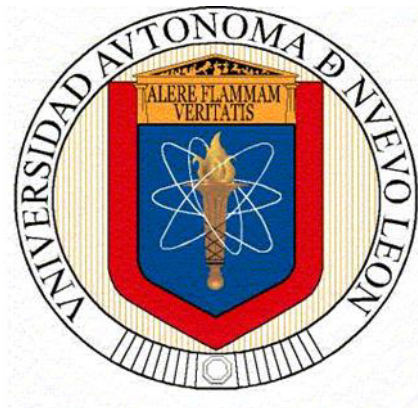


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**“Impacto de *Lactobacillus casei* Shirota sobre *Streptococcus mutans* presente en  
aparatosología ortodóntica infantil”**

POR

**CD. MARCELA GARZA GONZÁLEZ**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE  
ODONTOPEDIATRÍA

SEPTIEMBRE, 2018

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**“Impacto de *Lactobacillus casei* Shirota sobre *Streptococcus mutans* presente en aparatología ortodóntica infantil”**

POR

**CD. MARCELA GARZA GONZÁLEZ**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE  
ODONTOPEDIATRÍA

SEPTIEMBRE, 2018



**“Impacto de *Lactobacillus casei* Shirota sobre *Streptococcus mutans* presente en  
aparatosología ortodóntica infantil”**

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE  
ODONTOPEDIATRÍA

**Comité de Titulación / Miembros del Jurado**

---

Dra. Erandi Escamilla García.

**Presidente**

---

Dra. María Argelia Akemi Nakagoshi Cepeda.

**Secretaria**

---

Dra. Marcela Montes Villarreal.

**Vocal**



**“Impacto de *Lactobacillus casei* Shirota sobre *Streptococcus mutans* presente en  
aparatosología ortodóntica infantil”**

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRIA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE  
ODONTOPEDIATRÍA

**Comité de Tesis**

---

Dra. Erandi Escamilla García

**Directora**

---

Dra. María Argelia Akemi Nakagoshi Cepeda

**Codirectora**

**†**

Dr. Eloy Cárdenas Estrada  
**Asesor Estadístico**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento primeramente a Dios Nuestro Señor, a mi madre Emma Lourdes González Leal por todo el apoyo incondicional a lo largo de mi vida y por apoyarme para cumplir mi sueño de concluir mi especialidad.

A mi familia y amigos.



Al posgrado de Odontología Infantil de la Facultad de Odontología, UANL por darme la oportunidad de estudiar en tan prestigiada Institución y confiar en mi para realizar este proyecto al mismo tiempo que cursé mi especialidad. A la Dra. Sonia Martha López Villarreal, Coordinadora en turno del posgrado por su apoyo durante mi estancia en el posgrado.



A la Unidad de Odontología Integral y Especialidades (UOIE) del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), UANL por abrirme las puertas y permitirme utilizar su infraestructura y realizar mi proyecto de investigación. En particular a la Dra. Erandi Escamilla García directora de mi tesis por su paciencia y tiempo invertido en orientarme y apoyarme a concluir esta tesis. Al Dr. Eloy Cárdenas Estrada quien contribuyó al análisis estadístico a lo largo de todo el proyecto de tesis, y quien lamentablemente se nos adelantó en el camino.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México por el apoyo de la beca otorgada por realizar mis estudios.

## INDICE

<b>Sección</b>	<b>Página</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>LISTA DE IMÁGENES, DIAGRAMAS Y GRÁFICAS</b> .....	7-8
<b>ABREVIATURAS</b> .....	9
<b>1. RESÚMEN / ABSTRACT</b> .....	10-13
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	14
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	15
<b>3.1 Hipótesis inicial</b> .....	15
<b>3.2 Hipótesis nula</b> .....	15
<b>4. OBJETIVO</b> .....	16
<b>4.1 Objetivo General</b> .....	16
<b>4.2 Objetivos Específicos</b> .....	16
<b>5. ANTECEDENTES</b> .....	17
<b>5.1 Flora Microbiana</b> .....	17
<b>5.2 Maloclusión dental</b> .....	17
<b>5.3 Aparatología Ortodóntica infantil</b> .....	18
<b>5.4 Bacterias Acido lácticas</b> .....	19
<b>6. MARCO DE REFERENCIA</b> .....	20
<b>6.1 Tratamiento de ortodoncia preventiva</b> .....	20
<b>6.2 Formación de placa en ortodoncia infantil</b> .....	21
<b>6.3 <i>Streptococcus mutans</i></b> .....	22
<b>6.4 Ortodoncia en pacientes infantiles</b> .....	23
<b>6.5 Medidas de higiene oral durante el tratamiento ortodóntico</b> .....	24
<b>6.6 Los probióticos como herramienta en la salud bucal</b> .....	25
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	29-38

<b>8. RESULTADOS</b> .....	39
<b>8.1</b> Aislamiento de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota y viabilidad .....	39
<b>8.2</b> Medición de pH en boca y aparatos aislados.....	40
<b>8.3</b> Actividad antimicrobiana de <i>Lactobacillus casei</i> Shirota .....	41
<b>8.3.1</b> Cuantificación de la carga total microbiana.....	41
<b>8.3.2</b> Cuantificación de las UFC de <i>Streptococcus mutans</i> spp.....	43
<b>8.3.3</b> Identificación de <i>S. mutans</i> spp., por tinción de Gram .....	45
<b>9. DISCUSIÓN</b> .....	47-50
<b>10. CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIONES</b> .....	51-52
<b>11. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA</b> .....	53-57

## LISTA DE IMÁGENES, DIAGRAMAS Y GRÁFICAS

### IMÁGENES

**Imagen 1.** Representación de aparatos ortodónticos cortados a la mitad y dispuestos en caldo estéril de Trypticaseína de soya para estimular el crecimiento de microorganismos patógenos presentes adheridos.

**Imagen 2.** Representación fotográfica de un aparato ortodóntico cortado previamente a la mitad. El tubo color rosa contiene una mitad de aparato sumergido en el colutorio Peroxidín® como control positivo, y el tubo en color amarillo contiene la otra mitad sumergida en sobrenadante del cultivo *L. casei* Shirota.

**Imagen 3.** Representación fotográfica de las unidades formadoras de colonia totales desarrolladas en agar de tripticaseína de soya suplementado con hemina y menadiona (colonias color crema en forma de coco), y de *S. mutans spp.* aisladas en agar Mitis Salivarius en color azul oscuro en forma de coco. Cámara Canon Rebel T6i con lente de 18-135mm.

**Imagen 4.** Tinción de gram de UFC desarrolladas en agar Mitis Salivarius específico para el aislamiento de *S. mutans spp.*, y en agar de Trypticaseína de Soya suplementado con menadiona y hemina, para el desarrollo de UFC totales. Las muestras sembradas en los agares fueron tomadas de los aparatos ortodónticos aislados número 7, 21 y 22. La bacteria cariogénica *S. mutans spp.*, se identifica en color violeta como Gram+ y bacterias de otros géneros y especie desarrolladas se identifican en color rosa pálido como Gram-. Microscopio invertido (VanGuard, EUA), aumento de 100X.

### DIAGRAMAS

**Diagrama 1.** Procedimiento que indica la manipulación del probiótico *Lactobacillus casei* Shirota aislado de frascos de Yakult® comercial (normal y light) para determinar la viabilidad, cinética de crecimiento, identificación de fase exponencial de crecimiento y conservación por criopreservación.



**Diagrama 2.** Procedimiento para la conservación y manipulación de aparatos ortodónticos infantiles removidos después del tratamiento; así como para la determinación de las UFC/mL de carga microbiana total y la presencia de *Streptococcus mutans*.

**Diagrama 3.** Procedimiento para la determinación del efecto antimicrobiano del probiótico *Lactobacillus casei* Shirota aislado (ver Diagrama 1) sobre el desarrollo de flora microbiana total como del patógeno cariogénico *S. mutans spp.* presentes en aparatología ortodóntica retirada de pacientes infantiles.

## GRÁFICAS

**Gráfica 1.** (a) Cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota aislada de la bebida fermentada Yakult®, y (b) su correlación con el comportamiento del pH en el cultivo.

**Gráfica 2.** Representación gráfica del pH de saliva en boca de niños con aparatología (■), y pH promedio de la solución salina conteniendo cada aparato aislados, de una muestra total N=24 (■).

**Gráfica 3.** Concentración celular ( $10^8$  células/mL) correspondiente a la carga total microbiana contenida en cada aparato de ortodoncia, desarrollada en caldo de tripticaseína de soya: sin tratamiento (■), con tratamiento en contacto con *L. casei* Shirota (■) y en contacto con Perioxidin como control antimicrobiano (■).

**Gráfica 4.** Unidades Formadoras de Colonia expresado en  $10^2$  UFC-totales/mL (a) y  $10^2$  UFC/mL de *S. mutans spp.*, (b) desarrolladas en algunos de los 24 aparatos de ortodoncia removidos de pacientes infantiles sin recibir tratamiento (■), con perioxidin como control antimicrobiano (■) y con *L. casei* Shirota (■) como probiótico de estudio.

## ABREVIATURAS

<i>L. casei</i> Shirota	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota
<i>S. mutans</i> UA130	<i>Streptococcus mutans</i> UA130
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bacterias ácido lácticas
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
<i>S. salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
µL, mL, L	Microlitros, Mililitro, Litro
N	Muestra total
rpm	Revoluciones por minuto
NaCl	Cloruro de sodio
MRS	Man Rogosa y Sharpe
DO	Densidad Óptica
nm	Nanómetros
pH	Potencial Hidrógeno
TS	Tripticaseína de soya
min, h	Minuto, Hora
<i>spp.</i>	Especie
±	Desviación estándar
SPSS	Statistical Product and Service Solutions
®	Marca registrada
AAPD	Academia Americana de Odontología Pediátrica
ADA	Asociación Dental Americana
CIDICS	Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud
UOIE	Unidad de Odontología Integral y Especialidades
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
FO	Facultad de Odontología

## 1. RESUMEN

C.D. Marcela Garza González

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Odontología

Maestría en Ciencias Odontológicas con Especialidad en Odontopediatría

**Título del estudio:** IMPACTO DE *Lactobacillus casei* Shirota SOBRE *Streptococcus mutans* PRESENTE EN APARATOLOGÍA ORTODÓNTICA INFANTIL.

**Introducción.** El desarrollo de caries y enfermedad periodontal puede ser la repercusión del uso de aparatología ortodóntica por una maloclusión y como tratamiento correctivo. Generalmente se habla de tratamientos de mediana a larga duración con visitas periódicas al odontopediatra, de higiene con cepillado, y en ocasiones el uso de enjuague bucal como el Perioxidin. Al no cumplir con lo anterior, se promueve la proliferación de odontopatógenos, y uso excesivo de enjuagues en infantes resulta perjudicial para las encías o esmalte de los dientes. El uso de probióticos como *Lactobacillus casei* Shirota (un activo de la bebida fermentada Yakult®) son cada vez más investigados por su amplio espectro de beneficios en la salud del humano al consumirlo o administrarlo.

**Objetivo:** Determinar el efecto antimicrobiano de *Lactobacillus casei* Shirota sobre aparatología ortodóntica infantil aislada, en niños de entre 9-13 años de edad que acuden a la Clínica de Odontopediatría de la Facultad de Odontología (FO) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

**Materiales y Métodos:** Se calculó la muestra N con la fórmula de prevalencia  $Z_{\alpha,22} * p * (1-p) / (\delta^2)$  y  $p < 0.05$  y el programa SPSS-STATA-13. Tres grupos de 21 aparatos retirados de niños entre 9-13 años de edad son requeridos para determinar la carga microbiana total en agar Tripticaseína de soya suplementada con hemina y menadiona así como la presencia de *Streptococcus mutans spp*, en agar Mitis Salivarius con telurito de sodio y bacitracina. El segundo y tercer grupo de 21 aparatos consistió en un tratamiento de un grupo en 15 mL desobrenadante *L. casei* Shirota (experimental) y

otro grupo con tratamiento en 15 mL de Peroxidín (control) por 60 seg. Un análisis estadístico fue realizado utilizando la prueba T-*student*.

**Resultados:** La eficiencia antimicrobiana de ambas sustancias fue en el 76.2% de los aparatos (16), mientras que para 5 aparatos la eficiencia fue de 9.5% y 4.8% de carga total microbiana y de *S. mutans*, con el sobrenadante de *L. casei* Shirota y el Peroxidín respectivamente.

**Conclusiones:** *L. casei* Shirota aislado de la bebida fermentada es un probiótico candidato en el tratamiento o prevención de *S. mutans*.

**Palabras clave:** *Lactobacillus casei* Shirota, *Streptococcus mutans*, caries, aparatología ortodóntica, actividad antibacteriana.

**Director de Tesis:** \_\_\_\_\_  
**Dra. Erandi Escamilla García**

## **ABSTRACT**

CD. Marcela Garza González

Autonomous University of Nuevo Leon

School of Dentistry

Master's Degree in Odontological Sciences with Specialty in Pediatric Dentistry

Title of the study: IMPACT OF *Lactobacillus casei* Shirota ON *Streptococcus mutans* PRESENT IN CHILDREN ORTHODONTIC APPLIANCES.

**Introduction:** The development of caries and periodontal disease can be the repercussion of the use of orthodontic appliances due to a malocclusion and as a corrective treatment. Usually speaking of treatments of medium to long duration with periodic visits to the pediatric dentist, hygiene with brushing, and sometimes the use of mouthwash such as Peroxidín. Failure to comply with the above, promotes the proliferation of odontopathogens, and excessive use of rinses in infants is harmful to the gums or tooth enamel. The use of probiotics such as *Lactobacillus casei* Shirota (an active ingredient in the fermented Yakult® drink) is increasingly being investigated for its broad spectrum of benefits in human health when consumed or administered.

**Objective:** To determine the antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* Shirota on isolated children's orthodontic appliances in children aged 9-13 years old who attend the Pediatric Dentistry Clinic of the School of Dentistry (FO) of the Autonomous University of Nuevo Leon (UANL).

