



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Odontología

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología

Dr. "Keisaburo Miyata"

Especialidad en Ortodoncia

**“Eficiencia antifúngica de dos tipos de probióticos sobre
Candida albicans aislada de aparatología fija ortodóncica:
Estudio *in vitro*”**

PROYECTO TERMINAL

Para Obtener el Diploma de

Especialista en Ortodoncia

Presenta:

C.D. Isabel de Monserrat Osorio Bernal

Comité Tutorial:

Directora: Dra. en C.S. Edith Lara Carrillo

Asesor Interno: Dr. en C.S. Ulises Velázquez Enríquez

Asesor Externo: Dra. en C.B. María Saray Aranda Romo

Toluca, Estado de México, junio de 2018



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1. HOMEOSTASIA DE LA MICROBIOTA ORAL.....	5
2.2. ALTERACIÓN EN LA HOMEOSTASIA DE LA MICROBIOTA ORAL	7
2.3. DISBIOSIS.....	9
2.4. APARATOLOGÍA FIJA EN ORTODÓNCA Y SU RELACIÓN CON LA DISBIOSIS ORAL.....	10
2.5. CÁNDIDA.....	11
2.6. ANTISÉPTICOS PARA EL CONTROL DEL DESARROLLO DE CÁNDIDA EN PACIENTES BAJO TRATAMIENTO ORTODÓNCA.	14
2.7. PROBIÓTICOS	16
2.8. USO DE PROBIÓTICOS PARA EL CONTROL DE LA PROLIFERACIÓN DE CÁNDIDA EN PACIENTES BAJO TRATAMIENTO ORTODÓNCA	20
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	29
4. HIPÓTESIS	30
5. JUSTIFICACIÓN.....	31
6. OBJETIVOS	33
6.1. OBJETIVO GENERAL	33
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
7. MATERIAL Y MÉTODOS	34
7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	34
7.2 MUESTRA.....	35
7.3. SELECCIÓN DE LOS FACTORES Y SUS NIVELES	35
7.4. LUGAR DE REALIZACIÓN	37
7.5. CRITERIOS DE SELECCIÓN	38
7.5.1. Criterios de inclusión.....	38

7.5.2. Criterios de exclusión.....	38
7.5.3. Criterios de eliminación	38
7.6. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	38
7.7. PROCEDIMIENTO	40
7.7.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	41
7.7.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	42
7.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	48
7.9. CONSIDERACIONES BIOÉTICAS.....	49
8. RESULTADOS	50
9. DISCUSIÓN.....	52
10. CONCLUSIÓN	58
11. BIBLIOGRAFÍA	59
12. ANEXOS.....	62
Anexo 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRA MICROBIOLÓGICA	62
Anexo 2. OFICIO PARA TOMA DE MUESTRA	64
Anexo 3. OFICIO PARA PERMISO.....	65
Anexo 4. OFICIOS DE TRÁMITE DE MOVILIDAD.....	66
Anexo 5. CONSTANCIA DE PRESENTACIÓN DE CARTEL (SEMANA DE LAS CIENCIAS, FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM).....	67
Anexo 6. CONSTANCIA DE PRESENTACIÓN DE CARTEL (CONGRESO NACIONAL E INTERNACIONAL DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM, AMIC 2018)	69

1. INTRODUCCIÓN

Cualquier sólido sumergido en un ambiente húmedo o de agua corriente, tiene en su superficie una rica y variada actividad de microorganismos. La clave para que estos seres vivos puedan mantener su actividad es su capacidad de adhesión. Los microorganismos dependen de dicha propiedad para fijarse a la superficie, nutrirse y reproducirse, o que sean renovados. En condiciones de salud el organismo humano sólo tiene una superficie dura natural sumergida en un fluido: los dientes, la cavidad oral tiene características que dan un potencial de proliferación bacteriana y esta a su vez pueden producir ácidos que desmineralizan la superficie del esmalte dental. Los microorganismos se adhieren a la superficie dental mediante la placa dentobacteriana. Se han identificado bacterias con alta capacidad cariogénica entre las que destaca el *Streptococcus sobrinus* y el *Streptococcus mutans*.^{1, 2}

En Odontología específicamente en la especialidad de Ortodoncia, la colocación de aparatología fija en la cavidad bucal (brackets, bandas, ligadura, arcos, etc.) establecen condiciones para que estas superficies, al estar sumergidas en un fluido como la saliva, sean colonizadas por microorganismos. La superficie del material, su composición, el pH y diversos microorganismos presentes de manera normal en la cavidad oral, pueden influir en la capacidad de adhesión de microorganismos específicos y en la formación de la biopelícula dental, lo que aumenta el riesgo de desmineralización en el esmalte, particularmente en superficies dentales alrededor de dicha aparatología, alterando la microbiota bucal y haciendo más compleja la coagregación de microorganismos como *Candida albicans*, *Lactobacillus* y

Actinomyces. Se ha reportado desmineralización inducida por bacterias en el esmalte dental desde el primer mes después de la colocación de la aparatología fija³ y se estima que la prevalencia de lesión de mancha blanca en el esmalte (primer signo de desmineralización clínicamente visible) en pacientes tratados ortodóncicamente varía entre un 12.6% a un 50%.

La primera secuela del inminente crecimiento bacteriano a causa de los aparatos ortodóncicos son las lesiones de mancha blanca, estas son zonas en las que el esmalte dentario pierde la sustancia fundamental interprismática del esmalte y su evolución da lugar a la pérdida o disolución de este tejido.⁴ Por lo que, el objetivo de esta investigación es emplear probióticos para disminuir la proliferación de microorganismos en la biopelícula dental extraída de pacientes en tratamiento ortodóncico en un estudio *in vitro*.

2. ANTECEDENTES

2.1. HOMEOSTASIA DE LA MICROBIOTA ORAL

La microbiota oral es uno de los ecosistemas microbianos más complejos, e incluye bacterias, *archaea*, hongos, protozoarios y virus. En la actualidad, las técnicas de secuenciación y el análisis del genoma a gran escala han permitido edificar bases de datos genómicas, realizar linajes microbianos específicos y conocer que no solamente forman parte de la microbiota oral humana unos 600 o 700 taxones, sino que se calcula que el número de filotipos podrían estar alrededor de 19,000. Esta amplia diversidad microbiana hace que sea importante entender cómo están constituidas estas comunidades de microorganismos a nivel de la cavidad oral, cómo interactúan y mantienen su homeostasis en el ser humano, teniendo en cuenta que esta cavidad es la puerta de entrada de posibles infecciones del sistema gastrointestinal y respiratorio.¹

La colonización de la mucosa bucal comienza en el recién nacido al momento del parto con el establecimiento de especies pioneras pertenecientes al género *Streptococcus*, aunque adquirimos los microorganismos ya durante nuestro nacimiento, factores como edad, género, alimentación, ambiente o el sistema inmune del propio individuo los modificarán con el paso del tiempo. Es entonces que hasta alrededor de los 3 años la microbiota se vuelve estable y de acuerdo a las condiciones de la cavidad oral, varían los tipos y la proporción de las bacterias.²

En cuanto a la cavidad oral sana, está caracterizada por una microflora en su mayoría por *Phylum Firmicutes* (género *Streptococcus*, familia *Veillonellaceae*, género *Granulicatella*), *Proteobacteria* (género *Neisseria*, *Haemophilus*), *Actinobacteria* (género *Corynebacterium*, *Rothia*, *Actinomyces*), *Bacteroidetes* (género *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Porphyromona*) y *Fusobacteria* (género *Fusobacterium*). En un estudio realizado a partir de placa dental de niños libres de caries, se reporta una mayor frecuencia de *Streptococcus sanguinis*, *Abiotrophia defectiva*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* y *Streptococcus sanguinis*. Otras comunidades bacterianas relacionadas a pacientes en condiciones libres de caries son *Cordiobacterium*, *Rothia*, *Kingella*, *Aggregatibacter* o *Mannheimia*, que, a pesar de ser abundantes, algunas son poco conocidas por ser parte de grupos que no pueden ser cultivados en el laboratorio.³

Entonces podemos definir la microbiota oral normal de un individuo como el conjunto de microorganismos que colonizan permanentemente a la mayoría de los individuos sanos de la población, y que ejercen sobre éstos un efecto beneficioso al encargarse de: impedir la colonización por otros microorganismos no adaptados a ese hábitat (fenómenos de competencia interespecie), activar el sistema inmune. Por ejemplo, estimulando la producción de IgA secretora y producir nutrientes esenciales. Por ejemplo, algunas especies como *E. coli* o *Bacteroides* sintetizan vitamina B y K, además de enzimas capaces de desconjugar sales biliares y hormonas sexuales.¹

No podemos olvidar que un gran número de infecciones hospitalarias y extrahospitalarias son causadas por microorganismos pertenecientes a nuestra propia microbiota (estafilococos, estreptococos, hongos etc.) y no por las especies ambientales que constantemente están en contacto con nosotros. Ya que la cavidad oral posee una microbiota característica, debido a las condiciones peculiares de nutrientes, pH y humedad, y muy variable en función de distintos factores que confluyen localmente. La mayoría de estos microorganismos mantienen una relación con el huésped basada en beneficios mutuos, como es el no causar daños a nivel oral y permitir que las poblaciones comensales puedan mantener a las especies patógenas estables, al imposibilitar que se adhieran a las superficies mucosas.¹

Sin embargo cuando existe en la microbiota oral una alteración del metabolismo realizado por las bacterias orales así como en su composición, incrementando el número de patógenos oportunistas, se le denomina disbiosis, siendo esto la causa de las enfermedades que con mayor frecuencia se presentan en boca; caries y enfermedad periodontal.⁴

2.2. ALTERACIÓN EN LA HOMEOSTASIA DE LA MICROBIOTA ORAL

El cuerpo humano funciona como un sistema coordinado, así los problemas de salud general afectan a la salud de la boca y viceversa. Ante enfermedades consideradas complejas y multifactoriales (la vida moderna, el estrés, tabaco, alcoholismo, malos hábitos alimenticios, el consumo excesivo de medicamentos tales como antibióticos, antimicóticos y antivirales) como son las de la boca, cada

vez más, los nuevos enfoques deben ser multidisciplinarios donde los abordajes por parte del odontólogo y de los médicos tratantes deben ser locales y sistémicos, sin agravar el desequilibrio en el que se encuentra el paciente por la enfermedad o alteración que lo aqueja. Es así que las infecciones bucales crónicas en tejidos blandos provocan procesos inflamatorios liberando sustancias pro-inflamatorias como citoquinas, que a través del sistema circulatorio acceden a cualquier área del organismo aumentando el riesgo de problemas cardiovasculares como hipertensión, musculares, digestivos, diabetes, etc. Es por esto que el resolver las enfermedades crónicas orales, sus signos o síntomas y el mantener la salud de la boca deben considerarse una pieza clave en la prevención de problemas sistémicos para la salud general.⁵

Como anteriormente se mencionó el establecimiento de la microbiota oral es un proceso dinámico y complejo que depende principalmente de factores externos. En primer lugar la vía de nacimiento es decisiva para que la colonización sea adecuada, diversos estudios epidemiológicos han encontrado que los niños que nacen por cesárea muestran una mayor frecuencia de *S. mutans*, y son más susceptibles a caries que los niños que nacen por parto natural, de igual forma los niños que fueron alimentados con fórmula. Además durante su desarrollo el recién nacido es expuesto al uso de antibióticos, los cuales modifican completamente la microbiota original, llevando a la propagación de especies patógenas y el establecimiento de una microbiota muy similar a la encontrada en pacientes con enfermedades crónico degenerativas. La dieta influye notablemente en que la microbiota oral cambie a un estado de disbiosis, principalmente una dieta alta en carbohidratos. Por otro lado

algo poco estudiado es el efecto que tiene la realización de restauraciones dentales o la introducción de aparatología fija con fines ortodóncicos sobre la microbiota, sin embargo existen múltiples reportes que al introducir aparatología ortodóncica se acrecienta la frecuencia de caries y gingivitis, esto tal vez debido a que se rompe la homeostasia de la microbiota de la cavidad oral.⁴

Con todo lo mencionado podríamos concretar que las **funciones de la microbiota oral** son las siguientes: Mantener el estado de salud del huésped, incrementar la resistencia a ser colonizados por microorganismos ajenos a la microbiota normal, reducir el riesgo de superinfección por parásitos endógenos, contribuir al desarrollo del huésped en el ambiente natural, contribuir a la nutrición del huésped, detoxificación de compuestos ingeridos, potenciar el desarrollo del tejido linfoide, eliminar las aminas aromáticas heterocíclicas, desmetilación de metil-mercurio. La **función de la microbiota oral** es impedir implantación de patógenos oportunistas, colaborando con los mecanismos de defensa del huésped para controlar el crecimiento y reproducción de los microecosistemas que moran en la cavidad bucal. Cuidar la composición de estos microsistemas bióticos permite prevenir enfermedades locales y sistémicas para disminuir las consecuencias asociadas a problemas que tengan relación con su permanencia en la boca.⁵

