas es terminal en *Bacillus coagulans* a diferencia de *Bacillus subtilis* y otros miembros de *Bacillus* donde es sub-terminal o central. Las cepas de *Bacillus coagulans* producen coagulin y lactosporin con actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos.¹⁹

Propiedad	<i>B. coagulans</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
Catalasa	+	+	-
Oxidasa	-	+	-
Reducción de nitrato	-	+	-
Esporas	+	+	-
Motilidad	+	+	-/+
Producción de ácido láctico	+	-	+
Ácido diaminopimélico	+	+	-/+

Tabla 2. Principales características de *B. coagulans* con respecto a los géneros *Bacillus* y *Lactobacillus*.¹⁷

Moléculas antimicrobianas en los probióticos:

Las bacteriocinas son polipéptidos antimicrobianos sintetizados por ribosomas que proporcionan al organismo una ventaja selectiva sobre otras cepas bacteriocinas son estables, tienen la toxicidad baja, tienen amplio espectro de acción y son susceptibles a la bioingeniería. Bacteriocinas en bacterias Grampositivas son generalmente péptidos catiónicos con menos de 60 residuos de aminoácidos, se ha documentado que *Bacillus coagulans* es productor de bacteriocinas como el coagulin y lactosporin.¹⁹



Coagulin:

Se trata de una sustancia antibacteriana sensible a la proteasa, producida por el *Bacillus coagulans*, que ha sido aislada de las heces de los bovinos, se clasifica como una sustancia inhibidora de bacteriocina. Coagulin es estable incluso en 60 °C, a un pH que varía de 4 a 8 y parece no ser afectado por la α -amilasa, lipasa o disolventes orgánicos (10% v/v). Coagulin exhibe ser un bactericida y contar con un mecanismo bacteriolítico de acción contra las células indicadoras.¹⁹

Se encuentra en el líquido sobrenadante de los cultivos de cepas de *B. coagulans*, aislada de las heces animales y presenta las características clásicas de la mayoría de las bacteriocinas, pero también afecta a varios microorganismos patógenos.¹⁹

Lactosporin:

Lactosporin es una proteína antimicrobiana nueva, aislada de un suplemento dietético probiótico llamado Lactospore ® la pérdida de actividad después de la exposición a un número de enzimas proteolíticas y de la lipasa sugieren que el lactosporin puede poseer una molécula de lípido que contribuye a su actividad inhibitoria.²⁰ La cepa productora de lactosporina fue aislada por primera vez en 1933 y descrita como *Lactobacillus sporogenes*. Posteriormente se clasificó como *B. coagulans* ya que esta cepa posee características clave idénticas a las esporas anteriormente mencionadas, el espectro de la actividad antimicrobiana de Lactosporin es efectivo contra los microorganismos Grampositivos, pero no contra bacterias Gramnegativas.²⁰



III. Planteamiento del problema

El *Streptococcus mutans* es un microorganismo patógeno que promueve la desmineralización del esmalte dental, proceso que desencadena en caries dental, la cual es una de las enfermedades orales más contagiosas y predominantes en el ser humano. Por lo tanto, se requiere profundizar en mecanismos que ayuden a prevenir y controlar la adhesión de *S. mutans* a la superficie del esmalte dental y así disminuir la incidencia de esta patología.

IV. Justificación

El uso de probióticos ha demostrado controlar la adhesión y proliferación de microorganismos patógenos y pueden ser coadyuvantes en la prevención de la caries dental. Su utilización puede mejorar de forma importante la salud oral, regulando la cantidad de patógenos y su adhesión a las superficies dentales. Al realizar pruebas de inhibición de adhesión de *S. mutans* con probióticos directamente sobre esmalte dental podremos comprobar la efectividad que poseen estos microorganismos para controlar uno de los factores asociados al desarrollo de la caries dental.



V. Objetivos

General

Determinar si el uso de probióticos inhibe la adhesión del *S. mutans* al esmalte dental.

Específicos

- Determinar la viabilidad de los *Bacilos coagulans* a partir del comprimido de bacilos lácticos de Sinuberase® y realizar su cinética de crecimiento.
- Determinar si la incubación de muestras de esmalte con los probióticos (*Bacilos coagulans*) inhibe el crecimiento de colonias de *S. mutans* en diferentes tiempos (15, 30 y 60 min).
- Determinar si el medio de cultivo (agar sangre o agar de soya tripticasa, TSA) influye en el comportamiento de los microorganismos.

VI. Hipótesis

Los *Bacillus coagulans* inhibirán el crecimiento de colonias de *Streptococcus mutans* sobre el esmalte dental *in vitro*.



VII. Metodología

Muestras de Esmalte:

A partir de dientes bovinos sanos, se obtuvieron muestras de esmalte de 1x1x0.5 mm para realizar los estudios de adhesión e inhibición de microorganismos. La limpieza de las muestras se realizó con ciclos de vibración ultrasónica: las muestras fueron sumergidas en 20 ml de agua bidestilada y se les realizaron 3 ciclos de 1 min con vibrador ultrasónico (SONIC RUPTOR 250, OMNI INTERNATIONAL), utilizando una potencia de salida del 50% y una intermitencia del 70%). Posterior a ello se colocaron dentro de un vaso de precipitado con agua bidestilada y se esterilizaron por autoclave.

Preparación de medio de cultivo para *Bacillus coagulans*:

En un matraz de Erlenmeyer de 500 ml se prepararon 100 ml de medio de cultivo Luria Bertani (pectona 10g, extracto de levadura 10g y cloruro de sodio 5g para un litro de agua), esterilizado por autoclave.

Se colocó un comprimido de bacilos lácticos (*Lactobacillus sporogenes*) 1×10^6 UFC (Sinuberase®) 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.

Para verificar la viabilidad de los *Bacillus* en el medio, realizamos una primera cinética de crecimiento. Mediante el uso de un espectrofotómetro (DU® 640 BECKMAN), se tomó la primera lectura de la muestra, para ello se utilizó luz visible a 600 nanómetros. Se tomaron lecturas del cultivo a las 0,2,4,6,8,10 y 24 hrs para realizar la cinética de crecimiento. El crecimiento de los *Bacillus* también fue observado mediante microscopía de luz directamente de la disolución de la tableta (tiempo 0) y a las 24 hrs de cultivo (**Figura 7**). Los *Bacillus* que se crecieron en el



medio LB criopreservados para poder ser usados en los experimentos de adhesión / inhibición.

Para realizar la incubación de las muestras de esmalte con los probióticos, se realizó un cultivo en medio LB usando como inóculo inicial los lactobacilos del criopreservados (se tomaron 160 μ L que fueron agregados a 100 ml de medio LB estéril) y mediante el uso del espectrofotómetro con luz visible a 600 nanómetros, se tomaron lecturas hasta que el cultivo alcanzo una densidad óptica (O.D.) de 0.6.

Preparación de medios de cultivo para *Streptococcus mutans*:

Agar de soya tripticasa (TSA): En un matraz Erlenmeyer de 500 ml se prepararon 200 ml de medio del cultivo TSA (Tryptona (digerido pancreático de caseína) 15,0 g, Soytone (digerido papaico de harina de soya) 5,0, Cloruro de sodio 5,0. Por litro de agua destilada).

Agar sangre: En un matraz Erlenmeyer de 500 ml se prepararon 200 ml de medio del cultivo Agar Sangre (Digerido pancreático de caseína 12,0 g. Digerido péptico de tejido animal 5,0. Extracto de levadura 3,0. Extracto de carne bovina 3,0. Almidón de maíz 1,0. Cloruro sódico 5,0 Agar 13,5. Sangre de carnero desfibrinada 5% fórmula por litro de agua bidestilada).