**Materials and Methods:** Sample N was calculated with the prevalence formula  $Z\alpha, 22 * p * (1-p) / (\delta^2)$  and  $p < 0.05$  and the SPSS-STATA-13 program. Three groups of 21 devices removed from children between 9-13 years of age are required to determine the total microbial load on Trypticasein soy agar supplemented with hemin and menadione as well as the presence of *Streptococcus mutans* spp, on Mitis Salivarius agar with

sodium tellurite and bacitracin. The second and third group of 21 devices consisted of a treatment of one group in 15 mL of *L. casei* Shirota de-enbreeding (experimental) and another group with treatment in 15 mL of Peroxidín (control) for 60 sec. A statistical analysis was performed using the T-student test.

**Results:** The antimicrobial efficiency of both substances was in 76.2% of the apparatuses (16), while for 5 apparatuses the efficiency was of 9.5% and 4.8% of total microbial load and of *S. mutans*, with the supernatant of *L. Casei* Shirota and Peroxidín respectively.

**Conclusions:** *L. casei* Shirota isolated from fermented drink is a probiotic candidate in the treatment or prevention of *S. mutans*.

**Key words:** *Lactobacillus casei* Shirota, *Streptococcus mutans*, cavities, orthodontic appliances, antibacterial activity.

**Thesis Director:** \_\_\_\_\_

**Dra. Erandi Escamilla García**

## 2. INTRODUCCIÓN

La cavidad oral de los humanos está habitada por cientos de especies bacterianas, la mayoría de las cuales son comensales y ayudan a mantener en equilibrio el ecosistema de la boca. Sin embargo, algunas de ellas que tienen mucha influencia en el desarrollo de enfermedades orales, principalmente las caries y enfermedad periodontales.

Las enfermedades orales se inician principalmente cuando crece la placa dentobacteriana, un biofilm formado por la acumulación de bacterias oportunistas, que en conjunto con las glicoproteínas salivales y polisacáridos secretados por los microbios contribuyen a la generación de enfermedades, sobre todo cuando no se tienen correctos hábitos de higiene.

La placa subgingival está típicamente habitada por anaeróbicos Gram negativos y es responsable del desarrollo de gingivitis y periodontitis. La placa dental supragingival se forma en los dientes, lugar donde habitan bacterias acidogénicas y acidófilas, entre las cuáles la más predominante es *Streptococcus mutans*, estas son las responsables de la caries dental.

La caries dental es considerada la enfermedad infecciosa más frecuente a nivel mundial, que afecta alrededor del 80% de la población, es una enfermedad multifactorial crónica común que afecta del 60-90% a los niños en edad preescolar. Se caracteriza por la destrucción de los tejidos del diente como consecuencia de la desmineralización provocada por los ácidos que genera la placa dentobacteriana, y se asocia a la ingesta de azúcares y ácidos contenidos en bebidas y alimentos, así como también a errores en las técnicas de higiene. El no tener correctos hábitos de limpieza oral conlleva a problemas tales como úlceras gástricas, cáncer o enfermedad cardiovascular, entre otros. Tomando en cuenta esto es sorprendente que no se hayan desarrollado estrategias eficientes para combatir esta enfermedad, aun cuando repercute de forma directa en la salud en general.

Entre los problemas de salud oral más comunes se encuentra la maloclusión ocupando el tercer lugar, lo que significa un mal alineamiento de los dientes, lo que provoca un gran

número de complicaciones en la cavidad bucal por lo que se utiliza el tratamiento de ortodoncia para corregirlos. El tratamiento de maloclusiones dentales durante la infancia es la utilización de aparatos de ortopedia funcionales que pueden lograr un equilibrio en los músculos de la masticación y armonía de maxilar y mandíbula (Soergel1 et al,2012).

Las bacterias ácido-lácticas son microorganismos que benefician la salud por su capacidad metabólica para producir sustancias que ayudan al mantenimiento de la flora intestinal y a la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos. Estas bacterias ayudan mucho a mejorar la salud de los pacientes que presentan algunos trastornos como: síndrome del intestino corto, cáncer, enfermedades del hígado, diarrea, enfermedades del hígado, infecciones del tracto genitourinario, entre otros.

### 3. HIPÓTESIS

**Inicial\_** *Lactobacillus casei* Shirota tiene actividad antimicrobiana sobre la carga total microbiana, y en particular sobre el desarrollo de *S. mutans* presente en aparatología ortodóntica infantil removida del paciente.

**Nula\_** *Lactobacillus casei* Shirota NO tiene actividad antimicrobiana sobre la carga total microbiana, en particular sobre el desarrollo de *S. mutans* presente en aparatología ortodóntica infantil aislada del paciente o es menos efectiva respecto al enjuague bucal Peroxidín®.



## 4. OBJETIVO

### 4.1 General:

Determinar el efecto antimicrobiano de *Lactobacillus casei* Shirota sobre aparatología ortodóntica infantil aislada, en niños de entre 9-13 años de edad que acuden a la Clínica de Odontopediatría de la Facultad de Odontología (FO) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

### 4.2 Específicos:

1. Aislar *Lactobacillus casei* Shirota de la bebida fermentada de Yakult® y determinar su viabilidad mediante precultivos y cinética de crecimiento en agar y caldo de Man-Rogosa-Sharpe (MRS, Difco).
2. Cuantificar las Unidades Formadoras de Colonia (UFC/mL) de la carga microbiana total presente en la aparatología removida, e identificar la presencia de *Streptococcus mutans*, utilizando un cultivo nutritivo de Tripticaseína de Soya enriquecido y otro específico de Mitis Salivarius .
3. Exponer cada aparato ortodóntico en presencia de *L. casei* Shirota y determinar la carga microbiana total, así como la presencia de *S. mutans* mediante el desarrollo de UFC/mL.
4. Comparar la eficacia antimicrobiana de *L. casei* Shirota respecto al enjuague bucal Peroxidín® (Lacer), mediante el desarrollo de UFC/mL.

## **5. ANTECEDENTES**

### ***5.1 Flora Microbiana***

La flora microbiana de la boca es muy compleja, contiene una amplia variedad de especies bacterianas. Las condiciones ambientales como temperatura, salinidad, oxígeno, nutrientes y pH, tienen un impacto en el ecosistema y contribuyen a la formación de nuevas especies que componen el biofilm.

*Streptococcus mutans* es predominante entre las bacterias del género *Streptococcus* y es conocida como factor etiológico principal de la caries dental; una enfermedad muy extensa y creciente en los niños (Kryzysciak et al. 2014). Esta bacteria puede metabolizar rápidamente azúcares de la dieta provocando una disminución en el pH (Ashwin et al. 2015) creando así un ambiente idóneo para su propagación.

La caries dental es la enfermedad crónica más común que afecta de 60-90% a los niños en edad preescolar. Es una enfermedad multifactorial con origen bacteriano capaz de desmineralizar el esmalte dental. Los cambios en la homeostasis de la cavidad oral mejoran la proliferación de biofilm bacteriano, en particular *S. mutans* (Nozari et al. 2015).

### ***5.2 Maloclusión dental***

La maloclusión dental ocupa el tercer lugar entre los problemas de salud oral más comunes. La alimentación con biberón y los hábitos de succión no nutritiva (usos de chupón, por ejemplo) favorecen al desarrollo de las maloclusiones involucrando diferente participación de complejos musculares craneofaciales que son utilizados cuando el niño ejerce acción de amamantamiento principalmente las fuerzas que ejerce la lengua contra el paladar duro y blando, causando cambios en el desarrollo armónico de las arcadas dentarias.

Es generalmente aceptado que la lactancia materna exclusiva durante el primer año de vida contribuye al desarrollo normal del complejo craneofacial. La areola y el pezón materno ejercen acción en los labios ejerciendo efecto de apretamiento más que succión, la lactancia materna exclusiva por al menos los primeros seis meses de vida tiene un efecto protector o de prevención en el desarrollo de maloclusiones (Mendoza et al, 2008).

Esto provoca una serie de complicaciones para lo cual se utiliza el tratamiento de ortodoncia produciendo cambios colaterales o consecuencias en la cavidad oral incluyendo alteraciones en la capacidad amortiguadora de la saliva. El tratamiento de maloclusiones dentales durante la infancia consiste en la utilización de aparatos de ortodoncia funcionales, ya que pueden lograr un equilibrio en los músculos de la masticación y una armonía de maxilar y mandíbula (Wozniak et al. 2015).

### ***5.3 Aparatología Ortodóntica infantil.***

Los aparatos ortodónticos fijos se consideran como un peligro para la salud dental debido a la acumulación de microorganismos que pueden causar una desmineralización del esmalte clínicamente visibles como lesiones de mancha blanca (Castellanos et al, 2013). Por otra parte, aquellos aparatos fijos y adhesivos de superficie áspera en la cavidad oral crean sitios de retención resultando favorables para la acumulación de placa (restos de la dieta ingerida, colonización microbiana) aunado a una respuesta inflamatoria en los tejidos periodontales ocasionada por la dificultad en el cepillado dental para el paciente (Mishra et al. 2014).

Siendo el cepillado la medida de higiene oral mecánica más fiable para el control de placa requiere de tiempo, motivación y destreza manual. Es por ello que el uso de un agente antimicrobiano como adyuvante al cepillado (colutorios), dada su segura aplicación y eficiencia para limitar el desarrollo de microorganismos de tipo cariogénico, por ejemplo, así como prevenir la caries dental durante y/o posterior al tratamiento ortodóntico.

#### **5.4. Bacterias Acido lácticas**

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) o llamadas también probióticos, son considerados microorganismos benéficos para la salud debido a su capacidad metabólica de producir sustancias que ayudan al restablecimiento o mantenimiento de la flora intestinal o a la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos (Esquivel et al, 2012). En el mercado encontramos productos alimenticios o farmacéuticos formulados o suplementados con probióticos en distintas presentaciones como (yogurt, leches fermentadas, helado, pastillas, goma de mascar por citar algunos ejemplos, mismas que son fácilmente aceptadas por los pacientes y en especial por los niños.

Las BAL ayudan a mejorar la salud del paciente que presenta trastornos como: diarrea, gastroenteritis, síndrome del intestino corto, enfermedades intestinales inflamatorias, cáncer, alergias en pacientes pediátricos, enfermedades del hígado, infecciones del tracto genitourinario, además de preservar la inocuidad de los alimentos e incrementar su vida de anaquel (Cildir et al, 2009).

Los probióticos de tipo *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son los más utilizados, y se encuentran en los productos lácteos fermentados y colonizan el tracto gastrointestinal poco después del nacimiento (Jindal et al. 2012). *Lactobacillus casei* Shirota es una bacteria probiótica contenida en la leche fermentada Yakult® como principio activo, y que contribuye al desarrollo de resistencias a antibióticos entre bacterias intestinales, resiste en presencia de los jugos gástricos. Así como también, parece producir una bacteriocina de naturaleza proteínica, la cual suprime el crecimiento de microorganismos patógenos como por ejemplo *Bacteroides* y *coliformes* (Yakult, 2000).

Considerando las ventajas que aportan los probióticos y en específico *L. casei* Shirota, es que se incluyó en este estudio, a fin de determinar su posible actividad antimicrobiana sobre el desarrollo de *S. mutans* formado en pacientes infantiles con tratamiento ortodóntico fijo.

## **6. MARCO DE REFERENCIA**

### ***6.1 Tratamiento de ortodoncia preventiva***

Es importante realizar un tratamiento de ortodoncia preventiva, para corregir desequilibrios existentes o en desarrollo de tipo esquelético, dentoalveolar o musculares, mejorando así su entorno orofacial previo a la erupción de los dientes permanentes. Una intervención temprana puede reducir la necesidad de un tratamiento de ortodoncia complejo como la extracción de algún diente permanente o la cirugía ortognática (Suresh et al. 2015).

La mayoría de los ortodontistas concuerdan en que la eliminación de hábitos orales como succión digital, deglución atípica, uso de chupón y tratamiento ortopédico como clase III o mordidas cruzadas, requiere un tratamiento ortodóntico a edad temprana. La Academia Americana de Ortodontistas recomienda que los niños deben tener una cita para examen de ortodoncia a los 7 años (Ramachandhra et al. 2014). Algunas de las ventajas e inconvenientes de la ortodoncia se citan a continuación:

#### **Ventajas:**

- ▶ Mejorar desarrollo dental y esquelético
- ▶ Minimizar protrusión severa
- ▶ Reducción severa de sobremordida horizontal
- ▶ Generación de un espacio para la erupción de dientes permanentes
- ▶ Modificación de la morfología del músculo problema
- ▶ Reducción de la segunda fase del tratamiento

#### **Desventajas:**

- ▶ Proliferación de *Streptococcus mutans*
- ▶ Retención de partículas de alimento en el aparato
- ▶ Retención de alimento en los dientes.
- ▶ Daño a los tejidos

- ▶ Disminución de pH
- ▶ Elevación de niveles microbianos salivales (Ahmed 2013).

A los pacientes con ortodoncia se les recomienda cepillado manual minucioso en casa debido a la complejidad de eliminar la placa por completo alrededor del aparato ortodóntico (Haerian-Ardakani et al. 2015). La placa dental y el biofilm están hechos de diferentes tipos de bacterias. Algunas de estas, el ‘Streptococcus mutans’, por ejemplo, son las responsables de comer azúcar y convertirlo en ácido que provoca la caries dental.

Es importante considerarla posible contaminación bucal involucrada durante el tratamiento de ortodoncia, para ello el odontólogo debe emplear métodos preventivos para todos los pacientes. La Profilaxis Dental es uno de los métodos más importantes. El bicarbonato de sodio es eficaz en la eliminación de biofilm de las superficies de los dientes, así como de fosas y fisuras. La clorhexidina al 0,12% utilizada como enjuague durante diez minutos antes de la profilaxis, reduce significativamente el número de Unidades formadoras de Colonia (CFU) (Rodrigues et al. 2014).

## ***6.2 Formación de placa en ortodoncia infantil ó el tratamiento ortodóntico infantil***

La microflora oral humana es muy basta. Entre las especies bacterianas conocidas se encuentran más de 700 y están incluidas las de tipo estreptococos como *S. pyogenes*, *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. mutans* y *S. sanguis* entre otros.