2.3. DISBIOSIS

El hecho de que una persona esté sana, sin patología en la cavidad oral, viene determinada por el equilibrio ecológico entre la flora bacteriana y el huésped. Esto nos permite mantener un estado saludable de las distintas estructuras, bien sean

dientes, tejido de soporte, lengua, paladar, labios, mejillas, piso de la boca, mucosa, etc. Dicho equilibrio o relación puede verse afectado por diversos factores como son: la alteración de algún mecanismo de defensa, la terapia antimicrobiana, los hábitos la introducción de materiales restaurativos. Si se pierde la correcta relación microbiota – individuo aparece lo que conocemos como disbiosis que consiste en la alteración del ecosistema por el incremento de una de las especies implicadas en él. Esto puede dar lugar a productos tóxicos que dañan no solo la cavidad bucal si no el organismo.²

2.4. APARATOLOGÍA FIJA EN ORTODÓNCA Y SU RELACIÓN CON LA DISBIOSIS ORAL

La utilización de aparatos de ortodóncicos se hizo posible desde 1728 por el doctor Pierre Fauchard y tiene como objetivo el establecimiento de una oclusión funcional. Para llevar a cabo este tratamiento el paciente permanece con aparatología fija de ortodoncia durante varios meses e incluso años para reestablecer una oclusión funcional y estética, con esto es necesario que el profesional de la salud bucal motive a su paciente para mantener, modificar e instaurar hábitos de higiene oral ya que estos aparatos dificultan el cepillado dental y esto conduce a la formación de placa, por lo tanto, actúan como retenedores de microorganismos lo que hace que la cavidad oral de este individuo sea un lugar ideal para la proliferación de patógenos oportunistas que resulta en la desmineralización del esmalte y, en consecuencia, manchas blancas, la caries dental y la gingivitis.⁵

Al encontrarse en disbiosis la microbiota bucal, uno de los principales patógenos oportunistas que prolifera es *Candida albicans*, siendo su detección uno de los principales marcadores de que las bacterias orales se encuentran en desequilibrio.⁶

2.5. CÁNDIDA

Candida es un hongo dimórfico que se encuentra como comensal colonizando la mucosa bucal en forma de levadura, y cuando se encuentra en forma de hifa es capaz de producir infección en el huésped. Se conocen 17 especies de *Candida* que son causantes de infecciones en humanos. *Candida albicans* es la especie más comúnmente aislada de la boca de pacientes, tanto sanos como enfermos en un 60-80%, otras especies aisladas de boca son *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilopsis*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* y *C. guilliermondii*, la colonización de la boca por *Candida* comprende un proceso dinámico, que incluye la entrada del hongo en la cavidad oral, la adherencia a las células del huésped, la penetración de los tejidos y su permanencia en la cavidad oral, todos estos pasos están influenciados por el sistema inmune del huésped y las poblaciones bacterianas de la boca, por lo que las interacciones de *Candida* con bacterias son potencialmente importantes.⁷

Existen múltiples estudios en los cuales se encuentra una mayor población de especies de *Candida*, en pacientes que utilizan aparatos ortodóncicos, además se detecta un incremento de lesiones cariosas en cuya etiología *Candida* parece jugar un papel importante. Aunque ya se ha demostrado que el origen de la caries es multifactorial con un requerimiento absoluto de un biofilm acidogénico que produce

un ambiente propicio para que múltiples especies bacterianas den lugar a grandes cambios ecológicos todo esto, en combinación con las variaciones del pH, son factores para el desarrollo de enfermedades de la cavidad oral. Por otro lado, investigadores como Hara y Zero demostraron que no solo el *S. mutans* es el microorganismo que está en relación con la caries, se ha demostrado que existe una asociación entre especies de *Candida* y caries. Naidu lo demuestra en su estudio y concluye que la presencia de *Candida* se correlaciona con el estado de la caries, y también que *Candida* y la caries están inversamente relacionados con la edad, siendo los pacientes con menor edad los más afectados. Este mismo estudio mostró un predominio de *Candida albicans* con un 78% siendo similar a otros estudios en los que se encontró un 80,87% y 93,75% de aislamiento de *Candida albicans* en pacientes con alto índice de caries a diferencia de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, y *C. krusei*, encontrándose en menor porcentaje, lo que sugiere que *Candida albicans* está presente en todos los individuos que presentan caries.⁷

Por otro lado en pacientes con aparatología conformada con resinas acrílicas, el tratamiento contra candidiasis oral es común, sobre todo la de tipo eritematoso localizada en el paladar en contacto con el acrílico del aparato, Mezzari y colaboradores afirman que *Candida albicans* es la especie más común con aproximadamente 60% de las infecciones en estos pacientes, seguido de especies no *albicans* tales como *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* y otras.⁵

Este proceso de infección es importante y es poco reportado en las consultas periódicas que tiene el paciente bajo tratamiento de ortodoncia. Según algunos investigadores, la presencia de *Candida albicans* podría ser considerada como el factor principal en la aparición de estas lesiones de la mucosa. Ya que el hongo se localiza en el borde y sobre la superficie de la placa microbiana de aparatología fija y removible empleada en tratamientos de ortodoncia y la lesión será el resultado de la producción de toxinas considerablemente irritantes. Diversos estudios han demostrado la presencia de especies de *Candida* en donde los microorganismos que se encuentran encerrados en una matriz extracelular autoproducida y están protegidos de la acción de los agentes antimicrobianos, la saliva y las células inmunes del huésped.^{7, 8, 9}

Además el paciente bajo tratamiento ortodóncico es un huésped susceptible para el desarrollo de candidiasis diseminadas, considerando que el conjunto de brackets, ligadura y arcos actúan como un foco de probable diseminación que puede llevar a candidiasis esofágicas o candidemias cuya frecuencia es relativamente baja, pero cuando se presentan se asocian a una elevada mortalidad, además de esto una alteración en la microbiota no solo oral si no también sistémica llevando al paciente a problemas como hipertensión, diabetes, problemas gástricos, respiratorios que afectan su desarrollo. Por lo anteriormente expuesto es necesario llevar a cabo una adecuada higiene de los órganos dentarios y de la aparatología fija en ortodoncia para controlar la proliferación de *Candida* y otros patógenos oportunistas, para lo cual existen en el mercado muchas opciones de desinfectantes.^{7, 10, 11}

2.6. ANTISÉPTICOS PARA EL CONTROL DEL DESARROLLO DE CÁNDIDA EN PACIENTES BAJO TRATAMIENTO ORTODÓNCICO

La desinfección de los aparatología fija y/o removibles de pacientes en tratamiento puede realizarse por diversos medios uno de ellos es la desinfección con Gluconato de Clorhexidina que depende del pH (5.5 a 7), esta puede ser particularmente útil en individuos con dificultades para eliminar la placa (técnica de cepillado deficiente, apiñamiento dentario, etc.) y en aquellos que se hallan en riesgo de tener hiperplasia gingival por el uso de los aparatos protésicos. En colutorio se emplea en concentraciones del 0.12 al 0.2%, enjuagando la boca durante medio minuto, 2 veces al día con 10-15 ml de solución. La clorhexidina absorbida a la hidroxiapatita inhibe la colonización bacteriana. La solución de clorhexidina es exclusivamente para uso local y no debe tragarse, su preparación contiene alcohol al 12%, lo que es preocupante ya que el uso regular de alcohol incrementa el riesgo de cáncer bucofaríngeo, también puede dejar un sabor amargo tras su aplicación que se verá aumentado si se enjuaga la boca inmediatamente. Se recomienda evitar el consumo de alimentos y bebidas durante unas horas después de usar el medicamento, en caso de que se produzca descamación de la mucosa bucal se debe suspender su uso, pero considerar que al diluirla en agua reduce su efecto antimicrobiano. Su uso continuo por más de 2-3 meses, puede presentar efectos secundarios indeseables. En cuanto a su eficacia, estudios demuestran que la presencia de *Candida* en mucosa oral pasa de ser de 62.2% y se reduce a 51.1% con el uso de gluconato de clorhexidina así mismo, los pacientes con aparatología fija o removible reducen de un 82.25 al 68.8%.¹²

En otro estudio se reporta que un enjuague bucal con gluconato de clorhexidina al 0,2% utilizado en tres momentos diferentes durante el día fue eficaz en la reducción de la placa bacteriana pero no hubo un efecto significativo en el número de células de *Candida*.¹³

Otros de los antisépticos comerciales más comunes es listerine que contiene: Alcohol 28.4 ml; Timol 0.06 g; Eucaliptol 0.09 g; Salicilato de Metilo 0.05 g; Mentol 0.04 g; Acido Benzoico 0.150 g. En un estudio *in vivo* en el que se utilizó este producto en aparatos protésicos durante un período de 28 días resultó una reducción significativa de la inflamación palatina y la colonización de *Candida* de las prótesis dentales y la mucosa palatina. Los autores también sugirieron que la prótesis podría ser un reservorio de reinfección y recomiendan que el tratamiento incluyera un tratamiento antimicrobiano de la prótesis y que esta sea retirada un periodo de tiempo en cada día. También se observó que la zona de inhibición de todos los enjuagues bucales disminuyó con el aumento de la dilución.^{13, 14}

Son diversos los antisépticos que existen y que se pueden usar para la eliminación de microorganismos como *Candida*, sin embargo no restablecen el equilibrio de la microbiota oral, solo controlan la proliferación de patógenos, por tal motivo existen estudios que apoyan la idea de usar probióticos los cuales se definen según la OMS y la FAO como “microorganismos vivos, principalmente bacterias, que son seguros para el consumo humano, y cuando son ingeridos en suficiente cantidad, tienen efectos benéficos en la salud humana”. Algunas cepas de probióticos son:

Lactobacillus acidophilus, casei, rhamnosus, plantarum, Bifidobacterium infantis
Lactobacillus Reuteri. Streptococcus thermophilus, Enterococcus spp,
Saccharomyces spp, lactobacillus spp y bifidobacterias que hasta la fecha no
presentan contraindicaciones y pueden prevenir las enfermedades orales en
pacientes sanos o inmunosuprimidos.¹⁵

2.7. PROBIÓTICOS

La aplicación de los antimicrobianos a mediados del siglo XX revolucionó de una manera muy significativa el tratamiento de las infecciones, marcando nuevas pautas de actuación ante ellas; no obstante, el rápido desarrollo de resistencias hizo necesaria la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para el control de las enfermedades infecciosas. Dentro de diversos conceptos, los antibióticos se utilizan para definir el efecto antibacteriano de las bacterias, pero otros microorganismos, como levaduras y hongos, pueden presentar estas características. Por esto es importante el uso de nuevos implementos que nos ayuden a sobrellevar estos problemas que se han generado por el uso indiscriminado de medicamentos. Estas condiciones también son relevantes para la prevención de enfermedades dentales y existe un interés creciente en el uso de estrategias que no involucran a los agentes antimicrobianos convencionales para el cuidado oral. Ha habido un cambio de paradigma lejos del tratamiento de enfermedades dentales dirigiendo patógenos orales específicos hacia un enfoque ecológico y microbiano basado en la comunidad para entender las condiciones, como la caries y las enfermedades periodontales. Estos enfoques reconocen la importancia de mantener el equilibrio natural de la

microbiota oral residente y la necesidad de modular cuidadosamente las respuestas inmunes del huésped a la microflora en un sitio.¹⁶

Uno de los enfoques que ha ganado interés en los últimos años es el uso de bacterias probióticas para aplicaciones orales. El término “probióticos” se refiere a microorganismos vivos, usados en forma de suplementos nutricionales, que mejoran el equilibrio microbiano y tienen efectos beneficiosos sobre la salud general. La observación inicial de los efectos positivos de estas bacterias la hizo Ilya Metchnikoff, científico ruso del Instituto Pasteur que consiguió el premio Nobel en 1908, quien señaló los múltiples beneficios que proporcionaba el consumo de los probióticos en diversos productos como el yogurth, viéndose una asociación con una gran longevidad y buena salud física en las personas que los consumen. El término “probiótico” fue utilizado por primera vez en el año 1965 por Lilly y Stillwell para describir en un principio aquellas sustancias secretadas por un microorganismo que estimulan el crecimiento de otros microorganismos, sin embargo, fue posteriormente cuando se acuñó la palabra como se conoce actualmente, aludiendo a microorganismos incluidos en productos dietéticos que contribuyen al balance microbiano. Los efectos beneficiosos de los probióticos en la salud humana y en la nutrición están siendo cada vez más reconocidos. Diferentes grupos de trabajo que estudian las propiedades y la funcionalidad de los microorganismos vivos en la dieta sugieren que los probióticos desempeñan un papel importante en las funciones digestivas, inmunitarias y respiratorias, y podrían tener un efecto significativo en el

tratamiento de las enfermedades infecciosas, especialmente en los niños y en las poblaciones de alto riesgo.^{16, 17}