Ambos medios se esterilizaron por autoclave y se colocaron en cajas de Petri de plástico de 10 cm de diámetro.



Cultivo de *Streptococcus mutans*

En este trabajo se utilizó *Streptococcus mutans* de la cepa ATCC® 25175™ (*Streptococcus mutans* Clarke). **(Figura 8)**

Para asegurar de la pureza de la cepa, sembramos con técnica de estría triple, con la finalidad de obtener colonias aisladas, y se dejó en incubación durante 24 hr. En condiciones de anaerobiosis.

Las características morfológicas de la cepa de *S. mutans* usadas en este trabajo fueron observadas mediante microscopia de luz con un estéreomicroscopio (Stereomaster) A partir, de una colonia aislada como muestra. Mediante la inspección con un microscopio óptico, observamos que fenotípicamente coincidió con la morfología que corresponde al microorganismo.

Para su cuantificación se agregaron colonias del cultivo de *S. mutans* y mezcló con 1 ml de DMSO (dimetilsulfóxido, sustancia orgánica utilizada como criopreservante) el cual se colocó en una celda plástica para espectrofotómetro con luz visible a 600 nanómetros y se hizo lectura de la muestra, se agregaron colonias suficientes hasta llegar a una densidad óptica de 1.0 la cual equivale a 1×10^8 UFC.

Finalmente se guardó 1 ml de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175® en un criotubo y se llevó a ultracongelación a -80 °C.



Ensayos de inhibición:

Para la realización del experimento se dividieron las muestras de esmalte en tres grupos, cada uno constó de 24 muestras de esmalte, distribuidos en 3 tubos Eppendorf, 2 de ellos experimentales con 9 muestras y uno control con 6 muestras. (Tabla 3).

Una vez alcanzada esta la media logarítmica de crecimiento de 0.6. Se les agregó con una micropipeta, 1 ml del medio con lactobacilos a todos los tubos experimentales y se mantuvieron a 37° de temperatura, en condiciones de aerobiosis con una agitación de 200 rpm.

Una vez concluidos los tiempos para cada grupo: grupo1 (15min), grupo 2 (30 min) grupo 3 (60 min), con ayuda de una micropipeta se les retiró el medio con *Bacilos* y posteriormente se les realizó un lavado con PBS (por sus siglas en inglés, Phosphate Buffered Saline, la cual constituye una solución amortiguadora de pH comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos).

Grupos	Tiempo	A. SANGRE	TSA	Control
1	15 min	9 esmaltes (+ probiótico)	9 esmaltes (+ probiótico)	6 esmaltes (+ H ₂ O)
2	30 min	9 esmaltes (+ probiótico)	9 esmaltes (+ probiótico)	6 esmaltes (+H ₂ O)
3	60 min	9 esmaltes (+ probiótico)	9 esmaltes (+ probiótico)	6 esmaltes (+H ₂ O)

Tabla 3. Grupos de experimentación y distribución de muestras de esmalte dental.



Se utilizaron 6 placas de Petri, 3 con medio de cultivo Agar sangre y 3 con TSA, cada una de ellas fue sembrada con 50 μ L de la cepa de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 con técnica de estría múltiple, con el fin de tapizar por completo la superficie del agar.

Posteriormente se le colocaron las muestras de esmalte pertenecientes a cada grupo. Para ello fueron utilizadas 2 cajas por grupo. 1 de agar sangre y 1 de TSA. Es decir 2 cajas para el grupo 1 (15 min), 2 para el grupo 2 (30 min) y 2 para el grupo 3 (30 min). A Todas las cajas se les colocaron 12 muestras de esmalte: 9 experimentales distribuidos en la parte superior y media en las cajas, y 3 controles (distribuidos en la parte inferior de las cajas). (**Figura 9**).

Una vez que se pusieron en contacto las muestras sobre el agar, las placas se dejaron incubar en condiciones de anaerobiosis a 37 C° de temperatura durante 24h.

Posteriormente se tomaron fotografías de las placas con un equipo contador automatizado de colonias (aCOLyte 3 HD – Synbiosis). Así mismo se tomaron microfotografías mediante microscopio estereoscópico (Stemi SV 11, Carls Zeiss).



VIII. Resultados

A continuación, se muestra la cinética de crecimiento de *Bacillus coagulans* a partir de un comprimido de Sinuberase® cultivado en medio LB, cuyas mediciones fueron verificadas con espectrofotómetro.

Cinética de crecimiento:

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 4. Cinética de crecimiento *Bacillus coagulans*.

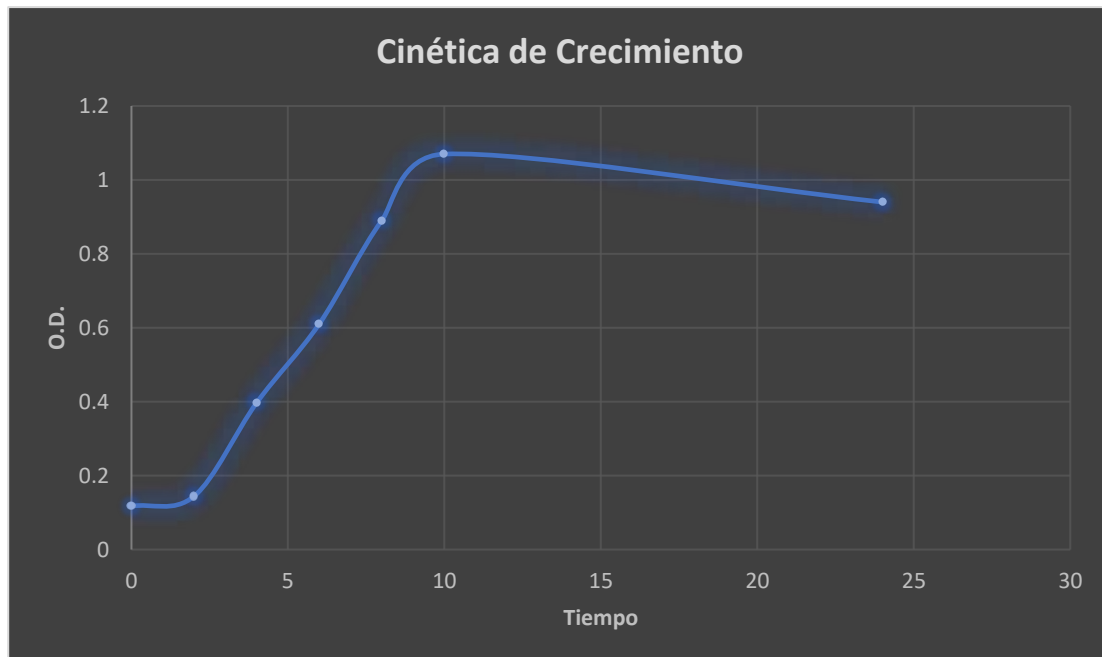


Gráfico 1. Elaborada a partir de los datos obtenidos en las lecturas de densidad óptica y la relación entre el tiempo(hr) y el crecimiento obtenido.

Bacillus Coagulans:

Con la finalidad de observar la viabilidad, características fenotípicas y cantidad de *Bacillus* presentes, se obtuvieron microfotografías del cultivo con medio LB, las cuales fueron tomadas en el tiempo 0 y a las 24h con el empleo de un microscopio óptico y de fluorescencia (Axioscop 2, Carls Zeiss).

