



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOPATOLOGÍA

**EFFECTO DE PROBIÓTICOS Y SUS METABOLITOS
APLICADOS A AISLADOS BACTERIANOS ASOCIADOS A
PERIODONTITIS APICAL PRIMARIA**

www.bdigital.ula.ve

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Odontólogo

Autores: Br. Angélica Sivira

Br. Jormany Quintero

Tutor: Prof^a. Elaysa Salas

Mérida, Venezuela

DEDICATORIA

A nosotros, compañeros de tesis, de aventuras,
hermanos, amigos, te amo .

JQ & AS

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios, por darnos toda la resiliencia necesaria durante toda la carrera, por bendecirnos todos los días con salud, perseverancia y paciencia durante todos estos años de carrera, aun cuando las cosas estuvieron cuesta arriba todo siempre estuvo en sus manos.

A nuestros padres, quienes con su ejemplo de esfuerzo, dedicación y trabajo nos demuestran que la excelencia no es una opción, sino un requisito, también quienes, con su calidad humana y vocación de servicio, nos enseñan que sea cual sea el rol que desempeñemos en nuestra sociedad debemos siempre hacer el bien por y para el prójimo.

A nuestra tutora la Dra. Elaysa Salas que creyó en este trabajo de investigación desde el primer día, regalándonos días y horas de su tiempo para que todo en el fuera excelente, ejemplo de amor por la ciencia, la microbiología y de empeño en este mundo de los probióticos, cosa que ahora llevamos en nuestro corazón y mente como parte de un gran aprendizaje. También queremos extender este agradecimiento a la familia de la Prof. Elaysa Salas, quienes nos abrieron las puertas de su casa e hicieron lo posible por ayudarnos, por ese café a cargo del Prof. Manolo Jiménez que se sentía como un abrazo luego de largas jornadas de trabajo en el laboratorio.

A la Dra. Ana Roa y la Prof. Yinec Varela quienes con su conocimiento en el área de la microbiología realizaron aportes a este trabajo de investigación y nos sacaron de dudas en más de una ocasión, siempre atentas y dispuestas a enseñar.

Al Od. José Maggiorani, quien colaboró de manera desinteresada con la recolección de las muestras para la investigación, completamente dispuesto a ayudar, demostrando pasión por todo aquello que pueda significar un avance en este campo.

Al Prof. Damián Cloquell quien fue el primer guía en el nacimiento de este proyecto y nos motivó a mejorarlo siempre.

A nuestros amigos: Ruth, Mafer, Betania, Eudy, Valeria, Stefany y Julio quienes siempre nos apoyaron en todo momento desde el amor y la empatía. A José y Alejandro quienes fueron pacientes, motivadores, empáticos y comprensivos durante todo este proceso.

Finalmente, queremos agradecer a nuestra Alma Mater, la Universidad de Los Andes, por formarnos como futuros profesionales, por enseñarnos perseverancia, paciencia y sentido de pertenencia, por ser siempre una casa de estudios con visión de futuro, aprendizaje, ciencia y excelencia, por lo que siempre seremos orgullosamente Ulandinos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
1.1. Definición y contextualización del problema	5
1.2. Objetivos de la investigación	9
1.2.1. Objetivo General	9
1.2.2. Objetivos Específicos	10
1.3. Justificación	10
1.4. Hipótesis	11
CAPÍTULO II	12
MARCO TEÓRICO	12
2.1. Antecedentes	12
2.2. Bases Conceptuales	22
CAPÍTULO III	31
MARCO METODOLÓGICO	31
3.1. Enfoque, alcance y diseño de la investigación	31
3.2. Muestra Biológica	31
3.3. Sistema de Variables	32
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	34
3.5. Procedimiento, materiales e instrumentos	34
Los materiales, instrumentos y equipos utilizados para el desarrollo del experimento se resumen en la Tabla 3.1	34
3.6. Principios Bioéticos	39
3.7. Plan de análisis de los resultados	40
CAPÍTULO IV	41
RESULTADOS	41
4.1 Fase Preliminar: Recolección de muestras biológicas	41
4.2 Fase I: Aislamiento e identificación de bacterias en muestras de PAP	42
4.3 Fase II: Pruebas de actividad antibacteriana	51

CAPÍTULO V	60
DISCUSIÓN	60
CAPÍTULO VI	66
CONCLUSIONES	66
RECOMENDACIONES.....	67
REFERENCIAS	68
ANEXO A	80
APÉNDICE A	0

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1 Materiales, instrumentos y equipos utilizados para el desarrollo del experimento	35
Tabla 4.1. Características microscópicas, macroscópicas, morfotintoriales y bioquímicas de las colonias halladas	46
Tabla 4.2. Identificación Bioquímica de los Aislados Bacterianos de PAP.....	48
Tabla 4.3. Características microbiológicas de las muestras seleccionadas	49
Tabla 4.4. Efecto inhibitorio de las cepas probióticas y sus sobrenadantes	52
Tabla 4.5. Frecuencia del efecto inhibidor de las cepas probióticas sobre los aislados PAP	52
Tabla 4.6. Correlación entre desempeño de los sobrenadantes	53
Tabla 4.7. Diámetro de los halos inhibitorios.....	55
Tabla 4.8. Valores de tendencia central para las cepas probióticas.....	57
Tabla 4.9. Valor p de la comparación entre sobrenadantes	57
Tabla 4.10. Equivalencia de halos representados en escala de Duraffourd.....	58
Tabla 4.11. Frecuencia de resultados según escala de Duraffourd.....	59

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Placas de agar sangre en cámara de anaerobiosis	37
Figura 3.2. Distribución de los sobrenadantes en los pozos.....	39
Figura 4.1. Radiografías periapicales de pacientes diagnosticados con PAP.....	41
Figura 4.2. Microscopía de bacilos Gram- dispersos	42
Figura 4.3. Aspecto macroscópico de colonias incubadas en anaerobiosis	43
Figura 4.4. Crecimiento de microorganismos en tubos de caldo de tioglicolato.....	44
Figura 4.5. Características morfológicas de las colonias seleccionadas	45
Figura 4.6. Aspecto macroscópico de la colonia β -hemolítica hallada	50
Figura 4.7. Aspecto microscópico de colonia β - hemolítica hallada.....	50
Figura 4.8. Halos inhibitorios sobre las bacterias identificadas	54
Figura 4.9. Halos inhibitorios sobre la bacteria β -hemolítica	55
Figura 4.10. Distribución de las medidas de los halos inhibitorios por cepa probiótica y su sobrenadante	56

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOPATOLOGÍA

EFFECTO DE PROBIÓTICOS Y SUS METABOLITOS APLICADOS A AISLADOS BACTERIANOS ASOCIADOS A PERIODONTITIS APICAL PRIMARIA

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Odontólogo.

Autores: Br. Sivira Angélica.

Br. Quintero Jormany.

Tutor: Prof^a. Elaysa Salas.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La Periodontitis Apical Primaria (PAP) es una condición inflamatoria causada por infecciones bacterianas resultantes de la necrosis del tejido pulpar. El tratamiento convencional antibacteriano está perdiendo eficacia debido a la resistencia bacteriana, esto conlleva a explorar alternativas como la bioterapia con probióticos. **OBJETIVO:** Determinar el efecto de probióticos y sus metabolitos aplicados a aislados bacterianos asociados a PAP. **METODOLOGÍA:** La presente investigación es de carácter explicativo y experimental, utilizando muestras biológicas de microorganismos patógenos anaeróbicos. Estos microorganismos fueron identificados y sometidos a pruebas de actividad inhibitoria frente a cepas de probióticos y sus metabolitos (*Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* y *Lacticaseibacillus paracasei*) mediante técnicas de dilución en pozos y difusión en agar, usando controles positivos (gluconato de clorhexidina al 2%) y negativos (solución fisiológica al 0.9%). **RESULTADOS:** Tras el análisis de los halos inhibitorios, algunos probióticos y sus metabolitos exhibieron actividad inhibitoria significativa contra las bacterias patógenas, con una notable variabilidad en la eficacia entre las distintas cepas probióticas y sus mezclas. En particular, se observaron halos inhibitorios de 12 mm en promedio, indicando una potencial efectividad en el tratamiento de la periodontitis apical. **CONCLUSIÓN:** Los probióticos y sus metabolitos pueden ser una alternativa viable a los tratamientos antibacterianos convencionales, sin embargo, se requieren más investigaciones para confirmar estos hallazgos y explorar su aplicación clínica. La investigación aporta una perspectiva innovadora en el tratamiento de infecciones bucales, destacando la necesidad de seguir desarrollando y evaluando terapias basadas en probióticos.

Palabras Clave: probióticos; periodontitis apical; endodoncia; tratamiento del conducto radicular.



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOPATOLOGÍA

**EFFECT OF PROBIOTICS AND THEIR BY-PRODUCTS APPLIED TO
BACTERIAL COLONIES ASSOCIATED WITH PRIMARY APICAL
PERIODONTITIS (PAP)**

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Odontólogo.

Authors: Br. Sivira Angélica.

Br. Quintero Jormany.

Tutor: Prof. Elaysa Salas.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Primary Apical Periodontitis (PAP) is an inflammatory condition caused by bacterial infections resulting from necrosis of pulp tissue. Conventional antibacterial treatment is losing effectiveness due to bacterial resistance, this leads to exploring alternatives such as biotherapy with probiotics. **OBJECTIVE:** To determine the effect of probiotics and their metabolites applied to bacterial isolates associated with PAP. **METHODOLOGY:** The present investigation is of an explanatory and experimental nature, using biological samples of anaerobic pathogenic microorganisms. These microorganisms were identified and tested for inhibitory activity against probiotic strains and their metabolites (*Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus rhamnosus* y *Lacticaseibacillus paracasei*) using well dilution and agar diffusion techniques, using positive (2% chlorhexidine gluconate) and negative (0.9% physiological solution) controls. **RESULTS:** After the analysis of the inhibitory halos, some probiotics and their metabolites exhibited significant inhibitory activity against pathogenic bacteria, with notable variability in efficacy between the different probiotic strains and their mixtures. Inhibitory halos of 12 mm on average were observed, indicating potential effectiveness in the treatment of apical periodontitis. **CONCLUSION:** Probiotics and their metabolites may be a viable alternative to conventional antibacterial treatments, however, further research is required to confirm these findings and explore their clinical application. This research provides an innovative perspective in the treatment of oral infections, highlighting the need to continue developing and evaluating probiotic-based therapies.

Keywords: probiotics; apical periodontitis; endodontics; root canal treatment.

INTRODUCCIÓN

La periodontitis apical (PA) se define como una condición inflamatoria del periodonto apical, que resulta principalmente de una infección bacteriana ocasionada por la colonización del sistema de conductos radiculares a consecuencia de la necrosis del tejido pulpar. Para la desinfección del sistema de conductos, se emplean diversas sustancias irrigantes y medicamentos, sin embargo, por la complejidad que presenta el mismo y la resistencia microbiana desarrollada por algunos microorganismos ante ciertos fármacos, la remoción de estos se dificulta, creando focos infecciosos y aumentando el riesgo de una Enfermedad Post Tratamiento Endodóntico.

Se han desarrollado nuevas terapéuticas alternativas para la eliminación de microorganismos persistentes. Entre las nuevas terapias no invasivas aplicadas en odontología se encuentra la bioterapia, empleando bacterias probióticas y sus subproductos para controlar selectivamente los patógenos causantes de algunas infecciones bucales y restablecer el estado de eubiosis. La aplicación de la bacterioterapia en endodoncia se fundamenta en sustituir las bacterias patógenas por bacterias beneficiosas, aunque, el papel de los probióticos en la terapia endodóntica no se ha evaluado ampliamente más que en estudios *in vitro* y pocos estudios *in vivo*.

En este contexto, surge la interrogante: ¿Podrían las bacterias probióticas y sus metabolitos causar un efecto inhibitorio en los microorganismos asociados a PAP?. Dado que en la revisión de la literatura se encontraron escasos estudios sobre el efecto antimicrobiano contra patógenos causantes de PAP, en este proyecto de investigación se busca determinar el efecto de probióticos aplicados sobre colonias bacterianas asociadas a periodontitis apical primaria.

Para lograr el cumplimiento del objetivo planteado en esta investigación, se realizó un estudio con un enfoque cuantitativo, alcance explicativo y diseño experimental en un contexto de laboratorio, empleando las bacterias aisladas de los pacientes diagnosticados con la patología. El documento está estructurado de la siguiente manera:

- Capítulo I: que hace referencia al planteamiento del problema, objetivos del proyecto, justificación e hipótesis del mismo.

- Capítulo II: donde se desarrolla el marco conceptual incluyendo los antecedentes más resaltantes y las bases teóricas necesarias para la contextualización del proyecto.
- Capítulo III: contiene el marco metodológico a desarrollar, en este se detalla el enfoque, alcance y diseño de la investigación, la muestra biológica a estudiar, el sistema de variables, la técnica e instrumentos de la recolección de datos, procedimiento, materiales e instrumentos para el desarrollo del experimento, principios bioéticos y el plan de análisis de los resultados que se obtendrán.
- Capítulo IV: contiene los resultados de las pruebas experimentales microbiológicas de identificación y antagonismo
- Capítulo V: constituido por la discusión de los resultados obtenidos, interpretación de estos y comparación con la evidencia hallada
- Capítulo VI: donde se establecen las conclusiones obtenidas y las recomendaciones para trabajos futuros.

Finalmente, se incluyen el modelo de instrumento de recolección de datos (Anexo A) y el consentimiento informado que empleado en la recolección de la muestra biológica (Apéndice A).

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Definición y contextualización del problema

La periodontitis apical (PA) se define como una condición inflamatoria del periodonto apical, que resulta principalmente de una infección bacteriana ocasionada por la colonización del sistema de conductos radiculares a consecuencia de la necrosis del tejido pulpar. La inflamación apical forma parte de la respuesta inmunológica destinada a contener y localizar la infección¹.