En partes de Europa y Asia, existe un amplio consumo, ya que se cree que proporcionan efectos provechosos para la salud, esto incluye a los probióticos y los prebióticos. Es importante diferenciar de otros elementos los “prebióticos” (por ejemplo, fructanos de tipo inulina, maltodextrina, fructooligosacáridos y galactooligosacáridos) que son oligosacáridos no digeribles que afectan a la proliferación de bacterias comensales residentes que pueden ejercer efectos probióticos. Más recientemente, se ha modificado la definición para incluir ingredientes selectivamente fermentados que permitan cambios específicos en la composición y/o actividad de la microflora residente que confieren beneficios locales y generales al bienestar y salud del huésped. Los estudios de prebióticos se han centrado principalmente en la microbiota gastrointestinal y beneficios para la salud; existe poca investigación sobre la cavidad oral. El principal mecanismo de acción de los prebióticos es indirecto, es decir facilitando la proliferación de componentes beneficiosos de la microbiota residente, con efectos probióticos resultantes de las acciones de estas bacterias. Hay pruebas de que algunos prebióticos también ejercen efectos directos sobre el huésped, independientemente de sus efectos sobre las poblaciones bacterianas residentes. Estos incluyen la estimulación de la expresión de IL-10 y el interferón γ , el incremento de la secreción de IgA, la modulación de las respuestas inflamatorias a patógenos y la estabilización de la barrera. Además, se han diseñado prebióticos con función mejorada. Estos

derivados de oligosacáridos contienen azúcares que son receptores de células epiteliales específicos a los que se adhieren los patógenos y, por lo tanto, facilitan sitios de adhesión "señuelo" y provocan que los patógenos se adhieran a los contenidos luminales en lugar de a las células epiteliales.¹⁶

Por lo general pero no de manera exclusiva los probióticos son bacterias "ácido lácticas", principalmente pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii subsp. bulbaricus*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. johnsonii* y *L. reuteri*) y *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. longum* y *B. lactis*). Otros microorganismos probióticos son *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Saccharomyces boulardii* y *Escherichia coli Nissle*.¹⁷

La justificación para su uso en la atención de la salud oral se deriva del aumento de la evidencia que apoya sus demandas de beneficio para una gama de enfermedades, especialmente en el tracto gastrointestinal.¹⁶

La diversidad de condiciones que pueden beneficiarse de la ingestión de probióticos muestra la variedad de mecanismos que pueden estar involucrados en sus acciones y que algunos efectos son sistémicos y no sólo locales. Es probable que estos mecanismos varíen según la cepa o combinaciones específicas de cepas utilizadas, la presencia de probióticos y la afección que se está tratando, así como la etapa del proceso de enfermedad en la que se administra el probiótico.

Se han propuesto numerosos mecanismos que incluyen:

- Competencia con los patógenos por sitios de unión, nutrientes y sustratos disponibles.
- Secretan diversas sustancias antimicrobianas, tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas.
- Previenen la adhesión e invasión de bacterias patógenas.
- Modifican el medio ambiente circundante mediante la modulación del pH y / o del potencial de oxidación y reducción, lo cual puede comprometer la capacidad de los patógenos para establecerse.
- Interfieren con factores de virulencia de microorganismos.
- Alteran la actividad metabólica de la microbiota.
- Regulan la permeabilidad y favorecen el desarrollo de especies menos patógenas en la microbiota oral.
- Modulan la inmunidad natural y la respuesta inmune adaptativa.^{13, 16, 17}

Debido a que los estudios en relación a probióticos y candidiasis oral en pacientes con tratamiento ortodóncico son escasos, este estudio busca aportar evidencia sobre el uso de probióticos como coadyuvante al tratamiento y prevención de la colonización por *Candida* aislada de aparatos ortodóncicos, aportando nuevas opciones de tratamiento para la disminución de este patógeno en pacientes sanos o inmunosuprimidos.⁷

2.8. USO DE PROBIÓTICOS PARA EL CONTROL DE LA PROLIFERACIÓN DE CÁNDIDA EN PACIENTES BAJO TRATAMIENTO ORTODÓNCICO

Las dos marcas comerciales de probióticos utilizadas en este estudio son:

1. **ProBiseis** que contiene; *Lactobacillus: acidophilus, casei, rhamnosus, plantarum, Bifidobacterium infantis* y *Streptococcus thermophiullus*.
2. **ProBucal-D** que contiene: *Lactobaciullus Reuteri*.

El uso de bacterias probióticas contra las infecciones microbianas ha surgido como una técnica terapéutica alternativa para las infecciones por *Candida* en vista de las limitaciones de los antifúngicos actualmente disponibles. En términos terapéuticos, se sabe que los probióticos reducen las infecciones por *Candida* en diferentes sistemas de órganos del cuerpo humano y generalmente se consideran beneficiosos para la salud en general. Recientes investigaciones sugieren que la combinación de probióticos con opciones de tratamiento tradicionales genera mejoras en los resultados y la resolución de la enfermedad.¹⁸

Respecto a los probióticos para la salud oral, aunque su uso es menos habitual a pesar de los resultados obtenidos en varios estudios y al desarrollo de productos comerciales con estos componentes. Se ha propuesto que las propiedades ideales de éstos serían: unión a superficies dentales, producción de sustancias antimicrobianas contra los patógenos orales, alteración de las condiciones ambientales de la cavidad bucal y reducción de la respuesta inflamatoria. Estudios clínicos recientes consideran a los probióticos como una alternativa de tratamiento válida en el control de las enfermedades orales que producen virus, bacterias y hongos.¹⁹

El efecto de los probióticos sobre la colonización de *Candida*, ha sido investigado, dando como resultado datos en los que se reporta una prevalencia disminuida de

recuento de *Candida albicans* reduciendo también los factores de virulencia. La inhibición de estos factores de virulencia en *Candida albicans* es una herramienta importante para el tratamiento de la candidiasis. Varios estudios en la literatura revelaron que algunas cepas de *Lactobacillus* fueron capaces de inhibir *Candida albicans* a través de la producción de bacteriocinas, alteraciones ambientales a través de la producción y secreción de moléculas derivadas del metabolismo del ácido láctico y peróxido de hidrógeno o inclusive por inhibición mecánica de la adhesión. Las bacterias probióticas también son capaces de modular el sistema inmunológico de sus huéspedes por medio de la producción de citoquinas y la estimulación de la actividad celular, diversos estudios manifiestan que la reducción de esta especie se da posterior al consumo de los productos como quesos, yogurth, pastillas y soluciones con probióticos añadidos, que contiene diversos *lactobacilos* y especies de *bifidobacterias*, la mayoría de estos estudios realizados sobre muestras tomadas de pacientes mayores portadores de prótesis removibles y cepas de *Candida ATCC*. En diversos estudios sobre *L. reuteri* se logró colonización en la mayoría de los pacientes periodontales que recibieron un probiótico, pero el estudio sólo duró 14 días. La microbiota residente de los pacientes con aparatología ortodóncica fija en adolescentes parece ser menos estable y más sujeta a flujo que las comunidades microbianas residentes en adultos, y tal vez sea en éste tipo de pacientes que se lograrán influencias a largo plazo sobre las poblaciones residentes.¹⁶

Los estudios de la influencia de *L. reuteri* ATCC en los *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus* indicaron que los beneficios observados pudieron ser debidos a

efectos sistémicos más que a la colonización de la boca por la bacteria probiótica. Los probióticos han sido eficaces en algunas enfermedades inflamatorias crónicas que implican la desregulación de las respuestas inmunitarias como Artritis y enfermedad de Crohn. Algunos de los efectos sistémicos requeridos para los probióticos son la inmunomodulación, la alteración de la producción de mucina, la estabilización de las barreras mucosas, el aumento de las defensas IgA, los efectos sobre los neutrófilos y las células dendríticas y la mejora de la salud ósea influyendo en el hueso, contenido mineral y estructura. La inflamación crónica y la resorción ósea contribuyen significativamente a la patogénesis de las enfermedades periodontales, y es posible especular que algunos de estos efectos sistémicos podrían proveer una protección relacionada en contra las enfermedades periodontales. También es posible que la colonización de un sitio pueda proporcionar protección indirecta en otros sitios mediante mecanismos distintos de los efectos sistémicos. Por ejemplo, la disminución de la colonización de la lengua puede reducir los depósitos para la colonización de la placa. La placa supragingival y la placa subgingival están íntimamente vinculadas, ya que la placa supragingival se extiende hacia abajo del diente para formar la placa subgingival, por lo que los cambios en la placa supragingival influirán en la composición futura de la placa subgingival. Los lactobacilos asociados con la salud periodontal fueron raramente aislados de muestras subgingivales. Sin embargo, se encontró que estas bacterias inhibían el crecimiento de ciertos patógenos periodontales. Por otra parte estudios realizados con un consumo de 12 semana mostraron que *L. reuteri* reduce significativamente la prevalencia de *Candida* de un 72% a un 51%, observándose

que el crecimiento de *Candida* fue obstaculizado, esto se debe a que *L. reuteri* produce una toxina similar al peróxido de hidrogeno llamada reuterina, que dificultan el crecimiento de *Candida* a través de inhibición selectiva. También hay una posibilidad de que favorezca al sistema inmune mediante inmunomodulación a través de la barrera mucosa y con un aumento en la producción de IgA. Las mezclas de probióticos en la que se contiene *L. rhamnosu*, también muestran una fuerte inhibición in vitro de *Candida albicans*, debido al pH bajo y a la producción de peróxido de hidrogeno, *L. rhamnosu* además tiene un gran potencial que produce exopolisacárido y aumenta su adherencia al sustrato teniendo una acción inmunomoduladora, regulando las citocinas como TNF-alfa, IL-6, IL-12 e IL-10, y ha demostrado en la cuantificación de unidades de colonias de *Candida albicans* una disminución del 52.2% en su crecimiento posterior a la interacción con las células de *L. rhamnosus* y una reducción del 48% en la actividad metabólica, también disminuyó el crecimiento de *Candida albicans* en un 39,4% esto sugiere que las bacterias probióticas interferían tanto con el crecimiento como con la actividad metabólica de los biofilms de *Candida albicans*, otro de los probióticos utilizados es *L. Acidophilus* bacterias lácticas con baja capacidad de producción de ácido láctico tiene características beneficiosas significativas, tales como: modulación beneficiosa de la actividad metabólica de las bacterias intestinales, prevención de la diarrea asociada con antibióticos, preservación de la integridad intestinal durante la radioterapia, estimulación de las respuestas del sistema inmunológico, aumento de la disponibilidad de hierro, reducción de la flora bacteriana vaginal y la producción

de sustancias antimicrobianas que actúan contra otras bacterias, virus, protozoos y hongos.^{11, 15}

Lactobacillus plantarum un lactobacilo heterofermentativo facultativo, metabólicamente muy flexible y versátil, ha sido muy investigado debido a su amplia capacidad de adaptación y sus numerosas aplicaciones, las investigaciones sobre este probiótico se centran en las respuestas bacterianas a factores de estrés como el choque térmico, la presencia de altas concentraciones de ácido láctico y la bilis, así como pH bajo y etanol, este lactobacilo ha sido estudiado en conjunto con otras bacterias como *Streptococcus thermophilus* que proporciona beneficios a la salud por su producción de exopolisacáridos que tienen diversas funciones como son la protección celular contra sustancias tóxicas, ambientes limitantes y otros antagonistas, secuestro de cationes esenciales, colonización y reconocimiento celular, estos probióticos han sido estudiados en el consumo de productos comestibles que han beneficiado la salud del huésped y contrarrestan la patogenicidad de bacterias como *Candida*.¹⁹

Bifidobacterium infantis es otra de las bacterias que han sido estudiadas, estas bacterias son habitantes naturales del tracto gastrointestinal que representan del 3-10 % en la microflora del adulto y el 90% en los infantes alimentados con leche materna. Este grupo bacteriano tiene un papel vital en el balance microbiano intestinal y en la modulación de la respuesta inmune del huésped así como *L. reuteri* ya menciona anteriormente que en conjunto ha representado un tratamiento

alternativo para la reducción de las infecciones por *Candida* en pacientes mayores portadores de prótesis.²⁰

L. rhamnosus, *L. rhamnosus* y *Propionibacterium freudenreichii*, *Sermani*, redujeron la prevalencia de *Candida*, por otra parte el uso de los probióticos con las cepas *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* y *B. bifidum*, también realizado en pacientes de edad avanzada portadores de prótesis removible con candidiasis oral asintomática mostro eficacia al reducir la colonización de *Candida* en la cavidad oral.²¹