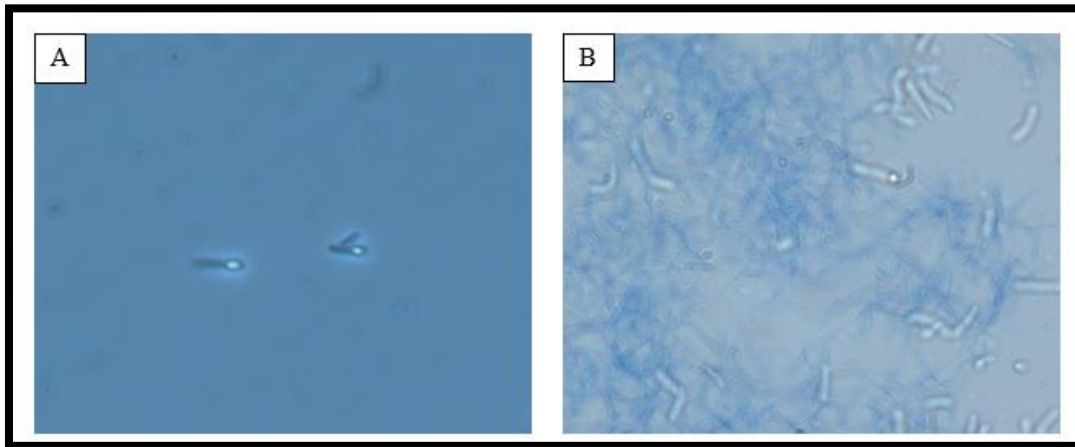


Figura 7. *Bacilos coagulans* (A) Esporas tiempo 0, (B). *Bacilos coagulans* después de 24 hr de crecimiento. Microfotografía tomada con microscopio óptico 100x (fuente directa).

Streptococcus mutans:

Con la finalidad de observar las características fenotípicas y asegurarnos de la pureza de la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 25175, se realizó su cultivo y asilamiento mediante la técnica de estría triple y el empleo de un microscopio estereoscópico.

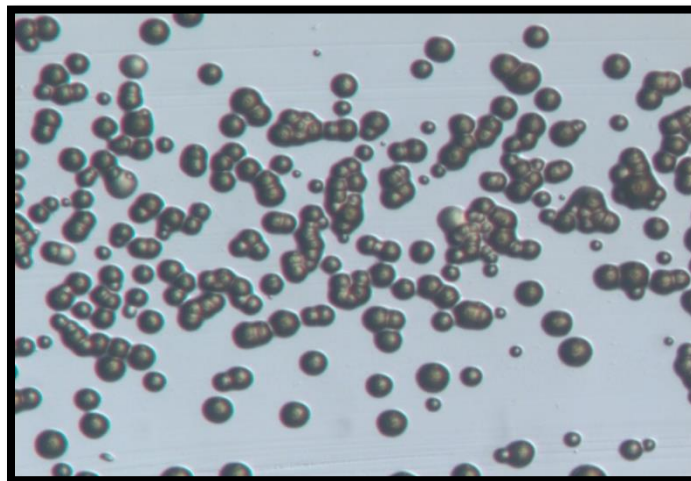


Figura 8. Colonias de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, microfotografía de tomada con Estereomicroscopio. (fuente directa).

Ensayos de inhibición

Todos los grupos experimentales que fueron inoculados con *Bacillus coagulans* durante 15, 30 y 60 min generaron zonas muy parecidas a halos de inhibición, excepto las muestras control que fueron inoculadas con agua bidestilada, y fueron visibles tanto en los cultivos con *Streptococcus mutans* sembrados en TSA como en los de agar sangre.

No se observaron diferencias significativas entre los diferentes tiempos de los 3 grupos en las muestras experimentales. Por lo que pudimos comprobar que a partir de 15 min ya existe una adhesión suficiente de los *Bacillus coagulans* a la superficie del esmalte, como para impedir la adhesión de los *Streptococcus mutans* no sólo a las muestras de esmalte sino también alrededor de ellas. (Figuras 10-15)

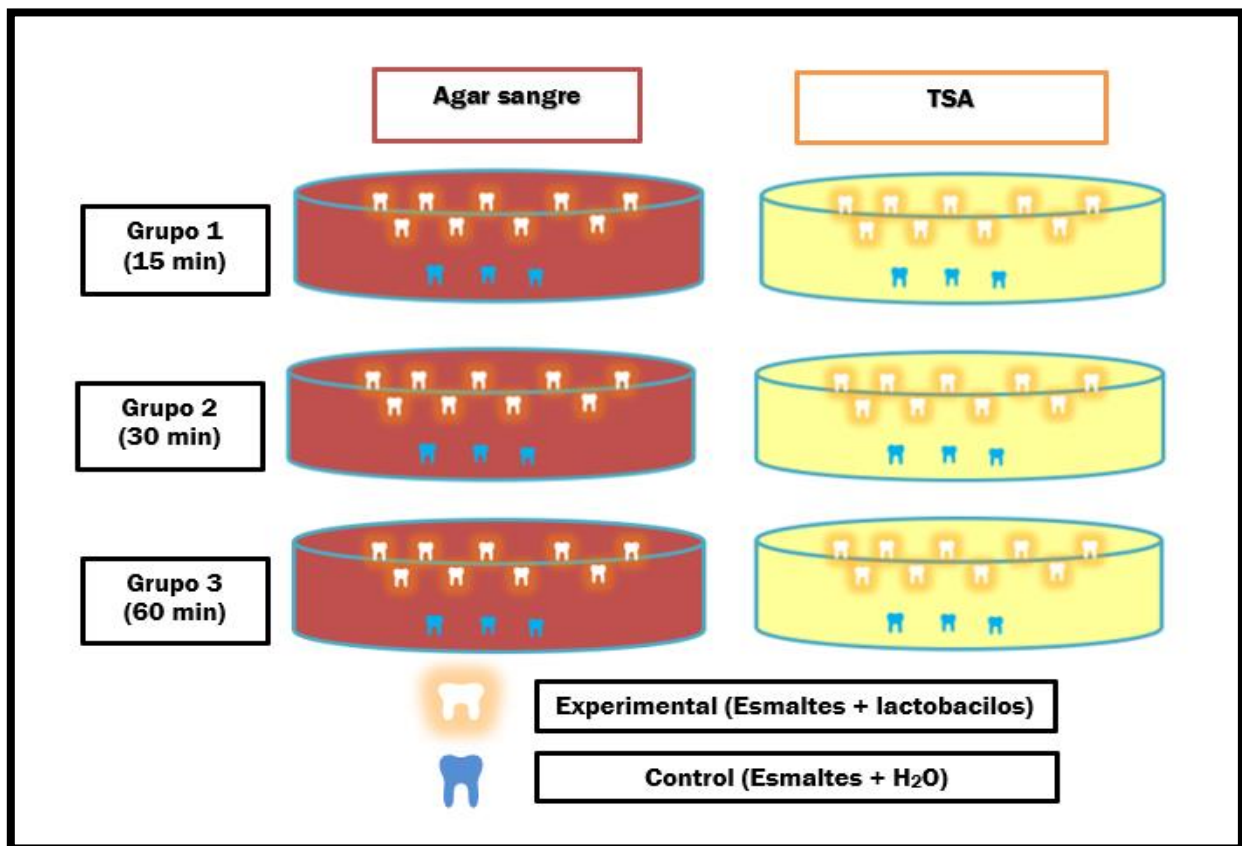


Figura 9. Distribución de las muestras experimentales y control. Fuente directa.