Esta entidad aparecería en presencia o ausencia de síntomas clínicos tales como, respuesta dolorosa al morder y a técnicas diagnósticas como percusión o palpación, puede o no estar asociada a un área radiolúcida apical, sin embargo, se observa el ensanchamiento del espacio correspondiente al ligamento periodontal². Debido a que la aparición de la inflamación ocurre previo a un tratamiento de la misma, esta se define como periodontitis apical primaria (PAP)^{1,3}. La afección puede considerarse un tipo específico de lesión endoperiodontal, donde la PAP se presenta como la lesión inicial que luego se extiende al periodonto de no tratarse oportunamente².

En cuanto al origen bacteriano de la PAP, aunque muchas de las infecciones agudas son ocasionadas por bacterias en estado planctónico, en este caso particular es mucho más común encontrar la presencia de biopelícula, siendo esta principalmente compuesta por Lipopolisacáridos (LPS), proteínas, nutrientes, sustancias de desecho y en muchos casos bacterias con elevada capacidad inmunogénica³. En la mayoría de las infecciones causadas por biopelícula, el sistema inmune como medida de contención bacteriana, activa una respuesta inflamatoria y en el caso de a PA el resultado es el daño tisular. Adicionalmente, muchos de los microorganismos presentes en la biopelícula obtienen los nutrientes necesarios de las glicoproteínas resultantes de la degradación de los tejidos¹.

Con relación a los microorganismos encontrados en la infección primaria se conoce que están presentes los siguientes phylum bacterianos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*,

Actinobacteria, Proteobacteria, Spirochaetota, Synergistota, así como especies de *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema* spp., *Dialister* spp., *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Propionibacterium* spp., *Parvimonas micra*, *Tannerella Forsythia*, *Filifactor alocis*, *Eubacterium* spp. y *Olsenella* spp.³⁻⁷

La PAP es una enfermedad prevalente a nivel mundial con porcentajes que van desde un 6,3 a un 54,7%⁸⁻¹¹, donde los porcentajes superiores se observan en aquellos países en vías de desarrollo⁸. Generalmente, se debe realizar un tratamiento endodóntico no quirúrgico, removiendo el tejido pulpar necrótico y dependiendo de la severidad del caso, se adiciona medicación intraconducto, donde las sustancias más utilizadas son el hidróxido de calcio y la pasta tri-antibiótica^{12,13}, posteriormente, se procede a realizar la limpieza y conformación de los canales radiculares empleando soluciones irrigantes como hipoclorito de sodio (al 2,5% - 5,25%) y clorhexidina (0,12% - 2%)¹²

La terapia endodóntica abarca una serie de procedimientos cuya finalidad es curar o prevenir la periodontitis perirradicular, tratando de forma efectiva la infección bacteriana ocasionada por la descomposición de la pulpa dental y radicular. El tratamiento endodóntico se puede resumir en tres fases principales: diagnóstico, limpieza y conformación de los conductos radiculares y, finalmente, obturación con un material inerte que logre el cierre hermético del ápice radicular, donde, el resultado que se busca es la cicatrización y curación de los tejidos perirradiculares¹². Los materiales empleados para el sellado endodóntico suelen proyectarse a través de los conductos accesorios o laterales y pueden ayudar al control microbiano expulsándolos del sistema de conductos radicular¹⁴.

En algunas ocasiones, no se obtiene el resultado deseado o favorable con el tratamiento endodóntico debido a una serie de factores, lo que conlleva a una Enfermedad Post-Tratamiento Endodóntico (EPTE) conocida anteriormente como “fracaso endodóntico”¹⁵. Su etiología es variada, pero básicamente, se puede resumir en microorganismos intrarradiculares persistentes o reintroducidos, infección extrarradicular, reacción de cuerpo extraño y quistes verdaderos¹², siendo la periodontitis apical sintomática una de las manifestaciones más frecuentes^{1,11}.

En la mayoría de los casos, el tratamiento endodóntico convencional combate efectivamente la infección bacteriana, sin embargo, y debido a que las bacterias, como todo ser vivo, tienen

como función vital sobrevivir y reproducirse, estas desarrollan mecanismos de resistencia, especialmente frente a medicamentos antibióticos como respuesta a una presión selectiva^{16,17}. Por lo general, los selladores endodónticos poseen en su composición elementos con propiedades microbiostáticas¹⁸, sin embargo, para que estas sean eficaces se debe lograr la eliminación casi total de microorganismos endodónticos persistentes^{14,18-20}.

Con base en la evidencia, nuevos conocimientos y herramientas tecnológicas, se han desarrollado terapéuticas alternativas, una de ellas es la aplicación de la bioterapia con probióticos para controlar selectivamente los agentes etiológicos de algunas infecciones bucales y establecer un estado de eubiosis. En este sentido, los probióticos se entienden como microorganismos vivos, principalmente bacterias, que administrados en cantidades adecuadas son seguros y causan un efecto beneficioso al hospedero^{21,22}.

La terapia con probióticos ha sido ampliamente estudiada y utilizada como tratamiento en trastornos gastrointestinales, enfermedades alérgicas, urogenitales, entre otras. Las bacterias probióticas se introdujeron en la práctica odontológica como terapia de sustitución para la prevención y tratamiento de enfermedades bucales, cuyo mecanismo de acción se lleva a cabo mediante la resistencia a la colonización y la modulación inmunológica²³. Dentro de este grupo, se considera que los probióticos más estudiados para cuidar la salud en la cavidad bucal son cepas microbianas aisladas, principalmente del tracto digestivo pertenecientes al género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*²⁴.

Los probióticos promueven la salud alterando el balance ecológico a través de varios mecanismos como la inhibición de crecimiento bacteriano por la producción de bacteriocinas, modulación local de la respuesta inmunitaria, estimulan la producción de IgA y la exclusión competitiva de bacterias patógenas por factores de crecimiento y nutrientes²¹⁻²³. Dentro de la microbiota habitual de la cavidad bucal se encuentran especies de lactobacilos que inhiben bacterias patógenas Gram positivas, Gram negativas, aeróbicas y anaeróbicas, sin embargo, estas cepas probióticas no se encuentran en todos los individuos en proporciones suficientes para generar un beneficio al hospedero. Es por ello que existen múltiples vehículos por los que se pueden administrar estas bacterias, tales como: pastillas, leche, queso, yogur, helado, jugos, gotas, polvo, enjuague bucal, chicles, geles adhesivos, entre otros, aunque no existe un medio ideal^{23,25}.

La utilización de los probióticos para la reducción de las afecciones bucales es una alternativa como tratamiento preventivo. Esta terapia ha demostrado ser segura para disminuir el recuento de bacterias patógenas en la cavidad bucal y establecer un ecosistema eubiótico²². Se ha demostrado que los probióticos son eficaces para controlar la inflamación gingival, reducir los niveles de biopelícula, la prevención de diversas enfermedades gingivales, periodontales y hasta peri implantares, el tratamiento de la halitosis, las infecciones por *Candida*, y también en la prevención de caries dental²³.

En la saliva, los microorganismos asociados a la caries, como *Streptococcus mutans*, se reducen en número después del consumo de productos que contienen los probióticos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*^{26,27}. En cuanto a las enfermedades periodontales, los efectos de los probióticos han mostrado ser más prometedores, presentando un efecto antiinflamatorio, que permite dirigir la respuesta inmune hacia el periodontopatógeno afectando su adhesión al epitelio ^{26,27}. Las patologías periodontales son causadas por numerosos patógenos comunes en las infecciones endodónticas, por lo que la utilización de probióticos en los conductos radiculares también puede resultar ventajosa en la lucha contra las mismas²³.

Debido a la complejidad del sistema de conductos radiculares, es difícil obtener una desinfección completa, estudios han sugerido que se logra una reducción significativa de la carga biológica microbiana. Las tendencias actuales y emergentes en microbiología afirman que una mejor forma de tratar una infección microbiana es lograr y mantener un estado de equilibrio en el microbioma humano y cambiar hacia una ecología más favorable que conduzca a la curación²³.

El nuevo concepto de bacterioterapia en endodoncia consiste en sustituir las bacterias patógenas por bacterias beneficiosas y de la microbiota habitual. Aunque el papel de los probióticos en la terapia endodóntica no se ha evaluado ampliamente, hay evidencia de estudios *in vitro* e *in vivo* que destacan su potencial actividad antimicrobiana contra los patógenos endodónticos *E. faecalis* y *C. albicans*, microorganismos frecuentemente aislados de dientes con periodontitis apical, por lo que la eliminación completa de estos patógenos es un reto^{24,28}.

Estos estudios han demostrado la actividad antimicrobiana de los probióticos comerciales compuestos por especies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus* contra *E. faecalis* y *C. albicans*²⁹. Entre los hallazgos se encuentran que *Limosilactobacillus reuteri* produce metabolitos con efectos antimicrobianos³⁰, *Lactiplantibacillus plantarum* inhibe la formación de biopelículas multiespecies preformadas dentro del sistema de conductos²³, *Lacticaseibacillus rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus*, cuando se administraron sistémicamente en ratones redujeron el infiltrado inflamatorio y modularon la respuesta inflamatoria reduciendo la gravedad general de la periodontitis apical³¹. Los estudios también revelaron que incluso el sobrenadante libre de células con subproductos metabólicos de las muestras probióticas podrían disminuir potencialmente el crecimiento de estos dos patógenos endodónticos, por tanto, puede sustituir a las células planctónicas probióticas²³. Estos resultados se hallaron con el uso de cepas de *L. acidophilus*, *Lacticaseibacillus casei*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum* y *B. bifidum*^{26,29,32-35}. También se demostró la efectividad del uso del polixámero como vehículo de administración de probióticos en el canal radicular³².

El novedoso enfoque de la terapia con probióticos en endodoncia parece ser un complemento prometedor para el tratamiento antimicrobiano de los sistemas de conducto radiculares, por ser natural y mínimamente tóxico. La microbiota probiótica, además de erradicar los patógenos endodónticos, podría prevenir su recolonización, lo que se traduce como la reducción en la manifestación de EPTE y mejoras en los éxitos a largo plazo. Sin embargo, impera la necesidad de estudios *in vitro* e *in vivo*, para seguir investigando sobre la efectividad de la bioterapia, en tal sentido, en la evidencia encontrada se hallaron escasos estudios que probaran el efecto antimicrobiano contra patógenos causantes de PAP. Por esta razón el problema se encuentra orientado en conocer cuál es el efecto que producen los probióticos y sus metabolitos aplicados sobre los aislados bacterianos asociados a periodontitis apical primaria mediante un estudio *in vitro*.

1.2. Objetivos de la investigación

1.2.1. Objetivo General

Determinar el efecto de probióticos y sus metabolitos aplicados a aislados bacterianos asociados a Periodontitis Apical Primaria.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Identificar aislados bacterianos presentes en periodontitis apical primaria.
- Describir el efecto de los probióticos y sus metabolitos sobre los aislados bacterianos identificados en periodontitis apical primaria.
- Comparar el efecto inhibitor de los metabolitos con los controles positivos y negativos usados para la experimentación.

1.3. Justificación

La siguiente investigación se justifica en virtud de las siguientes razones:

- La persistencia de las bacterias causantes de PAP, ante procedimientos y sustancias que buscan la erradicación total de estas³⁶⁻⁴⁰, pueden resultar, en algunos casos en una Enfermedad Post Tratamiento Endodóntico por Periodontitis Apical Secundaria debido a que la anatomía de los conductos es variable y la presencia de conductos accesorios dificulta el alcance de los irrigantes y la preparación biomecánica¹², es por ello, que resulta interesante seguir investigando en este tipo de terapias coadyuvantes que puedan disminuir el riesgo de un retratamiento de conducto y procedimientos quirúrgicos, los cuales representan un costo elevado para el paciente.

- Los resultados de esta investigación generarán evidencia científica que podría dar cabida a la realización de más estudios relacionados al tema, ya que se ha demostrado la actividad antimicrobiana de cepas probióticas contra patógenos endodónticos relacionados con PAP^{24,28,29,32,34,41,42}. Es por ello que la bioterapia con probióticos podría considerarse en el futuro como un complemento en la terapia endodóntica, debido a que, en algunos casos, las bacterias asociadas a esta condición han demostrado ser resistentes a la terapia antibiótica convencional^{16,17,43}.

- Los patógenos endodónticos asociados a PAP han demostrado estar relacionadas a fallas en el sellado del sistema de conductos¹ por lo que la aplicación de probióticos y sus subproductos contribuyen a la eliminación de patógenos cubriendo las limitaciones de las sustancias irrigantes y el sellador, aumentando el éxito y longevidad del tratamiento. Sin

embargo, en la evidencia hallada se encontraron muy pocos estudios específicos que hubieran probado probióticos o subproductos contra bacterias específicas relacionadas con la PAP.

1.4. Hipótesis

- **H0:** Las bacterias probióticas y sus metabolitos causan un efecto inhibitorio sobre microorganismos asociados a PAP.
- **H1:** Las bacterias probióticas y sus metabolitos no causan efecto inhibitorio sobre microorganismos asociados a PAP.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

En esta sección, se citan los estudios previos de carácter internacional por orden temático, organizados en subtítulos y estos a su vez por orden cronológico desde el más reciente al más antiguo. Se inicia con aquellos estudios que describen la efectividad de los metabolitos probióticos sobre patógenos endodónticos, seguido del efecto de los probióticos sobre periodontitis apical, actividad antimicrobiana de probióticos sobre otras bacterias, actividad antimicrobiana de irrigantes de conducto convencionales sobre patógenos endodónticos y culminando con investigaciones sobre procedimientos endodónticos para el retratamiento de periodontitis apical.

2.1.1. Actividad antimicrobiana de metabolitos probióticos sobre biopelículas de patógenos endodónticos

En el 2023 Widyarman et al.⁴⁴ estudiaron el efecto de la reuterina, una sustancia aislada de *Limosilactobacillus reuteri* en biopelículas mono y multiespecies de patógenos endodónticos *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* y *Candida albicans* para ello se formaron biopelículas de los mismos en los conductos de 60 muestras de premolares humanos extraídos, dicha formación se llevó a cabo siguiendo un protocolo estandarizado. Utilizaron un control positivo donde se empleó NaOCl al 2,5% y un control negativo con agua destilada esterilizada. La eficacia de la irrigación se evaluó con un ensayo tiempo dependiente 5 y 30 min después del proceso. Los resultados demostraron que la reuterina fue efectiva sobre biopelículas de *E. faecalis*, *C. albicans*, *F. nucleatum* y *P. gingivalis* usando concentraciones de 100mg/ml demostrando eficacia similar en comparación con el control positivo (NaOCl).