Esto nos demuestra que las intervenciones dietéticas simples y relativamente baratas como el consumo de productos como yogurt, queso o pastillas con probióticos, que no presentan efectos secundarios, pueden considerarse como una base para el tratamiento o la prevención de la candidiasis oral y que es posible que los subproductos metabólicos de estos probióticos puedan interferir con las propiedades de unión o la actividad metabólica de *Candida albicans*. Lo que sugiere que los productos en los que pueden encontrarse estos lactobacilos, en diversas combinaciones y su consumo ayuda a reducir, prevenir, y modificar la presencia de *Candida* en la cavidad oral, siendo un tratamiento en pacientes susceptibles a candidiasis oral, por la disbiosis que se ocasiona al ser portadores de aparatos ortodóncicos, estos probióticos puede aliviar y reducir el potencial patógeno de especies de *Candida*. Ya que diversas investigaciones mostraron una reducción significativa en el recuento de unidades formadoras de colonias de esta especie así como la reducción de síntomas en pacientes con candidiasis oral. Con todo esto, existe una necesidad de investigación en aislados de *Candida albicans* con el

objetivo de prevenir o tratar enfermedades orales causadas por este hongo en pacientes portadores de estos aparatos.^{22, 23}

La mayoría de las enfermedades bucales son de naturaleza polimicrobiana y resultan de cambios ecológicos complejos en la microbiota residente. En caries, la capacidad de las bacterias para colonizar la placa, producir ácido y sobrevivir bajo condiciones de pH bajo son de gran importancia y estas propiedades no están restringidas a pocas especies. Por lo tanto, los enfoques altamente focalizados pueden tener un éxito limitado, ya que hay tantos otros microorganismos que pueden ocupar un nicho similar. Además, se ha hecho hincapié en la identificación de probióticos que tendrán un efecto sobre las bacterias que tienen fuertes asociaciones con enfermedad establecida o grave. En el momento en que estas especies son frecuentes, la enfermedad está bien establecida y el sitio ya está en crisis; Un enfoque terapéutico más eficaz que el objetivo de estos patógenos podría ser inhibir el crecimiento o la actividad de las uniones microbianas que están asociados con la transición de la salud a la enfermedad. Los avances que se han producido en las tecnologías utilizadas para detectar y caracterizar las poblaciones microbianas están llevando a una caracterización más detallada de la microbiota asociada con fases específicas de la salud y la enfermedad por lo que este enfoque se está convirtiendo en una posibilidad realista. Por último, existe una amplia aprobación de la importancia de la ecología oral.¹⁶

A pesar de la alta prevalencia de infecciones por candidiasis oral en poblaciones predispuestas en todo el mundo y cronicidad de estas enfermedades, existen pocos estudios in vivo que evalúen el efecto de los probióticos sobre la supresión de la

candidiasis oral. Estos indican que los probióticos pueden ser un complemento útil en la batalla contra la candidiasis oral, especialmente como agente profiláctico en individuos inmunocompetentes. Las características que les permiten ser probióticos y la selección de las cepas para la enfermedad son complejas pero esenciales. Algunas cepas probióticas han estado en uso durante muchos años y tienen excelentes registros de seguridad. La mayoría de las bacterias probióticas son débilmente proteolíticas. El uso de probióticos para uso en aplicaciones de atención oral está ganando impulso. Cada vez hay más pruebas de que el uso de cepas probióticas existentes puede proporcionar beneficios para la salud bucal. Pero se necesitará más trabajo para optimizar y cuantificar completamente el alcance de este beneficio.²⁴

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen numerosos microorganismos en la boca, una disbiosis (de etiología multifactorial, entre ellos la utilización de aparatología fija ortodóncica) en la microbiota oral puede ocasionar superinfecciones resultando en complicaciones durante el tratamiento ortodóncico además de comprometer la salud oral y general del paciente. Se ha identificado que *Candida* es uno de los principales microorganismos que proliferan en situaciones de disbiosis oral.

El uso de probióticos ha sido reportado con efectos benéficos para la salud general, además de tener efecto inhibitorio en proliferación de *Candida albicans*; sin embargo, aunque ha sido reportada su actividad antifúngica contra sepsas orales certificadas, es escasa la literatura que reporte estos efectos en aislados clínicos.

Por lo que surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál será la eficacia antifúngica *in vitro* de dos tipos de probióticos en la biopelícula madura de *Candida albicans* aislada de pacientes con aparatología fija ortodóncica?

4. HIPÓTESIS

Hipótesis de Investigación (Hi):

Ambos probióticos tendrán eficiencia antifúngica en *Candida albicans* ATCC y aislado de *Candida albicans* proveniente de aislados clínicos de pacientes con aparatología fija ortodóncica.

Hipótesis Nula (H0):

Ambos probióticos tendrán ineficiencia antifúngica en *Candida albicans* ATCC y aislado de *Candida albicans* proveniente de aislados clínicos de pacientes con aparatología fija ortodóncica.

Hipótesis Alterna (Ha):

Ambos probióticos tendrán un efecto inocuo en el desarrollo y proliferación de *Candida albicans* proveniente de aislados clínicos de pacientes con aparatología fija ortodóncica.

Hipótesis Estadística (He):

El grupo experimental obtendrá diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) con respecto a los Grupos controles.

5. JUSTIFICACIÓN

La aparatología fija en ortodoncia a 30 días de su colocación ocasiona un desequilibrio de la microbiota oral (disbiosis), aumentando cuando se incorporan materiales elastoméricos y/o resinas acrílicas que lleva a la proliferación de *C.albicans*, el incremento de este patógeno tiene un impacto en la salud de los pacientes a nivel oral y sistémico. A nivel oral el establecimiento de la disbiosis ocasiona una mayor susceptibilidad a caries en la cual *C. albicans* tiene un papel importante, a nivel sistémico los aparatos ortodóncicos sirven como reservorio para una diseminación ocasionando candidiasis esofágica o candidemia. Existen reportes en la literatura de la eficacia de diversos agentes antimicrobianos para el control de la proliferación de *C. albicans*, sin embargo a pesar de ser eficaces, estos perpetúan el desequilibrio de las bacterias que forman parte de la microbiota oral. Por tal motivo, recientemente se ha propuesto utilizar probióticos para lograr restablecer el equilibrio bacteriano y de esta manera por competencia de nichos se dé la inhibición del hongo, siendo éste método menos dañino para el paciente, sin embargo los estudios que existen son solo sobre cepas ATCC, adicionalmente es escasa la información reportada en literatura relevante en aislados clínicos de cepas provenientes de aparatos ortodóncicos. Por tal motivo, este estudio aportará información esencial en esta área del conocimiento acerca de la efectividad antifúngica de probióticos comerciales sobre aislados de pacientes con aparatología fija en ortodoncia, del mismo modo con una cepa ATCC ya que ordinariamente es utilizada para certificar la calidad de los resultados de ensayos de laboratorio, validar

los métodos microbiológicos y asegurar que nuestros resultado sean técnicamente válidos, con todo esto ofrecer las bases para la realización de ensayos clínicos controlados aleatorizados y así establecer una rutina preventiva basada en probióticos que obstaculice la proliferación de *C. albicans* en pacientes con aparatología fija ortodóncica.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar cuantitativamente la eficiencia antifúngica de dos tipos de probióticos en *Candida albicans* provenientes de una cepa certificada y un aislado clínico proveniente de pacientes con aparatología fija ortodóncica.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la eficiencia antifúngica de probióticos contenidos en una presentación comercial **ProBiouseis** en cepas de *Candida albicans* (ATCC o aislado clínico) sobre un biofilm maduro.
- Determinar la eficiencia antifúngica de probióticos contenidos en una presentación comercial **Probucaal-D** en cepas de *Candida albicans* (ATCC o aislado clínico) sobre un biofilm maduro.
- Comparar la eficiencia antifúngica de los dos tipos de probióticos evaluados en cepas de *Candida albicans* (ATCC o aislado clínico) sobre un biofilm maduro.
- Identificar el tipo de probiótico más eficiente en biofilm maduro en las cepas.
- Evaluar si el efecto antifúngico de los probióticos es por una interacción célula-célula.
- Realizar cultivos de los probióticos, 5 diluciones de cada grupo experimental y control para conteo de UFC's y lograr la estimación cuantitativa.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Tipo de investigación: básica

Diseño de estudio: experimental, transversal y prospectivo.

- Diseño de bloques completos de manera aleatoria.
- Se siguieron las guías de la ATLA con respecto al diseño de experimentos *in vitro* y se cumplieron los criterios. (Anexo 1)
- Procedimiento que basado en el control de las condiciones permitió verificar (apoyar, rechazar o modificar) una hipótesis y con esto dar recomendaciones de aplicación práctica.
- Se siguieron los rasgos universales del diseño experimental:
 - a) La selección aleatoria de las unidades experimentales.
 - b) Número de repeticiones.
 - c) El control local de las condiciones.

Se determinó si los dos tipos de probióticos producen una diferencia en la inhibición del biofilm con un desarrollo maduro de *C.albicans* de una cepa ATCC y un aislado clínico para medir su eficiencia antifúngica. En la tabla 1 se muestran los factores y sus niveles.

7.2 MUESTRA

La unidad experimental estuvo conformada por una cepa de *Candida albicans* ATCC 90028 y un aislado clínico de *Candida albicans* proveniente de pacientes con aparatología fija ortodóncica previa firma de consentimiento informado por los implicados en el estudio (participantes y/o padres).

7.3. SELECCIÓN DE LOS FACTORES Y SUS NIVELES

Tabla 1. Descripción de los Factores del diseño experimental

Factor	Nombre	Nivel	Nombre
A	Tratamiento	A ₀ , A ₁	ProBiseis, ProBucal-D
B	Cepa	B ₀ , B ₁	<i>C. albicans</i> ATCC 90028, <i>C. albicans</i> a. Clínico.
C	Biofilm	C ₁	Biofilm maduro

El diseño de un factor completamente aleatorizado consiste en asignar aleatoriamente cada uno de los tratamientos a una unidad experimental (cepas de *Candida albicans* ATCC o aislado clínico) y evaluar la susceptibilidad correspondiente. El cálculo del tamaño de la muestra se hizo en base a la fórmula Resource Equation basada en la ley de las repeticiones mínimas.²⁵

$$E = N - T - B$$

Se determinó una n=10 unidades experimentales por Factor en 2 experimentos independientes.

1. Colocación de *Candida albicans* en 30 pozos para el experimento de eficiencia los probióticos de las dos marcas comerciales en un biofilm maduro de 24 horas de una cepa ATCC. *Fig. 1*
2. Colocación de *Candida albicans* en 30 pozos para el experimento de eficiencia los probióticos de las dos marcas comerciales en un biofilm maduro a 24 horas de un aislado clínico de pacientes con aparatología ortodóncica fija. *Fig. 2*

- C: Control (Bacteria experimental + medio de cultivo)
- A: Bacteria experimental + probiótico marca comercial ProBucal-D
- B: Bacteria experimental + probiótico marca comercial ProBiseis

10 cepas en cada uno de los experimentos numeradas del 1 al 10.

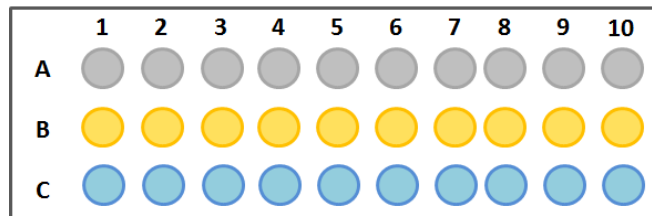


Figura 1. Distribución del grupos experimentales y grupos controles de los probióticos en las microplacas de 30 pozos con las cepas ATCC en un biofilm maduro (24 horas).

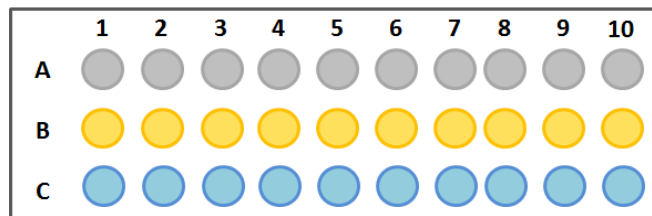


Figura 2. Distribución del grupos experimentales y grupos controles de los probióticos en las microplacas de 30 pozos con *C. albicans* aislado clínico en un biofilm maduro (24 horas).

Por lo tanto, se utilizaron un total de **30** unidades experimentales por **2** bloques = **60** cepas (30 ATCC y 30 *Candida albicans* aislado clínico) para realizar este experimento (*Tabla 2*).

Tabla 2. Diseño del experimento en bloque.