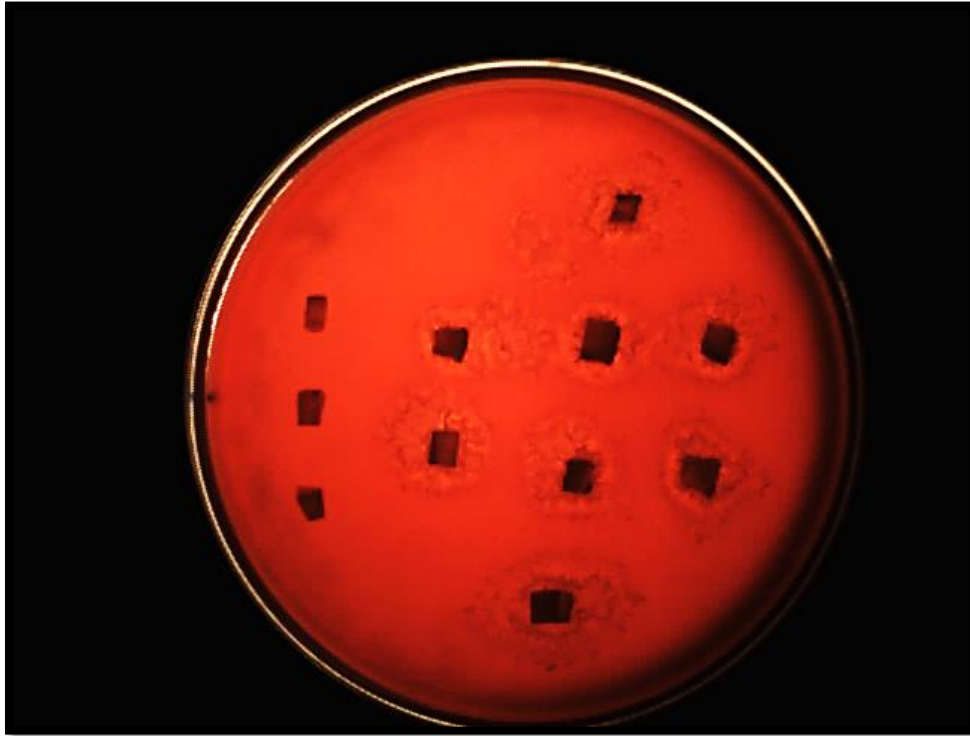


Figura 10. Cultivo de agar sangre prueba 15min (grupo 1). Fotografía tomada con aCOLyte 3 HD – Synbiosis.

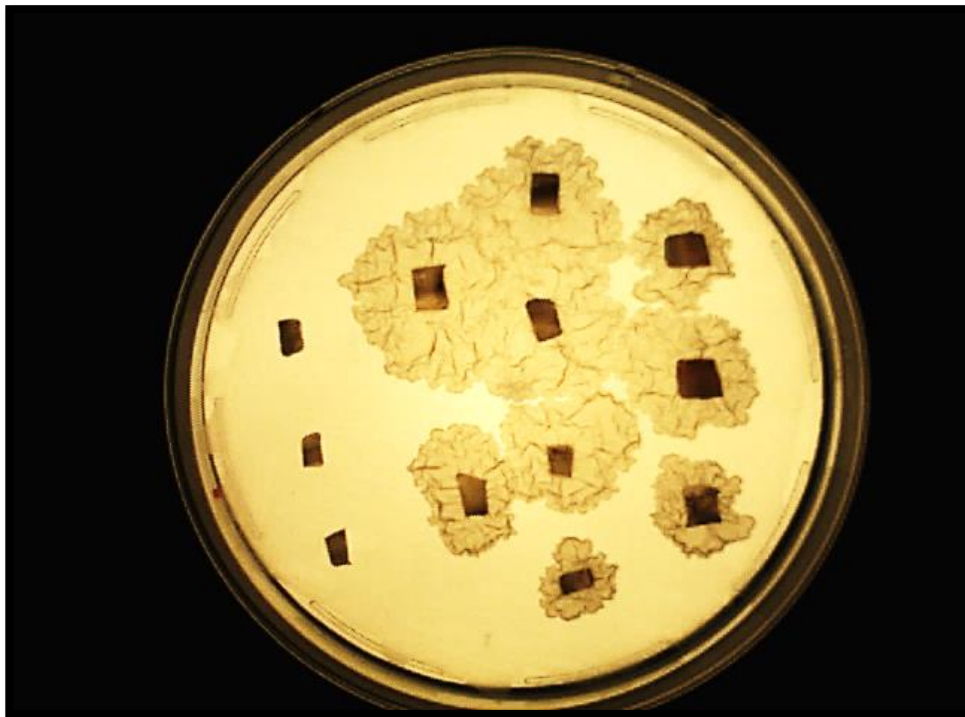


Figura 11. Cultivo de TSA prueba 15 min (grupo I). Fotografía tomada con aCOLyte 3 HD – Synbiosis.

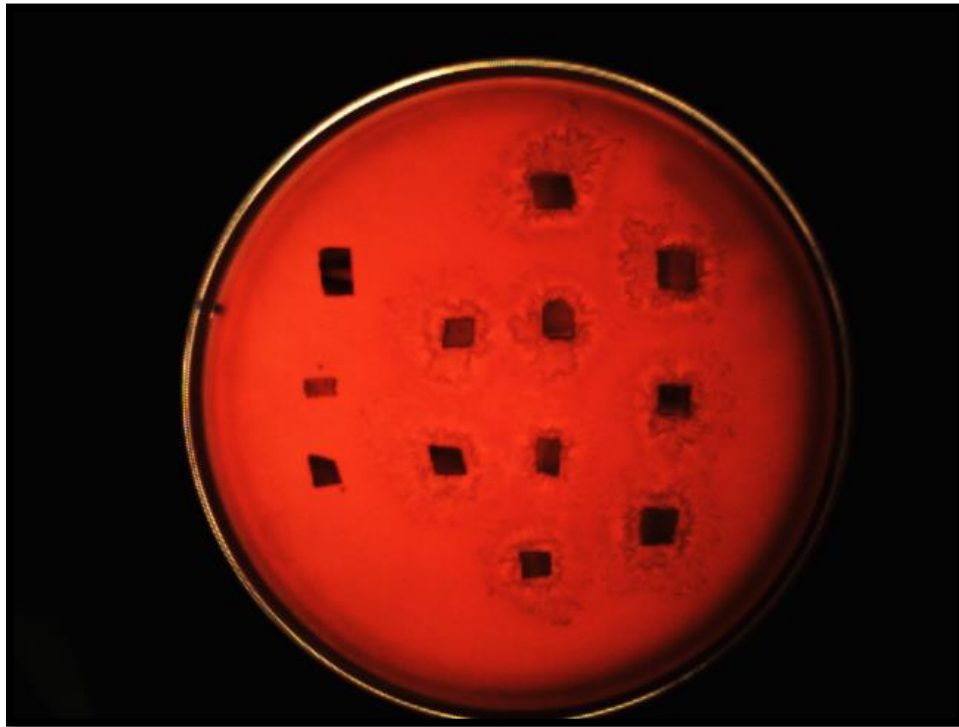


Figura 12. Cultivo agar sangre prueba 30 min. (grupo II) Fotografía tomada con aCOLyte 3 HD – Synbiosis.