El término de placa dental se le conoce a la acumulación heterogénea de una comunidad microbiana rodeada por una matriz intercelular de origen salival y se adhiere a paredes y superficies de las piezas dentales. La adhesión depende de componentes que interactúan entre sí, como la adhesina producida por microorganismos y receptores del tejido oral. Lo antes mencionado, es el mecanismo de acción que confiere al microorganismo la capacidad de agregación y coagregación. Aunque la placa dental se forma naturalmente, la ausencia de higiene oral o la mala higiene, acumula microorganismos por encima de los niveles que son compatibles con la salud oral. La composición de la placa dental,

varía según el tiempo de maduración y la región de la pieza dentaria colonizada (Barrancos, 2006). Dicho de otra manera, existe un desarrollo de biopelícula previo a la placa dental, ésta última llamada así por su madurez y consistencia más firme con respecto a la primera.

La biopelícula consta de componentes en el siguiente orden de aparición: 1) depósito de película adquirida (la saliva y proteínas bañan las superficies dentales), 2) colonización inicial (incorporación de grupos microbianos gram positivo en su mayoría a la película adquirida), 3) crecimiento de la película (a partir de los microorganismos iniciales, se coagregan otros en un tiempo de 8-12 h posterior a la etapa anterior), y 4) remodelación (la microbiota se vuelve compleja debido a las interacciones microbianas). La placa dental al ser una entidad bacteriana proliferante y enzimáticamente activa, por su actividad metabólica, presenta la capacidad de inducir algunas de las enfermedades más comunes en cavidad oral como caries, gingivitis y periodontitis (Mishra et al. 2014).

Leeuwenhoek fue el primero en informar la presencia de bacterias en cavidad oral en 1699. Las bacterias colonizan la cavidad oral dentro de unas pocas horas después del nacimiento (Haerian-Ardakani et al. 2015).

### **6.3 *Streptococcus mutans***

Una vez establecida la película adquirida, las primeras bacterias en colonizar son las del grupo sanguis (*Streptococcus sanguis* tipo I, *Streptococcus gordonii* y *Streptococcus parasanguis*). La presencia de *S. mutans* en esta fase puede ser baja o nula. Es, hasta la colonización inicial, donde azúcares como la sacarosa que abunda en la dieta la proliferación de *S. mutans* quien a su vez produce ácidos orgánicos e inicia la síntesis de mutanos. Estos sirven para adherirse entre sí, así como a la pieza dental. A partir de aquí, se modifica la población microbiana oral y se agregan bacterias como *Actinomyces*, *Streptococcus salivarius*, *S. mutans* y *S. mitis* (Barrancos et al. 2006).

En el caso de *S. mutans* como microorganismo cariogénico, posee una adhesión típica en la cual intervienen mutanos y proteínas superficiales que ayudan a fijar glucanos y glucosiltransferasas. Ello, facilita su absorción promoviendo una acumulación en la película salival. Esta situación es posible en presencia de sacarosa en el medio bucal originando una placa cariogénica (Negróni, 1999).

*S. salivarius* por su parte, predomina en cavidad oral y es uno de los principales productores de una bacteriocina que actúa como inhibidora de sustancias activas frente a otros microorganismos (Santagati et al., 2012).

La placa dental tiene la capacidad de inducir el desarrollo de las enfermedades más comunes que afectan a la cavidad oral como caries, gingivitis, periodontitis, entre otras.

#### **6.4 Ortodoncia en pacientes infantiles**

La ortodoncia y ortopedia dentofacial se encarga del diagnóstico, prevención, intercepción y corrección de la maloclusión incluyendo anomalías musculares y esqueléticas de desarrollo o estructuras orofaciales (Abeleira, 2014).

El tratamiento ortodóntico se designa conforme a las necesidades del paciente pudiendo ser fijo o removible.

La *aparatología fija* está formada por elementos que van cementados en los dientes los cuáles harán la función necesaria y aplicarán fuerza a los órganos dentarios para realizar movimientos, a fin de lograr una alineación en el lugar correcto y adecuando funcionamiento.

La *aparatología removible* puede ser retirada en cualquier momento por el paciente ya sea, para alimentarse o para realizar la higiene bucal. Con estos aparatos se estima una mejoría en oclusión, masticación y habla (Mansor, 2012).



La designación de un tratamiento ortodóntico tiene como origen la maloclusión, misma que se define como una irregularidad de los dientes, maxilares o de una mala posición de los arcos dentales o fuera del rango ideal. Además de esta irregularidad, una maloclusión puede causar problemas periodontales, alteraciones de la función oral como la masticación, la deglución, el habla e inclusive problemas psico-sociales relacionados con la estética dentofacial (Ruhi , 2012).

Por la alta incidencia de pacientes que requieren este tratamiento, es de suma importancia prevenir la generación de condiciones que desencadenen enfermedades como la gingivitis, la caries dental ó la enfermedad periodontal. Dichas condiciones van desde la retención de los alimentos y acumulación de placa dentobacteriana al aparato ortodóntico (convirtiendo los sustratos en sustancias que generarán cambios cualitativos y cuantitativos en la flora microbiana), hasta un cepillado e higiene deficientes, mismos que ponen en riesgo al paciente de padecer cualquiera de las enfermedades antes citadas. Además, el complejo diseño de bandas y brackets de ortodoncia puede crear un ambiente ecológico que facilita la proliferación de especies como *S. mutans* (Marin, 2007).

La colocación de bandas en la ortodoncia preventiva tiende a crear durante el tratamiento, nuevas superficies acumulando placa y el nivel de microorganismos en la cavidad oral. El sitio más común para la acumulación de placa de *S. mutans* es donde se encuentra la banda alrededor de los molares.

### ***6.5 Medidas de higiene oral durante el tratamiento ortodóntico***

La Academia Americana de Odontología Pediátrica (AAPD, 2012) recomienda que los niños deben tener una evaluación oral en los primeros 6 meses de la erupción del primer diente primario, o bien a los 12 meses de edad. La Asociación Dental Americana (ADA) en conjunto con la AAPD, recomiendan el cuidado dental infantil desde los 12 meses de edad ligado con la educación que también reciben al respecto los padres y/o cuidadores; con el único fin de prevenir la caries temprana de la infancia.

La salud oral no es ajena a la salud en general, los esfuerzos para promover la buena salud oral deben tratarse integralmente vinculando los servicios de atención primaria para los niños. La caries en niños se puede prevenir mediante la fluoración del agua, aplicación tópica de fluoruro y selladores, el uso de pastas que contengan flúor, a través de una alimentación apropiada (baja en carbohidratos), así como una higiene oral de rutina. El agua fluorada es la medida más efectiva en la prevención de la caries. La fluoración por sí misma no erradica la enfermedad, esto se constata con niños que viven en comunidades con agua fluorada. Por tanto, algunas recomendaciones son consideradas:

1. Realizar un examen periódico del riesgo de caries dental en base a: la edad del niño, los factores biológicos como la mala higiene, apiñamiento, entre otros; así como también hallazgos clínicos.
2. Contar con protocolos de manejo clínico, basado en la edad del niño, el riesgo de caries, y el nivel de cooperación del paciente / padre. Los protocolos proporcionan criterios para la determinación del tipo de caries dental, la frecuencia de la atención diagnóstica, preventiva y reparadora para el manejo de pacientes.
3. Por último y el menos usado entre los pacientes infantiles, es el uso de enjuagues bucales antimicrobianos. Mismo si desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la higiene oral, mediante la reducción de carga microbiana que conforma la placa dental.

### ***6.6 Los probióticos como herramienta en la salud bucal***

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) conocidas como probióticos, son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas generan beneficios para la salud del individuo (Rebolledo et al,2013). Una característica que confiere ese beneficio se encuentra ligado al metabolismo de las BAL. Tienen la capacidad de degradar

compuestos orgánicos como el caso de azúcares, y producir sustancias de interés con bajo peso molecular, de tipo peptídico o proteico (bacteriocinas) y con características antimicrobianas.

En su origen, las LAB han permitido que alimentos naturales se conserven a través del proceso de fermentación (productos lácteos, cárnicos, bebidas fermentadas, etc). La inhibición de microorganismos patógenos en la prevención del deterioro de los alimentos e incrementando su vida de anaquel; se atribuye a la producción de compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, antibióticos, entre otros (Kaktcham , 2011; Sarika , 2010).

En la actualidad, está bien establecido que algunas de las infecciones y trastornos del cuerpo humano como el síndrome del intestino irritable en donde además del dolor se genera una diarrea inducida por antibióticos; pudiera tener su origen en la deficiencia de la microflora intestinal. Aquí es en donde los probióticos son considerados como estrategia de control de enfermedades causadas por microorganismos.

Las LAB, especialmente las de tipo *Lactobacillus*, son los más utilizados debido a la percepción de que son miembros deseables ó tolerantes de la microflora intestinal pudiendo además reestablecerla (Brunser et al,2013).

Especies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* y algunas *Saccharomyces*, han sido reconocidos como probióticos dadas sus propiedades benéficas como ayudar al sistema inmunológico, flora intestinal. Entre otros; (Cannon et al. 2013).

*Lactobacillus casei* Shirota es una bacteria láctica aislada y cultivada por vez primera en 1930 por el doctor Monoru Shirota. Sus estudios en el campo de la medicina preventiva fueron orientados a evitar enfermedades infecciosas ayudando así al bienestar de las personas (Boletín, 2013). Se trata de un probiótico anaerobio, Gram positivo que habita en la boca y el intestino humano. Al igual que todas las bacterias lácticas además de producir ácido láctico, es muy utilizada en la industria de los lácteos para la elaboración

de alimentos funcionales o probióticos. Tiene gran capacidad para modular la composición y la actividad metabólica de la flora intestinal y mejorar el sistema inmunológico humano sano. Puede sobrevivir a través del tracto gastrointestinal posterior a su consumo ya que presenta propiedades acidúricas y acidogénicas.

La denominación de producto lácteo fermentado, se refiere a aquellos productos que en su elaboración involucran la presencia de BAL y den como resultado una leche fermentada, como es el caso del Yakult®, un producto que emplea *Lactobacillus casei* Shirota como iniciador de una fermentación a partir de leche descremada, sacarosa y glucosa. Cada envase de Yakult® contiene  $1 \times 10^8$  UFC/mL de *L. casei* Shirota (LcS), (Sutula et al. 2012). Este microorganismo se aisló del tracto intestinal de un infante y fue sometido a pruebas de resistencia contra jugos gástricos y secreciones biliares, de tal forma que es capaz de alcanzar viva el intestino delgado posterior a su ingesta (boletín Yakult, 2000). *L. casei* Shirota no presenta genes resistentes a antibióticos y nunca se han aislado cepas de *L. casei* de sitios de infección intestinales. Así mismo, presenta interacciones con otras bacterias del tracto digestivo.

Existen diversos estudios en donde se ha recurrido al uso de bacterias lácticas, como parte de los componentes de un alimento en tanto que vehículo de administración, para estudiar la inhibición o reducción de patógenos orales como *S. mutans*.

En un segundo estudio efectuado por Ashwin , (2015), se evaluó el riesgo de caries basado en los niveles salivales de *S. mutans* en niños de la misma edad que el estudio precedente. En este estudio se partió de una mezcla probiótica compuesta por *Bifidobacterium lactis* Bb-12 y *Lactobacillus acidophilus* La-5, y contenida en un helado como vehículo. Al igual que en el estudio anterior, se observó una reducción significativa ( $P < 0.001$ ) del patógeno cariogénico.

Jothika et al., (2015) (42), realizó un estudio para determinar la eficacia a corto plazo de un enjuague bucal probiótico respecto a un enjuague antiséptico bucal de clorhexidina y la aplicación de fluoruro de sodio contra *S. mutans*.

Las ventajas de usar cepas probióticas son que las cepas bacterianas presentes en ellas no son dañinas para la cavidad oral, no existe el problema de la resistencia a los antibióticos y no existen toxicidades comprobadas relacionadas con su uso. En su publicación Jothika publica los siguientes resultados con el uso de enjuague bucal probiótico: los recuentos medios de colonias fueron 1.26 UFC / ml al inicio del estudio, 3.27 UFC / ml el día 7, 4.92 UFC / ml el día 14 y 8.71 UFC / ml el día 30 día. Hubo una disminución sostenida en el recuento de bacterias incluso después del día 14 hasta el día 30 de uso del enjuague bucal probiótico. (21)

Cuando se comparó el enjuague bucal probiótico con los enjuagues con clorhexidina y fluoruro de sodio, el recuento medio de colonias de *S. mutans* se redujo los días 14 y 30. Entre los tres enjuagues bucales utilizados, las muestras de enjuague bucal probiótico dieron el menor valor medio de UFC. Pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los 3 enjuagues. Jothika concluyo que se deben realizar más estudios en el futuro para analizar los efectos beneficiosos del enjuague bucal probiótico utilizado durante un período más prolongado en la reducción del nivel oral de *S. mutans* .

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 Universo del Estudio**

Es un estudio comparativo, descriptivo, abierto, experimental. Prospectivo y longitudinal.

De acuerdo a un análisis de prevalencia, se dispuso de una muestra total de **N = 24** aparatos ortodónticos retirados de **pacientes infantiles de 9-13 años de edad** que acudieron a la Clínica de Odontopediatría de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León; y que hubieran terminado el tratamiento de **ortodoncia fija**.

#### **7.1.1 Criterios de selección**

Criterios de Inclusión: Pacientes infantiles de 9 a 13 años de edad con aparatología ortodóntica fija.

Criterios de exclusión: Pacientes que padezcan alguna enfermedad sistémica o crónica y/o que consuman cualquier medicamento incluso antibiótico., Pacientes que se les haya decementado el aparato.

### **7.2 Aislamiento, activación y conservación de *Lactobacillus Casei* Shirota**

*L. casei* Shirota en tanto que activo biológico de la bebida fermentada del Yakult® fue utilizada como base de activo biológico en este estudio para determinar su actividad antimicrobiana.