En el mismo año Shaaban et al.⁴⁵ evaluaron la actividad antibacteriana de sobrenadantes de probióticos multicepa *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactocaseibacillus rhamnosus* y *Lactobacillus acidophilus* como medicación intracanal contra la biopelícula de *E. faecalis* en un modelo de diente. Para ello, instrumentaron, esterilizaron e inocularon 60 dientes

monorradiculares con *E. faecalis*. Luego de 21 días de incubación, dividieron los mismos al azar según la medicación intracanal recibida en 3 grupos: sobrenadante de probióticos en vehículo de gel de poloxámero, hidróxido de calcio, y control (solo con biopelícula) que además fueron subdivididos según el período de incubación (24 horas y 7 días). La actividad antibacteriana fue evaluada cuantitativa y cualitativamente después de cada período de incubación utilizando UFC/ml. En el período de incubación de 24 horas se observó menos UFC en el grupo de hidróxido de calcio. Para el período de incubación de 7 días, se encontró una reducción significativa de UFC en todos los grupos. Concluyeron que el sobrenadante de probióticos tiene un efecto antibacteriano potencial sobre el crecimiento de *E. faecalis* muy similar al hidróxido de calcio utilizado de manera rutinaria.

Castillo et al.⁴⁶ también en el 2023 caracterizaron la actividad inhibitoria de una bacteriocina producida por *Staphylococcus epidermidis* contra *Porphyromonas gingivalis*. Dicha actividad fue evaluada con el método de difusión en agar sobre un cultivo de *P. gingivalis*, purificaron la bacteriocina utilizando espectrometría de masas MALDI-TOF (MALDI-TOF MS). La bacteriocina purificada fue selectiva contra *P. gingivalis* mostrando un estrecho rango de actividad, la producción durante la curva de crecimiento indicó que *S. epidermidis* tiene una producción continua de este antimicrobiano mostrando su más alta concentración en la fase estacionaria.

Para el año 2022, Safadi et al.⁴⁷ estudiaron metabolitos bacterianos con el fin de evaluar la eficacia de las cepas probióticas para prevenir el nuevo crecimiento de biopelícula de *E. faecalis* tratadas con irrigación de NaOCl al 2,5%. Para ello cultivaron cepas de *E. faecalis* y *Heyndrickxia coagulans* en medio Luria-Bertani (LB), *L. casei* y *L. plantarum* en medio Man, Rogosa, Sharpe (MRS), los ensayos fueron llevados a cabo en caldo Soja Trypticaseina (TSB) enriquecido con glucosa al 1%. Verificaron el crecimiento de biopelícula con tinción de cristal violeta, se trató a *E. faecalis* con una solución de NaOCl, las células restantes fueron cultivadas y tratadas con una solución de probióticos y sus sobrenadantes. Los resultados obtenidos en esta investigación indicaron que la solución de NaOCl fue tóxica para las células planctónicas, pero no erradicó las células de la biopelícula en su totalidad, luego del tratamiento con la solución probiótica se determinó que esta fue eficaz contra las células de biopelícula y no así contra las células planctónicas.

En ese mismo año, en Egipto, Shaaban et al.⁴⁸ evaluaron la actividad antibacteriana de subproductos de lactobacilos contra *E. faecalis* en comparación con la pasta de hidróxido de calcio. El estudio implicó dos etapas, donde primeramente determinaron las propiedades antibacterianas de tres cepas de sobrenadantes de probióticos: *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, y *L. acidophilus* y una mezcla de los tres sobrenadantes contra *E. faecalis*. En la segunda fase se compararon las ZDI del hidróxido de calcio con las de los sobrenadantes. Los resultados de este estudio demostraron que todos los sobrenadantes mostraron inhibición del crecimiento de *E. faecalis* y la mezcla del cóctel mostró la ZDI más grande. El hidróxido de calcio mostró una inhibición significativamente menor a la de la mezcla de cóctel y gel. La concentración mínima inhibitoria tanto para el cóctel como para el gel fue de 50mg/ml.

También en el 2022, Hashim et al.⁴⁹ determinaron las propiedades antimicrobianas y antiadhesivas de los biosurfactantes extraídos de probióticos contra patógenos endodónticos comunes seleccionados. Primeramente, cultivaron *L. plantarum* en agar y caldo MRS, adicionalmente, cultivaron *S. anginosus*, *S. intermedius*, *S. constellatus*, *S. aureus*, *E. faecalis* en agar FAA (*Fastidious Anaerobe Agar*), agar para microorganismos anaeróbicos nutricionalmente exigentes suplementado con sangre de caballo. El sobrenadante de *L. plantarum* fue obtenido luego de un proceso de incubación de 48h, según la curva de crecimiento los sobrenadantes fueron obtenidos a las 8.5, 16, 24 y 48 horas respectivamente. Esta solución de sobrenadantes fue centrifugada a 10.000 g y luego ultra filtrada. Como control se utilizó el rhamnolipido obtenido de *P. aeruginosa*. Posteriormente, se agregó el sobrenadante de probióticos sobre los cultivos de las bacterias anteriormente mencionadas. La actividad antimicrobiana fue cuantificada mediante ZDI y la actividad antiadhesiva fue determinada usando análisis de imagen con un microscopio de fluorescencia. Los resultados de este estudio determinaron la presencia de tres proteínas similares a las adhesinas bacterianas lo que sugiere funciones para obstaculizar la adhesión de los patógenos. La mayor ZDI fue obtenida en los ejemplares donde utilizaron un subproducto llamado rhamnolipido obtenido de *P. aeruginosa*.

2.1.2. Actividad antimicrobiana de probióticos sobre patógenos endodónticos

2.1.2.1. Efecto *in vitro* de probióticos sobre *E. faecalis* y *C. albicans*

En el 2022, Charan et al. realizaron una evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de probióticos frente a patógenos endodónticos. Dicha evaluación fue llevada a cabo en tres etapas. La primera etapa consistió en analizar la eficiencia de los microorganismos probióticos contra *E. faecalis* y *C. albicans* en etapa planctónica con el procedimiento de copa de agar. En la segunda etapa se utilizó un experimento antagónico diferido para determinar la actividad de los probióticos contra los microorganismos antes mencionados también en etapa planctónica y, por último, en la tercera etapa se evaluó la fase de biopelícula de un portador de microorganismos probióticos intracanal. La ZDI fue medida al final de las etapas 1 y 2. Reconocieron actividad antimicrobiana con ZDI de 10mm o superior. Las UFC fueron medidas al final de la etapa 3. En los resultados obtenidos en este estudio hubo una marcada actividad de los microorganismos probióticos sobre los patógenos endodónticos en las etapas 1 y 3. Durante el uso de la técnica antagónica diferida no mostraron actividad antimicrobiana. Concluyeron que estos hallazgos ofrecen evidencia preliminar del posible uso de probióticos como un componente exitoso dentro del tratamiento endodóntico, por lo que se requieren más estudios *in vitro* e *in vivo*.

En el año 2019 Sari y Elysia³⁰ en la Universidad de Trisakti, realizaron un estudio para analizar el efecto de la cepa indonesia de *L. reuteri* sobre el crecimiento de biopelículas de *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. Se cultivó *L. reuteri* en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) durante 24 horas a 37°C en condiciones anaeróbicas y se prepararon placas con los patógenos a estudiar. Realizaron diluciones del cultivo de *L. reuteri* y luego las distribuyeron en una placa de 96 pocillos junto a controles positivos y negativos. Para los controles positivos de *E. faecalis* utilizaron hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5,25% y para los de *C. albicans*, Nistatina (100.000 UI). En el caso de los controles negativos solo fueron empleados caldo de Infusión Cerebro Corazón. Para medir la formación de biopelícula utilizaron tintura de cristal violeta (0.5 w/v) donde el restante fue contado como número de biopelícula y medido usando un espectrofotómetro de microplaca. Obtuvieron como resultado una reducción significativa del crecimiento de biopelículas de *E. faecalis* (79.2%) y *C. albicans* (62.5%) después del tratamiento con *L. reuteri* en comparación con los controles positivos,

esta inhibición fue dependiente de la dosis, que para *E. faecalis* fue de 10^8 UFC/ml y para *C. albicans* 10^4 UFC/ml. Respecto a los controles negativos, *L. reuteri* tuvo capacidad inhibitoria en todas las concentraciones. En conclusión, *L. reuteri* inhibe el crecimiento de la biopelícula de *E. faecalis* y *C. albicans*, lo cual podría resultar útil para prevenir la formación de biopelícula en el canal radicular.

En el mismo año Bohora et al.³² estudiaron la efectividad antibacteriana de los probióticos del grupo *Lactobacilli* y *Bifidobacterium* frente a *E. faecalis* y *C. albicans* tanto en etapa planctónica como en etapa de biopelícula. El estudio consistió en tres fases. La fase 1 tenía la finalidad de probar la eficacia de los probióticos contra los patógenos elegidos en estado planctónico utilizando el método de difusión en agar, perforando pocillos circulares de 8 a 10mm en cada placa con agar y agregando 150µl de los ejemplares diluidos. La fase 2 consistió en una prueba de antagonismo diferido con la misma finalidad de la fase 1, donde, el cultivo purificado de la cepa de patógeno se inoculó con el crecimiento productor original. Se midió la zona de inhibición (ZDI) para ambas fases. Finalmente, en la fase 3 se realizó la evaluación de la etapa de biopelícula, mezclando 9 ml de poloxámero 407 al 30% y caldo de MRS en un tubo de ensayo con 500 µl de cualquiera de los patógenos, junto con 500 µl de cepas probióticas de prueba y se incubaron (37 ° C, 48 h), seguido de diluciones en serie de la mezcla para la evaluación de los recuentos de UFC/ml. Los controles fueron patógenos endodónticos en poloxámero al 30% con caldo MRS y sin probióticos. Los resultados del estudio demostraron que, en la etapa planctónica, los probióticos mostraron actividad inhibitoria contra patógenos endodónticos, no así, en la prueba de antagonismo diferido. En la etapa de biopelícula, los tres probióticos mostraron una reducción del crecimiento de *E. faecalis*, mientras que el grupo de lactobacilos mostró una reducción en las colonias de *C. albicans*. En este estudio, los autores concluyeron que existe efecto inhibitorio de los probióticos sobre los patógenos endodónticos y el poloxámero 407 funciona como vehículo ideal para los probióticos.

Rai et al.³³ también en el 2019, evaluaron y compararon la eficacia antimicrobiana de tres cepas probióticas diferentes (*L. acidophilus*, *L. casei* y *L. rhamnosus*) y NaOCl al 5,25% frente a *E. faecalis* y *C. albicans* a las 48 horas y 1 semana. Se prepararon 5 grupos de prueba con cada solución. El estudio fue realizado en dos fases. Durante la fase 1 se probó la eficacia

de los probióticos y el hipoclorito de sodio al 5,25% contra *E. faecalis* y *C. albicans*, para ello se midió el halo de ZDI con un micrómetro digital a las 48 horas y 1 semana de la colocación de un disco embebido en la solución de prueba y colocado en agar con los microorganismos de prueba. En la fase 2, se evaluó el vehículo intraconducto para los probióticos, para ello se utilizó poloxámero en caldo MRS frío en una concentración de 30%. Se realizaron diluciones que posteriormente, fueron cultivadas en agar sangre por 72 horas y se evaluaron las UFC en todos los grupos de prueba. Los resultados reflejaron diferencias entre las ZDI de cada grupo, el halo más amplio de inhibición fue encontrado en el grupo del NaOCl al 5,25%, la menor cantidad de UFC fue encontrada en el grupo de *L. casei* contra *C. albicans* y en el de *L. rhamnosus* contra *E. faecalis*. En conclusión, los autores sugieren con este estudio que las cepas probióticas usadas como candidatas son efectivas para prevenir el crecimiento de *E. faecalis* y *C. albicans*.

Bohora y Kokate²⁸ en el 2017, evaluaron la eficacia antibacteriana de los probióticos contra patógenos endodónticos comunes, *E. faecalis* y *C. albicans* y el uso potencial de la terapia probiótica como aditivo en procedimientos de tratamiento de endodoncia. Se seleccionaron y evaluaron dos probióticos comerciales en función del número y la concentración de microorganismos, adicionalmente se eligieron *C. albicans* y *E. faecalis* como patógenos de prueba. El estudio se llevó a cabo mediante el método de difusión en agar mediante pocillos para evaluar la actividad antibacteriana de los probióticos seleccionados contra los patógenos midiendo las ZDI en mm. Los resultados demostraron que los grupos probióticos mostraron actividad inhibidora contra *E. faecalis* por el método de difusión de agar mediante pocillos, mientras que no hubo efecto sobre *C. albicans*. En la etapa de biopelícula, ambos grupos de prueba tuvieron un efecto antibacteriano sobre los microorganismos patógenos. En conclusión, este estudio sugiere que los microorganismos probióticos de las especies *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son efectivos para prevenir el crecimiento de *E. faecalis* y *C. albicans in vitro*, sin embargo, los autores sugieren que se realicen estudios adicionales ya que los probióticos comerciales se encuentran disponibles en diferentes concentraciones y presentaciones.

En el 2014 Seifelnasr²⁶, evaluó el uso potencial de la terapia probiótica como coadyuvante en la terapia endodóntica junto con su efecto sobre la reducción o limitación de la

periodontitis apical. Para ello, se seleccionaron y evaluaron cinco grupos de probióticos comerciales en función del número y la concentración de organismos (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium. longum* eran cepas comunes en todos los cocteles seleccionados). Se realizaron dos fases, donde, la fase 1 fue llevada a cabo mediante una prueba de ensayo de difusión en disco para evaluar las ZDI en milímetros de los probióticos seleccionados contra *E. faecalis* y *C. albicans*. La fase 2 fue realizada mezclando 9ml de poloxámero 407 al 30% y caldo MRS en un tubo de ensayo con 500ml de probiótico de un grupo y otro. Los resultados de la fase 1 indican que tres de los cocteles utilizados obtuvieron ZDI con una media de 7,4mm, 10,05mm, 11,2 mm para *C. albicans* y una media de 6,7mm, 11,1mm y 12,5mm para *E. faecalis*, en comparación con ninguna ZDI para el grupo control. En la fase 2, los resultados iniciales mostraron una disminución en los grupos I y IV con respecto al recuento de UFC/ml para *C. albicans* y para *E. faecalis*. Los grupos probióticos I y IV en 1 semana mostraron una completa eliminación de *E. faecalis* y solo estaban presentes las colonias de probióticos. El autor concluye reconociendo que, los probióticos pueden actuar de manera diferente según su composición y concentración, este estudio sugiere que organismos como *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei* y *B. longum* son efectivos para prevenir el crecimiento de *E. faecalis* y *C. albicans in vitro* tanto en etapa planctónica como de biopelícula.