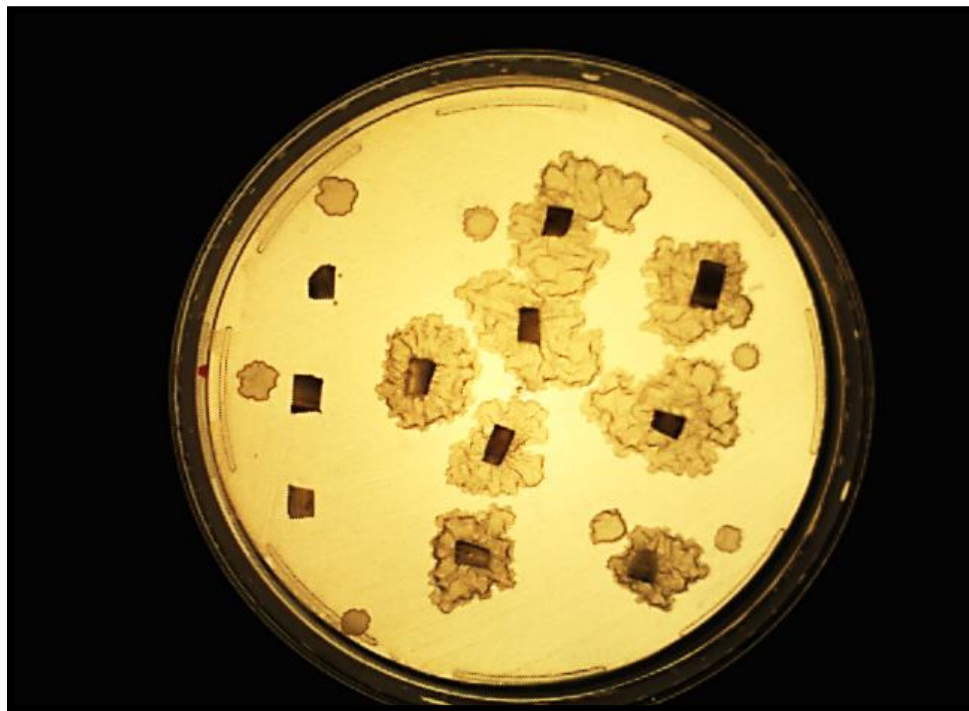


Figura 13. TSA prueba 30 min (grupo II) Fotografía tomada con aCOLyte 3 HD – Synbiosis.

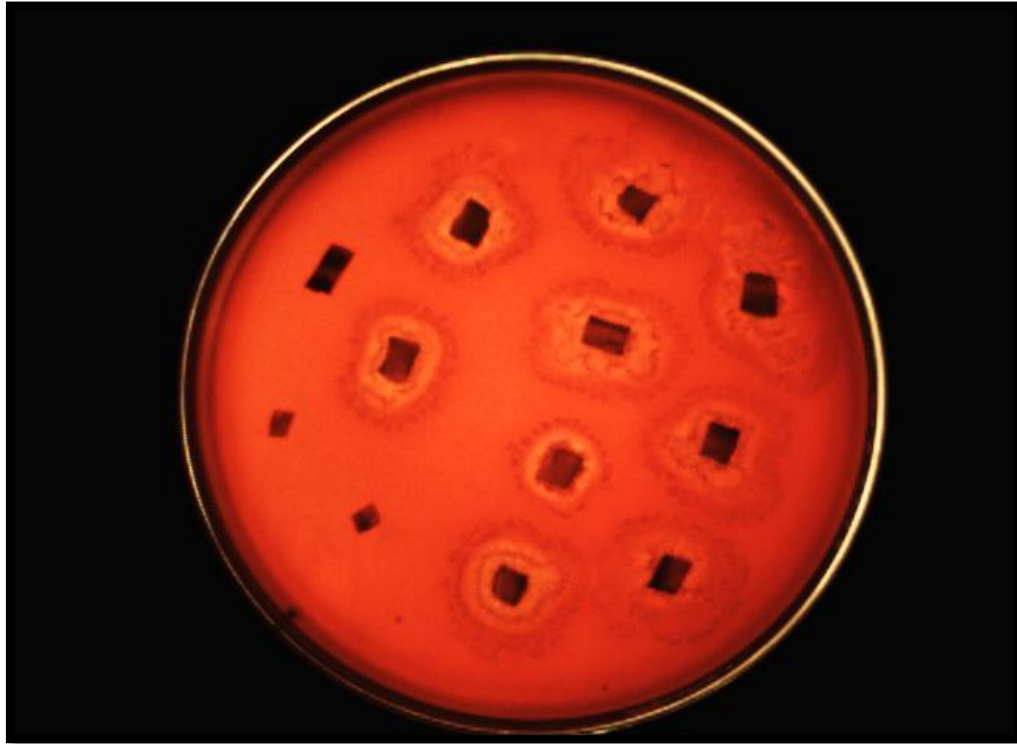


Figura 14. Cultivo de agar sangre prueba 60 min. (grupo III) Fotografía tomada con aCOLyte 3 HD – Symbiosis.

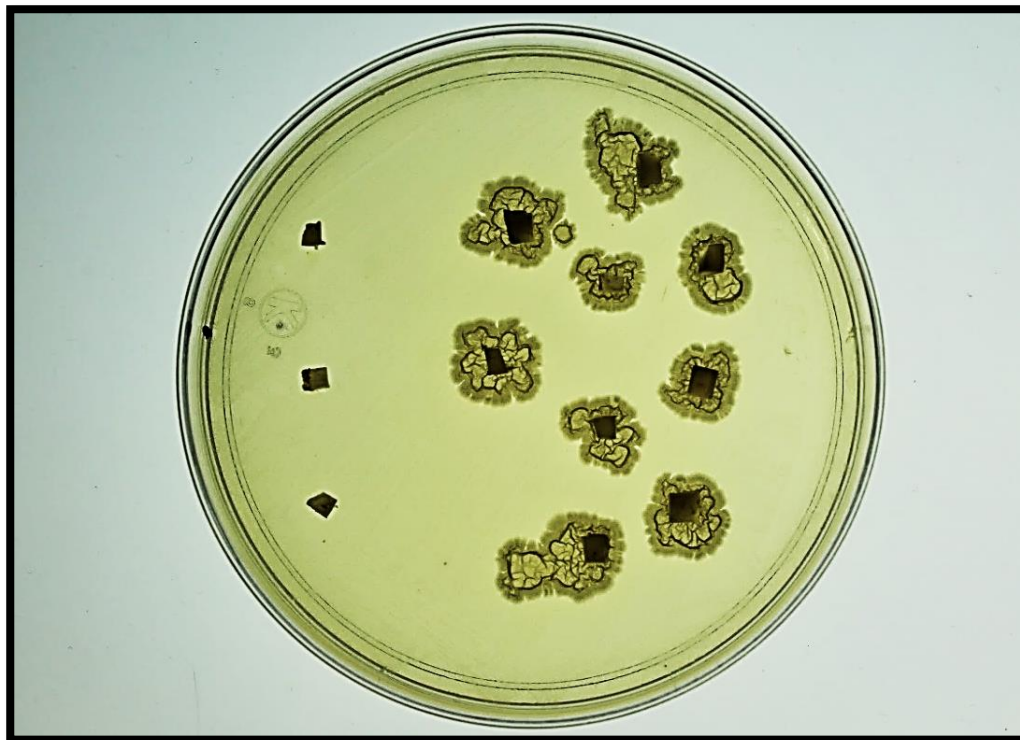


Figura 15. Cultivo de TSA prueba 60 min. (grupo III) Fotografía tomada con aCOLyte 3 HD – Symbiosis.