El contenido total (80 mL) de un Yakult® normal y de uno light se distribuyó en partes iguales en dos tubos falcon estériles de 50 mL. El procedimiento se realizó dentro de una campana de bioseguridad (Labnoco, Clase II-A2) limpiada previamente con alcohol al 70% y expuesta a la luz ultravioleta (15 min).; La separación de *L. casei* Shirota se realizó por centrifugación a 4000rpm, 20°C por 5-10 minutos (Eppendorf 5810-R),

**Diagrama 1.** El sobrenadante que contenía los residuos grasos, proteínas, azúcares disueltos y el resto de los ingredientes de la formulación de la bebida fermentada, fue desechado (**Tabla 1**).

El paquete celular o pellet que contiene las células de *L. casei* Shirota se lavó dos veces con solución salina (NaCl) estéril al 0.9%, en las condiciones de centrifugación antes descritas.

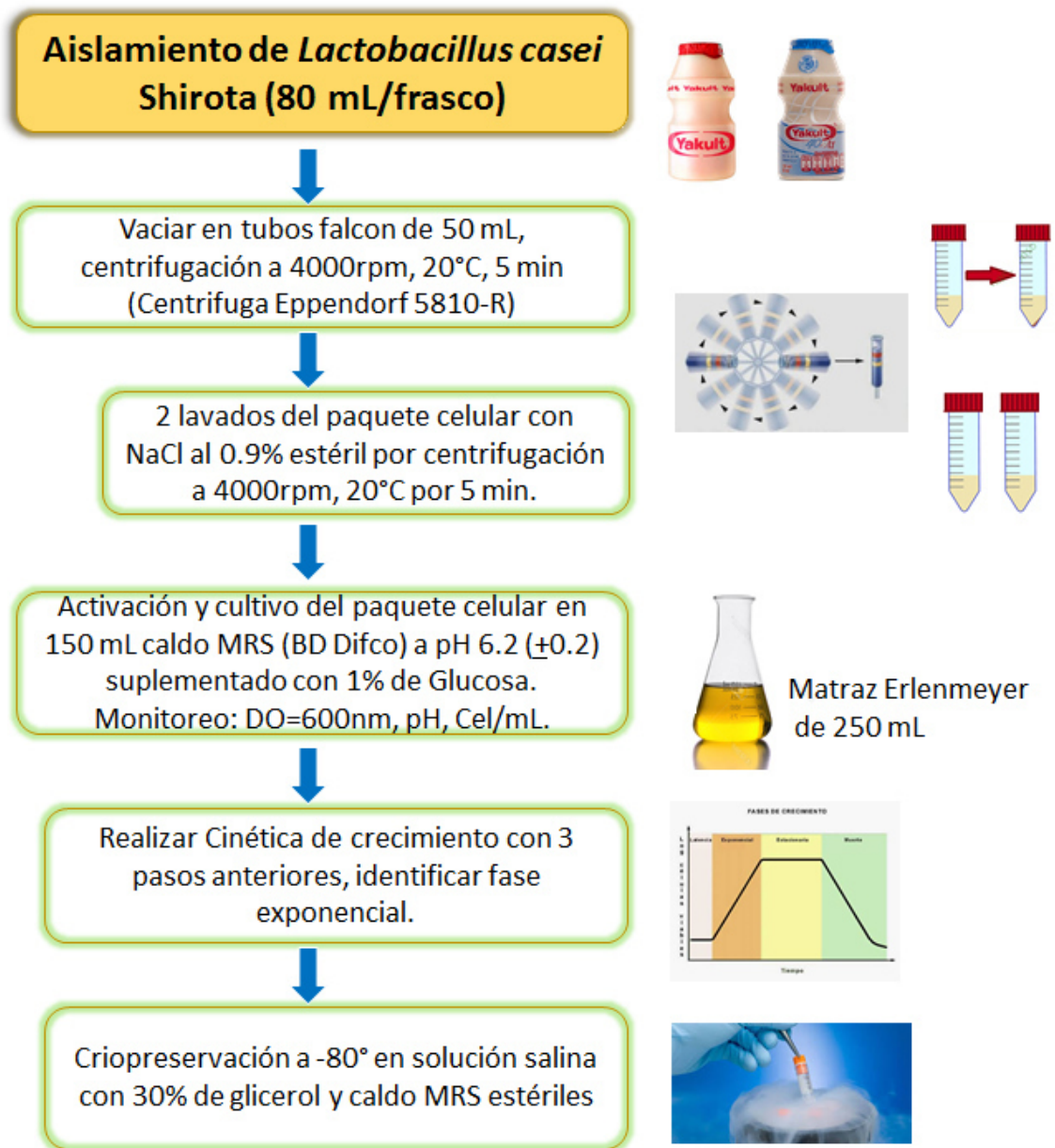
El paquete celular aislado y lavado de *L. casei* Shirota fue activado en 100 mL de caldo Man Rogosa y Sharpe (MRS, BD Difco Francia) a pH 6.2 ( $\pm 0.2$ ) contenido en un matraz Erlenmeyer de 250 mL previamente esterilizado por autoclave 15 min a 120 °C y 15 libras de presión (All-American, Hillsville, USA) y suplementado con 1% de glucosa. Se incubó a 37°C de 24-48 h en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific Lab-Line Incubator, USA). La viabilidad celular fue monitoreada observando la turbidez del cultivo a través del matraz.

La conservación de *L. casei* Shirota se realiza en criotubos de 2 mL. Las células cultivadas y lavadas se suspenden en solución salina con 30% de glicerol y caldo MRS estériles en una proporción de 1:1. Se esperó de 5-10 min antes de resguardar los criotubos a -80°C (Ultracongelador Revco, EUA), con el fin de permitir que el glicerol penetre en las células.

### **7.3 Cinética de Crecimiento**

Una vez activado *L. casei* Shirota,  $6 \times 10^7$  células/mL fueron inoculadas en 150 mL de caldo MRS suplementado con 1% de glucosa, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, incubado a 37°C de 24-48 h en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>. A partir del tiempo de inoculación (0 h) y cada 2h por un lapso de 24-36 h se tomaron 2 mL de muestra, para monitorear la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nanómetros, la concentración celular (DO<sub>600nm</sub>, Espectrofotómetro SmartSpec, BioRad), el pH (potenciómetro Corning, modelo 313), y con la finalidad de descartar cualquier tipo de contaminación en el cultivo e incluso presencia de glóbulos grasos que pudieran interferir en el crecimiento, se utilizó una alícuota de 100 µL para ser observada y

observar al microscopio con un aumento de 100X y aceite de inmersión (VanGuard, EUA). La activación como la cinética de crecimiento fueron realizados por duplicado.



**Diagrama 1.** Procedimiento que indica la manipulación del probiótico *Lactobacillus casei* Shirota aislado de frascos de Yakult® comercial (normal y light) para determinar la viabilidad, cinética de crecimiento, identificación de fase exponencial de crecimiento y conservación por criopreservación.

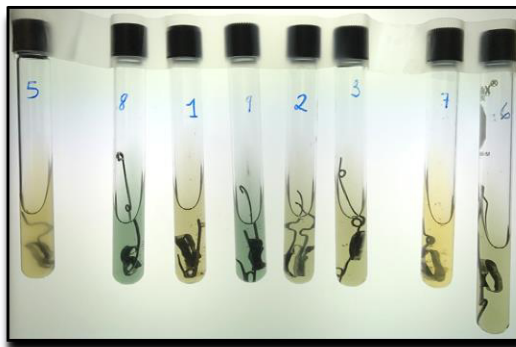


#### 7.4 Aislamiento e identificación de *Streptococcus mutans* spp. en aparatología ortodóntica infantil:

Cada aparato retirado de la boca del paciente fue dispuesto en vasos de plástico con tapa conteniendo 60 mL de solución salina estéril (NaCl al 0.9%) y conservados en refrigeración (4°C) hasta su utilización (*Diagrama 2*).

Los vasos con los aparatos ortodónticos en solución salina fueron agitados vigorosamente en un vortex por 1 min, con el fin de sacudir lo más posible la carga microbiana adherida en el aparato.

10 mL de la suspensión obtenida fue centrifugada a 4000 rpm, por 5 min, a 20°C (Centrifuga Eppendorf 5810-R). El paquete celular se utilizó para inocular. 20 mL de caldo estéril de Trypticaseína de Soya (TS,) (BD Bioxon) contenido en tubos de ensayo de vidrio. En un segundo tubo de ensayo se dispuso la mitad del aparato previamente cortado con pinzas, para estimular la proliferación de microorganismos aún presentes en la aparatología ortodóntica infantil, tal como se muestra en la *Imagen 1*.



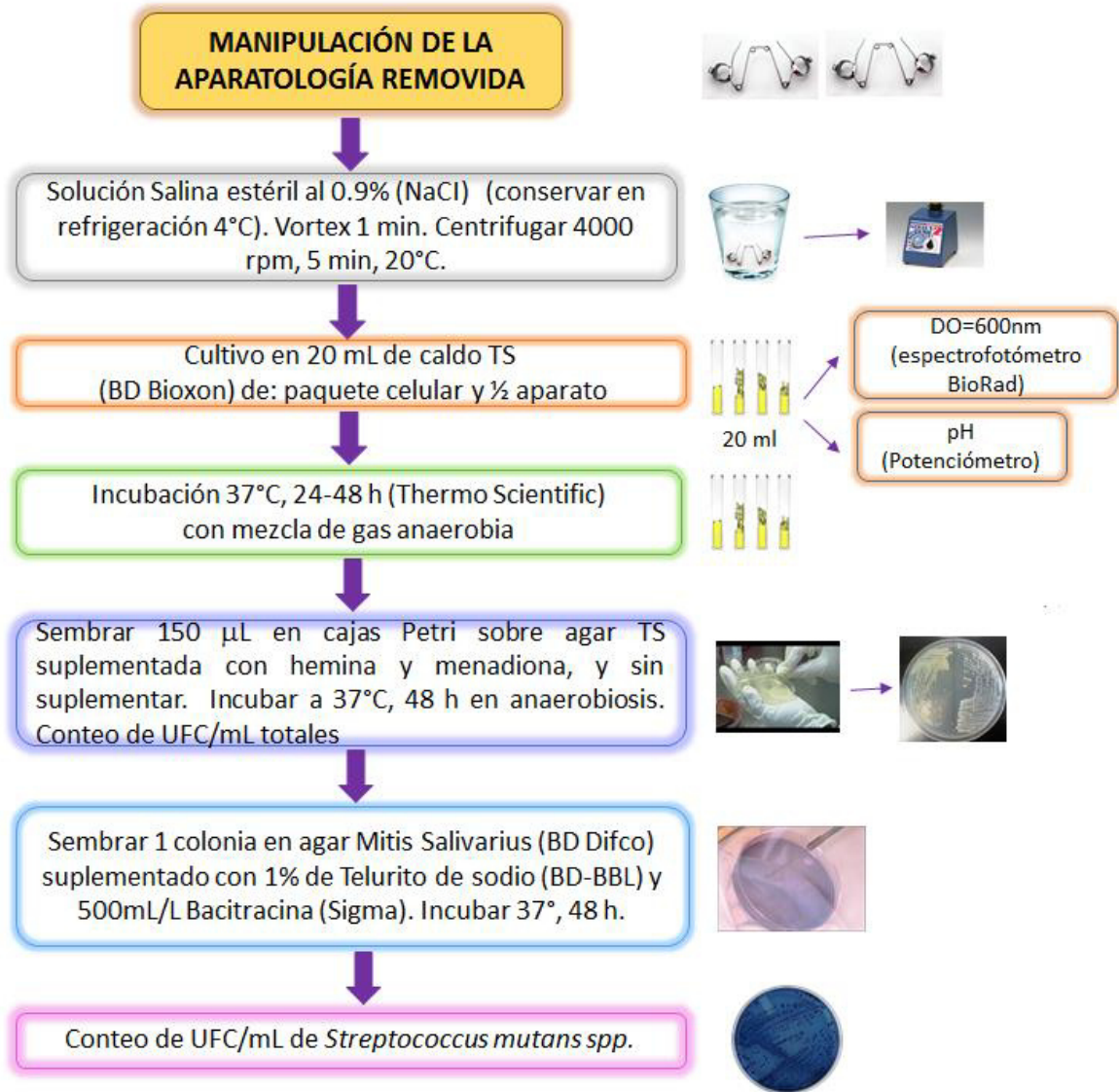
**Imagen 1.** Representación de aparatos ortodónticos cortados a la mitad y dispuestos en caldo estéril de Trypticaseína de soya para estimular el crecimiento de microorganismos patógenos presentes adheridos.

Posterior a ello los tubos fueron incubados a 37°C de 24 a 48 horas (Thermo Scientific Lab-Line Incubator, EUA) en presencia de una mezcla de gas anaerobia H<sub>2</sub> (20.13 %), CO<sub>2</sub> (10.13 %) y N<sub>2</sub> (69.74 %) (Praxair, Mexico). Transcurrido el tiempo, se tomó una

alícuota para medir la Absorbancia (600nm), la concentración celular (Células/mL) y el pH.

De cada tubo se tomaron 100 mL de cultivo y se sembró en cajas Petri sobre agar TS suplementado con Hemina (5 mg/L) y Menadiona (1 mg/L) para la determinación del recuento total de anaerobios desarrollados; y también es sembrado en agar TS sin suplementar. Se incubó a 37 °C por 48 h en condiciones anaerobias. El mismo procedimiento se realizó con agar TS sin suplementar.

**Es importante destacar, que únicamente** en las cajas en las que se observó el desarrollo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC), se realizó la transferencia de 1 colonia sobre cajas Petri con agar Mitis Salivarius (BD Difco). Se trata de un medio previamente suplementado con Telurito de sodio (1%) (BD-BBL) para estimular el desarrollo de *S. mutans spp.* en el caso de estar presente en la muestra, y Bacitracina (500 mL/L) (Sigma) que excluye la proliferación de bacterias distintas a la de interés. El sembrado se realizó por estría con un asa bacteriológica estéril y se incubó en las condiciones antes descritas. Un conteo de las Unidades Formadoras de Colonia por mililitro (UFC/mL) tanto de la carga microbiana total como de *S. mutans spp.*, aislado fue realizado.



**Diagrama 2.** Procedimiento para la conservación y manipulación de aparatos ortodónticos infantiles removidos después del tratamiento; así como para la determinación de las UFC/mL de carga microbiana total y la presencia de *Streptococcus mutans*.