2.1.2.2. Efecto *in vitro* de probióticos sobre *E. faecalis*

Jung et al.³⁴ en el 2019, investigaron la inhibición de la biopelícula de *Enterococcus faecalis* por acción del ácido lipoteicoico producido a partir de lactobacilos. Para este estudio usaron cepas de *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. plantarum* y *L. acidophilus* contra el patógeno de prueba *E. faecalis*, *in vitro* sobre placas de 96 pocillos con caldo Infusión Cerebro Corazón, sobre agar y cortes de dentina humana. Para determinar el grado de formación de biopelícula, se empleó un ensayo de cristal violeta y tinción de bacterias vivas/muertas. La cuantificación del crecimiento bacteriano se determinó midiendo la densidad óptica a 600nm con un espectrofotómetro. La formación de biopelícula en cortes de dentina humana se observó bajo un microscopio electrónico de barrido. La formación de biopelículas de *E. faecalis* se redujo con el tratamiento con ácido lipoteicoico de *L. plantarum* (Lp.LTA) de manera dependiente

de la dosis y en una etapa temprana sin afectar el crecimiento bacteriano, así como, el derivado de las otras especies de lactobacilos. Sin embargo, el mayor efecto inhibitor fue logrado por Lp.LTA. Los efectos inhibidores también fueron observados en los cortes de dentina. Los autores concluyeron que el Lp.LTA inhibe la formación de biopelícula y mantiene el efecto inhibitor en el tiempo, esto podría resultar útil para el tratamiento de periodontitis apical refractaria.

Noushad et al.³⁵ en el año 2019, estudiaron la inhibición de los lactobacilos probióticos sobre *E. faecalis* y compararon su eficacia de inhibición con la pasta tri-antibiótica y el hidróxido de calcio. Para identificar la eficacia antibacteriana realizaron un ensayo de difusión en agar, donde se incubaron los microorganismos y las muestras de prueba (pasta tri-antibiotica, hidróxido de calcio y probióticos) en concentraciones variables, donde, se registraron las ZDI. Para evaluar la inhibición de la biopelícula utilizaron concentraciones más altas que la ZDI y lo realizaron a través de un ensayo de actividad metabólica celular. Los resultados demostraron que a la concentración mínima de 250µg/l, el probiótico mostró un rango inhibitorio de 6,38mm y aumentó gradualmente a 12,88mm y 39,75µg/l a 500µg/l y 1000µg/l respectivamente. La acción inhibitoria del hidróxido de calcio alcanzó un máximo de 4,75mm a 1000µg/l. El antibiótico triple mostró una ZDI de más de 30mm en todas las concentraciones. La viabilidad de las bacterias fue mayor que la del hidróxido de calcio en el grupo probiótico a una concentración de 1000µg/l, en tal sentido los autores concluyeron que conviene investigar sobre otras cepas de probióticos.

Bohora y Kokate⁴¹ en el 2017, evaluaron la posible eficacia de los probióticos para prevenir el crecimiento de *E. faecalis*. Utilizaron dos cultivos probióticos *L. plantarum* y *L. rhamnosus* para comprobar su actividad antimicrobiana contra *E. faecalis* mediante dos métodos: método de difusión en copa de agar que fue evaluada con la medición de la ZDI y prueba de antagonismo diferido donde se empleó la densidad óptica para determinar el efecto inhibitor. Los resultados demostraron que los lactobacilos tuvieron un efecto inhibitor sobre el crecimiento de *E. faecalis* mediante el método de difusión en agar mediante pocillos, pero no mediante la prueba de antagonismo diferido.

En el 2014, Khan⁵⁰ realizó un estudio para determinar si *L. reuteri* mostró un efecto inhibitor sobre el crecimiento de *E. faecalis*. Realizó un estudio *in vitro* donde cultivó dos

cepas de *L. reuteri* junto con el microorganismo patógeno. Se cultivaron juntos en tres diferentes métodos: tubos de ensayo variando las concentraciones, en viales a través de diluciones seriadas para poder contar las colonias y en placas de Petri con el método de difusión en agar. Se utilizó una técnica de superposición de agar donde el agar líquido mezclado con *E. faecalis* se vertió sobre las placas de *L. reuteri* PTA 5289 y DSM 17938 en placas con agar Rogosa. Después de la incubación anaeróbica, se observó que *E. faecalis* crecía a lo largo de la placa de Petri, incluidas las áreas donde crecía el probiótico. En conclusión, los probióticos no tuvieron un efecto inhibitorio sobre *E. faecalis*.

2.1.3. Efecto de probióticos sobre periodontitis apical

Cosme et al.⁵¹ en su trabajo publicado en el 2020, evaluaron la relación entre la administración sistémica de probióticos y los procesos de inflamación/reabsorción asociados con la periodontitis apical en ratas de laboratorio. Se utilizaron ratas Wistar macho a las cuales se les indujo periodontitis apical en los primeros molares mandibulares izquierdo y derecho. Los animales se organizaron en tres grupos: control, *L. rhamnosus* y *L. acidophilus*. Los probióticos se administraron por vía oral mediante una sonda (10^9 UFC/5ml de agua) durante 30 días. Al día 30, se extrajo sangre para analizar las concentraciones plasmáticas de calcio, fósforo y fosfatasa alcalina. Luego, los animales fueron sacrificados y se extrajeron las mandíbulas para realizar una micro tomografía computarizada y un análisis inmunológico-histopatológico. No hubo diferencia significativa en los niveles de calcio y fósforo en plasma entre los grupos. El nivel de fosfatasa alcalina fue significativamente mayor en los grupos que consumieron probióticos y se observó un volumen significativamente menor de reabsorción ósea. En tal sentido concluyeron que la suplementación sistémica con probióticos (*L. rhamnosus* y *L. acidophilus*) tuvo un efecto significativo en la reducción de la inflamación y la resorción ósea en el desarrollo de periodontitis apical en ratas.

2.1.4. Actividad antimicrobiana de irrigantes convencionales sobre patógenos endodónticos.

Misuriya et al.⁵² en el 2014, desarrollaron una investigación en la que buscaron comparar y analizar el efecto de diversas soluciones de irrigación del conducto radicular sobre ciertos patógenos endodónticos *in vitro*. Para ello realizaron un estudio experimental, en el cual

analizaron la zona de inhibición (ZDI) de los irrigantes: hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5%, NaOCl 3%, clorhexidina 2%, clorhexidina 0,12%, doxiciclina 0,01%, doxiciclina 0,005% y MTAD (*Mixture of Tetracycline Acid and Detergent*). Se utilizó una placa de cultivo de agar inoculada con cuatro patógenos endodónticos: *Enterococcus faecalis* (MTCC-439), *Candida albicans* (MTCC-183), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC-25586) y *Peptostreptococcus anaerobius* (ATCC-27337). Los inóculos se esparcieron sobre la placa de agar tripticasa de soya y se posicionaron los discos de antibióticos, se incubaron en un frasco anaeróbico con una concentración aumentada de dióxido de carbono. Mediante este método se comparó la ZDI obtenida por diferentes irrigantes contra diferentes patógenos. MTAD mostró máxima actividad antibacteriana sobre otros irrigantes. En el caso de *C. albicans*, el MTAD fue menos eficaz que los otros irrigantes, sin embargo, fue más eficaz contra *E. faecalis*, *F. nucleatum* y *P. anaerobius*. Además, el NaOCl al 5% y al 3% mostró una actividad antimicrobiana significativa contra todos los microorganismos de prueba. Por tanto, es la mejor opción para un irrigante endodóntico primario.

Tirali et al.⁵³ en el 2013, realizaron un estudio en el cual buscaban comparar la actividad antimicrobiana del NaOCl, el gluconato de clorhexidina (CHX) y el clorhidrato de octenidina (OCT) en diferentes concentraciones contra patógenos endodónticos in vitro. Los irrigantes de prueba fueron varias concentraciones de NaOCl (0,5%, 2,5%, y 5,25%), Clorhexidina (CHX) (0,2%, 1% y 2%) y clorhidrato de octenidina (0,025%, 0,05% y 0,1%). Utilizaron *E. faecalis*, *C. albicans* y una mezcla de ambos, estos fueron cultivados en agar de Infusión Cerebro-Corazón (BHI). Se impregnaron discos de papel Whartman, previamente esterilizados con las soluciones de prueba. Para determinar el efecto antibacteriano se midieron las ZDI en mm. Los resultados de la investigación demostraron que, todas las concentraciones de clorhidrato de octenidina fueron efectivas contra *C. albicans* y *E. faecalis*. Un 0,2% de CHX fue ineficaz en todos los microorganismos. La eficacia antibacteriana de todas las soluciones experimentales disminuyó en la mezcla de todas las cepas. Los autores concluyeron que la disminución de las concentraciones de NaOCl resultó en efecto antimicrobiano reducido.

En el año 2005 Dametto et al.⁵⁴, evaluaron la actividad antimicrobiana in vitro del gel de clorhexidina al 2% frente a *E. faecalis*, comparándolo con otros irrigantes endodónticos

(clorhexidina líquida al 2% e hipoclorito de sodio al 5,25%). Para este estudio se prepararon 80 raíces de premolares mandibulares humanos mediante la técnica de instrumentación en serie, se esterilizaron en autoclave y se contaminaron durante 7 días con monocultivos de *E. faecalis*. Luego, las raíces se dividieron en 5 grupos según la sustancia irrigante utilizada durante la preparación biomecánica estandarizada. Para evaluar la acción antimicrobiana de las sustancias irrigantes se tomaron 3 muestras microbianas: inicial, postratamiento, y final (7 días después de la preparación biomecánica). Las muestras microbiológicas se sembraron en placa para contar las UFC. Los resultados demostraron que, el gel de clorhexidina al 2% y el líquido de clorhexidina al 2% redujeron significativamente las UFC de *E. faecalis* en las muestras microbiológicas posteriores al tratamiento y muestras finales. El hipoclorito de sodio al 5,25% también redujo la UFC de *E. faecalis* inmediatamente después de la instrumentación del conducto radicular, pero no pudo mantener el conducto radicular libre de *E. faecalis* detectable en la muestra final.

2.2. Bases Conceptuales

La siguiente sección abarca los conceptos básicos necesarios para comprender el desarrollo del proyecto de investigación. Se inicia contextualizando la periodontitis apical como patología asociada al problema y se concluye con el uso de los probióticos en odontología con énfasis en la aplicación de estos en la terapia endodóntica.

2.2.1. Periodontitis Apical

La periodontitis apical (PA) es una inflamación de los tejidos perirradiculares producto de una infección persistente de origen bacteriano localizada en la zona del periápice que puede ser una secuela de la necrosis y posterior infección de la pulpa dental¹². Esta enfermedad se caracteriza de acuerdo a sus hallazgos clínicos, radiográficos e histológicos^{1,12}. Puede presentarse con o sin síntomas dependiendo de la severidad y progreso de la misma¹.

De acuerdo a la *American Association of Endodontists* (Asociación Americana de Endodoncia) (AAE) se estableció una terminología diagnóstica dependiendo de la presencia o no de síntomas y signos radiográficos y son las siguientes:

Periodontitis apical asintomática

Inflamación y destrucción del periodonto apical que es de origen pulpar, se observa un área radiolúcida periapical y no da síntomas clínicos.

Periodontitis apical sintomática

Inflamación, generalmente del periodonto apical, que da síntomas clínicos como respuesta dolorosa al morder y/o percusión o palpación. Puede estar asociada a un área radiolúcida apical como puede no estarlo².

2.2.2. Etiología bacteriana de la periodontitis apical

Entre las múltiples etiologías de la PA, la infección bacteriana es una de ellas. Las lesiones pulpares necróticas e infectadas tienen un efecto inflamatorio y destructivo sobre el área perirradicular, durante este proceso se presenta una interacción dinámica entre las bacterias patógenas y los mecanismos de defensa del hospedero, los cuales pueden verse sobrepasados por la cantidad y virulencia de las mismas o puede exacerbarse por otros factores como presencia de enfermedades autoinmunes, diabetes mellitus, enfermedades virales como virus de Epstein Barr, entre otros^{1,12,55,56}. Las bacterias encontradas en esta zona se encuentran organizadas formando una biopelícula. La composición de la misma depende de si se trata de una PA primaria (previa al tratamiento endodóntico) o secundaria (posterior al tratamiento endodóntico)^{12,43}.

La biopelícula encontrada en la PA primaria se encuentra formada por especies bacterianas de los géneros *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Streptococcus* spp., *Olsenella uli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micra*, *Tanarella forsythia* y *Treponema* spp., las cuales pueden variar en cantidad de acuerdo a la presencia o no de síntomas¹. Sin embargo, cuando la PA persiste luego del tratamiento endodóntico, se encuentran otras especies bacterianas como *E. faecalis*, *Streptococcus* spp., *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Propionibacterium* spp., *Filifactor alocis*, *Dialister* spp., *Fusobacterium* spp., *P. micra*, *Pyramidobacter piscolens* y *Prevotella* spp. donde las bacterias Gram positivas tienden a ser los microorganismos más predominantes¹.