Factores	Bloque	
	I	
	B_0^{\wedge}	B_1^{\wedge}
	C_1^{**}	C_1^{**}
A_0^+		
A_{1++}		
+Probiseis, ++Probuca-D, \wedge C. <i>albicans</i> ATCC90028, \wedge C. <i>albicans</i> a. clínico, **Biofilm Maduro,		

7.4. LUGAR DE REALIZACIÓN

- Clínica de Ortodoncia del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO) de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex).
- Laboratorio de bioquímica, microbiología y patología de la Facultad de Estomatología de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP).
- Laboratorio de ciencias básicas de la Facultad de Estomatología de la UASLP.

7.5. CRITERIOS DE SELECCIÓN

7.5.1. Criterios de inclusión

- Aislamiento de *Candida albicans* proveniente de pacientes con aparatología ortodóncica fija que tenga al menos 3 meses en cavidad oral, de cualquier sexo, que acepten participar mediante la firma del consentimiento informado.
- Aislado de *Candida albicans* ATCC 90028 cepa de referencia para pruebas de susceptibilidad recomendada por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

7.5.2. Criterios de exclusión

- Aislados contaminados por otras bacterias.

7.5.3. Criterios de eliminación

- Aislados que no sean factibles de procesar.

7.6. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN
Inhibición del biofilm de <i>Candida albicans</i>	Inhibición del biofilm por una interacción célula – célula mediante el conteo de las UFC de <i>Candida albicans</i> en ADS posterior a la interacción con probióticos en una suspensión celular	Número de UFC en ADS a partir de una suspensión celular conocida 1×10^7 cel / ml se <u>cuantificará su disminución</u>	Cuantitativa Discreta	Absoluta

VARIABLES INDEPENDIENTES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN
Probiótico	Microorganismos vivos que son capaces de inhibir el crecimiento de cepas patógenas	Tipo de probiótico de acuerdo a las especies que componen la mezcla	Nominal A0=Probiseis A1=Probuca -D	Nominal
Cepas de <i>Candida</i>	Célula eucariota fúngica con rasgos genotípicos y fenotípicos de acuerdo al origen del cual proviene	Tipo de aislamiento de acuerdo al origen, cepa de referencia y un aislado clínico oral	Nominal B0= <i>C. albicans</i> ATCC 90028 B1= <i>C. albicans</i> aislado clínico	Nominal
Maduración del biofilm	Células planctónicas que se adhieren a una superficie forman una comunidad protegida por una matriz extracelular	Etapas para la formación del biofilm en una etapa inicial 1.5h las células se adhieren levemente al sustrato a las 7.5hr fuertemente y a las 25.5h hay agregación de microcolonias seguido por la maduración de la biopelícula	Nominal C0= Biofilm maduro	Nominal

7.7. PROCEDIMIENTO

Se determinó el efecto directo que tienen las células bacterianas probióticas de dos marcas comerciales sobre el desarrollo del biofilm de *C. Albicans*. Una suspensión celular de probióticos se añadió a *C. albicans* (ATCC y aislado clínico) en la fase de maduración secundaria o madura del biofilm. La viabilidad celular fue determinada por el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Fig.3

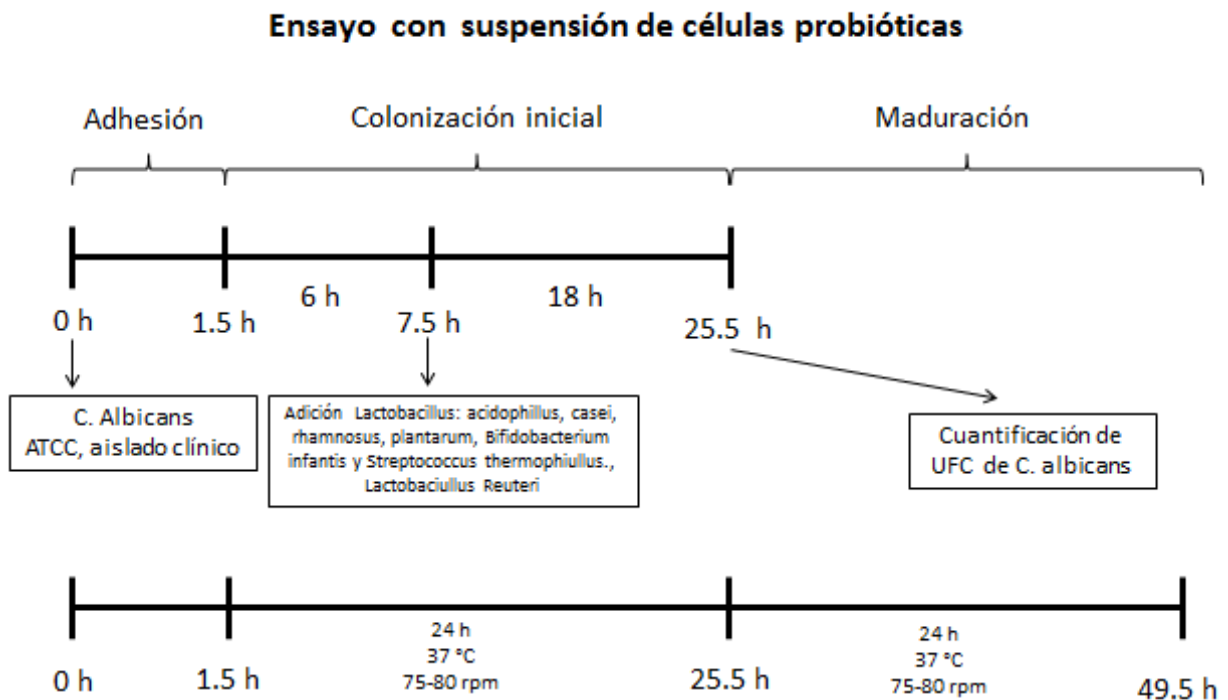


Figura 3. Descripción del experimento con base en la formación de biofilm.

7.7.1. MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS

Microorganismos

Candida albicans ATCC 90028 y un aislado clínico proveniente de pacientes con aparatología ortodóncica fija. *Fig. 4 y 5*



Figura 4. Colonias de *C. albicans* ATCC.



Figura 5. Colonias de *C. albicans* de aislado clínico.

Los **probióticos** seleccionados fueron dos marcas comerciales Probuca-D (*L. reuteri*) y ProBiseis (*Lactobacillus: acidophilus, casei, rhamnosus, plantarum, bifidobacterium infantis* y *Streptococcus thermophilus*) este probiótico fue previamente estudiado, en donde se pudo caracterizar e identificar mayor crecimiento de *Lactobacillus*, mostrando mayor concentración y mejor efecto de inhibición de *C. albicans* ATCC. (Evaluación *in vitro* del efecto antagónico de *Lactobacillus* recuperados de formulaciones probióticas comerciales sobre el crecimiento de *C. albicans*). *Fig. 6*



Figura 6. Probióticos comerciales seleccionados.

7.7.2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Para el desarrollo de *C. albicans* se sembraron en placas de Agar Dextrosa Saboraud (ADS) ya que este medio de cultivo es utilizado para crecimiento de mohos y levaduras patógenas y no patógenas el pH ácido del medio resulta favorable para el crecimiento de los hongos y ligeramente inhibitorio para las bacterias.

Se colocaron 50 μ l de la suspensión de *C. albicans* para 1 cultivo de ATCC y 1 cultivo de *C. albicans* aislado clínico de pacientes con aparatología ortodóncica fija con previo consentimiento informado. *Fig. 7*

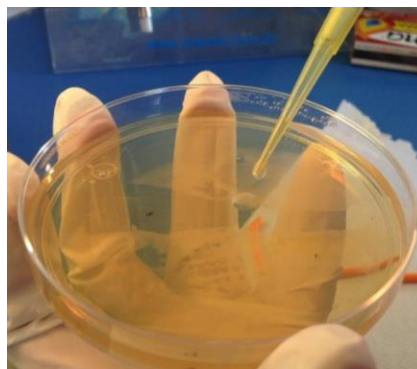


Figura 7. Siembra de *C. albicans*.

Después de 24 horas de cultivo de ATCC y *C. albicans* aislado, se tomó una colonia de cada uno de los aislados de las células y se colocaron en 5 ml de ADS para incubarlos 24 horas a 37°C 80 RPM, 10 colonias por cada experimento (ATCC y *C. albicans* aislado clínico). Fig. 8 y 9

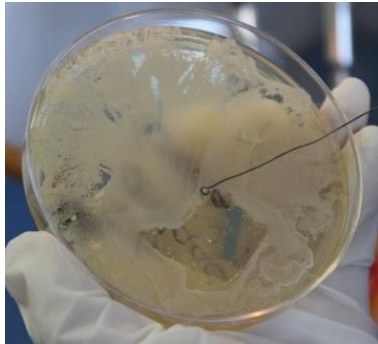


Figura 8. Selección de colonia de *C. albicans*.



Figura 9. Colocación de colonia *C. albicans* en medio ADS.

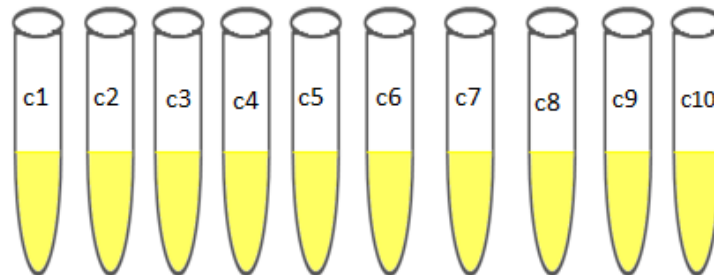


Figura 10. Inoculación de las 10 colonias en tubos falcon con 5 ml de Caldo ADS.

Después de 24 horas las células se recolectaron mediante centrifugación (a 3000 rpm durante 5 minutos), se descartó el sobrenadante y se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH 7,2) y se resuspendieron en infusión de cerebro corazón (BHI). Fig. 10 y 11

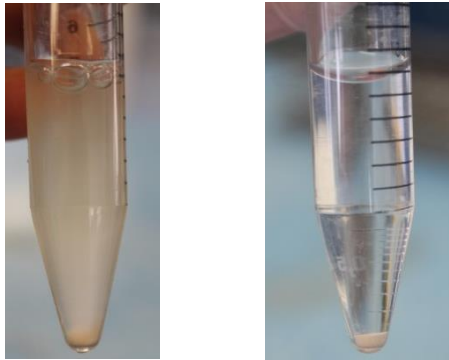


Figura 11. Recolección de células de *C. albicans* mediante centrifugación.

Para la siembra de cepas probióticas se usó Infusión de Cerebro Corazón (BHI) caldo. BHI es un medio muy rico en nutrientes, que proporciona un adecuado desarrollo microbiano. La infusión de cerebro de ternera, la infusión de corazón vacuno y la peptona, son la fuente de carbono, nitrógeno, y vitaminas. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el fosfato disódico otorga capacidad buffer para la mayor proliferación de las cepas probióticas.

Se sembraron las dos marcas de probióticos en agar rogosa, puesto que es un agar selectivo para el aislamiento de Lactobacilos y se incubaron en anaerobiosis para su crecimiento. *Fig. 12*

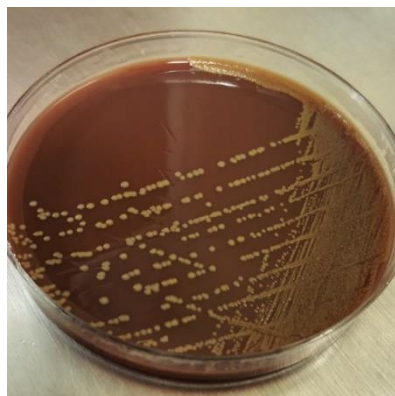


Figura 12. Siembra de probióticos agar rogosa.

Después de 24 horas de la siembra individual de las dos marcas de probióticos en agar rogosa, fueron seleccionadas colonias para colocarlas en 5 ml de BHI para su crecimiento en un medio anaerobio a 37 °C por 24 horas. *Fig. 13*

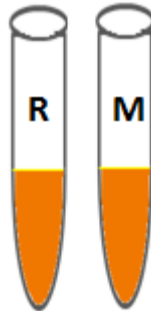


Figura 13. Colocación de células probióticas en BHI.

Las dos marcas de probióticos por separado fueron centrifugadas y lavadas con PBS dos veces para resuspenderlas en 5 ml de BHI. Las suspensiones celulares de *C. albicans* y de células probióticas se ajustaron a 1×10^7 cel / ml mediante espectrofotometría. *Fig. 14*

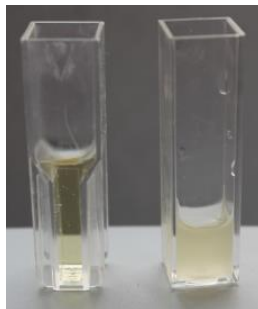


Figura 14. Colocación de las suspensiones para lectura mediante espectrofotometría.