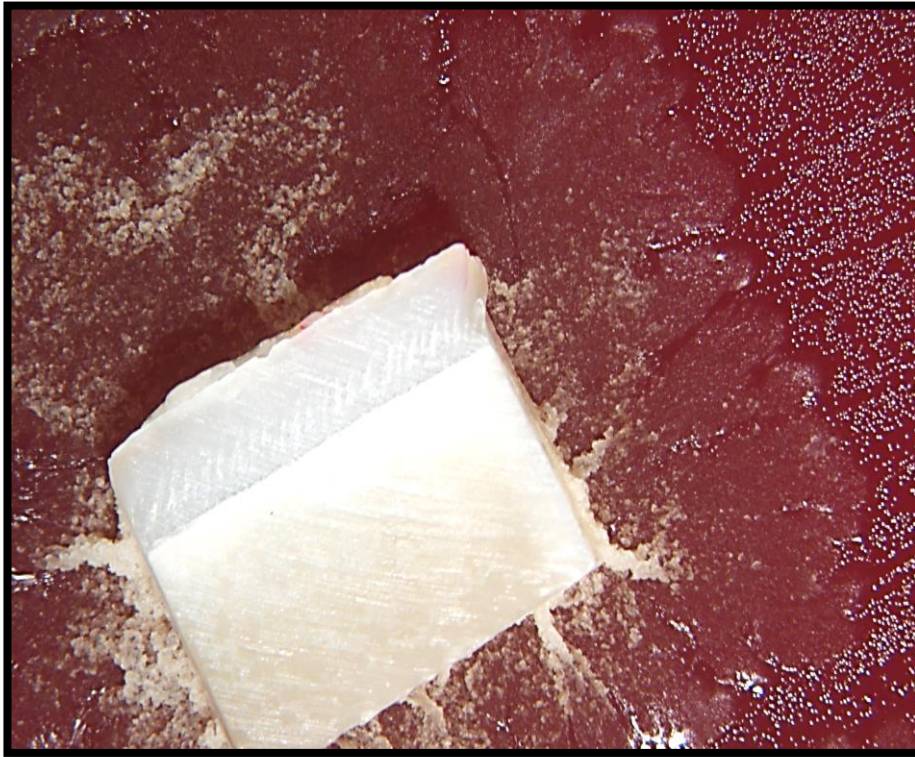


Figura 16. Cultivo de agar sangre prueba 15 min. (grupo I) muestra experimental, con visible halo de inhibición, después de 24 hr. de incubación. microfotografía tomada con estéreomicroscopio.



Figura 17. Cultivo de agar sangre, prueba 15 min (grupo I) muestra control, con crecimiento de *S. mutans*, después de 24 hr. de incubación. microfotografía tomada con estéreomicroscopio.

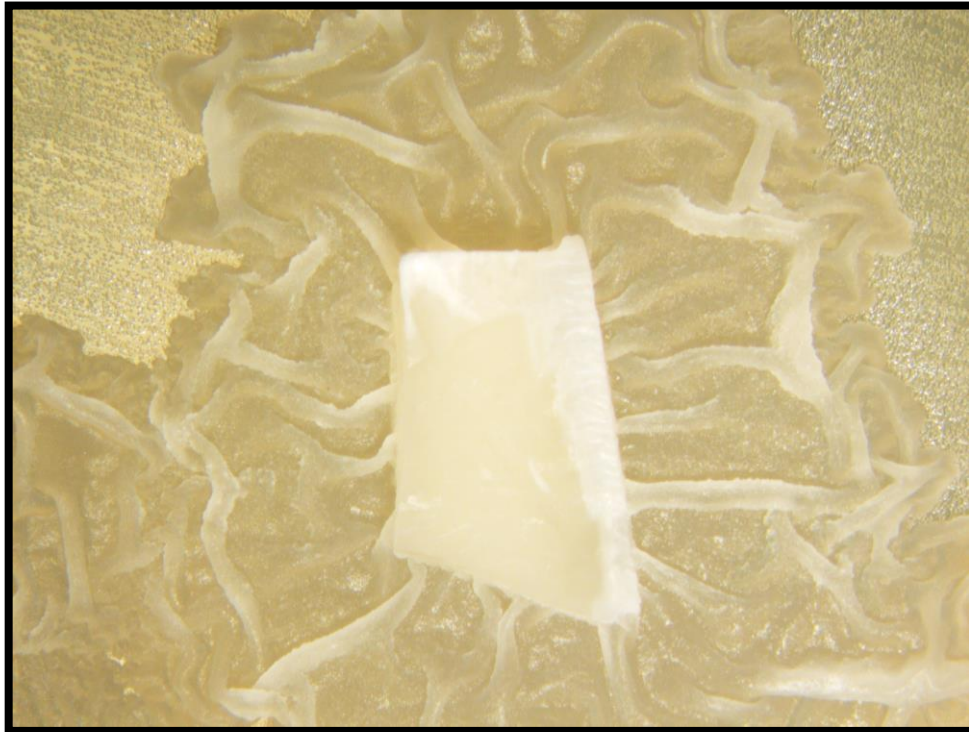


Figura 18. Cultivo TSA prueba 15 min (grupo I) muestra experimental, con visible halo de inhibición, después de 24 hr de incubación. Microfotografía tomada con estéreomicroscopio.



Figura 19. Cultivo de TSA prueba 15 min (grupo I) muestra control, con crecimiento de *S. mutans* sobre la superficie del esmalte, después de 24 hr de incubación. Microfotografía tomada con estéreomicroscopio.



Figura 20. Cultivo de agar sangre prueba 30 min (grupo II) muestra experimental, con visible halo de inhibición, después de 24 hr de incubación. Microfotografía tomada con estéreomicroscopio.



Figura 21. Cultivo de agar sangre prueba 30 min (grupo II) muestra control, con crecimiento de *S. mutans* sobre la superficie del esmalte, después de 24 hr de incubación. Microfotografía tomada con estéreomicroscopio.



Figura 22. Cultivo de TSA prueba 30 min (grupo II) muestra experimental, con visible halo de inhibición, después de 24 hr de incubación. Microfotografía tomada con estéreo microscopio.