2.2.3. Enfermedad postratamiento endodóntico (fracaso endodóntico)

Debido a la ambigüedad y subjetividad de la definición de “éxito” o “fracaso” endodóntico, esta cualificación depende del pronóstico de cada caso e involucra un espectro muy amplio de características, se prefiere denominar al resultado del tratamiento como curación o enfermedad. Cuando la radiolucidez ha persistido sin cambios o ha surgido una nueva, se considera una expresión de “enfermedad”, incluso cuando no hay signos y síntomas clínicos, sin embargo, se debe tener en cuenta que, la curación completa de un proceso periapical, podría tardar entre 4 y 6 años y la radiolucidez reducida combinada con la normalidad clínica puede interpretarse como una sugerencia de “curación” progresiva¹⁵.

La radiolucidez periapical en dientes tratados endodónticamente es denominada periodontitis apical^{1,12}. Sin embargo y en el caso de la enfermedad postratamiento endodóntico, esta condición persiste a pesar del tratamiento, ha vuelto a aparecer después de haber cicatrizado al principio o ha surgido durante el período de seguimiento, por lo tanto, se puede caracterizar como periodontitis apical persistente, recurrente o emergente, para diferenciarla de la periodontitis apical en dientes no tratados o periodontitis apical primaria¹⁵.

La etiología de la enfermedad postratamiento endodóntico es variada, pero, puede resumirse en cuatro grandes grupos: microorganismos intrarradiculares persistentes o reintroducidos, infección extrarradicular, reacción de cuerpo extraño y quistes verdaderos¹².

2.2.4. Enfermedad postratamiento endodóntico de origen bacteriano

La llegada de bacterias a la zona del periápice podría deberse a múltiples causas. Una de ellas es la obturación insuficiente de la porción apical del sistema de conductos radiculares o micro filtraciones en la porción coronal producto de una restauración defectuosa⁵⁷, donde la biopelícula es más parecida a los casos de PA primaria¹. Otra causa está relacionada a infecciones bacterianas persistentes donde la población bacteriana es menos variada y a menudo dominada por una especie en particular, se ha encontrado que *E. faecalis* es una de estas⁵⁸. La aparición de *E. faecalis* es comúnmente asociada a dientes que se dejaron con cámara abierta para drenaje, dientes tratados en múltiples visitas, restauraciones o tratamiento endodóntico con microfiltraciones¹. Debido a que *Enterococcus* es colonizador de comidas y puede ser encontrado en la superficie de varios quesos, algunos estudios sugieren que su aparición en el ápice radicular puede estar relacionada a la alimentación¹.

Otra vía planteada es la presencia de una infección extrarradicular que pudo ser ocasionada por extensión directa de la infección, vía sacos periodontales que se comunican con la zona apical, por la extrusión de restos dentinarios infectados o por contaminación con instrumentos endodónticos infectados y sobreextendidos^{12,15}. Usualmente la respuesta inmune del hospedero destruiría estos microorganismos, sin embargo, algunos de estos son capaces de resistir a esta respuesta a través de la formación de una matriz extracelular o una placa protectora⁵⁹.

Estos factores sumados a la virulencia y cantidad de las bacterias presentes y adicionalmente a la respuesta inmune del hospedero que en algunos casos resulta en inflamación del tejido, activación de mediadores de la inmunidad y activación de los osteoclastos, constituyen el cuadro de periodontitis apical secundaria¹².

2.2.5. Prevalencia de periodontitis apical primaria

Los casos de PA varían según el sexo, la edad, entre otros factores. En la población adulta, Jakovljevic et al.¹¹, en el 2020, encontraron que, de 200.041 dientes examinados un 3,5% tenían PA y que las pacientes femeninas eran menos propensas a esta condición, en comparación con los pacientes masculinos.

También es importante destacar que la prevalencia de PA varía entre países debido a una gran cantidad de factores¹². En China según Liu et al.⁶⁰, en el 2021, la prevalencia de esta condición era de 7,79% , en Estonia 54,7% en el 2018⁹ encontrando que es más común en molares inferiores, así como en Irak se encontró una prevalencia de 40,1% ¹⁰ siendo más frecuente en dientes superiores.

2.2.6. Aplicación de probióticos en odontología

El uso actual de los probióticos en el campo de la odontología es variado, este apartado se contextualiza sobre los términos empleados, el mecanismo de acción, los efectos sobre el hospedero, bacterias comúnmente usadas y posible uso en la terapia endodóntica.

2.2.6.1. Probióticos y bacterioterapia

El término probióticos fue acuñado por primera vez en la década de 1960. Según el informe de la Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, los probióticos son “microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del hospedero”. Desde este punto de vista surge el concepto de bacterioterapia, término utilizado cuando se implanta una cepa inofensiva en la microbiota del hospedero para mantener o restaurar el microbioma natural a través de la interferencia y/o inhibición de otros microorganismos, especialmente patógenos²¹.

La bacterioterapia proporciona formas alternativas de luchar contra las enfermedades infecciosas, con menos efectos secundarios que los medicamentos convencionales y también ayuda a tratar trastornos que parecen no tener conexión con las bacterias, como el asma, la obesidad y la diabetes. En los últimos años el uso de probióticos ha generado interés en la comunidad odontológica con el desarrollo de estudios enfocados a reducir la incidencia de caries, mejorar el pronóstico de la periodontitis, eliminar halitosis e infecciones como la candidiasis bucal²¹.

2.2.6.2. Mecanismo de acción de los probióticos

Se han propuesto varios mecanismos para el efecto beneficioso de los probióticos. Estos efectos incluyen:

1. Prevención de la adhesión de patógenos a los tejidos del hospedero.
2. Estimulación y modulación del sistema inmunológico de las mucosas.
3. Modulación de la proliferación celular y la apoptosis.
4. Mejora de la integridad de la barrera intestinal y regulación positiva de la producción de mucina.
5. Eliminación o inhibición del crecimiento de patógenos mediante la producción de bacteriocinas u otros productos.
6. Desplazamiento de los microorganismos patógenos por competencia directa de nutrientes y sitios de adhesión a los enterocitos.

7. Inhibición de la formación de biopelículas de patógenos.
8. Inducción de proteínas citoprotectoras.
9. Reducción de la inflamación.
10. Estimulación del sistema inmunológico del hospedero.
11. Eliminación de patógenos mediante la producción de bacteriocinas y ácidos/peróxidos junto con la alteración de pH del medio local²⁴.

Para una mayor comprensión de los efectos, estos se clasifican en cuatro grandes líneas:

1. La producción de antimicrobianos (bacteriocinas) o ácidos que pueden inhibir la proliferación de patógenos.
2. Competencia por los sitios de adhesión celular (inhibición competitiva o terapia de reemplazo) con patógenos y / o coagregación a la biopelícula.
3. Modulación de funciones inmunes locales y sistémicas.
4. Degradación de toxinas²¹.

Los efectos de los probióticos son específicos de especies y cepas. La dosis óptima para las enfermedades bucales aún no se ha explorado, ya que las dosis se han adaptado a los estándares para el tracto gastrointestinal y para la atención de la salud pediátrica. Sin embargo, se sabe que hay entre 75 y 100 especies bacterianas en la cavidad bucal y que diferentes personas tienen diferentes combinaciones de especies probióticas. En otras palabras, no existe una solución única para todos, por lo que es posible que se necesite una mezcla de cepas probióticas en lugar de una sola cepa como bacterioterapia oral, comparable al uso de antibióticos de amplio espectro²¹.

2.2.6.3. Cepas de probióticos utilizados en cavidad bucal

Las especies de bacterias probióticas más estudiadas pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Los lactobacilos se consideran un componente normal de la biopelícula bucal y representan aproximadamente el 1%. Las bifidobacterias se producen sólo en pequeñas cantidades en la biopelícula bucal. La atención particular en estas especies radica en su amplio uso en la industria láctea y los pocos casos asociados a infecciones humanas. De hecho, estas bacterias tienen una relación simbiótica con los seres humanos. Están

presentes en la membrana mucosa de las células epiteliales intestinales, inhibiendo el crecimiento y la adhesión de bacterias patógenas a través de la producción de bacteriocinas, actuando como un recubrimiento que protege los tejidos²⁸.

Desde la perspectiva odontológica, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son acidógenos y acidúricos, por lo que se consideran cariogénicos y un riesgo para la salud dental. Sin embargo, la capacidad amortiguadora de los productos lácteos que contienen estas bacterias contrarresta su acidez. Además, se ha demostrado que las especies de *Lactobacillus* son mediadores tardíos en la progresión de las lesiones cariosas debido a sus malas propiedades de adhesión. Por tanto, no aumentan la incidencia de nuevas lesiones, aunque se sabe poco sobre el efecto que podrían tener sobre las lesiones preexistentes. Sin embargo, no todas las cepas de *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* son probióticas²¹.

Las primeras especies probióticas en ser introducidas en la investigación odontológica fueron *L. acidophilus* en 1984 y *Bifidobacterium bifidum* en 1991. Se ha demostrado que *L. rhamnosus* GG, ATCC 53103 reduce el riesgo de caries al producir una sustancia inhibidora del crecimiento contra *Streptococcus sobrinus*. Las cepas de *Streptococcus salivarius* son excelentes candidatas para un probiótico aplicado en cavidad bucal, ya que se encuentran entre los miembros más numéricamente predominantes de la microbiota de la lengua de individuos sanos y son colonizadores tempranos de las superficies bucales. Otras cepas de probióticos en la cavidad bucal incluyen: *L. acidophilus*, *L. casei* cepa Shirota, *Lactobacillus paracasei*, *L. casei*, *L. johnsonii*, *L. reuteri*, *propionibacterium*, *Weissella cibaria*²⁴.

Los estudios experimentales y los ensayos clínicos mostraron avances en múltiples campos de la odontología, tales como:

Control de caries: En la saliva, se ha demostrado que los microorganismos asociados a la caries, como *Streptococcus mutans*, se reducen en número después del consumo de productos que contienen los probióticos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Enfermedad periodontal: los estudios iniciales sugirieron que el uso de probióticos podría mejorar la salud bucal al disminuir la inflamación periodontal. Estudios posteriores que

evaluaron a pacientes con diversas formas de enfermedad periodontal, como gingivitis y periodontitis, mostraron una recuperación significativa después del tratamiento con un cultivo de la cepa *L. acidophilus* en la mayoría de los pacientes. Otro estudio evaluó cepas probióticas, incluidas *L. reuteri*, *L. brevis* y *L. casei*, que revelaron una mejora en la salud gingival, por la disminución del sangrado de las encías. Otros estudios evaluaron cepas probióticas de *L. reuteri*, *L. brevis* y *L. salivarius* contra marcadores inflamatorios en los que *L. reuteri* mostró niveles reducidos de citocinas proinflamatorias en el líquido crevicular gingival y el uso de *L. brevis* y *L. salivarius* disminuyó la actividad de la metaloproteinasa de la matriz junto con otros marcadores inflamatorios en la saliva.

Candidiasis bucal: Estudios preliminares investigaron las bacterias probióticas *L. acidophilus* y *L. fermentum* en las cavidades bucales, lo que resultó en una rápida disminución de *C. albicans* después de la ingesta de probióticos. Un mayor consumo dio lugar a un número casi indetectable de hongos en boca. Otro estudio evaluó *L. rhamnosus* y *Propionibacterium freudenreichii*, *P. shermanii* para conocer el efecto sobre la infección bucal por *Candida* en humanos, en lo que resultó en la disminución de recuentos altos de levaduras bucales.

Halitosis: algunos estudios clínicos han encontrado cepas probióticas eficaces para el tratamiento de la halitosis oral o intestinal asociada. Las cepas estudiadas incluyeron aislados de *Lactobacillus*, *E. coli Nissle*, *S. salivarius* y *Weissella*²⁶.

2.2.6.4. Uso potencial de probióticos en la terapia endodóntica

En endodoncia, se ha sostenido durante mucho tiempo que hay tres principios básicos que deben seguirse para lograr el éxito. Esto se conoce como la tríada endodóntica la cual llevada a cabo de manera adecuada y secuencial permite garantizar el éxito clínico, radiográfico y recuperación de la funcionalidad de la pieza dental. Estos tres principios son desbridamiento completo del sistema de conductos radiculares, esterilización del sistema de conductos radiculares y obturación completa del sistema de conductos radiculares²⁶. El método tradicional de tratamiento ha sido eliminar las bacterias presentes en el sistema de conductos radiculares a través de procedimientos quimicomecánicos. Cuando la terapia de conducto radicular falla, casi siempre es debido a la presencia de microorganismos. *E. faecalis* y *C.*

albicans se encuentran particularmente de manera constante en la enfermedad endodóntica posterior al tratamiento²⁸.

En este contexto, es importante acotar que los trabajos acerca de probióticos y su efecto terapéutico en el tratamiento de la enfermedad endodóntica son escasos. Por tal motivo, aún permanece la interrogante referente a la eliminación de los microorganismos de un sistema de conductos radiculares infectado^{26,28}. En casos refractarios de PA en los que patógenos como *E. faecalis* y *C. albicans* están implicadas y en ocasiones son difíciles de tratar, los probióticos pueden desempeñar un papel contra estas bacterias. Los lactobacilos pueden producir diferentes componentes antimicrobianos, incluidos ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, sustancias antimicrobianas de bajo peso molecular, bacteriocinas e inhibidores de la adhesión, y han ganado relevancia como probióticos. Se conoce, que los medicamentos intraconducto tienen un efecto bactericida muy limitado en los espacios intrarradiculares, y el uso de probióticos entre visitas puede mejorar este proceso de eliminación bacteriana. La incorporación de la bioterapia puede desempeñar un papel crucial en el éxito de la apexogénesis y la apexificación²⁴.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

A continuación, se describen los tópicos relacionados con la metodología, que permitieron alcanzar los objetivos propuestos, tales como, enfoque, alcance y diseño de investigación. Adicionalmente, se mencionan los especímenes de estudio, las variables, técnica e instrumentos de recolección de datos, materiales, procedimiento y método de análisis de los resultados.

3.1. Enfoque, alcance y diseño de la investigación

Tomando en consideración los criterios de Hernández et al.⁶¹ esta investigación tuvo un enfoque cuantitativo, ya que se midieron los halos de inhibición generados alrededor de los pozos por los probióticos y sus metabolitos, los cuales fueron comparados con los halos obtenidos por el *gold standard* (Gluconato de clorhexidina al 2%).