### **7.4.1 Tinción de Gram**

Mediante esta tinción diferencial empleada en microbiología para la visualización de bacterias, se permitirá distinguir morfológicamente la carga microbiana presente en la aparatología ortodóntica infantil aislada. El procedimiento de tinción se realizó como sigue: a partir de UFC desarrolladas en agar Trypticaseína de Soya así como de UFC provenientes de agar Mitis Salivarius, se tomó una muestra representativa para realizar el extendido con un asa bacteriológica estéril sobre un porta objetos previamente limpiado con alcohol al 70%. La muestra se seca con fuego haciendo pasar cuidadosamente la flama por debajo del cubre objeto. Enseguida se fija mediante metanol exponiéndola durante 1 minuto. Se agregó solución azul violeta para exponerse durante 1 un minuto, se enjuagó con agua destilada para enseguida, agregar lugol y dejar la reacción durante 1 minuto aproximadamente. Se agregó solución de alcohol-acetona (proporción 70:30) y se mantuvo entre 5 y 30 segundos según la concentración del reactivo (parte crítica de la coloración) antes de enjuagar con agua. En este paso únicamente los microorganismos Gram- se decoloran y los Gram+ adquirirán una coloración violeta/morado. Finalmente se realizó una tinción de contraste agregando safranina o fucsina básica al 25% y se mantuvo la reacción por 1 minuto antes de lavar levemente con agua. Este tinte dejó de color rosa/rojizo las bacterias Gram-.

Se colocó un cubreobjetos sobre la muestra fijada y teñida (pegado por las esquinas con barniz de uñas), se colocó una gota de aceite de inmersión y se observó en el microscopio de campo claro con un objetivo de 100X (VanGuard, EUA).

### **7.5 Actividad antimicrobiana de *L. casei* Shirota**

De acuerdo a lo establecido en la cinética de crecimiento (punto 6.2), la activación de *L. casei* Shirota se realizó a una  $Abs_{600nm}=0.2$  en la escala de McFarland. Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de caldo MRS a pH 6.2 ( $\pm 0.2$ ) estéril en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> e incubado a 37 °C hasta alcanzar la fase exponencial logarítmica (~23-24 h). Enseguida se recuperó el sobrenadante por centrifugación a

27°C, 4,000 rpm por 5-10 minutos en tubos falcon de 50 mL mismo que se reparte en alícuotas de 15 mL en otros tubos falcon estériles, tal y como se muestra en el **Diagrama 3**.

Por otra parte, los 24 frascos que contenían cada uno solución salina y el aparato ortodóntico respectivo se agitaron 5 segundos en un vortex, con la finalidad de homogenizar la posible carga microbiana que se encuentre precipitada y/o en el aparato ortodóntico.

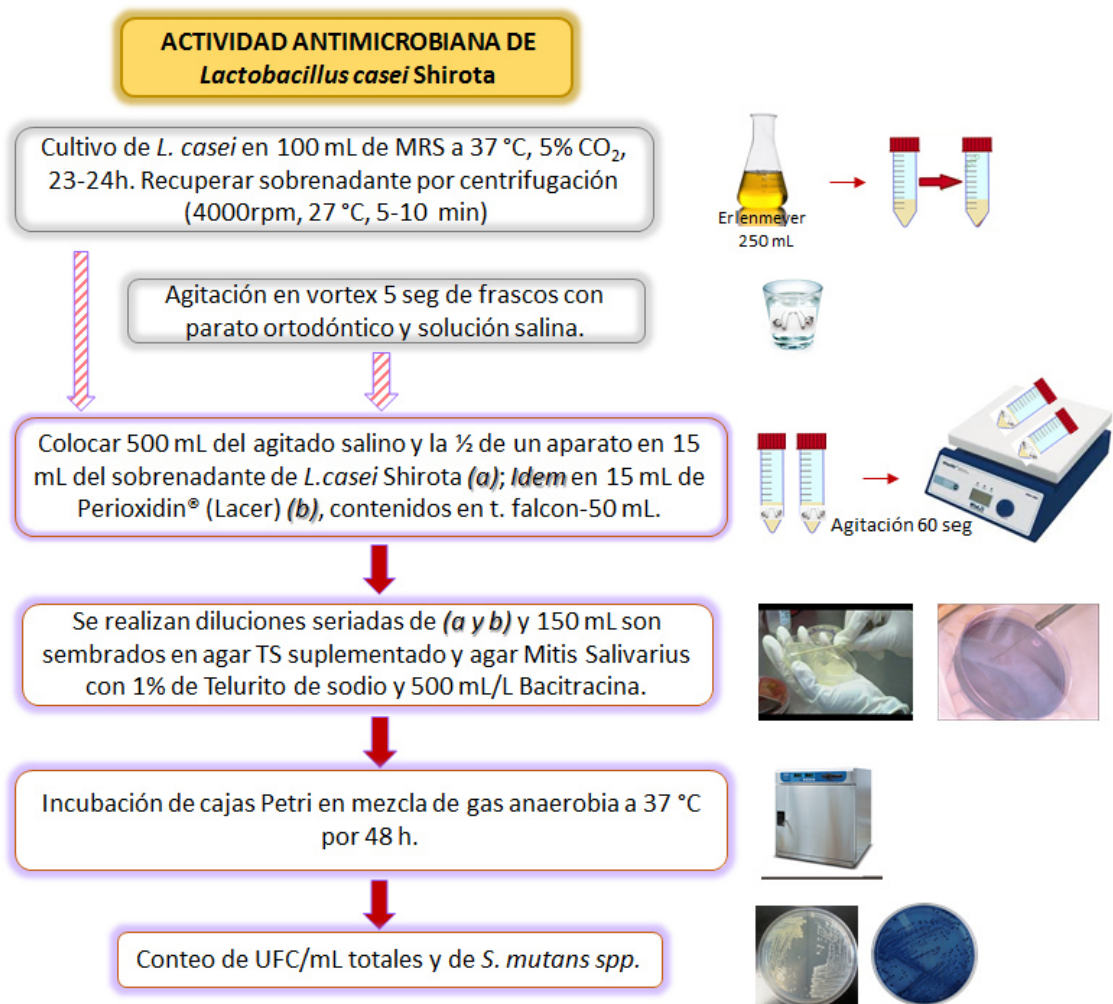
**Grupo experimental\_** 500 microlitros de la suspensión homogenizada y la mitad del aparato correspondiente fueron dispuestos por separado en tubos falcon estériles conteniendo 15 mL de sobrenadante de un cultivo de *L. casei* Shirota, *Imagen 2*. Ambos tubos se colocaron en una placa con agitación por 60 segundos.

**Grupo control positivo\_** Al igual que en el párrafo anterior, se tomaron 500 µL de suspensión homogenizada y la otra mitad del aparato ortodóntico, ambos fueron dispuestos por separado en tubos falcon estériles conteniendo 15 mL de Perioxidin® (Lacer) como control antimicrobiano, ver *Imagen 2*. Ambos tubos se colocaron en una placa con agitación por 60 segundos. Conforme a las especificaciones del fabricante. Para ambos grupos, el procedimiento se realizó por duplicado.



**Imagen 2.** Representación fotográfica de un aparato ortodóntico cortado previamente a la mitad. El tubo color rosa contiene una mitad de aparato sumergido en el colutorio Perioxidin® como control positivo, y el tubo en color amarillo contiene la otra mitad sumergida en sobrenadante del cultivo *L. casei* Shirota.

Posterior a la agitación de las muestras suspendidas en *L. casei* Shirota ó Peroxidín®, se tomaron alícuotas y fueron diluidas de forma seriada de 1:100, 1:1000 y 1:10,000. De cada dilución se tomaron 150 mL para sembrar en cajas Petri agar de TS suplementado con hemina (5 mg/mL) y menadiona (1 mg/mL) para determinar las UFC/mL totales. Un volumen igual se utilizó para sembrar en cajas Petri agar Mitis Salivarius suplementado previamente con Telurito de sodio (1%) para estimular el desarrollo de *S. mutans spp.*, y Bacitracina (500 mL/L) que excluye la proliferación de bacterias distintas a la de interés. Las cajas fueron incubadas a 37°C por 48 horas (Thermo Scientific Lab-Line Incubator, EUA) en presencia de una mezcla de gas anaerobia H<sub>2</sub> (20.13 %), CO<sub>2</sub> (10.13 %) y N<sub>2</sub> (69.74 %) (Praxair, Mexico).



**Diagrama 3.** Procedimiento para la determinación del efecto antimicrobiano del probiótico *Lactobacillus casei* Shirota aislado (ver Diagrama 1) sobre el desarrollo de

flora microbiana total como del patógeno cariogénico *S. mutans spp.* presentes en aparatología ortodóntica retirada de pacientes infantiles.

## 7.6 Análisis Estadístico

Se utilizó para hacer el análisis de los datos prueba *T-student* para dos muestras suponiendo varianzas iguales para así determinar las diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos empleados. Se registraron los datos en Microsoft Excel y se analizaron mediante el paquete Statistical Product and Service Solutions (SPSS).

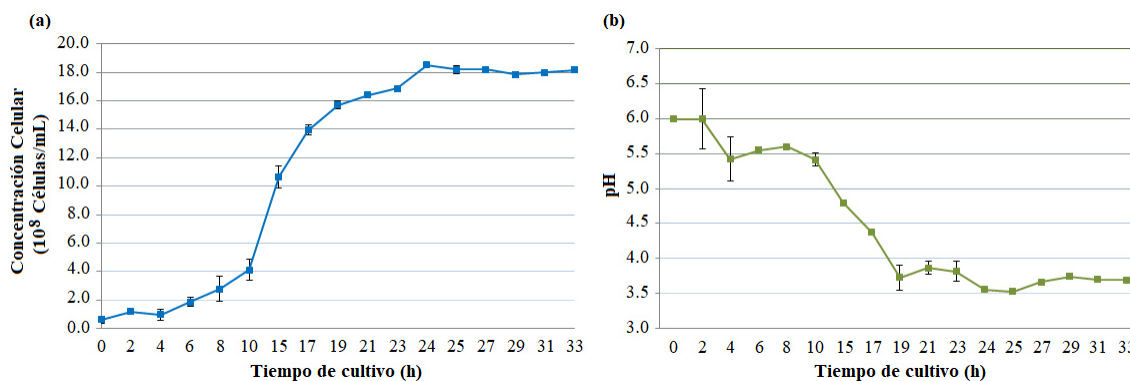
La fórmula para calcular la muestra de prevalencia fue  $Z_{\alpha,22} * p * (1-p) / (\delta^2)$ , utilizando el programa estadístico SPSS-STATA-13 (Serial-Nr. 1910531247), y un valor de significancia  $p < 0.05$ . El estudio incluyó 24 aparatos sin previo tratamiento para la determinación de UFC/mL totales y presencia de *S. mutans spp.* El sobrenadante de un cultivo de *Lactobacillus casei* Shirota aislado previamente de un frasco de leche fermentada de Yakult®, se utilizó como agente antimicrobiano de estudio ó experimental. El enjuague bucal Perioxidin® (Lacer) que contiene 0.12% de clorhexidina como activo en el desarrollo de placa dental, se utilizó como sustancia de control antimicrobiano. Se utilizó la prueba *T-student* para dos muestras suponiendo varianzas iguales y así determinar las diferencias estadísticas entre el tratamiento de estudio y el de control empleados.

En hojas de cálculo de Excel 2016 se registraron los resultados. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. El valor promedio y la desviación estándar fueron calculadas para graficar, analizar e interpretar los resultados.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Aislamiento de *Lactobacillus casei* Shirota y viabilidad

El primer objetivo establecido en este estudio fue determinar el desarrollo de *Lactobacillus casei* Shirota, dado que son microorganismos que se encuentran vivos en la bebida fermentada de Yakult. Posterior a una serie de etapas en las que se estandarizó el aislamiento de *L. casei* Shirota de la bebida fermentada por centrifugación y lavados con solución salina estéril al 0.9% a fin de eliminar el contenido de azúcar y carbohidratos de la bebida, se logró cultivar en medio MRS específico para lactobacilos. De aquí se logró realizar su cinética de crecimiento y conocer su viabilidad para realizar estudios posteriores de actividad antimicrobiana. En la **gráfica 1a**, se muestra claramente el desarrollo de la bacteria probiótica mediante su cinética de crecimiento; aquí se observó una fase lag o de adaptación rápida de aproximadamente 4 horas, momento a partir del cual la fase exponencial de crecimiento tuvo lugar de forma lenta durante las siguientes 6 horas, y fue a partir de las 10 horas de haberse cultivado en MRS que se incrementó exponencialmente su crecimiento hasta alcanzar  $18.5 \times 10^8$  células/mL al cabo de 24 horas con una desviación estándar de  $(\pm 0.14 \times 10^8)$  células/mL, siendo este punto la fase logarítmica de crecimiento. En este punto logarítmico, el pH alcanzado en el medio fue de 3.7 ( $\pm 0.03$ ), **gráfica 1b**.



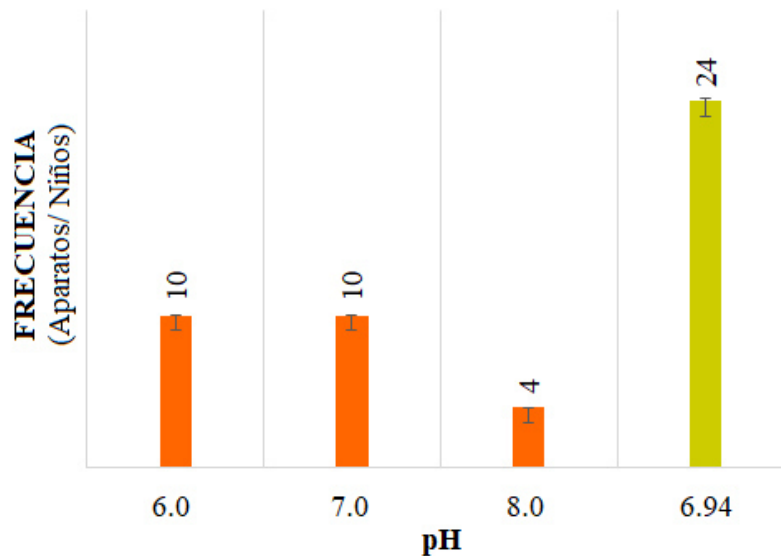
**Gráfica 1.** (a) Cinética de crecimiento de *Lactobacillus casei* Shirota aislada de la bebida fermentada Yakult®, y (b) su correlación con el comportamiento del pH en el cultivo.