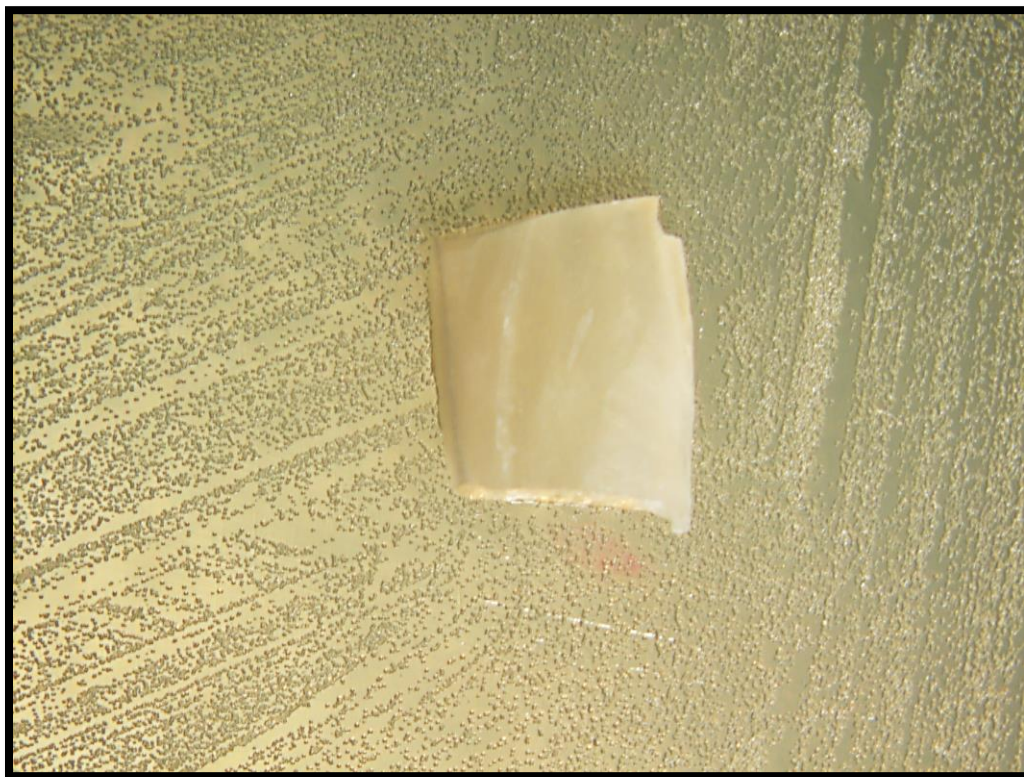


Figura 23. Cultivo de TSA prueba 30 min (grupo II) muestra control, con crecimiento de *S. mutans* sobre la superficie del esmalte, después de 24 hr de incubación. Microfotografía tomada con estéreo microscopio.

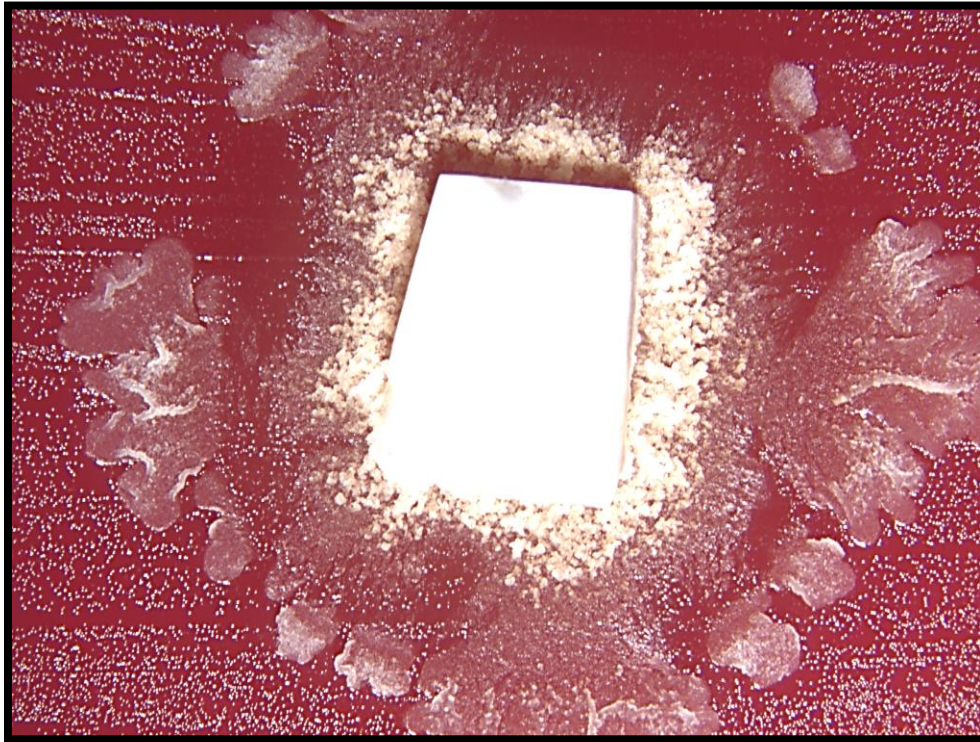


Figura 24. Cultivo de agar sangre prueba 60 min (grupo III) muestra experimental, con visible halo de inhibición, después de 24 hr de incubación. Microfotografía tomada con estereomicroscopio.

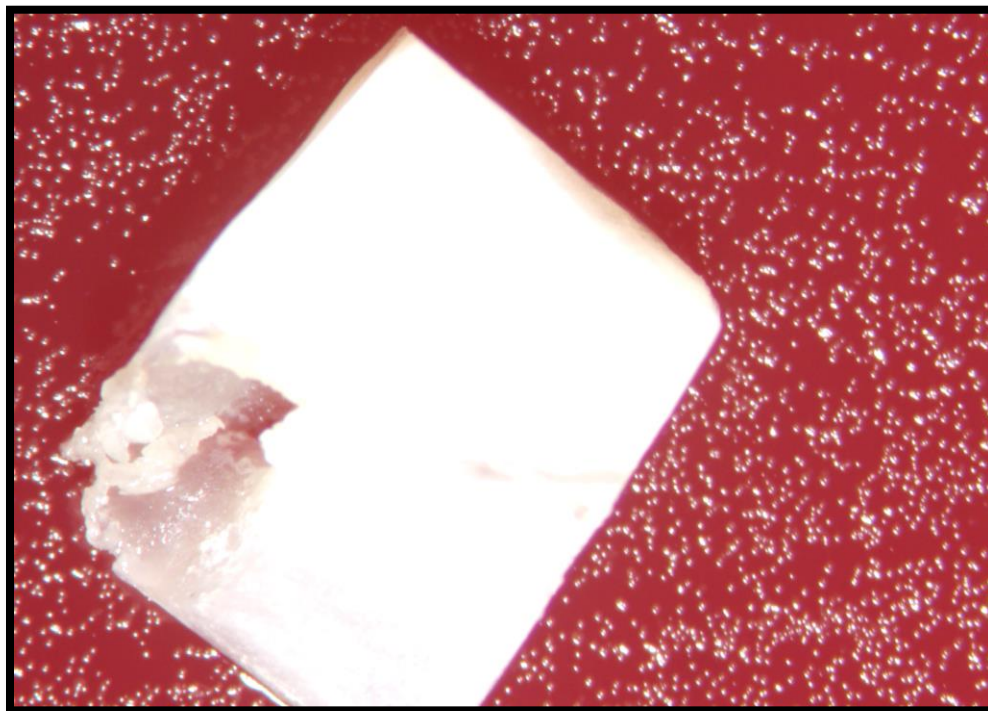


Figura 25. Cultivo de agar sangre prueba 60 min (grupo III) muestra control, con crecimiento de *S. mutans* sobre la superficie del esmalte, después de 24 hr. de incubación. microfotografía tomada con estereomicroscopio.



Figura 26. Cultivo de TSA prueba 60 min (grupo III) muestra experimental, con visible halo de inhibición, después de 24 hr de incubación. fotografía tomada con estéreo microscopio.



Figura 27. Cultivo de TSA prueba 60 min (grupo III) muestra control, con crecimiento de *S. mutans* sobre la superficie del esmalte, después de 24 hr de incubación. Microfotografía tomada con estéreo microscopio.