Así mismo, este estudio contó con un alcance explicativo⁶¹, pues se determinó el efecto que tienen los probióticos y sus metabolitos sobre bacterias asociadas a la PAP, a través de la comparación con el *gold standard*, tomando en cuenta una serie de variables que explicaron la relación con dicho efecto.

Respecto al diseño de la investigación, esta fue experimental de tipo posprueba y control, se realizó una medición sobre una variable y un control⁶¹. En este experimento se conformaron dos ambientes de estudio (bacterias microaerófilas y bacterias anaeróbicas) donde se midieron las zonas de inhibición de los probióticos y sus metabolitos junto a un grupo control (Gluconato de Clorhexidina al 2% y solución fisiológica), en los cuales se determinó el efecto a las 24 horas de incubación.

3.2. Muestra Biológica

Según la literatura, la población de microorganismos asociados a PAP incluyen bacterias Gram positivas y Gram negativas, aeróbicas, microaerófilas, aeróbicas facultativas y anaeróbicas estrictas, siendo más prevalentes las bacterias anaeróbicas. Entre los géneros causantes de PAP se encuentran *Atopobium*, *Capnocytophaga*, *Parvimonas*, *Filifactor*, *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*,

Propionibacterium, Eubacterium, Fusobacterium, Cutibacterium, Solobacterium, Dialister, Porphyromonas, Prevotella, Tannerella, Treponema, Campylobacter, y Veillonella, específicamente las especies de *Olsenella uli, P. alactolyticus, P. endodontalis, F. nucleatum, P. micra, T. forsythia* y especies de *Candida*^{1,3,5,12,43,59,62}. La muestra estuvo conformada por las bacterias que se lograron aislar, cultivar e identificar de la recolección del material biológico de cuatro pacientes.

3.3. Sistema de Variables

3.3.1. Fase I

Variables independientes

Grupo experimental

- Cepas probióticas de *Lacticaseibacillus rhamnosus* en concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml y metabolitos.
- Cepas probióticas de *Lactiplantibacillus plantarum* en concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml y metabolitos.
- Cepa probiótica de *Lacticaseibacillus paracasei* en concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml y metabolitos
- Mezcla X3 conformada por una cepa de *L. rhamnosus*, una cepa de *L. plantarum* y una cepa de *L. paracasei*
- Mezcla X5 conformada por dos cepas de *L. rhamnosus*, dos cepas de *L. plantarum* y una cepa de *L. paracasei*.

Grupo control

Control positivo

- Gluconato de clorhexidina al 2%

Control negativo

- Solución fisiológica al 0,9%

Variable dependiente

- Presencia de actividad antimicrobiana contra las bacterias en estudio.

Indicadores

Sí y No

En esta fase se respondió si hay o no presencia de actividad antimicrobiana por parte de las cepas probióticas y sus metabolitos sobre las bacterias identificadas.

3.3.2. Fase II.

Variables independientes

Grupo experimental

- Cepas probióticas de *L. rhamnosus* en concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml y sus metabolitos.
- Cepas probióticas de *L. plantarum* en concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml y sus metabolitos.
- Cepa probiótica de *L. paracasei* en concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml y sus metabolitos.
- Mezcla X3 conformada por una cepa de *L. rhamnosus*, una cepa de *L. plantarum* y una cepa de *L. paracasei*
- Mezcla X5 conformada por dos cepas de *L. rhamnosus*, dos cepas de *L. plantarum* y una cepa de *L. paracasei*

Grupo control

Control positivo

- Gluconato de clorhexidina al 2%

Control negativo

- Solución fisiológica al 0,9%

Variable dependiente

Colonias bacterianas identificadas: se midieron los halos inhibitorios según la escala de Duraffourd y se clasificaron según los siguientes indicadores:

- Nula (-) si fue inferior o igual a 8mm
- Sensible (Sensible=+) de 9 a 14mm
- Muy sensible (muy sensible =++) de 15 a 19mm
- Sumamente sensible (S.S.=+++)) si fue igual o superior 20mm.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se utilizó como técnica de recolección de datos la observación directa⁶¹ para determinar la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano, junto a la existencia o no de halos inhibitorios en las cepas bacterianas, así como la observación técnicamente asistida⁶¹ para medir el diámetro de los halos inhibitorios en las cepas bacterianas utilizando un vernier como instrumento de medición.

El instrumento que permitió recolectar los datos microbiológicos obtenidos en el experimento fue una ficha de registro elaborada por Cedillo y Fernandez⁶³, con modificaciones en el Ítem 1 en el apartado de bacterias donde se remplazaron las bacterias allí nombradas por las bacterias aisladas, posteriormente en la sección de tratamiento se modificó con las cepas probióticas a utilizar, los metabolitos, el control positivo (Gluconato de clorhexidina al 2%) y el control negativo (solución fisiológica al 0,9%).

Respecto al Ítem 3 del instrumento ya mencionado⁶³, se modificó la sección de bacterias con las bacterias aisladas, posteriormente en el apartado de tratamiento, se incluyeron los metabolitos usados en la fase anterior. En cuanto a la medida del halo inhibitorio, se modificó para registrar mediciones a las 24h (Anexo A).

3.5. Procedimiento, materiales e instrumentos

Los materiales, instrumentos y equipos utilizados para el desarrollo del experimento se resumen en la Tabla 3.1

3.5.1. Materiales

Tabla 3.1 Materiales, instrumentos y equipos utilizados para el desarrollo del experimento

Material biológico			
Cepas de <i>L. rhamnosus</i> con un concentrado celular de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml		Cepas de <i>L. plantarum</i> con un concentrado celular de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.	
Cepa de <i>L. paracasei</i> con un concentrado celular de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml		Aislados bacterianos obtenidos de las muestras biológicas de pacientes con PAP	
Medios de cultivo			
Agar Sangre		Caldo tioglicolato	
Kit de identificación			
Galerías API 20 ^a Biomeriux-France		Kit de coloración de Gram	
Material de vidrio			
Tubos de ensayos con tapa de rosca	Cilindro graduado 100ml	Pipetas Graduadas 20 ml, 10 ml	
Placas de Petri	Pipetas Pasteur	Varillas	
Frascos con tapa de rosca diferentes capacidades	Láminas de portaobjeto		
Misceláneos			
Guantes	Tapabocas	Mechero	Agua destilada
Pinzas algodonerías	Asa de platino de punta y calibrada	Vástago homogeneizador con hélice	
Cilindros de acero	Glicerol	Espátulas	Gotos
Filtros milipore 20 μ m	Conos de papel estériles #20, #25, #30	Nefelómetro de Mc Farland 0,5Mc (equivalente a $1,5 \times 10^8$ bacterias /ml)	
Jeringas desechables 5cc	Torundas de algodón estériles	Gasas estériles	Aceite de Inmersión
Gradillas	Puntas para micropipetas	Palillos de madera	Marcadores
Medicamentos y Soluciones Químicas			
Solución de Gluconato de Clorhexidina al 2%	Peróxido de Hidrógeno al 3%	Solución fisiológica 0,9%	Alcohol Isopropílico 70%
Equipos			
Autoclave	Campana de flujo laminar	Centrífuga	
Incubadora	Cámara de anaerobiosis	Regla flexible / Vernier	
Cronómetro y reloj	Refrigerador	Microondas	
Balanza electrónica	Micropipetas	Propipetas	
Microscopio Óptico	Negatoscopio		
Medios de Registro			
Ficha de recolección de datos en formato digital (Anexo A).			

3.5.2. Procedimientos

Para mejor comprensión de los procedimientos realizados se dividió esta sección en tres fases: una fase preliminar de recolección de muestras biológicas y dos fases experimentales.

Fase preliminar

Recolección de muestras biológicas.

Se seleccionaron pacientes que acudieron a la Clínica Dental privada El Quijote, del centro Profesional El Quijote, Mérida Venezuela y que fueron diagnosticados con PAP clínica y radiográficamente. Con la finalidad de evitar la contaminación de fluidos y otros agentes que pueden encontrarse en el medio bucal se aplicó el siguiente protocolo al momento de recolectar las muestras endodónticas:

- Enjuague bucal con gluconato de clorhexidina al 0,12% durante 30 segundos.
- Aislamiento absoluto del campo operatorio.
- Apertura cameral.
- Debridación y limpieza del conducto de forma manual hasta 2mm antes del ápice radicular.
- Conductometría de los conductos involucrados.
- A partir de este momento se evitó el uso de eyectores y alta succión, en cambio se utilizó hidrogel o torundas de algodón estériles.
- Limpieza cuidadosa del conducto radicular con lima.
- Colocación dentro del canal radicular una (1) o dos (2) gotas de NaCl al 0,9% para obtener la mayor cantidad de muestra.
- Introducción de un cono de papel #20, #25 o #30 calibrado, durante 10 segundos para recolectar la muestra del ápice radicular, y repetir este paso utilizando un segundo cono de papel.
- La muestra obtenida fue colocada en medio tioglicolato y trasladada a temperatura ambiente hasta el laboratorio^{4,64,65}.

Una vez en el laboratorio, la muestra se incubó a 37°C por 72 horas, para promover el crecimiento bacteriano.

Fase I: Aislamiento e identificación de bacterias en muestras de PAP.

El cultivo fue homogenizado por 10 segundos empleando un vástago homogeneizador con hélice, se inoculó una alícuota de 5 µl en agar Sangre, utilizando la técnica de agotamiento en 4 cuadrantes y se incubó por 7 días a 37°C en cámara de anaerobiosis como se aprecia en la Figura 3.1.

Concluido el tiempo de incubación, se seleccionaron aleatoriamente las colonias características con ayuda de los palillos de madera y se realizó la identificación morfotintorial empleando la tinción de Gram y un microscopio óptico, así como la prueba de catalasa; los hallazgos observados se registraron en el instrumento diseñado para tal fin. Las colonias identificadas fueron subcultivadas en caldo tioglicolato, haciendo uso de conos de papel estériles e incubadas a 37°C por 72 horas. La identificación se realizó empleando el sistema miniaturizado de identificación bioquímica Galerías API (*Analytic Profile Index*), siguiendo las instrucciones de la casa comercial Biomeriux-France.



Figura 3.1. Placas de agar sangre en cámara de anaerobiosis

Fase II: Pruebas de actividad antibacteriana.

Preparación de los probióticos y sus metabolitos.

Las cepas probióticas en estudio, fueron cultivadas en caldo MRS a 35°C durante 18 horas, el cultivo obtenido fue centrifugado a 8000 rpm durante 20 minutos, para luego separar el

sobrenadante (metabolitos) del concentrado celular (probióticos). Los sobrenadantes se filtraron con filtros de jeringa millipore de 0,20 micras, el filtrado fue recolectado en tubos estériles identificados para cada cepa probiótica y el concentrado celular fue ajustado a una concentración equivalente a 0,5 McFarland equivalente a $1,5 \times 10^8$ bacterias/ml utilizando solución salina fisiológica estéril.

Preparación de los inóculos de los aislados bacterianos de PAP.

A partir de los cultivos de PAP identificados, se obtuvo una alícuota del fondo de los tubos de ensayo y se resuspendió en 2 ml de solución salina fisiológica estéril contenida en tubos de ensayo con tapa de rosca, debidamente rotulados, hasta alcanzar una turbidez similar al patrón 0,5 de McFarland equivalente a $1,5 \times 10^8$ bacterias/ml.

Evaluación preliminar del efecto inhibitor de los probióticos y sus metabolitos sobre los aislados de PAP

Para esta prueba, se inocularon tubos de agar sangre, con 100µl de los concentrados celulares y los sobrenadantes de las cepas probióticas en estudio *L. rhamnosus* (Lr), *L. rhamnosus* (71), *L. paracasei* (75), *L. plantarum* (174) y *L. plantarum* (8014) así como de las mezclas de sobrenadantes X3 conformada por 3 cepas 71, 174 y 75, y X5 conformada por Lr, 71, 75, 174 y 8014, se vertieron en placas estériles y se permitió su solidificación. Sobre la superficie del agar, se colocaron 9 µl de la suspensión bacteriana de cultivos de PAP, se dejó reposar por 1 hora con la finalidad de permitir la absorción del inóculo y posteriormente se incubaron en un ambiente de microaerobiosis a 37°C por 48 horas. La ausencia de crecimiento de los cultivos de PAP sobre el agar sangre suplementado con concentrado celular o sobrenadante, indicó la posible presencia de un efecto antibacteriano, los resultados observados fueron registrados en el instrumento de recolección de datos (Anexo A, Ítem 1).

Evaluación cuantitativa del efecto inhibitor de los probióticos y sus metabolitos sobre los aislados de PAP.

Esta prueba se realizó utilizando la técnica de difusión en pozos estandarizada por Serrano⁶⁶. Se colocaron cilindros de acero de 6mm de diámetro en placas de Petri estériles en forma radial y uno central (Figura 3.2). Posteriormente se inocularon tubos de agar sangre de 12 ml

con 100 µl de la suspensión bacteriana de cultivos de PAP y se vertieron en las placas, se permitió su solidificación y por último se removieron los cilindros de acero para obtener los pozos. Se dispensaron en 30 µl de los concentrados celulares y los sobrenadantes de las cepas probióticas en estudio, solución fisiológica, gluconato de clorhexidina al 2%, en su pozo correspondiente y se dejó reposar 1 hora para permitir la difusión de las muestras de prueba. Las placas fueron incubadas en condiciones de microaerobiosis a 37°C por 24 horas, seguidamente se midieron los diámetros de los halos inhibitorios empleando un vernier y un negatoscopio. Estos resultados fueron registrados en una ficha digital (Anexo A, Ítem 2). Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

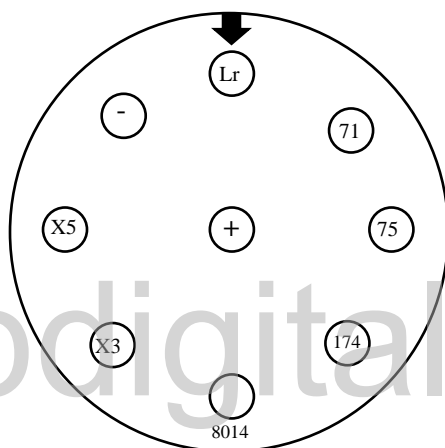


Figura 3.2. Distribución de los sobrenadantes en los pozos

3.6. Principios Bioéticos

Según la Declaración de Helsinki⁶⁷, en el curso de una investigación médica, es deber del investigador proteger la vida, la integridad, el derecho a la autodeterminación, la intimidad y la confidencialidad de la información personal de los participantes de la misma, es por ello, que los individuos que formaron parte de esta investigación no sólo fueron aquellos que cumplieron con presentar la patología apical, sino también, aquellos que así lo decidieron y manifestaron su voluntariedad a través del consentimiento informado enmarcado dentro de los principios de esta declaración (Apéndice A) el cual fue otorgado, leído y explicado previamente a la toma de la muestra correspondiente a la fase preliminar del estudio. Este formato de consentimiento informado contiene los objetivos de la investigación y explicó

que el procedimiento realizado no supondría ningún tipo de intervención y es un procedimiento de rutina para realizar el diagnóstico microbiológico.