De forma global se puede apreciar una correlación entre el crecimiento de *L. casei* Shirota respecto a la acidificación del medio de cultivo. Esta baja en el pH es normal y tiene su explicación en el metabolismo de nutrientes (carbohidratos principalmente) que contiene el medio de cultivo MRS, que son convertidos por las bacterias lácticas, en ácidos orgánicos como es el caso del ácido láctico.

## 8.2 Medición de pH en boca y aparatos aislados

En este estudio se analizó pH bucal en 24 pacientes que acudieron a la Clínica de Odontopediatría de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León los cuales llevaron tratamiento con ortodoncia fija, **Gráfica 2**. Se le retiraron los aparatos y previo a la determinación de UFC totales y de *S. mutans* presentes, se determinó el pH, un parámetro importante a considerar como indicador de la presencia baja o abundante del patógeno cariogénico.



**Gráfica 2.** Representación gráfica del pH de saliva en boca de niños con aparatología (■), y pH promedio de la solución salina conteniendo cada aparato aislados, de una muestra total N=24 (■).

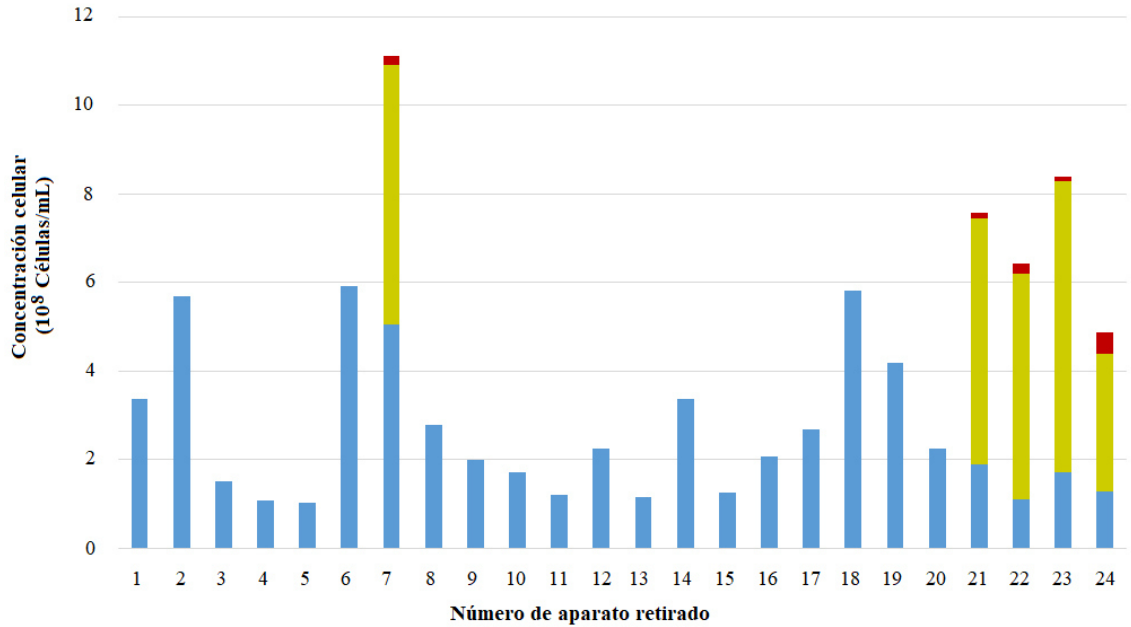
En la **gráfica 2** se ilustra el pH medido con tiras indicadoras, en boca de los niños aparatología ortodóntica (misma muestra N=24, pero diferentes niños a los que se les retiró la aparatología utilizada en el estudio). Para esta población infantil con aparatología en boca, se encontró una media en pH de 6.75, con una desviación estándar de  $\pm 0.74$ . De aquí, 10 pacientes tuvieron un pH de 6 equivalente a un 41.7% de la población, otros 10 pacientes un pH de 7 (41.7%) y solo 4 un pH de 8 (16.7%).

En un segundo plano sobre la misma figura, se muestra el pH promedio de los aparatos de ortodoncia fija después de ser retirados y resguardados en solución salina. La media de pH es de 6.94 con una desviación estándar de  $\pm 0.26$ . En donde 8 aparatos que representan el 33.3% de la muestra total, tuvieron un pH de  $6.63 \pm 0.18$  mientras que los 16 aparatos restantes (66.7%) su pH fue  $7.10 \pm 0.07$ .

### **8.3 Actividad antimicrobiana de *Lactobacillus casei* Shirota**

#### ***8.3.1 Cuantificación de la carga total microbiana***

Para determinar la actividad antimicrobiana del probiótico *L. casei* Shirota aislado de la bebida fermentada de Yakult® y posteriormente cultivado hasta alcanzar su fase exponencial logarítmica (24 h); fue necesario determinar previamente la carga microbiana total que contenía cada uno de los 24 aparatos de ortodoncia aislados de cada paciente infantil, tal y como se muestra en la **gráfica 3**. En color *azúl* se puede identificar que en todos los aparatos hubo presencia de carga microbiana, presentando una concentración celular promedio de  $2.6 \times 10^8 \pm 1.54$  cél/mL, teniendo 7 de los aparatos una carga microbiana de entre  $3.0$  a  $5.9 \times 10^8$  cél/mL.



**Gráfica 3.** Concentración celular ( $10^8$  células/mL) correspondiente a la carga total microbiana contenida en cada aparato de ortodoncia, desarrollada en caldo de tripticaseína de soya: sin tratamiento (■), con tratamiento en contacto con *L. casei* Shirota (■) y en contacto con Peroxidín como control antimicrobiano (■).

Una vez determinada la carga microbiana total para cada aparato, se dispuso la mitad de un aparato en contacto con el enjuague bucal Peroxidín libre de alcohol que contiene clorhexidina al 0.12% como activo de la placa dental y su respectiva mitad con un cultivo de *L. casei* Shirota. En el caso de las mitades de cada aparato tratado con Peroxidín, la efectividad antimicrobiana fue igual que con *L. casei* Shirota, es decir hubo nula proliferación microbiana en el 79% de las mitades tratadas, coincidiendo con las respectivas 5 mitades (21%) del probiótico en donde hubo aún un posterior desarrollo microbiano. En los siguientes aparatos hubo una concentración celular correspondiente a:  $0.21 \times 10^8$  cel/mL (aparato 7),  $0.13 \times 10^8$  cel/mL (aparato 21),  $0.23 \times 10^8$  cel/mL (aparato 22),  $0.12 \times 10^8$  cel/mL (aparato 23) y  $0.49 \times 10^8$  cel/mL (aparato 24). La eficiencia del sobrenadante de *L. casei* Shirota y del enjuague Peroxidín sobre el desarrollo de la carga total microbiana se vio reflejada hasta en un 90.5% y 95.2% respectivamente. De forma global, estos resultados arrojan un valor de  $p > 0.05$ , lo que significa que si hay diferencia significativa entre la actividad antimicrobiana del Peroxidín y los aparatos

que no recibieron tratamiento.

En lo que a la segunda mitad tratada con *L. casei* Shirota respecta, se tuvo una efectividad antimicrobiana idéntica que cuando sus 19 mitades correspondientes fueron tratadas con el enjuague bucal, siendo un 0% de desarrollo microbiano en el 79% de las mitades de aparatos aislados. Mismo si hubo una coincidencia en las 5 mitades de los aparatos a los tratados con el Perioxidin, la concentración celular desarrollada después de tratarse con el cultivo de la bacteria probiótica, fue mayor a aquella tratada con el enjuague bucal. En la mitad del aparato número 7 se cuantificaron  $5.9 \times 10^8$  cel/mL, en el 21 con  $5.6 \times 10^8$  cel/mL, en el 22 con  $5.1 \times 10^8$  cel/mL, en el 23 con  $6.6 \times 10^8$  cel/mL y en el 24 hubo  $3.1 \times 10^8$  cel/mL. Por tanto, la eficiencia sobre el desarrollo de *S. mutans spp.* en esta segunda resiembra, arrojó un 100% de efecto antimicrobiano para ambas sustancias. De acuerdo al análisis estadístico de varianza, si hay diferencia significativa entre la actividad antimicrobiana de *L. casei* Shirota y los aparatos ortodónticos sin tratamiento, con  $p \geq 0.05$ .

Comparando los resultados obtenidos con el probiótico y el enjuague bucal, si hay una diferencia significativa entre la actividad antimicrobiana de *L. casei* Shirota y aquella del Perioxidin, con  $p > 0.05$ , esto significa que el Perioxidin es más efectivo.

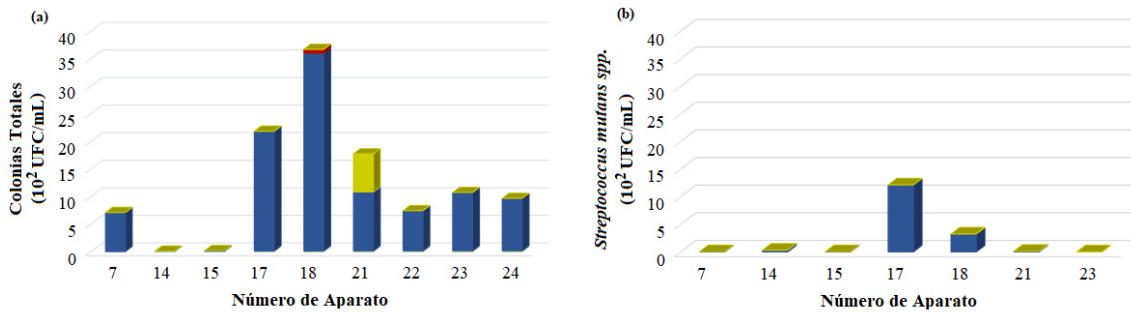
A nivel de la carga microbiana total encontrada en cada uno de los 24 aparatos, y respecto a los 5 aparatos en donde después de haber recibido tratamiento hubo desarrollo microbiano, se establece que si hay diferencia significativa entre los casos de estudio (sin tratamiento, y tratados con el Perioxidin y *L. casei* Shirota respectivamente).

### **8.3.2 Cuantificación de las UFC de *Streptococcus mutans spp.***

Un cultivo nutritivo de agar Tripticaseína de Soya suplementado con hemina y menadiona que favorecen el aislamiento de microorganismos anaerobios, permitió en este estudio contabilizar en cajas de Petri las UFC totales/mL que podrían contener cada uno de los 24 aparatos removidos antes y después del tratamiento con Perioxidin y el probiótico de estudio *L. casei* Shirota. En la gráfica 4(a), se muestran los aparatos 7, 14, 15, 17, 18, 21-24 donde hubo crecimiento de UFC/mL totales, resultando los aparatos 17 y 18 con mayor desarrollo de colonias totales sin tratamiento con un monto de  $21.72 \times 10^2$

UFC/mL y  $35.88 \times 10^2$  UFC/mL respectivamente. Para el resto de aparatos un promedio de colonias desarrollado fue de  $90.12 \times 10^2$  ( $\pm 1.67$ ) UFC/mL. Después de que los nueve aparatos fueron tratados con el colutorio Perioxidin como control, el desarrollo de colonias totales se cuantificó únicamente en el aparato número 18 (66 UFC/mL), mientras que al recibir tratamiento con *L. casei* Shirota el desarrollo de colonias totales se manifestó únicamente en dos aparatos siendo uno también el número 18 con solo 2.35 UFC/mL y el número 21 con  $6.90 \times 10^2$  UFC/mL.

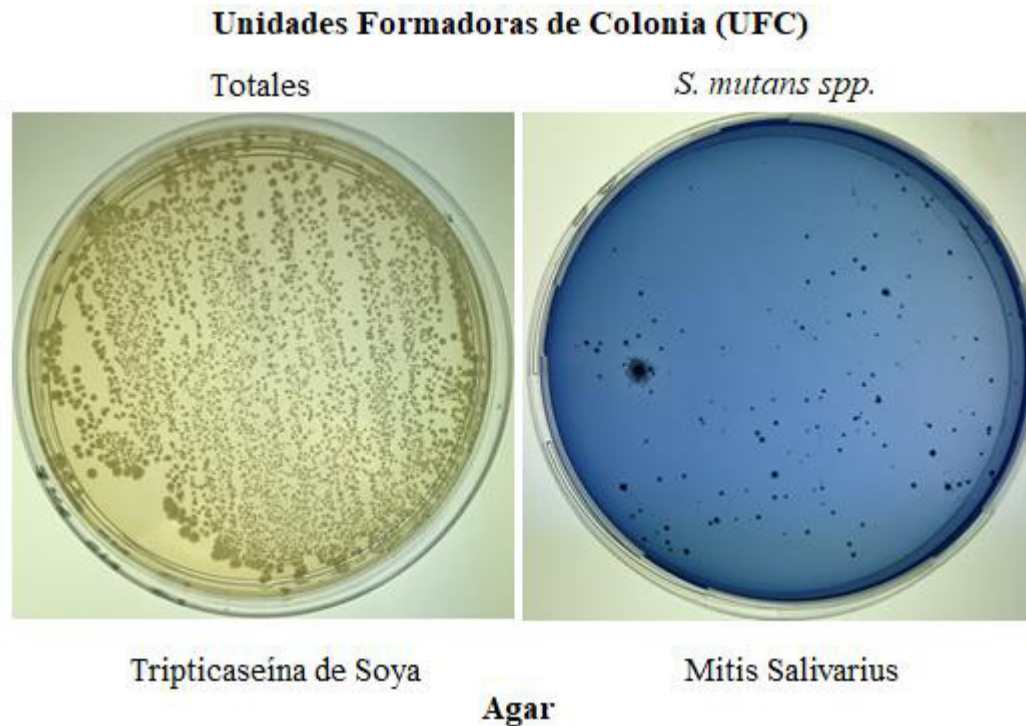
Estadísticamente, se encontró una diferencia significativa entre los aparatos sin tratamiento y aquellos que fueron tratados con el Perioxidin ( $p \geq 0.05$ ). Sin embargo, no existe diferencia estadística significativa entre los aparatos sin tratamiento y los tratados con el probiótico *L. casei* Shirota. Así como tampoco la hubo entre *L. casei* Shirota y el Perioxidin ( $p < 0.05$ ).