Para el desarrollo del biofilm de *Candida albicans* se utilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano, pre-esterilizadas. Se colocaron 100µl de las 10 suspensiones por experimento de células de *C. albicans* (ATCC y aislado clínico) (1×10^7 células / ml) en cada pozo y se incubaron durante 1,5 h a 37°C bajo agitación a 80 rpm. Después de la incubación, se lavaron los pocillos dos veces con PBS para eliminar las células no adheridas, posterior a esto se colocaron 200µl BHI a cada pocillo, y las placas se incubaron posteriormente durante 24 horas para obtener un biofilm maduro de ATCC y *C. albicans* aislado clínico. *Fig. 15*

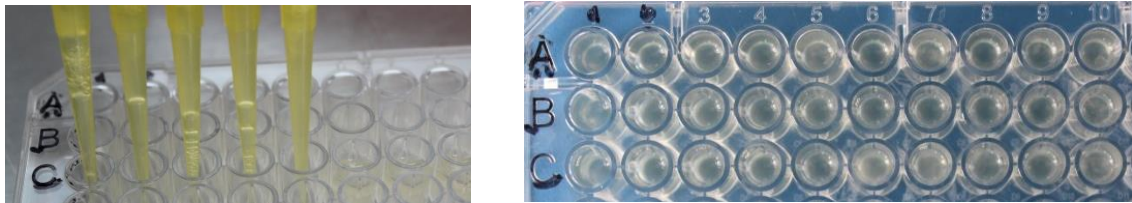


Figura 15. Colocación de 100 µl de suspensión de células *C. albicans*.

Los sobrenadantes del biofilm fueron descartados y se añadió a cada pocillo un total de 100 µl de BHI y 100 µl de la suspensión celular de probióticos para la fila A y B, para la fila C 200µl de BHI sin suspensión de células probióticas por ser el grupo control en cada experimento. Las placas con los biofilms de *C. albicans* ATCC y aislado clínico de 24 h de desarrollo se incubaron durante 24 horas a 37° C a 75-80 rpm.

Pasadas las 24 horas se lavaron 2 veces los pozos con 200 μ l de PBS, se añadieron 200 μ l de PBS para remover el biofilm y transferir a tubos eppendorf de 1.5 ml, se agregaron 800 μ l de PBS, para hacer diluciones seriadas hasta la -5. *Fig. 16*



Figura 16. Colocación de la suspensión de cada pozo en tubos eppendorf.

La viabilidad celular de *C. albicans* se determinó mediante la cuantificación de UFC en ADS, cultivandose 50 μ l de la suspensión en placas de agar de ADS de la dilución -3 y -4. *Fig. 17*

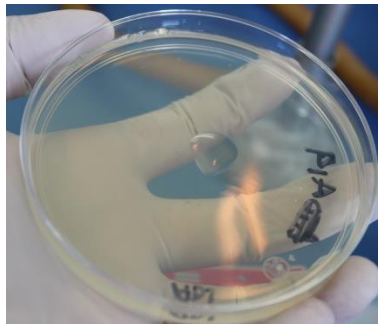


Figura 17. Colocación de 50 μ l de la dilución -3 y -4 en agar ADS.

Finalmente se realizó la cuantificación de UFC de cada placa. *Fig. 18*

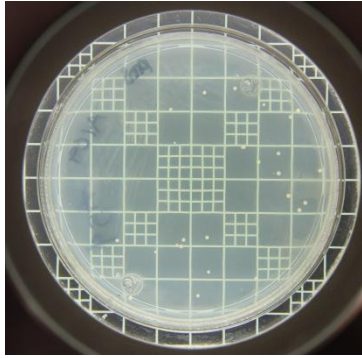


Figura 18. Cuantificación de UFC.

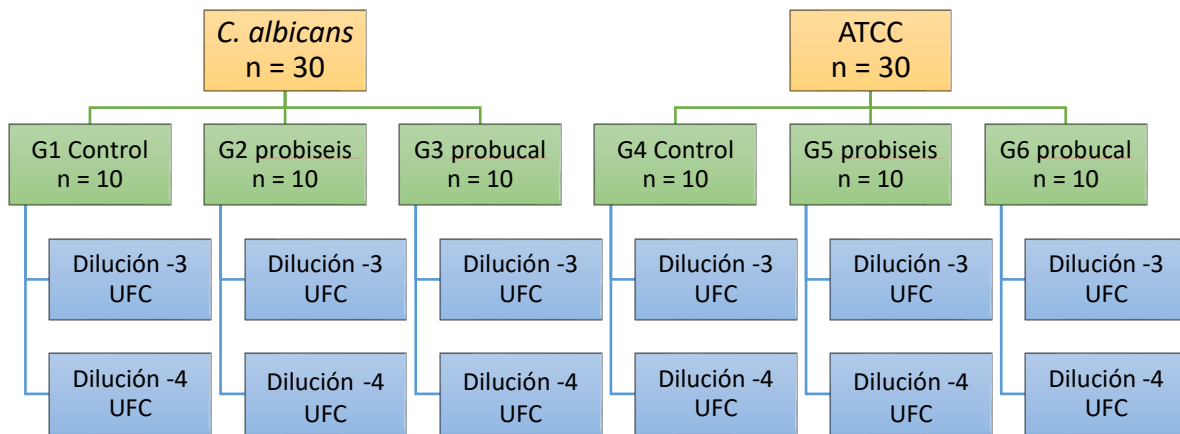


Figura 19. Diseño Experimental.

7.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los ensayos se realizaron con una n de 10 para cada grupo en 2 experimentos. De acuerdo a la distribución de los datos y prueba de homogeneidad se realizó el análisis estadístico mediante la prueba de ANOVA de un factor con un valor de $p \leq 0.05$ para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, mediante el programa IBM SPSS v23e.

7.9. CONSIDERACIONES BIOÉTICAS

De acuerdo con los principios establecidos en el artículo 17 del reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, esta investigación se considera de riesgo tipo II, ya que consistirá de un estudio experimental *in vitro* en el que se utilizarán muestras microbiológicas tomadas de pacientes bajo tratamiento ortodóncico. Y en cumplimiento de los aspectos mencionados en la declaración de Helsinki, este estudio se desarrollará conforme a los siguientes criterios:

- El conocimiento que se pretende generar no puede obtenerse por otro medio idóneo, por lo que se justifica la realización de este estudio con muestras microbiológicas, tomando en cuenta siempre la relevancia que el estudio tiene para la sociedad y la salud pública; considerando en todas sus etapas la normativa de la Ley General de Salud y los aspectos establecidos en la declaración de Helsinki.
- Se anexará el consentimiento informado por escrito de la autorización para la toma de muestra microbiológica de acuerdo a los parámetros establecidos en el artículo 20, 21 y 22 del reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud.

8. RESULTADOS

EFFECTO ANTIGÚNGICO DE PROBIÓTICOS EN BIOPELICULA MADURA.

Ambos probióticos mostraron efectos inhibitorios en el número de UFC's para los grupos experimentales (G2, G3, G5, G6) encontrado diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p \leq 0.05$), los valores más bajos de las medianas de UFC's fueron encontradas en el G2 (17 UFC), seguido del G5 (21.5 UFC); en contraste, los valores más altos de las medianas de UFC's fueron localizados en el G6 (29 UFC). Ver tabla 3.

Tabla 3. Resultados estadísticos descriptivos y significancia por grupos

Grupos	Total UFC's	Mediana	Desviación Estándar	Kruskal Wallis $p \leq 0.05^*$
ATCC Control (G1)	539	49	37.07	A
ATCC Probiseis (G2)	420	17	67.11	B
ATCC Probuca (G3)	316	23	26.35	C
<i>Albicans</i> Control (G4)	368	30	28.40	A
<i>Albicans</i> Probiseis (G5)	214	21.5	13.34	D
<i>Albicans</i> Probuca (G6)	397	29	32.50	C

*Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas



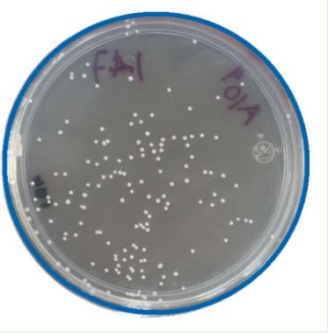
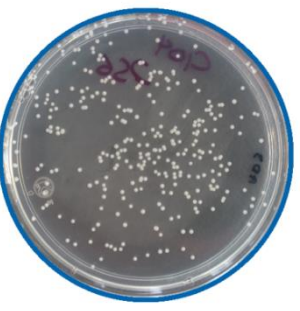
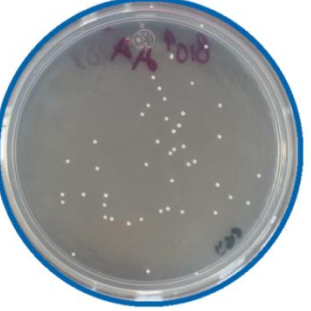

	CONTROL	PROBISEIS	PROBUCAL-D
<i>Candida albicans</i> / Aislado Clínico			
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028 (cepa certificada)			

Figura 20. Imágenes representativas de los resultados de conteos de las Unidades Formadoras de Colonias (1×10^7).

9. DISCUSIÓN

En sistemas de fluidos corrientes, cualquier sólido inmerso potencialmente puede retener en su superficie una diversa actividad de microorganismos. La piedra toral para que estos seres vivos puedan mantener su actividad es su capacidad de adhesión. Los microorganismos dependen de dicha propiedad para fijarse a la superficie, nutrirse y reproducirse, o que sean renovados. En condiciones ideales y de salud el organismo humano sólo tiene una superficie dura natural sumergida en un fluido como son los dientes, la cavidad oral tiene características que dan un potencial de proliferación bacteriana. Los microorganismos se adhieren a la superficie dental mediante la placa dentobacteriana.^{39, 31}

En el área de la Odontología la sustitución del tejido dentario por un material restaurador y específicamente en la especialidad de Ortodoncia, la colocación de aparatología fija en la cavidad bucal (brackets, bandas, ligadura, arcos, etc.) establecen condiciones para que estas superficies, al estar sumergidas en un fluido como la saliva, sean colonizadas por microorganismos. La superficie del material, su composición, el pH y diversos microorganismos presentes de manera normal en la cavidad oral, pueden influir en la capacidad de adhesión de microorganismos específicos y en la formación de la placa dentobacteriana, lo que aumenta el riesgo disbiosis, enfermedades, desmineralización en el esmalte, caries, y candidiasis oral, particularmente un aumento de microorganismos adheridos en superficies y espacios circundantes de aparatología fija y/o accesorios empleados en ortodoncia dispositivos fijo o removibles, como arcos, ligaduras, materiales elastoméricos,

acrílicos, etc., en este sentido se ha reportado cambios relevantes en la microbiota oral y repercusiones inmediatas como desmineralización del esmalte desde el primer mes después de la colocación de la aparatología fija en pacientes tratados ortodóncicamente con una incidencia de entre 12.6% a 50%.^{31, 32}

Por otra parte, en retrospectiva a partir del descubrimiento de microscopio y con ello la identificación de microorganismos patógenos, se inició una búsqueda de mecanismos para la erradicación de bacterias y hongos como causales de enfermedades, es entonces que se emplean vacunas y antimicrobianos que revolucionaron de una manera muy significativa la prevención y tratamiento de las infecciones, sin embargo, con el tiempo las mutaciones dio paso a cierta resistencia de microorganismos por lo que nuevamente se hizo necesaria la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para el control de las enfermedades infecciosas.¹⁸ En este contexto, específicamente en cavidad oral estas condiciones también son importantes para la prevención de enfermedades dentales y antecedentes de esfuerzos con interés en el uso de estrategias que no involucran agentes antimicrobianos para el cuidado oral, además de mantener el equilibrio natural de la microbiota oral residente y la necesidad de modular cuidadosamente las respuestas inmunes del huésped a la microflora en un sitio.¹⁸ En consecuencia el uso de “probióticos” se hace necesario para aplicaciones antes mencionadas ya que se ha demostrado que mejoran el equilibrio microbiano y tienen efectos beneficiosos sobre la salud general que de acuerdo con Ilya Metchnikoff, reportando asociación de longevidad y buena salud física en las personas que consumen probióticos

debido a que desempeñan un papel importante en las funciones digestivas, inmunitarias y respiratorias, infiriendo que podrían tener un efecto significativo en el tratamiento de las enfermedades infecciosas, especialmente en los niños y en las poblaciones de alto riesgo.^{15, 17}

Por lo general pero no de manera exclusiva los probióticos más reconocidos son bacterias “ácido lácticas”, principalmente pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii subsp. bulbaricus*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. johnsonii* y *L. reuteri*) y *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. infantis*, *B. breve*, *B. longum* y *B. lactis*). Otros microorganismos probióticos son *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Saccharomyces boulardii* y *Escherichia coli* Nissle.¹⁶

Esta investigación evaluó el eficiencia *in vitro* de dos marcas de probióticos comerciales (Probiseis y Probucal D) en la inhibición del biofilm maduro de *Candida albicans* ATCC y *Candida albicans* proveniente de aislado clínico de la biopelícula de pacientes con aparatología fija de ortodoncia. Los hallazgos del estudio demostraron inhibición del crecimiento ambos grupos experimentales (ATCC y aislado clínico), identificando diferencias estadísticas significativas entre las cepas. Con respecto a la cepa probiótica la más eficiente fue la mezcla (Probiseis) en el biofilm maduro de *Candida albicans* ATCC, cabe señalar que Probiseis contiene 4 lactobacilos, 2 bifidobacterias e inulina es considerada un simbiótico, los cuales han sido identificados en investigaciones previas con resultados similares y en donde

fueron evaluados por separado con diferentes combinaciones.^{13, 14} Del mismo modo otras investigaciones ^{9, 18, 33} sugieren con base en sus resultados que el efecto antifúngico se debe a una sinergia de acción de las diferentes cepas, y esta combinación de microorganismos probióticos resulta notable contra el desarrollo y crecimiento de *Candida albicans*, en niños, adultos y pacientes geriátricos.