El protocolo realizado, respetó los datos que se obtuvieron de manera tal que resulten confiables y replicables, respetando la integridad de los mismos sin que exista ningún tipo de alteración a conveniencia de los investigadores y genere conflictos de interés en el proceso.

3.7. Plan de análisis de los resultados

En función al procedimiento desarrollado, el plan de análisis de los resultados fue estructurado en dos fases:

Fase I

Se realizó un análisis descriptivo, el cual está compuesto por la frecuencia de los indicadores Si y No, indicando cuáles probióticos y sus metabolitos mostraron actividad antibacteriana y cuáles no, esto se tomó en cuenta para cada aislado bacteriano. Adicionalmente se aplicó un test alfa de Cronbach para verificar la consistencia interna de la prueba, así como, una prueba de correlación de Pearson para determinar la relación del desempeño similar de las cepas probióticas.

Fase II

En esta fase, de igual manera, se aplicó un análisis estadístico descriptivo para mostrar la frecuencia de los diámetros medidos por los halos y los indicadores de la escala de Duraffourd que presentaron cultivos de PAP y sus duplicados en las diferentes placas de agar. La representación de los datos en esta fase se realizó a través de tablas de frecuencia. Para la inferencia de datos se aplicó una prueba de χ^2 para determinar el comportamiento similar del diámetro de los halos ante las diferentes bacterias aisladas, el resultado se consideró estadísticamente significativo a partir de un valor de $p < 0,05$. Para el procesamiento de los datos se empleó el paquete estadístico *IBM SPSS Statistics 26*

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

En este apartado se describen los resultados obtenidos de la investigación, organizados de acuerdo a las 3 fases definidas en la metodología. Fase preliminar que contiene los resultados de la toma de muestra, en la Fase I se detallan los resultados obtenidos del proceso de aislamiento e identificación de las bacterias asociadas a PAP y la Fase II que detalla los resultados de las pruebas de actividad antimicrobiana.

4.1 Fase Preliminar: Recolección de muestras biológicas

Se recolectaron muestras biológicas de cuatro pacientes con diagnóstico de PAP, tres de ellos con sintomatología asociada y el paciente restante cursaba con la patología de forma asintomática. El diagnóstico de los pacientes fue confirmado por un especialista tomando en cuenta la radiografía inicial, como se detalla en la Figura 4.1.



Figura 4.1. Radiografías periapicales de pacientes diagnosticados con PAP

4.2 Fase I: Aislamiento e identificación de bacterias en muestras de PAP

Transcurridos los 7 días, se procedió a la identificación microscópica de 18 colonias seleccionadas al azar, donde fue posible constatar que las mismas no se encontraban suficientemente puras (Figura 4.2), por lo que fue necesario realizar un segundo proceso de cultivo y siembra, hasta obtener colonias puras.

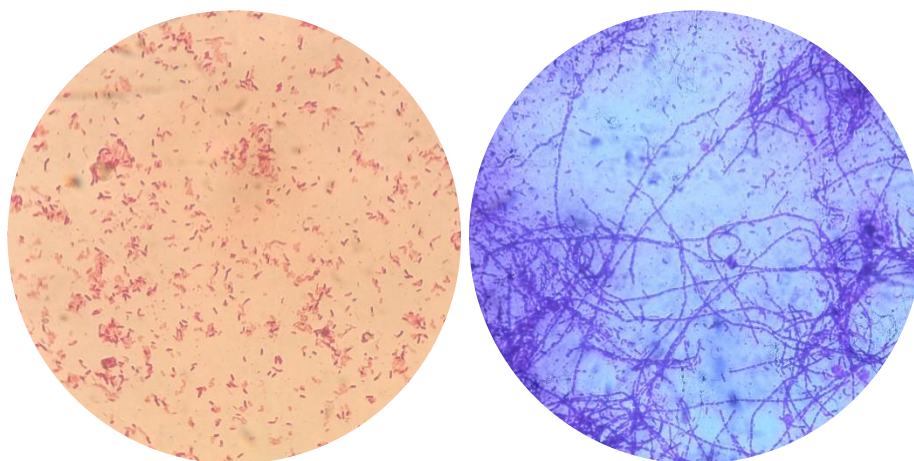


Figura 4.2. Microscopía de bacilos Gram- dispersos.

Una vez purificadas, se realizó la identificación de las características macroscópicas como color, textura y bordes (Figura 4.3), así como las características de crecimiento en caldo tioglicolato (Figura 4.4) y se procedió al análisis microscópico tomando en cuenta morfología, agrupación y tinción de Gram, de los cuales 10 sólo resultaron viables A2, A3, A5, A6, A8, B2, B5, B6, B8 Y B9 (Figura 4.5). Adicionalmente, se realizó la prueba de catalasa, cuyo resultado fue negativo para todas, estos resultados se resumen en la Tabla 4.1.

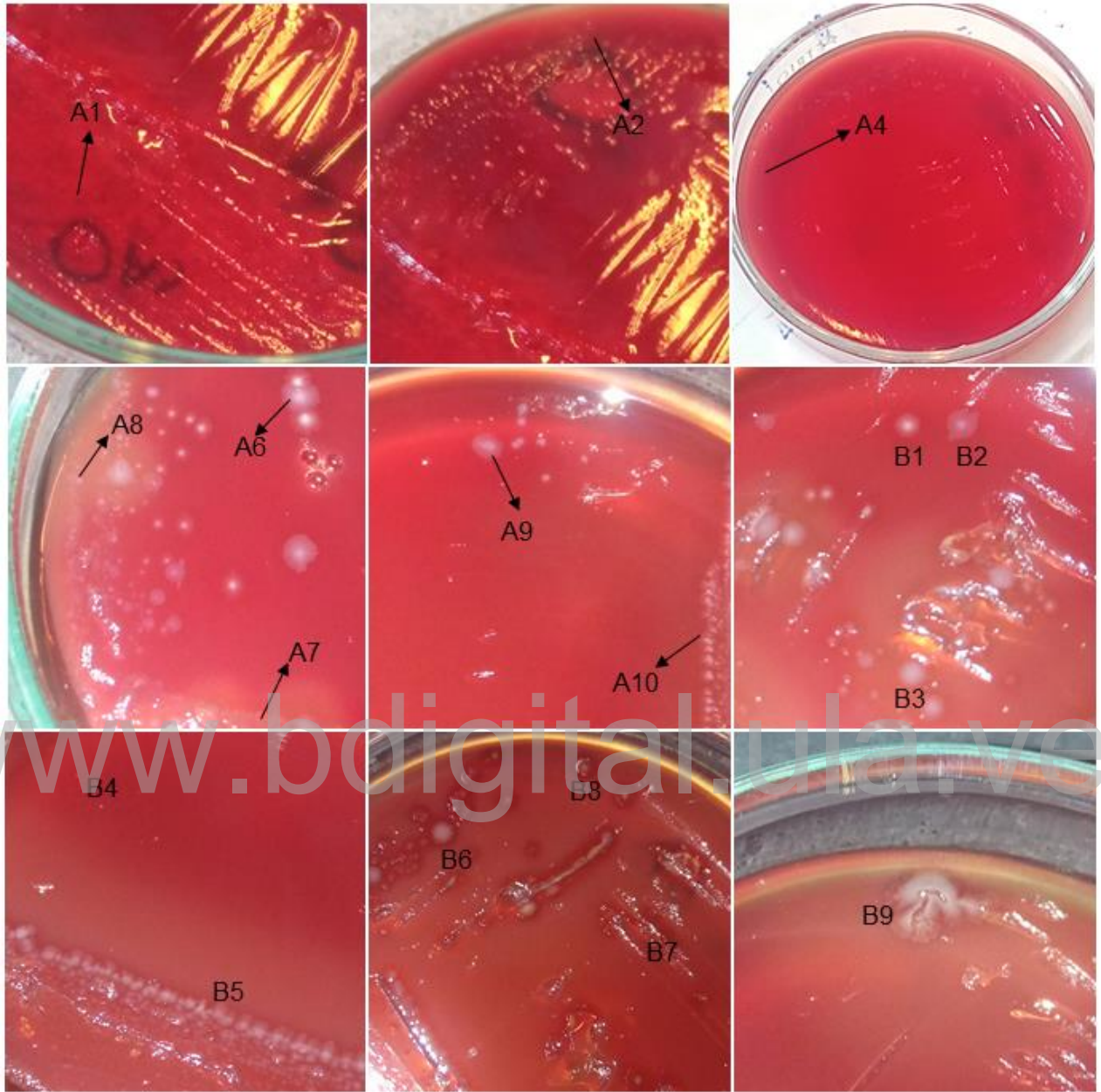


Figura 4.3. Aspecto macroscópico de colonias incubadas en anaerobiosis



Figura 4.4. Crecimiento de microorganismos en tubos de caldo de tioglicolato

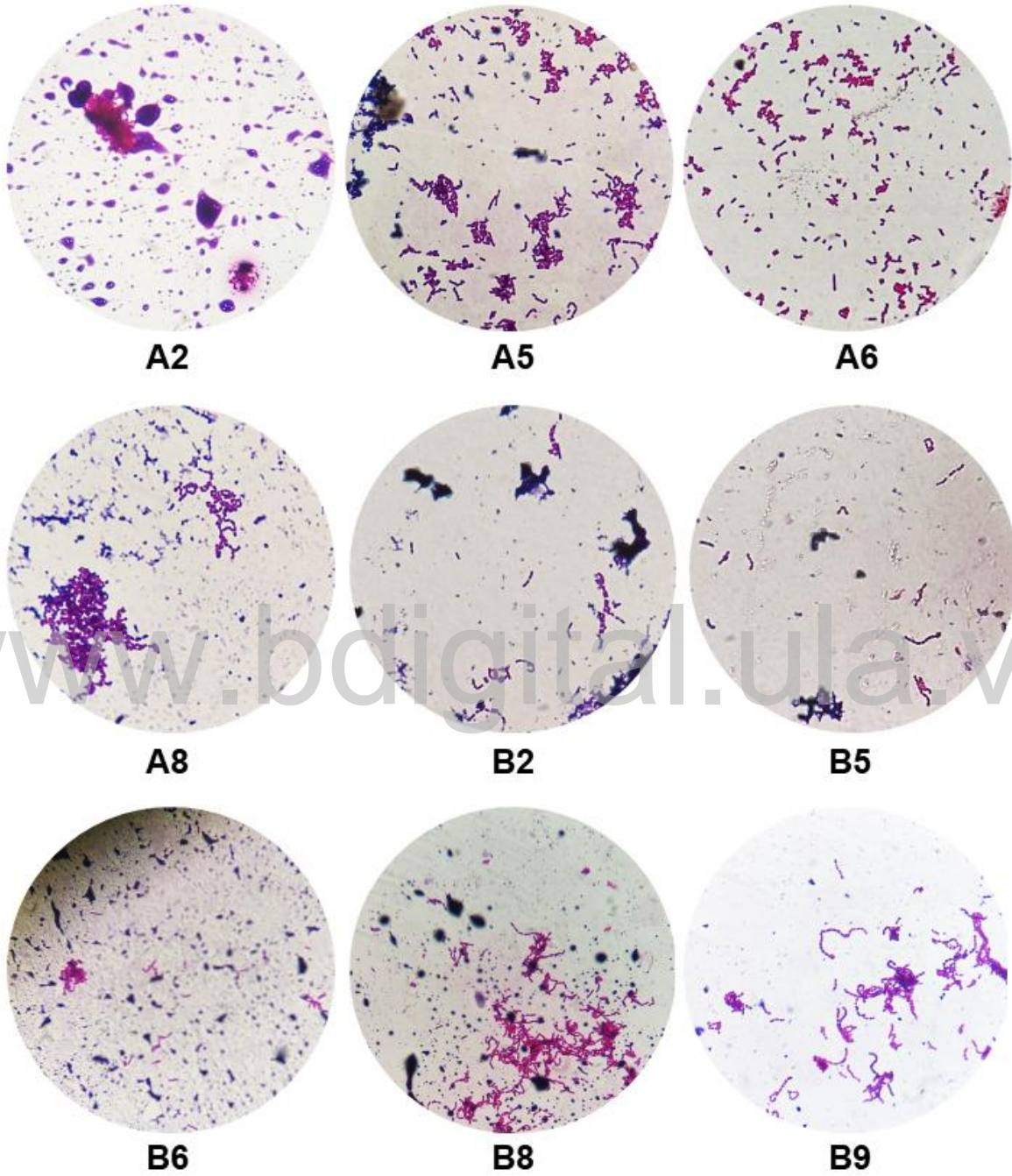


Figura 4.5. Características morfotintoriales de las colonias seleccionadas

Tabla 4.1. Características microscópicas, macroscópicas, morfotintoriales y bioquímicas de las colonias halladas