**Gráfica 4.** Unidades Formadoras de Colonia expresado en  $10^2$  UFC-totales/mL (a) y  $10^2$  UFC/mL de *S. mutans* spp., (b) desarrolladas en algunos de los 24 aparatos de ortodoncia removidos de pacientes infantiles sin recibir tratamiento (■), con perioxidin como control antimicrobiano (■) y con *L. casei* Shirota (■) como probiótico de estudio.

Por otra parte, en el medio agar Mitis salivarius suplementado con telurito de sodio y bacitracina específico, se utilizó para el aislamiento de *S. mutans* spp., encontrando colonias del patógeno cariogénico en siete de los 24 aparatos sin tratamiento (Gráfica 4(b)). A excepción de los aparatos 17 y 18 que fueron los que mayor cantidad de colonias presentaron con  $12.12 \times 10^2$  UFC/mL y  $3.24 \times 10^2$  UFC/mL respectivamente; los cinco aparatos restantes siendo el número 7, 14, 15, 21 y 23 presentaron una reducida

cantidad de colonias (4, 32, 4, 12 y 1 UFC/mL). Respecto a la efectividad en la reducción y/o eliminación de *S. mutans spp.*, no existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos, y entre los aparatos sin tratamiento respecto a los tratados con el colutorio Perioxidin ó el probiótico *L. casei* Shirota.



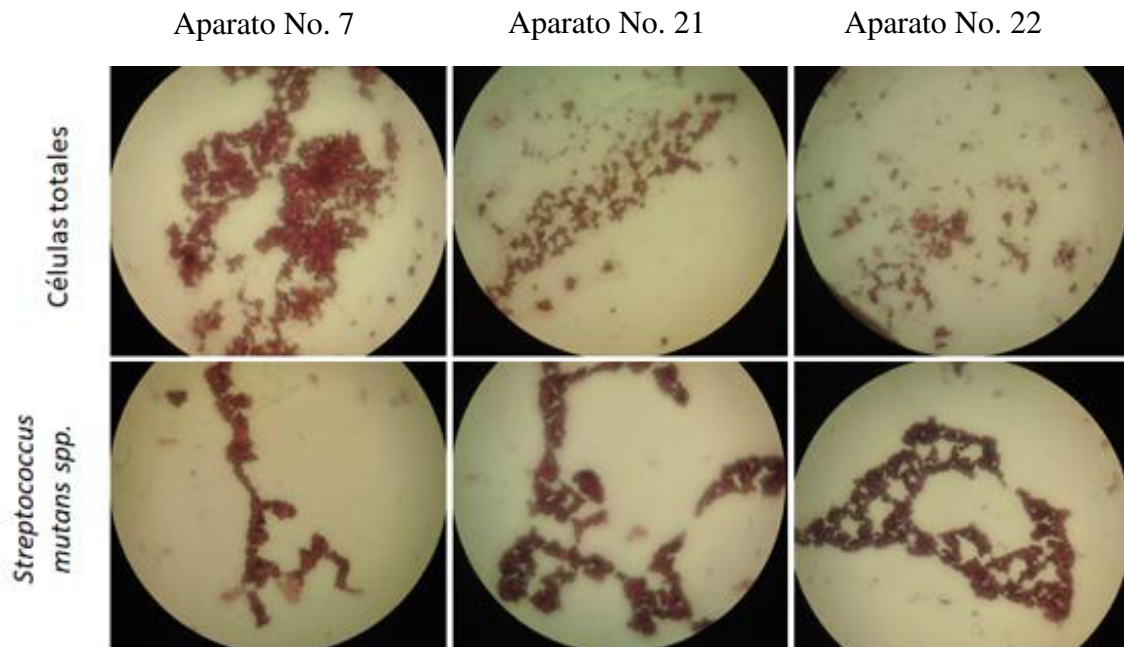
**Imagen 3.** Representación fotográfica de las unidades formadoras de colonia totales desarrolladas en agar de tripticaseína de soya suplementado con hemina y menadiona (colonias color crema en forma de coco), y de *S. mutans spp.* aisladas en agar Mitis Salivarius en color azul oscuro en forma de coco. Cámara Canon Rebel T6i con lente de 18-135mm.

### 8.3.3 Identificación de *S. mutans spp.*, por tinción de Gram

Gracias a la tinción de gram, se logró identificar y distinguir morfológicamente la presencia de bacterias Gram- y Gram+, siendo la identificación de la bacteria cariogénica *S. mutans spp.*, de nuestro principal interés. En la imagen 4, se observa la presencia de cadenas de cocos de color violeta, siendo estas una característica de *S. mutans spp.* El hallazgo se tuvo principalmente en las muestras provenientes de los

aparatos identificados con el número 7, 21 y 22. En este caso particular, las muestras fueron tomadas directamente de las UFC desarrolladas en agar Mitis Salivarius.

En color rosa/rojo pálido, se logra apreciar las bacterias Gram-, en donde la morfología es de un aspecto ovalado y no forman cadenas. Ésta muestras provienen de UFC desarrolladas de los mismos aparatos 7, 21 y 22 pero desarrolladas en agar nutritivo suplementado. La varianza para los aparatos sin tratamiento fue de  $7.5 \times 10^5$ , mientras que para el control Perioxidin de 181.5 y para *L. casei* Shirota de  $2.4 \times 10^5$ .



**Imagen 4.** Tinción de gram de UFC desarrolladas en agar Mitis Salivarius específico para el aislamiento de *S. mutans* spp., y en agar de Trypticaseína de Soya suplementado con menadiona y hemina, para el desarrollo de UFC totales. Las muestras sembradas en los agares fueron tomadas de los aparatos ortodónticos aislados número 7, 21 y 22. La bacteria cariogénica *S. mutans* spp., se identifica en color violeta como Gram+ y bacterias de otros géneros y especie desarrolladas se identifican en color rosa pálido como Gram-. Microscopio invertido (VanGuard, EUA), aumento de 100X.

## 8. DISCUSIÓN

Al igual que en la flora intestinal se puede romper el equilibrio bacteriano de la flora que habita en la cavidad bucal (*Boletín Yakult 2012; Osorio et al. 2014; Ashwin et al 2015*) por causas como una mala alimentación con alto contenido en proteínas, grasas y azúcares refinados, así como el uso de antibióticos indiscriminadamente, el exceso de consumo de tabaco y alcohol. Aunado a ello, el constante estrés y una higiene deficiente pueden ser otras de las causas que contribuyan al desequilibrio. Pero también, el uso de materiales odontológicos correctivos como es la aparatología ortodóntica la cuál por tener una duración prolongada de tratamiento, dificulta el cepillado y la buena higiene; lo que ocasiona una acumulación de microorganismos que afectan las piezas dentales no solo a nivel de tejidos duros (corona, esmalte) sino también de los tejidos blandos (encías, periodonto, etc). Los niños que presentan patologías bucales tienden a restringir el desarrollo de sus tareas o llegan a faltar más a la escuela en comparación con aquellos que no tienen enfermedades orales (Esquivel, et al, 2012).

La edad escolar es la etapa idónea en donde se puede tener mayor influencia en los niños, ya que es el punto de partida del desarrollo de las conductas en relación con la salud oral que repercutirán el resto de la vida. Los niños son muy receptivos en esta etapa, entre más temprano se establezcan buenas costumbres, el impacto será de más larga duración, pues los hábitos se van reforzando regularmente en el transcurso de los años escolares (Rebolledo et al, 2013).

En el estudio aquí presentado se buscó comprobar la eficiencia antimicrobiana de *L. casei* Shirota aislada de la bebida fermentada Yakult® en comparación con el Perioxidin el cual también contribuye a modificar el ambiente ácido de la cavidad oral para lograr una lisis bacteriana. En general el Perioxidin es bien tolerado por los pacientes. Sin embargo, en tratamientos crónicos se puede producir irritación en la mucosa, lo cuál contribuye a deserciones en la continuidad de los tratamientos o la dilución de la solución, para permitir tolerar el uso del producto (Rego et al,2010). Además, se puede



llegar a tener alteración en el gusto lo que frecuentemente contribuye a la pérdida de la continuidad en el uso del producto.

Por ende, aislar la bacteria láctica *L. casei* Shirota, fue uno de los retos principales en este estudio, dado que, si bien existe una amplia gama de productos fermentados, alimentos funcionales (conteniendo probióticos) o suplementos alimenticios (bajo la forma de comprimidos, gotas...) en algunos casos estos microorganismos no se encuentran viables, es decir, no tienen la capacidad para multiplicarse y colonizar las mucosas intestinales siendo este su principal destino para equilibrar la flora que ahí reside. La acidificación del medio de cultivo de los microorganismos, y más aun tratándose de bacterias lácticas, el pH ácido es un indicador del metabolismo que tienen dichas bacterias en su asimilación de carbohidratos que contiene el medio, principalmente azúcares.

Un estudio piloto realizado en el 2014 utilizando la bebida fermentada de Yakult® comercial con *L. casei* Shirota, consistió en determinar el efecto del consumo de la bebida probiótica sobre el desarrollo de *S. mutans spp.*, posterior a la ingesta de alimentos en el desayuno y la comida, pero antes del cepillado habitual durante 7 días consecutivos. 12 pacientes de 4 a 18 años de edad con aparatología ortodóntica que acudían al Posgrado de Odontopediatría de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Armendariz-Arias DI, 2014), siguieron este protocolo. Sin embargo, los resultados en la disminución de *S. mutans spp.*, no fueron los esperados al cabo de 1 semana. El resultado negativo del estudio piloto se atribuyó a la presencia de azúcar en la bebida fermentada, que puede repercutir directamente sobre el desarrollo del patógeno cariogénico. Esta, fue la principal razón para lo cual se decidió continuar con este estudio utilizando como base la bebida fermentada Yakult® pero mejorando el procedimiento, es decir, trabajando directamente con aparatos removidos de pacientes infantiles que terminan su tratamiento de ortodoncia, y aislando *L. casei* Shirota de la bebida fermentada.

Publicaciones científicas consultadas para este estudio, han demostrado la efectividad de los lactobacilos ejemplo de ello *L. reuteri* puesto que tiene la capacidad de inhibir bacterias odontopatógenas encontrándose algunas que desarrollan la caries, atribuyendo

este efecto a la generación de ácidos orgánicos capaces de regular el desarrollo del patógeno cariogénico *S. mutans* (Baca-Castañón et al 2015). E incluso, la regulación de genes que ayudan a la tolerancia de ambientes ácidos (Urrutia-Baca et al 2018), teniendo a su vez un efecto inmunomodulador actuando sobre la producción de interleucina IL-10 (Wozniak et al, 2015; Muñoz et al, 2010; Astekar et al, 2014.) para evitar así inflamaciones causadas por infecciones microbianas. Estudios han demostrado el efecto de la bebida fermentada Yakult® que contiene la bacteria *L. casei* Shirota sobre la producción de IL-10, siendo ésta una citocina inmunosupresora que se activa ante la inflamación e irritación de la mucosa oral secundario a infección bacteriana. A su vez, se ha comprobado que contribuye también a la producción de IFN- $\gamma$  la cuál es una citocina proinflamatoria, contribuyendo a mejorar la respuesta inmune innata (Nozari et al, 2015).

En este trabajo tanto el sobrenadante de la fase logarítmica de crecimiento (24 h) de *L. casei* Shirota, como el enjuague Perioxidín utilizado como control comercial, tuvieron un efecto positivo ante el desarrollo de la carga microbiana total como del patógeno cariogénico *S. mutans spp.*, es decir, ambas cargas microbianas odontopatógenas contenidas en 16 aparatos ortodónticos de un total de 21 aparatos, fueron removidas completamente después de su exposición a ambas soluciones. Sin embargo, es relevante recordar que solo 5 de 21 aparatos ortodónticos mostraron aún una proliferación de UFC totales que fueron incontables y se requirieron aún más diluciones. Fue hasta entonces que la actividad antimicrobiana se vió reflejada hasta en un 90.5% con *L. casei* Shirota y 95.2% con Perioxidín. Mientras que para el desarrollo de *S. mutans spp.*, la eficiencia en esta segunda resiembra arrojó un 100% de efecto antimicrobiano con ambas sustancias.

Al trabajar con aparatos ortodónticos infantiles removidos al finalizar el tratamiento, resulta difícil asegurar si los cinco pacientes infantiles a quienes se les retiraron los aparatos que necesitaron más diluciones y una segunda resiembra; contrajeron algún tipo de enfermedad sistémica que repercutió en la proliferación masiva de patógenos orales, o bien, se trataba de pacientes infantiles con otras características como una mala o baja higiene de cepillado, no acudían a las revisiones periódicas con su Odontopediatra,

contaba ya con alguna pieza cariada o inflamación de encía creando condiciones para la proliferación excesiva de patógenos.

Es importante considerar que la resistencia en algunos aparatos al tratamiento pudo deberse a la presencia de patógenos más virulentos que causan caries y tienden a disminuir el pH o en su defecto la presencia de una gingivitis en el paciente infantil. Ambos casos pueden explicarse por una falta o incorrecto aseo bucal.

El estudio mostró que el tratamiento con *L. casei* Shirota puede inhibir patógenos orales entre los cuales se encuentra la proliferación de *S. mutans spp.*, y controlar el desarrollo de caries dental y pudiera tener un efecto positivo si se toma en cuenta el uso en aquellos pacientes en los que el pH se encuentra en valores normales y la concentración bacteriana este debajo de  $3 \times 10^8$  cel/mL ya que se demostró más eficacia en pacientes bajo estas condiciones.