IX. Discusión

Los efectos de los probióticos en la salud oral son relativamente una nueva área de investigación. Los *Lactobacillus* sp. y bifidobacterias son generalmente considerados como microorganismos cariogénicos, así que la idea de que los probióticos sean beneficiosos desde un punto de vista dental puede parecer controvertido.²⁰

Sin embargo, estudios clínicos existentes, apoyan la idea de los efectos beneficios que poseen estos microorganismos en lugar de efectos nocivos que pudieran tener sobre la salud bucal. Eva M. Söderling quien evaluó efectos de los probióticos sobre *S. mutans*, menciona que la formación de biopelículas de *S. mutans* fue inhibida por todos los tipos de *Lactobacillus* estudiados.²¹

Por otra parte, Mette Kirstine Keller quien utilizó cepas aisladas de *Streptococcus mutans* de adultos jóvenes libres y susceptibles de caries, las cuales fueron procesadas con ocho cepas de *Lactobacillus* probióticos comerciales, reportó que todos los *Lactobacillus* probióticos utilizados, inhibieron el crecimiento de *Streptococcus mutans* en los grupos experimentales.²²

Así mismo R. Teanpaisan trabajó con un total de 357 cepas que comprenden 10 especies de *Lactobacillus* orales y las utilizó para producir un efecto inhibitorio contra un panel de indicadores para periodontitis y patógenos relacionados con la caries. Demostró que la mayoría de los *Lactobacillus* orales fueron capaces de inhibir el crecimiento de patógenos relacionados tanto con la periodontitis como con la caries, principalmente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175 en el modelo de biopelícula.²³



Por tal motivo el objeto de este estudio consistió en comprobar lo reportado en la literatura con una variante, que fue el empleo de muestras de esmalte dental obtenidas de dientes de bovino, las cuales fueron inoculadas en un medio de cultivo líquido, que contenía una cepa de *Bacillus coagulans*, que posteriormente fueron puestas en interacción con placas de agar sangre y TSA sembradas con *Streptococcus mutans*.

Al término de este estudio fue posible observar la similitud de los resultados obtenidos en comparación con los de otros autores, ya que el crecimiento del *S. mutans* fue inhibido por la acción de los *Bacillus*, debido a que éstos se adhirieron firmemente a la superficie del esmalte impidiendo la adhesión *S. mutans* a la misma.

Sin embargo, al ser un estudio realizado de manera *in vitro*, donde únicamente existió la interacción y antagonismo entre dos tipos de bacterias presentes en el microbiota oral, y no las casi 700 especies de microorganismos que la conforman además de variables como la saliva y el tipo de alimentación, sólo podemos tener un panorama general del efecto que podrían tener estos probióticos en la salud bucodental del ser humano, por lo que es necesario continuar con investigaciones futuras que contengan variables semejantes a la cavidad oral.



X. Conclusiones

En la búsqueda de mejores tratamientos que promuevan la disminución en la incidencia de la caries dental, se han investigado diferentes alternativas, el uso de probióticos con tales fines, ha sido un área poco profundizada, sin embargo, los estudios que han sido realizados demuestran la capacidad que estos microorganismos poseen para la modulación de la microflora oral y los efectos benéficos que confieren a la salud bucodental.

En este trabajo, fue posible comprobar que *B. coagulans* posee un mecanismo de adhesión muy eficiente a la superficie del esmalte dental. Y que su adhesión o posiblemente, alguno de sus productos tiene la capacidad de inhibir la adherencia del *Streptococcus mutans* a las muestras y a su alrededor, generando así halos de inhibición.

Por lo que con nuestros resultados se genera un área de investigación novedosa y prometedora encaminada a desarrollar una nueva terapéutica asociada al control de microorganismos patógenos en la cavidad oral.



XI Referencias Bibliográficas

1. **Singh, V.P.** Role of probiotics in health and disease: A review., *J Pak Med Assoc* 2013. 63(2):253-7.
2. **Nadelman, P., Magno, M. B., Masterson, D., da Cruz, A. G., & Maia, L. C.** Are dairy products containing probiotics beneficial for oral health? A systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*, 2018, Vol. 1. 1–23.
3. **Zhang, Y., Wang, X., Li, H., Ni, C., Du, Z., & Yan, F.** Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 2018. 99, 883-893.
4. **Gschmeissner S.** Las reveladoras imágenes de las bacterias que viven en nuestra boca. [BBC Mundo] 2016.
5. **Dewhirst, F.E., Chen, T., Izard, J, Paster, B.J., Tanner, A.C.R., Yu, W.-H., Lakshmanan, A., Wade, W.G.** The Human Oral Microbiome. *J. Bacteriol* 2010. 192: 5002-5017.
6. **Almaguer J.G., Villagómez A.** Ecología oral. 1era edición. El manual moderno, México, 2018.
7. **Tello G.** Microbioma Humano y Microbioma Oral: Una Revisión. *Revista Científica Odontológica.*2016, Vol. 4.
8. **Bermúdez, L.** Biofilm: a new conception of dentobacterial plaque. *Medicent Electrón*, 2016, Vol. 20. 3-12.
9. **Serrano D., Herrera J.** La placa dental como biofilm ¿cómo eliminarla?. *RCOE*, Vol. 10. 431-139.



10. **Hernández P.** Aplicaciones de las Lectinas. Cubana Hematol Inmunol Hemoter, 1999. 155(9): 4218-23.
11. **García M., Reyes J.** La Hidroxiapatita, su importancia en los tejidos mineralizados y su aplicación. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 2006, Vol. 9. 90-95.
12. **Tong Z, Zhou L, Li J, Kuang R, Lin Y, Ni L.** An in vitro investigation of Lactococcus lactis antagonizing cariogenic bacterium Streptococcus mutans. Archives of oral biology, 2012, Vol. 57. 376-382
13. **Ojeda J.C.** Streptococcus mutans y caries dental. Rev. CES. Odont., 2013, Vol. 26. 44-56
14. **Núñez D., García L.** Bioquímica de la caries dental. Rev haban cienc méd. 2010, Vol. 9. 156-166.
15. **Rossoni R.** Inhibitory effect of probiotic Lactobacillus supernatants from the oral cavity on Streptococcus mutans biofilms. Microbial pathogenesis, 2018, Vol. 123. 361-367.
16. **Näse L., Hatakka K., Savilahti E., Saxelin M., Pönkä A., Poussa T., Korpela R., Meurman J.H.** Effect of Long-Term Consumption of a Probiotic Bacterium, Lactobacillus rhamnosus GG, in Milk on Dental Caries and Caries Risk in Children. Caries Res. 2001. Vol. 35. 412-420.
17. **Drago L.** Should Lactobacillus sporogenes and Bacillus coagulans Have a future?. Journal of chemotherapy, 2009, Vol. 21. 371-377.
18. **Konuray G., Erginkaya Z.** Potential Use of Bacillus coagulans in the Food Industry. Foods, Vol. 7(6): 92.



19. **Le Marrec C., Hyronimus B., Bressollier P., Verneuil B., Urdaci MC.** Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I(4). Appl Environ Microbiol., 2000, Vol. 12. 66(12):5213-20.
20. **Riazi S.** Characterization of lactosporin, a novel antimicrobial protein produced by *Bacillus coagulans* ATCC 7050. J Appl Microbiol. 2009. Vol. 4. 13-70.
21. **Söderling E.M.** Probiotic Lactobacilli interfere with *Streptococcus mutans* Biofilm Formation In vitro. Curr Microbiol. 2011. Vol. 62. 618-622.
22. **Keller M.K.** Co-aggregation and growth inhibition of probiotic lactobacilli and clinical isolates of mutans streptococci: An in vitro study. Acta odontológica, 2011, Vol. 69. 263-268.
23. **Teanpaisan R.** Inhibitory effect of oral Lactobacillus against oral pathogens. The Authors Letters in Applied Microbiology, 2011, Vol. 53. 452-459.