Es a través de éstos resultados y en congruencia con otros estudios que se puede inferir que aunque existen alternativas farmacéuticas efectivas disponibles para el tratamiento contra Candidiasis, en pacientes adultos mayores con prótesis dentales totales, pacientes pediátricos con prótesis o con aparatología fija o removible de ortodoncia, pacientes con xerostomía y con algún tipo de discapacidad para realizar una buena higiene oral, la afección puede ser crónica o recurrente, lo que resulta en una alteración en la homeostasis de la microbiota oral o disbiosis, que sin aparición de síntomas genera una inflamación crónica en la mucosa bucal, es así como uno de los efectos beneficiosos de la combinación de probióticos actúa modulando el sistema inmunitario, este efecto puede ser el resultado de factores que alteran la permeabilidad epitelial, inhiben la cascada inflamatoria o bien condicionan la activación-maduración- supervivencia de las células dendríticas, por lo que los probióticos se vuelven una opción eficiente para la prevención y la inhibición de la formación de *Candida albicans* en pacientes susceptibles con mayor potencial cuando han sido medicados con antifúngicos y se ha creado resistencia.

Por otro parte *L. Reuteri* (probiótico contenido en Probuca D) demostró efecto inhibitorio en el biofilm maduro del aislado clínico en esta investigación, el mecanismo de acción de éste probiótico es debido a la producción de una toxina similar al peróxido de hidrógeno, la reuterina, que puede obstaculizar el crecimiento de *Candida albicans* oral a través de la inhibición selectiva.^{8,10} Adicionalmente a estos datos, otros estudios reportan una interferencia sistémica a través de la inmunomodulación por medio de una barrera de la mucosa reforzada y el aumento de la producción de IgA.^{7,9,18} Estos datos coinciden con los reportados en un estudio realizado por Pérez 2016 en donde se observó la inhibición de *S. Mutans* y *Candida albicans* con probióticos comerciales entre los que se incluye *L. reuteri*.⁶

Por lo antes descrito y los resultados en esta investigación, *L. Reuteri*, resulta interesante ya que este microorganismo se encuentra disponible comercialmente en productos de cuidado de higiene oral con un enfoque preventivo para caries como Biogaia Prodentis, otra de sus cualidades de acuerdo a estos resultados es la inhibición de *Candida albicans*, brindando un mayor beneficio a la población susceptible.³⁴ Por lo que *L. Reuteri*, parece una buena alternativa para proponer más estudios que sustenten sus efectos *in vitro* y posteriormente *in vivo* como una buena opción para el tratamiento preventivo de caries y candidiasis, del mismo modo como antifúngico contra candidiasis orales ya establecidas ya que ha demostrado su afectividad inhibitoria directa en la biopelícula de *Candida albicans*.

Las limitaciones de estudio radican específicamente en el número de observaciones por lo que se sugiere aumentar la muestra y continuar con la línea de investigación

en modelos de estudio que emulen las condiciones reales en la cavidad oral para poder trasladar directamente estos hallazgos a estudios *in vivo* y posteriormente se difunda el conocimiento al profesional en odontología y en consecuencia en beneficio de los pacientes.

Esta investigación apoya la hipótesis de que los probióticos influyen en la homeostasis y el perfil microbiano en la cavidad oral, disminuyendo a los microorganismos patógenos oportunistas como *Candida albicans*, a través de un método competitivo, sin embargo, se requieren más estudios clínicos adicionales para verificar el rol de los probióticos en el efecto antifúngico/antimicrobiano así como determinar los mecanismos antimicóticos, optimizar dosis orales de suplementos probióticos para pacientes vulnerables.

10. CONCLUSIÓN

Los hallazgos de esta investigación mostraron que los grupos en los que se incluyeron probióticos (G2, G3, G5, G6) mostraron una notable reducción de UFC's de *Candida albicans*, lo que demostró una eficacia de actividad antifúngica. Específicamente los grupos G2 y G5 mostraron un potencial antifúngico relevante, lo que sugiere que la inclusión de este probiótico podría coadyuvar al tratamiento tradicional y/o prevenir infecciones de la mucosa oral por *Candida albicans* en pacientes bajo tratamiento ortodóncico.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Coll HAS, Jiménez MS, Castro NC. Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. CES Odontol 2015; 28(2):112–8.
2. Microbiología Oral - La cavidad oral como habitat para los microorganismos [Internet]. [consultado 14/03/2018]. Disponible en: <https://microral.wikispaces.com/La+cavidad+oral+como+habitat+para+los+microorganismos>
3. Agarwal G, Ingle NA, Kaur N, Yadav P, Ingle E, Charania Z. Probiotics and Oral Health: A Review. J Int Oral Health 2015; 7(10): 133-36.
4. Çağlar E, Topcuoglu N, Ozbey H, Sandalli N, Kulekci G. Early colonization of *Lactobacillus reuteri* after exposure to probiotics. J Clin Pediatr Dent 2015; 39(4): 326-330.
5. Mezzari M, Faria AG, de Souza IP, Marchioro E, Fuentefria AM, Mezzari A. Prevalência de *Candida* spp. em biofilme dentário de usuários de aparelhos ortodônticos fixos. Rev Fac Odontol P Alegre 2012; 53(2): 5-10.
6. Pérez J. Colonización oral por *Cándida* y su relación con la presencia de caries y/o enfermedad periodontal crónica en población adulta del País Vasco. 2016; [Internet]. [consultado 24/04/2018] Disponible en: <https://addi.ehu.es/handle/10810/19074>
7. Naidu BV, Reginald BA. Quantification and correlation of oral *Candida* with caries index among different age groups of school children: A case–control study. Ann Med Health Sci Res 2016; 6(2): 80-84.
8. Qiu R, Li W, Lin Y, Yu D, Zhao W. Genotypic diversity and cariogenicity of *Candida albicans* from children with early childhood caries and caries-free children. BMC Oral Health 2015; 15(1): 144.
9. Martínez-Beneyto Y, López-Jornet P, Velandrino-Nicolás A, Jornet-García V. Use of antifungal agents for oral candidiasis: results of a national survey. Int J Dent Hyg 2010; 8(1): 47–52.
10. Pardi G, Cardozo EI, Perrone M, Salazar E. Detección de especies de *Cándida* en pacientes con estomatitis subprotésica. Acta Odontol Venez 2001; 39(3): 32–44.
11. Lee MX, Gómez CL, Vergara NC, Astorga BE, Cajas CN, Ivankovic SM. Asociación entre Presencia de Levaduras del Género *Cándida* y Factores del Paciente Adulto Mayor con y sin Estomatitis Protésica. Int J Odontostomatol. 2013; 7(2): 279–85.

12. George VT, Varghese MM, Vaseem MS, Thomas A, Ittycheria PG, Sreejith CK. The promising future of probiotics: A new era in periodontal therapy. *J Int Oral Health* 2016; 8(3): 404-8.
13. Tehrani MH, Akhlaghi N, Talebian L, Emami J, Keyhani SE. Effects of probiotic drop containing *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium infantis*, and *Lactobacillus reuteri* on salivary *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* levels. *Contemp Clin Dent* 2016; 7(4): 469–74.
14. Mruthyuenjaya RK, Venugopal S, Sateesh CP, Bennadi D, Renushree BV. Antimicrobial efficacy of commercially available mouthrinses: An in vitro study. *J Indian Assoc Public Health Dent* 2016; 14(4): 463-8.
15. Matthes R, Jablonowski L, Koban I, Quade A, Hübner N-O, Schlueter R, et al. In vitro treatment of *Candida albicans* biofilms on denture base material with volume dielectric barrier discharge plasma (VDBD) compared with common chemical antiseptics. *Clin Oral Investig* 2015; 19(9): 2319–26.
16. Devine DA, Marsh PD. Prospects for the development of probiotics and prebiotics for oral applications. *J Oral Microbiol* 2009; 1(1):1-11.
17. Kraft-Bodi E, Jørgensen MR, Keller MK, Kragelund C, Twetman S. Effect of Probiotic Bacteria on Oral *Candida* in Frail Elderly. *J Dent Res* 2015; 94(9): 181S–186S.
18. Matsubara VH, Bandara HMHN, Mayer MPA, Samaranayake LP. Probiotics as Antifungals in Mucosal Candidiasis. *Clin Infect Dis* 2016; 62(9):1143–53.
19. López-Ávila K, Dzul-Rosado KR, Lugo-Caballero C, Arias-León JJ, Zavala-Castro JE. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. *Rev Bioméd* 2016; 27(3):127–36.
20. Ishikawa KH, Mayer MPA, Miyazima TY, Matsubara VH, Silva EG, Paula CR, et al. A Multispecies Probiotic Reduces Oral *Candida* Colonization in Denture Wearers. *J Prosthodont* 2015; 24(3):194–9.
21. Ujaoney S, Chandra J, Faddoul F, Chane M, Wang J, Taifour L, et al. In vitro effect of over-the-counter probiotics on the ability of *Candida albicans* to form biofilm on denture strips. *J Dent Hyg JDH* 2014; 88(3):183–9.
22. Ribeiro F c., de Barros P p., Rossoni R d., Junqueira J c., Jorge A o. c. *Lactobacillus rhamnosus* inhibits *Candida albicans* virulence factors in vitro and modulates immune system in *Galleria mellonella*. *J Appl Microbiol* 2017; 122(1):201–11.

23. León Reissig, M. "Evaluación in vitro de cepas de bacterias ácido lácticas nativas con potencial probiótico ". Tesis de grado, Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Ciencias, 2012.
24. Díaz MDP. Probióticos y su relación con el control de caries. Revisión de tema. Rev Fac Odontol Univ Antioq 2016; 28(1): 179-202.
25. Mead R, Gilmour SG, Mead A. Statistical principles for the design of experiments: applications to real experiments (Vol. 36). Nueva York: Cambridge University Press; 2012.
26. Hasslöf P, Hedberg M, Twetman S, Stecksén-Blicks C. Growth inhibition of oral mutans streptococci and *candida* by commercial probiotic lactobacilli-an in vitro study. BMC Oral Health 2010; 10(1): 10-18.
27. Spinler JK, Taweechoatrat M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. Anaerobe 2008; 14(3):166–71.
28. Ishikawa KH, Mayer MPA, Miyazima TY, Matsubara VH, Silva EG, Paula CR, et al. A Multispecies Probiotic Reduces Oral *Candida* Colonization in Denture Wearers. J Prosthodont 2015; 24(3):194–9.
29. Madhwani T, McBain AJ. Bacteriological effects of a *Lactobacillus reuteri* probiotic on in vitro oral biofilms. Arch Oral Biol 2011; 56 (11):1264–73.
30. Babaahmady KG, Challacombe SJ, Marsh PD, Newman HN. Ecological study of streptococcus mutans, streptococcus sobrinus and lactobacillus spp. at sub-sites from approximal dental plaque from children. Caries Res 1998; 32(1):51-8.
31. Hamada S, Slade HD. Biology, Immunology, and cariogenicity of streptococcus mutans. Microbiol Rev 1980; 44(2): 331-84.
32. Gorelick L, Geiger AM, Gwinnett AJ. Incidence of white spot formation after bonding and banding. Am J Orthod 1982; 81(2):93-8.
33. Arendorf T, Addy M. Candidal carriage and plaque distribution before, during and after removable orthodontic appliance therapy. J Clin Periodontol 1985; 12(5): 360-68.