Aun cuando *Lactobacillus casei* Shirota logró disminuir la concentración de bacterias en los aparatos que tuvieron cierta resistencia al tratamiento, y comparado con aquellos aparatos tratados con Perioxidin, se pudo constatar que no hay diferencia significativa entre ambas sustancias, esto tanto para la determinación total bacteriana como en específico para *Streptococcus mutans spp.* Al demostrarse que el probiótico contenido en la bebida fermentada de Yakult® tiene efectos importantes en el desarrollo de cáncer, inflamación, desequilibrio de la flora intestinal entre otros (D'Ercole et al, 2014); con el estudio aquí presentado se determina también otro posible uso del probiótico contenido en la bebida, como un posible agente antimicrobiano de patógenos orales.

Los probióticos son cada vez más, el ejemplo mejor caracterizado y más estudiado de alimentos funcionales por el amplio espectro de beneficios que confiere a la salud del huésped.

## 9. CONCLUSIÓN

Conforme a los objetivos establecidos en este estudio se obtuvieron los siguientes logros:

- 1.- Aislar *Lactobacillus casei* Shirota de la leche fermentada Yakult® y trazar su viabilidad mediante la cinética de crecimiento; así como una efectividad en la criopreservación una vez aislada de la bebida fermentada
- 2.- De los aparatos removidos en cuestión, se desarrolló una variedad microbiana de la cual se cuantificaron las UFC/mL totales mediante un cultivo nutritivo de Tripticaseína de Soya enriquecido. Así como también se identificó la presencia de *S. mutans spp.*, con el medio enriquecido de Mitis Salivarius.
- 3.- Al comparar la eficiencia antimicrobiana de *L. casei* Shirota respecto al enjuague Perioxidín, se observaron y cuantificaron resultados muy favorables hacia la eficiencia de la bacteria probiótica frente a patógenos orales totales y en particular con *S. mutans spp.*
- 4.- La realización de este trabajo en donde se incluyeron diversas estandarizaciones que repercutieron en resultados efectivos orientados hacia la determinación del efecto antimicrobiano de *L. casei* Shirota aislada del Yakult® sobre el desarrollo de patógenos orales totales como en *S. mutans spp.*, permitirá continuar con esta línea de investigación hacia la realización de posteriores estudios que pudieran involucrar la formulación de algún enjuague o bebida para ser administrada a pacientes infantiles, adultos o en modelos animales con aparatología ortodóntica e incluso un posible acercamiento a la empresa Yakult.

## 10. RECOMENDACIONES

- Incrementar la concentración celular o biomasa de *Lactobacillus casei* Shirota un cultivo.
- A partir de la ruta metabólica de asimilación de carbohidratos que utiliza *L. casei* Shirota para su desarrollo, identificar el metabolito o sustancia que produce dicho probiótico y le confiere la actividad antimicrobiana. Acto seguido, verificar si dentro de la o las rutas metabólicas de degradación de carbohidratos, existe alguno en específico que es el responsable de la producción del metabolito de interés que le confiere una actividad antimicrobiana y moduladora en el huésped cuando es consumido; de tal manera que se pueda potencializar su actividad.
- Realizar los mismos experimentos con aparatología, pero con la sustancia aislada, realizar estudios *in vivo* e *in vitro* para determinar toxicidad aguda y nivel de absorción en distintos órganos utilizando un modelo animal (ratas o ratones).
- De identificar la sustancia o metabolito antagónico en *L. casei* adquirido de la American Type Culture Collection (ATCC) y de las bebidas a base leche fermentada (Yakult®) podrán realizarse estudios de caracterización en cuanto al espectro de actividad antimicrobiana en patógenos orales, por ejemplo, y de otros de interés para la industria agroalimentaria.

## **11. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA**

- 1) **Abeleira MT**, Pazos E, Ramos I, 2014. Orthodontic treatment for disabled children: a survey of parents' attitudes and overall satisfaction. *BMC Oral Health*.14:98.
- 2) **Ahmed N**, 2013. Iatrogenic possibilities of orthodontic treatment and modalities of prevention. *Journal of Orthodontic science*. 2(3):73-86.
- 3) **Armendariz Árias DI** (2014). Impacto de *Lactobacillus casei* Shirota en el desarrollo de *Streptococcus mutans* en pacientes con aparatología ortodóntica. Tesis de Maestría en Odontopediatría, Facultad de Odontología de la UANL.
- 4) **Ashwin D**, KE V, Taranath M, Ramagoni NK, Nara A, Sarpangala M, 2015. Effect of Probiotic Containing Ice-cream on Salivary Mutans Streptococci (SMS) Levels in Children of 6-12 Years of Age: A Randomized Controlled Double Blind Study with Six-month Follow Up. *J Clin Diagn Res*. 9(2): ZC06-ZC09.
- 5) **Astekar M**, Sidhu G K, Kathuria N S 2014. Impact of diet alteration on oral microflora by addition of probiotics. *Indian J Med Microbiol*. 32:466-467.
- 6) **Baca-Castañón M-L**, De la Garza-Ramos M-A., Alcázar-Pizaña A-G., Grondin Y., Coronado-Mendoza A., Sánchez-Najera R-I., Cárdenas-Estrada E., Medina-De la Garza C-E., Escamilla-García E (2015). Antimicrobial effect of *Lactobacillus reuteri* on cariogenic bacteria *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, and periodontal diseases *Actinomyces naeslundii* and *Tannerella forsythia*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* (Springer US), 7:1-8.
- 7) **Barrancos MJ**, Barrancos P, (2006). *Operatoria dental – Integración clínica*. 4ª Edición, Editorial Panamericana. Pp: 301-345.
- 8) **Boletín Yakult®**, 2012. *Nutrición e Inmunidad*, 1ª Parte. 27(11):1-4
- 9) **Boletín Yakult®**, 2013. ¿Qué es el *Lactobacillus casei* Shirota (LcS)? <http://www.yakult.com.mx/que-es-el-lactobacillus-casei-shirota-lcs/>
- 10) **Brunser T**, Oscar. (2013). El desarrollo de la microbiota intestinal humana, el concepto de probiótico y su relación con la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 40(3), 283-289.

- 11) **Cannon M**, Trent B, Vorachek, Kramer S, Esterly 2013. Effectiveness of CRT at measuring the salivary level of bacteria in caries prone children with probiotic therapy. *J Clin Pediatr Dent.* 38(1):55-60.
- 12) **Castellanos JE**, Marín LM, Úsuga MV, Castiblanco GA, Martignon S 2013. La remineralización del esmalte bajo el entendimiento actual de la caries dental. *Univ Odontol.* 32(69): 49-59.
- 13) **Cildir SK**, Germec D, Sandalli N, Ozdemir FI, Arun T, Twetman S, Caglar E 2009. Reduction of salivary mutans streptococci in orthodontic patients during daily consumption of yoghurt containing probiotic bacteria. *Eur J Orthod.* 407-411.
- 14) **Coreano J** *Orthod.* 2012 Oct; 42 (5): 263 - 269. Publicado en línea 2012 29 de octubre.
- 15) **D'Ercole S**, Martinelli D, Tripodi D 2014. Influence of sport mouthguards on the ecological factors of the children oral cavity. *BMC Oral Health.* 14:97.
- 16) **Esquivel R**, Jiménez J 2012. *Revista ADM;* 69(2) 69-75.
- 17) **Haerian-Ardakani A**, Rezaei M, Talebi-Ardakani M 2015. Comparison of Antimicrobial Effects of Three Different Mouthwashes. *Iranian Journal of Public Health.* 44(7):997-1003.
- 18) **Hambire CU**, Jawade R, Patil A, Wani VR, Kulkarni AA, Nehete PB 2015. Comparing the antiplaque efficacy of 0.5% *Camellia sinensis* extract, 0.05% sodium fluoride, and 0.2% chlorhexidine gluconate mouthwash in children. *J Int Soc Prev Community Dent.* 5(3):218-226.
- 19) **Jothika M**, et al 2015. *J Int Soc Prev Community Dent.*
- 20) *Journal of cellular and molecular medicine.* 2018, 22 (3).
- 21) **Kaktcham M** 2011. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* 1K isolated from traditionally fermented milk in the western highlands region of Cameroon. *New York science journal.* 4(8).
- 22) **Khanpayeh E**, Jafari A, Tabatabaei Z 2014. Comparison of salivary *Candida* profile in patients with fixed and removable orthodontic appliances therapy. *Iran J Microbiol.* 6(4):263-268.
- 23) **Krzyściak W**, Pluskwa KK, Piątkowski J, et al 2014. The usefulness of biotyping in the determination of selected pathogenicity determinants in *Streptococcus mutans*. *BMC Microbiology.* 14:194.

- 24) **Lara E**, Montiel N, Sanchez L, Alanís J 2010. Effect of orthodontic treatment on saliva, plaque and the levels of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. Med oral Patol Oral Cir Bucal. 15(6):e924-e929.
- 25) **Leung V**, Dufour D, Levesque C.M. 2015. Death and survival in *Streptococcus mutans*; differing outcomes of a quorum-sensing signaling peptide. Front Microbiol 6: 1176.
- 26) **Mahantesha T**, Parveen K, Praveen N, Nara A, Ashwin D, Buddiga V 2015. Comparative study of probiotic ice cream and probiotic Drink on salivary *Streptococcus mutans* levels in 6-12 years age group children. J Int Oral Health. 7(9): 47-50.
- 27) **Mansor N**, Saub R, Othman SA 2012. Changes in the oral health-related quality of life 24h following insertion of fixed orthodontic appliances. J Orthod Sci. 1(4):98-102.
- 28) **Marín C**. 2007. Importancia del control de placa bacteriana en el tratamiento ortodóncico. Revista Estomatología. 15(1):24-28.
- 29) **Mendoza A**, Paola Asbún, Andrea Crespo A, Susana Gonzales, Rosa Patiño 2008. Revista boliviana de pedistria. v.47 n.1 La Paz jan.
- 30) **Mishra S**, Routray S, Kumar Sahu S, Bhusan Nanda S, CHARAN Sahu K 2014. The role efficacy of herbal antimicrobial agents in orthodontic treatment. J Clin Diagn Res. 8(6): ZC12-ZC14.
- 31) **Muñoz SK**, Alarcón Palacios M 2010. Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral. 3, 136-139.
- 32) **Negroni M**, (1999). Microbiología Estomatológica, Fundamentos y Guía Práctica. Editorial Panamericana. Pp: 166-304.
- 33) **Nozari A**, Motamedifar M, Seifi N, Hatamizargaran Z, Ranjbar MA 2015. The Effect of Iranian Customary used probiotic yogurt on the children's salivary cariogenic microflora. J Dent (Shiraz). 16(2):81-86.
- 34) **Petti S**, Barbato E, Simonetti D'Arca A 1997. Effect of orthodontic therapy with fixed and removable appliances on oral microbiota: a six-month longitudinal study. New Microbiol 20(1):55-62.
- 35) **Ramachandhra R**, Saravanan R, Karthikeyan M.K, Vishnuchandran C, Sudeepthi 2014. Prevalence of malocclusion and need for early orthodontic treatment in children. J Clin Diagn Res 8(5): ZC60-ZC61.



- 36) **Rebolledo M**, Rojas E, Salgado F 2013, International journal of odontostomatology. 7(3) 415-419.
- 37) **Rego RO**, Oliveira CA, dos Santos-Pinto A, Jordan SF, Zambon JJ, Cirelli JA, Haraszthy VI 2010. Clinical and microbiological studies of children and adolescents receiving orthodontic treatment. Am J Dent. 23(6):317-23.
- 38) **Rodrigues I** et al 2014. Effect of 0.12% chlorhexidine in reducing microorganismos found in aerosol used for dental prophylaxis of patients submitted to fixed orthodontic treatment. Dental press journal of orthodontics. 19(3): 95-101.
- 39) **Rondon L**, Añez M. Sociedad Venezolana de Puericultura y Pediatría, (2015), 123-128. ISSN: 0004-0649.
- 40) **Ruhi N**, Serhat D, Firat O, Burcu A. Altan, Oral Sokucu, Vildan Bostanci 2012. The Relationship of Orthodontic Treatment Need with Periodontal Status, Dental Caries, and Sociodemographic Factors,” The Scientific World Journal, 498012.
- 41) **Sánchez L**. Rev. Salud Anim (2014) 36(2) 124-129. ISSN:0253-570X.
- 42) **Santagati M**, Scillato M, Patane F, Ajello C, Stefani S 2012. Bacteriocin-producing oral streptococci and inhibition of respiratory pathogens. FEMS Immunol Med Microbiol. 65(1):23-31.
- 43) **Sarika AR**, Lipton AP, Aishwarya MS 2010. Bacteriocin Production by a New Isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under Different Culture Conditions. Advance journal of food science and technology (5):291-297.
- 44) **Sidhu GK**, Mantha S, Murthi S, Sura H, Kadaru P, Jangra JK 2015. Evaluation of *Lactobacillus* and *Streptococcus mutans* by addition of probiotics in the form of curd in the diet. J Int Oral Health. 7(7):85-89.
- 45) **Singh RP**, Damle SG, Chawla A 2011. Salival *Streptococcus mutans* y lactobacilos modulaciones en los niños pequeños sobre el consumo de probióticos helado que contiene *Bifidobacterium lactis* Bb12 y *Lactobacillus acidophilus* La5. Acta Odontol Scand. 69(6):389-94.
- 46) **Soergel DAW**, Neelendu Dey, Knight Rob, Brenner Steven E 2012. International Society for Microbial Ecology. The ISME Journal 6, 46-56.
- 47) **Suresh M**, Ratnaditya A, Karrimani V, Karpe S 2015. One phase versus two phase treatment in mixed dentition: A critical review. J Int Oral health, 7(8):144-147.

- 48) **Urrutia-Baca V**, Escamilla-García E, De la Garza-Ramos MA, Taméz-Guerra P, Flores-Gómez R\*, Cynthia Urbina-Ríos (2018). In vitro antimicrobial activity and downregulation of virulence gene expression on *Helicobacter pylori* by reuterin. Probiotics and Antimicrobial Proteins (Springer US). 10(2): 168-175.
- 49) **Wozniak K**, Piatkowska D, Szyszka-Sommerfeld L, Buczkowska J 2015. Impact of functional appliances on muscle activity: a surface electromyography study in children. Med Sci Monit. 21:246-253.