12. ANEXOS

Anexo 1. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA TOMA DE MUESTRA MICROBIOLÓGICA

Toluca, México; a ____ de diciembre de 2017.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Parte 1. Hoja Informativa

La Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México, además de dar la atención necesaria para diagnosticar y tratar enfermedades bucales, realiza investigación en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología (CIEAO), la cual se publica en revistas científicas nacionales e internacionales. Parte de las investigaciones que se realizan utilizan muestras microbiológicas que son tomadas de pacientes para la experimentación *in vitro* de efectos diversos.

A través de este documento, queremos solicitar su autorización para la toma de muestra microbiológica para utilizarlo en la investigación **“Efecto de probióticos en la biopelícula extraída de pacientes con tratamiento ortodóncico: estudio *in vitro*”**. En la cual analizaremos el efecto *in vitro* de la inclusión de probióticos en biopelícula obtenida en pacientes con tratamiento ortodóncico.

Aspectos a considerar:

- En el estudio no se podrá identificar a quien pertenece la muestra y no serán necesarios sus datos personales más allá de su nombre y edad, los cuales serán manejados con privacidad y absoluta confidencialidad.
- No existe ningún riesgo para su salud durante la toma de muestra microbiológica.
- De ninguna manera está obligado a participar en este estudio. Aunque su participación sería muy útil y benéfica para nuestra investigación, esta participación es totalmente voluntaria y su decisión de aceptar o no, será

respetada, y no afectará la atención dental que recibe normalmente en esta clínica.

Parte 2. Formulario

Por medio de este documento, declaro y manifiesto, en pleno uso de mis facultades mentales que:

1. He sido invitado a participar como donante de muestra microbiológica para la investigación titulada **“Efecto de probióticos en la biopelícula extraída de pacientes con tratamiento ortodóncico: estudio *in vitro*”**.

2. Entiendo que los investigadores únicamente requerirán de mi muestra microbiológica y de mi nombre y firma en este documento.

3. Sé que posiblemente no haya beneficios para mi persona y que no se me recompensará por mi participación como donante en esta investigación, sin embargo, también entiendo que tal vez generaciones futuras se beneficien de la investigación hecha con el mismo.

4.- Entiendo que tendré el derecho de conocer los resultados de la investigación realizada.

Acepto de manera libre e informada participar como donante de muestra microbiológica en la investigación “Efecto de probióticos en la biopelícula extraída de pacientes con tratamiento ortodóncico: estudio *in vitro*”: _____

Nombre y firma del donador: _____

Firma del investigador: _____

C.D. Isabel de Monserrat Osorio Bernal

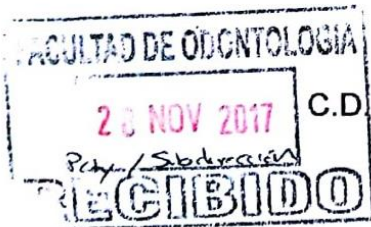
Anexo 2. OFICIO PARA TOMA DE MUESTRA

Toluca, México; a 28 de noviembre de 2017.

DR. EN C.S. EDITH LARA CARRILLO
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO (UAEM).
PRESIDENTA DE LOS H.H. CONSEJOS ACADÉMICO Y DE GOBIERNO.

Anticipándole un cordial saludo, la que suscribe C.D. Isabel de Monserrat Osorio Bernal alumna del tercer semestre de la Especialidad en Ortodoncia (Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma del Estado de México), a través de este medio solicito atentamente su apoyo para llevar a cabo el proyecto terminal de especialidad titulado "Efecto de probióticos en la biopelícula extraída de pacientes con tratamiento ortodóncico: estudio *in vitro*" en su etapa experimental, consistente en toma de muestra de biopelícula en pacientes con tratamiento ortodóncico bajo consentimiento informado.

Esperando contar con su valioso apoyo, quedo atenta a sus instrucciones y quedo de usted.



Atentamente

C.D. Isabel de Monserrat Osorio Bernal



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Recibi 28/Nov/17

- c.c.p. Dr. en C.S. Ulises Velázquez Enríquez. Subdirector Académico de la Facultad de Odontología, UAEM.
- c.c.p. Dr. en O. Rogelio José Scougall Vilchis. Coordinador del CIEAO-UAEM.
- c.c.p. Dr. en Estomat. Pat. Victor Hugo Toral Rizo. Coordinador de Posgrado CIEAO-UAEM.
- c.c.p. Dr. Toshio Kubodera Ito. Coordinador de la Especialidad en Ortodoncia CIEAO-UAEM.
- c.c.p. Interesada.

Anexo 3. OFICIO PARA PERMISO

Toluca, México; a 05 de diciembre de 2017.

**DR. EN C.S. EDITH LARA CARRILLO
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO (UAEM).**

Anticipándole un cordial saludo, la que suscribe C.D. Isabel de Monserrat Osorio Bernal alumna del tercer semestre de la Especialidad en Ortodoncia (Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Odontología, Facultad de Odontología, Universidad Autónoma del Estado de México), a través de este medio solicito atentamente su apoyo y permiso para realizar la primera etapa de la fase experimental del proyecto terminal de especialidad titulado "Efecto de probióticos en la biopelícula extraída de pacientes con tratamiento ortodóncico: estudio *in vitro*", en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí desde el día lunes 11 de diciembre hasta el viernes 15 de diciembre del año en curso. No omito mencionar que no tengo pendientes de carácter académico y/o clínico en nuestra institución.

Esperando contar con su valioso apoyo, quedo atenta a sus instrucciones y quedo de usted.



Atentamente

C.D. Isabel de Monserrat Osorio Bernal



Toshio Kubodera
6/12/17



c.c.p. Dr. en O. Rogelio José Scougall Vilchis. Coordinador del CIEAO-UAEM.
c.c.p. Dr. en Estomat. Pat. Victor Hugo Toral Rizo. Coordinador de Posgrado CIEAO-UAEM.
c.c.p. Dr. Toshio Kubodera Ito. Coordinador de la Especialidad en Ortodoncia CIEAO-UAEM.
c.c.p. Interesada.

Anexo 4. OFICIOS DE TRÁMITE DE MOVILIDAD



San Luis Potosí, a 29 de marzo de 2018

DRA. EN C.S. EDITH LARA CARRILLO
DIRECTORA DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
P R E S E N T E

AT'N DR. EN O. ROGELIO JOSÉ SCOUGALL VILCHIS
COORDINADOR DEL C.I.E.A.O

Por este medio le comunico que la **C.D. Isabel de Monserrat Osorio Bernal**, alumna del programa de la Especialidad en Ortodoncia de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma del Estado de México, ha sido aceptada para que curse una estancia académica en el Laboratorio de Bioquímica, Microbiología y Patología de la Facultad de Estomatología de nuestra Institución, en el periodo del 09 de abril al 09 de mayo del año en curso.

Al término del periodo de estudio le estaré remitiendo un informe detallado de las actividades realizadas por la alumna y aprovechamiento logrado durante su estancia en esta Facultad.

Sin otro particular quedo a sus órdenes para cualquier aclaración.

ATENTAMENTE

DRA. EN C. MA. SARAY ARANDA ROMO

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA, MICROBIOLOGÍA Y PATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

Av. Dr. Manuel Nava 2
Zona Universitaria • CP 78290
San Luis Potosí, S.L.P., México
tel. +52 (444) 826 2300
ext. 5116 a 5120
(444) 813 9743, 834 2522, 23 y 25
www.estomatologia.uaslp.mx
estomatologia@uaslp

San Luis Potosí, a 09 de mayo de 2018

A QUIEN CORRESPONDA

Por medio del presente le informo que la alumna Isabel de Monserrat Osorio Bernal, ha cumplido y realizado de manera satisfactoria los objetivos de la estancia académica en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, bajo el apoyo y supervisión de la Dra. en C.B. María Saray Aranda Romo, del Laboratorio de Bioquímica, Microbiología y Patología de la Facultad de Estomatología de la misma Universidad. Dicha estancia se realizó del 09 de abril al 09 de mayo del año en curso, con la finalidad de contribuir a los siguientes objetivos:

- Desarrollo del proyecto terminal "Eficiencia antifúngica de probióticos sobre candida proveniente de pacientes con tratamiento ortodóncico: estudio in vitro".
- Análisis y tipificación de las muestras obtenidas.
- Análisis estadístico de los resultados.
- Redacción de discusiones y conclusiones.

ATENTAMENTE



DRA. EN C. MA. SARAY ARANDA ROMO

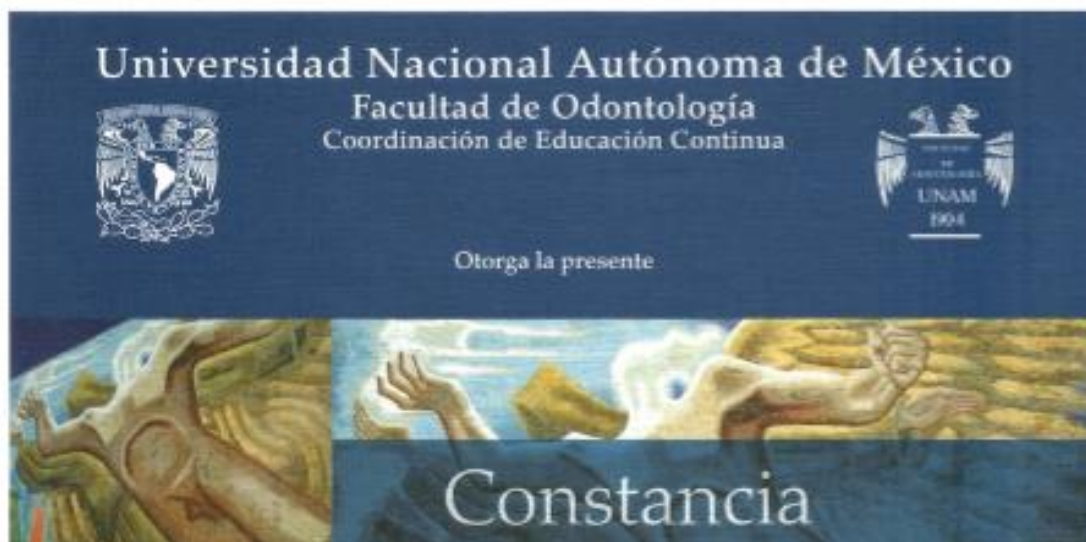
**LABORATORIO DE BIOQUÍMICA, MICROBIOLOGÍA Y PATOLOGÍA DE LA FACULTAD DE
ESTOMATOLOGÍA, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**



**FACULTAD DE
ESTOMATOLOGÍA**

Av. Dr. Manuel Nava 2
Zona Universitaria • CP 78290
San Luis Potosí, S.L.P., México
tel. +52 (444) 826 2300
ext. 5116 a 5120
(444) 813 9743, 834 2522, 23 y 25
www.estomatologia.uaslp.mx
estomatologia@uaslp

Anexo 5. CONSTANCIA DE PRESENTACIÓN DE CARTEL (SEMANA DE LAS CIENCIAS, FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM)



OSORIO BERNAL ISABEL DE MONSERRAT

EDITH LARA CARRILLO, ULISES VELÁZQUEZ ENRÍQUEZ, MARÍA SARAY ARANDA ROMO, VÍCTOR HUGO TORAL RIZO

Por su participación académica con el trabajo:

EFICIENCIA ANTIFÚNGICA DE PROBIÓTICOS SOBRE CÁNDIDA PROVENIENTE DE PACIENTES CON TRATAMIENTO ORTODÓNICO: ESTUDIO IN VITRO

En la categoría: CARTEL

**"Semana de la Ciencias Básicas"
Realizada del 16 al 20 de abril, en
la Facultad de Odontología, UNAM**

Atentamente

"Por mi raza hablará el espíritu"

Ciudad Universitaria, Cd Mx, a 20 de abril de 2018.

Mtro. José Arturo Fernández Pedrero
Director

Mtro. Enrique Navarro Borí
Coordinador de Educación Continua

Anexo 6. CONSTANCIA DE PRESENTACIÓN DE CARTEL (CONGRESO NACIONAL E INTERNACIONAL DE LA FACULTAD DE ODONTOLOGÍA, UNAM, AMIC 2018)



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Odontología



**Federación Mexicana de Facultades
y Escuelas de Odontología**

Otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

C.D. Isabel de Monserrat Osorio Bernal



Por su Participación Académica en la exposición de carteles del
Encuentro Estudiantil de Facultades y Escuelas de Odontología del País
Celebrado el 5 de mayo de 2018 en el WTC de la Ciudad de México.


Mtro. José Arturo Fernández Pedrero
Director
Facultad de Odontología


Mtro. Francisco Magaña Moheno
Presidente
FMFEO