Microorganismo Aislado	Morfología	Gram	Disposición	Metabolismo	Formador Biopelícula	Catalasa	Color	Bordes	Forma	Tamaño	Movilidad	Hemólisis
A1	C	P	Cadenas cortas y dispersos	AE	No	N	Gris	Definidos	Redonda elevada	Pequeña	Inmóvil	γ
A2	C	P		AE	No	N	Transparente	Definidos	Irregular	Mediana	Inmóvil	β
	B	N	Cadenas									
A3	C	P	Pares	AF	No	N	Transparente			Muy pequeña	Inmóvil	β
	B	N	Cadenas									
A4	B	P		AF	No	N	Transparente	Redonda		Pequeña	Inmóvil	γ
	B	N										
	C	P										
A5	B	N		AE	No	N	Grisácea opaca	Definidos	Redonda		Inmóvil	γ
	B	P	Cadenas cortas dispersos									
A6	B	P	Cortos	AT	No	N	Blanca	Difusos	Redonda		Inmóvil	γ
	B	P	Largos									
A7	B	P	Cortos	AF		N	Transparente		Redonda	Pequeña	Inmóvil	γ
	B	P	Largos									
A8	C	P	Cadenas	AF	Si	N	Transparente	Definidos	Redonda		Inmóvil	β
A9	B	P	Largos			N	Oscuro	Difusos	Redonda		Inmóvil	γ
	C	P	Dispersos									
A10	C	P	Pares y dispersos				Transparente			Pequeña	Inmóvil	β

C: Cocos, B: Bacilos, P: Positivo, N: Negativo, AF: Anaeróbico Facultativo, AE: Anaeróbico Estricto, AT: Aerotolerante

Tabla 4.1. Características microscópicas, macroscópicas, morfotintoriales y bioquímicas de las colonias halladas (continuación)

<i>Microorganismo Aislado</i>	Morfología	Gram	Disposición	Metabolismo	Formador Biopelícula	Catalasa	Color	Bordes	Forma	Tamaño	Movilidad	Hemólisis
B1	B	P	Rectos Y Dispersos	AE	No	N	Blanca	Difusos	Redonda		Inmóvil	Γ
B2	B	N	Curvos	AE	No	N	Blanca	Definidos	Redonda		Inmóvil	Γ
B3	C	P		AF		N	Blanca	Difusos	Redonda Plana			B
	B	P	Rectos									
B4	B	P	Dispersos			N	Transparente		Redonda		Perfora El Agar	Γ
B5	C	P	Cadenas Cortas	AF	No	N	Transparente	Difusos	Irregular		Inmóvil	B
B6	C	P	Pares	AF	Si	N						
	B	P					Grisácea	Definidos	Redonda		Inmóvil	Γ
B7	C	P				N	Transparente				Inmóvil	Γ
B8	B	P	Cadenas Cortas	AF	Si	N	Ocre	Irregulares	Redonda	Pequeña	Inmóvil	Γ
B9	C	P	Cadenas Largas	AF	No	N	Blanca	Difusos	Irregular		Inmóvil	Γ

C: Cocos, B: Bacilos, P: Positivo, N: Negativo, AF: Anaeróbico Facultativo, AE: Anaeróbico Estricto, AT: Aerotolerante

Para las pruebas de identificación bioquímica se seleccionaron 7 aislados, a saber: A2, A8, B2, B5, B6, B8 Y B9, los resultados obtenidos de la identificación de las Galerías API se resumen en la Tabla 4.2. Ya identificados los géneros bacterianos y las posibles especies las características de los aislados tomados en cuenta para esta investigación se resumen en la Tabla 4.3.

Tabla 4.2. Identificación Bioquímica de los Aislados Bacterianos de PAP

Código	Identificación Bacteriana	%
A2	<i>Serratia</i> sp.	83%
A8	<i>Enterococcus moraviensis</i> o <i>Enterococcus faecalis</i>	85%
B2	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>	86%
B5	<i>Enterococcus innesii</i>	81%
B6	<i>Serratia</i> sp.	86%
B8	<i>Klebsiella</i> sp.	84%
B9	<i>Enterococcus moraviensis</i>	83%

Entre los hallazgos encontrados se observó una colonia blanquecina, de bordes definidos, irregular, elevada β -hemolítica, como se aprecia en la Figura 4.6, se realizó tinción de Gram y al análisis microscópico se observó bacilos Gram negativos pequeños agrupados en clúster muy densos (Figura 4.7). Tomando en cuenta estas características, fue posible notar un alto grado de similitud con una cepa de *Aggregatibacter actinomycetencomitans*.

Tabla 4.3. Características microbiológicas de las muestras seleccionadas

Bacteria Aislada	Morfología	Tinción Gram	Disposición	Metabolismo	Formador Biopelícula	Catalasa	Color	Bordes	Forma	Tamaño	Movilidad	Hemólisis	Posibles especies
A2	B	N	Cadenas	AE	No	N	Transparente	Definidos	Irregular	Mediana	Inmóvil	β	<i>Serratia</i> sp.
A3	B	N	Cadenas	AF	No	N	Transparente	No identificables	No identificable	Muy pequeña	Inmóvil	β	<i>P. intermedia</i> , <i>P. nigrescens</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>T. forsythia</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>Capnocytophaga</i> sp
A5	B	P	Cadenas cortas dispersos	AE	No	N	Grisácea opaca	Definidos	Redonda	No identificable	Inmóvil	γ	<i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>A. israelii</i> , <i>A. odontolyticus</i> , <i>A. viscosus</i>
A6	B	N	Empalizada	AT	No	N	Blanca	Difusos	Redonda	No identificable	Inmóvil	γ	<i>E. corrodens</i> , <i>Capnocytophaga</i> spp., <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>Leptotrichia</i> spp.
A8	C	P	Cadenas	AF	Si	N	Transparente	Definidos	Redonda	No identificable	Inmóvil	β	<i>Enterococcus moraviensis</i> o <i>Enterococcus faecalis</i>
B2	B	P	Cadenas cortas	AE	No	N	Blanca	Definidos	Redonda	No identificable	Inmóvil	γ	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
B5	C	P	Cadenas cortas	AF	No	N	Transparente	Difusos	Irregular	No identificable	Inmóvil	β	<i>Enterococcus innesii</i>
B6	B	N	Empalizada	AF	Si	N	Grisácea	Definidos	Redonda	No identificable	Inmóvil	γ	<i>Serratia</i> sp.
B8	B	N	Cadenas cortas	AF	Si	N	Ocre	Irregulares	Redonda	Pequeña	Inmóvil	γ	<i>Klebsiella</i> sp.
B9	C	P	Cadenas largas	AF	No	N	Blanca	Difusos	Irregular	No identificable	Inmóvil	γ	<i>Enterococcus moraviensis</i>

C: Cocos, B: Bacilos, P: Positivo, N: Negativo, AF: Anaeróbico Facultativo, AE: Anaeróbico Estricto, AT: Aerotolerante

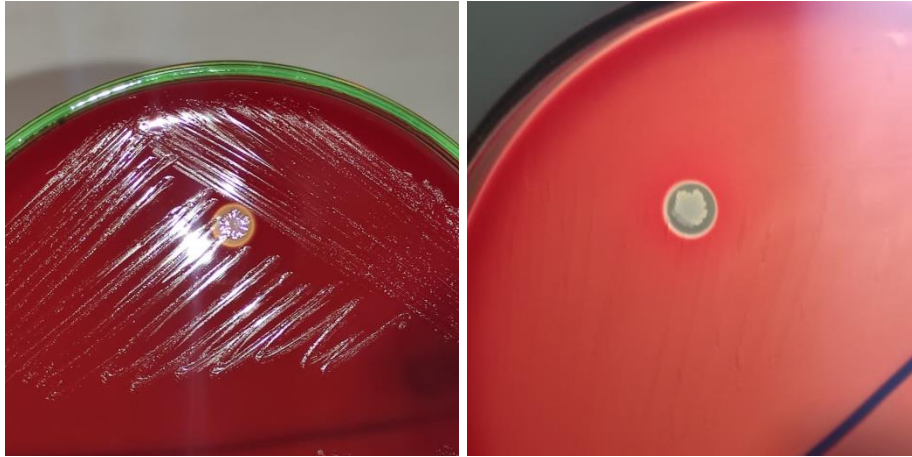


Figura 4.6. Aspecto macroscópico de la colonia β -hemolítica hallada

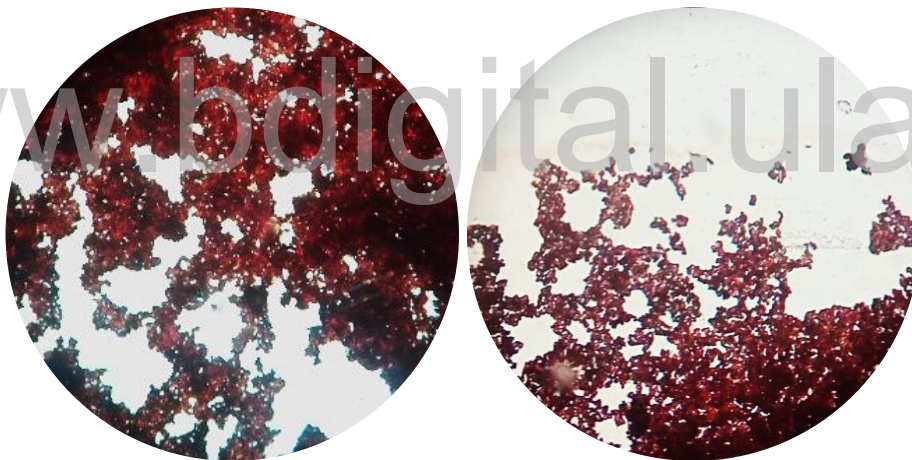


Figura 4.7. Aspecto microscópico de colonia β - hemolítica hallada

4.3 Fase II: Pruebas de actividad antibacteriana

Evaluación preliminar del efecto inhibitor de los probióticos y sus metabolitos sobre los aislados de PAP

Para determinar el efecto inhibitorio se realizó según lo establecido en la metodología, en esta fase de la investigación se tomaron en cuenta los metabolitos en los sobrenadantes de las cepas probióticas contra las 10 bacterias PAP identificadas. Los resultados se observan en la Tabla 4.4 en donde el valor “Si” representa la presencia de efecto inhibitor, para una mejor visualización se sombrearon las celdas donde hubo actividad antimicrobiana. De estos resultados se resume que las bacterias **A2, A3, A5, A6, B2, B5, B6 y B9** fueron inhibidas por la mayoría de los metabolitos probióticos, mientras que las bacterias **A8 y B8**, fueron las bacterias más resistentes a la presencia de estos compuestos biológicos.

La tabla 4.5 muestra la proporción de acción inhibitoria por cada uno de los metabolitos. Analizando estos resultados, donde las pruebas dieron positivas, es de notar que la cepa **Lr** mostró mayor actividad antimicrobiana (90%), en contraste, la cepa **8014** demostró menos actividad antimicrobiana (60%). Las mezclas **X3** y **X5** mostraron una actividad antimicrobiana alta, a pesar de que la concentración de cada metabolito fue menor, por lo que se intuye, que la mezcla por sí sola produce efectos individuales independientes y no sinérgicos, requiriendo una mayor concentración de este material biológico para asegurar el efecto inhibitorio.

A los datos obtenidos, se les aplicó una prueba de confiabilidad alfa de Cronbach cuyo valor arrojó un $\alpha=0,83$, lo que representa una confiabilidad respetable para la prueba de determinación del efecto inhibitor, es decir, los datos obtenidos son consistentes internamente. Adicionalmente, se aplicó una prueba de correlación de Pearson entre grupos de metabolitos para comparar su desempeño, lo que arrojó como resultado que las parejas de metabolitos **Lr-X3, 71-75, 71-174, 71-8014, 71-X5, 75-174, 75-8014, 75-X3, 75-X5, 8014-X3, 8014-X5, X3-X5** fueron las que mostraron un comportamiento similar, estos resultados se pueden detallar en la Tabla 4.6.

Tabla 4.4. Efecto inhibitorio de las cepas probióticas y sus metabolitos

Microorganismo Aislado	N° placa	Presencia de efecto inhibitorio							Control Positivo	Control Negativo
		Lr	71	75	174	8014	X3	X5		
A2	1	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
	2	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
A3	1	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
	2	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
A5	1	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
	2	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
A6	1	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
	2	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
A8	1	No	Si	No	Si	No	No	No	Si	No
	2	Si	No	No	No	No	No	No	Si	No
B2	1	No	Si	Si	Si	No	No	Si	Si	No
	2	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
B5	1	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
	2	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	Si	No
B6	1	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	No
	2	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	No
B8	1	Si	No	No	No	No	Si	Si	Si	No
	2	Si	No	No	No	No	Si	No	Si	No
B9	1	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	No
	2	Si	Si	Si	Si	No	Si	Si	Si	No

Tabla 4.5. Frecuencia del efecto inhibitorio de las cepas probióticas sobre los aislados PAP

Probióticos	Frecuencia	%
Lr	18	90
71	17	85
75	16	80
174	14	70
8014	12	60
X3	17	85
X5	17	85

Tabla 4.6. Correlación entre desempeño de los metabolitos

		Lr	71	75	174	8014	X3	X5
Lr	R	1	-,140	,250	-,218	,408	,793**	,327
	P		,556	,288	,355	,074	,000	,160
P71	R		1	,840**	,642**	,514*	,216	,608**
	P			,000	,002	,020	,361	,004
P75	R			1	,491*	,612**	,490*	,840**
	P				,028	,004	,028	,000
P174	R				1	,134	,031	,336
	P					,574	,898	,147
P8014	R					1	,514*	,514*
	P						,020	,020
X3	R						1	,608**
	P							,004
X5	R							1
	P							

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

* . La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).

Evaluación cuantitativa del efecto inhibitor de los probióticos y sus metabolitos sobre los aislados de PAP.

Una vez realizado el procedimiento para el análisis del efecto inhibitorio de los probióticos y sus metabolitos sobre las bacterias identificadas, se realizó la prueba de susceptibilidad a través de la medición de halos inhibitorios (Figura 4.8), esta prueba se realizó según el protocolo establecido en la metodología (Fase II) y se empleó para ello un vernier y un negatoscopio que ayudó a facilitar la visualización de los mismos a través de la luz. Para la bacteria β -hemolítica hallada se realizó la prueba, cuyo resultado fue nulo en todos los metabolitos a excepción de **71**, que arrojó un halo inhibitorio de 15mm (Figura 4.9). Los resultados obtenidos de las mediciones de los halos inhibitorios para las cepas patógenas elegidas se resumen en la Tabla 4.7.

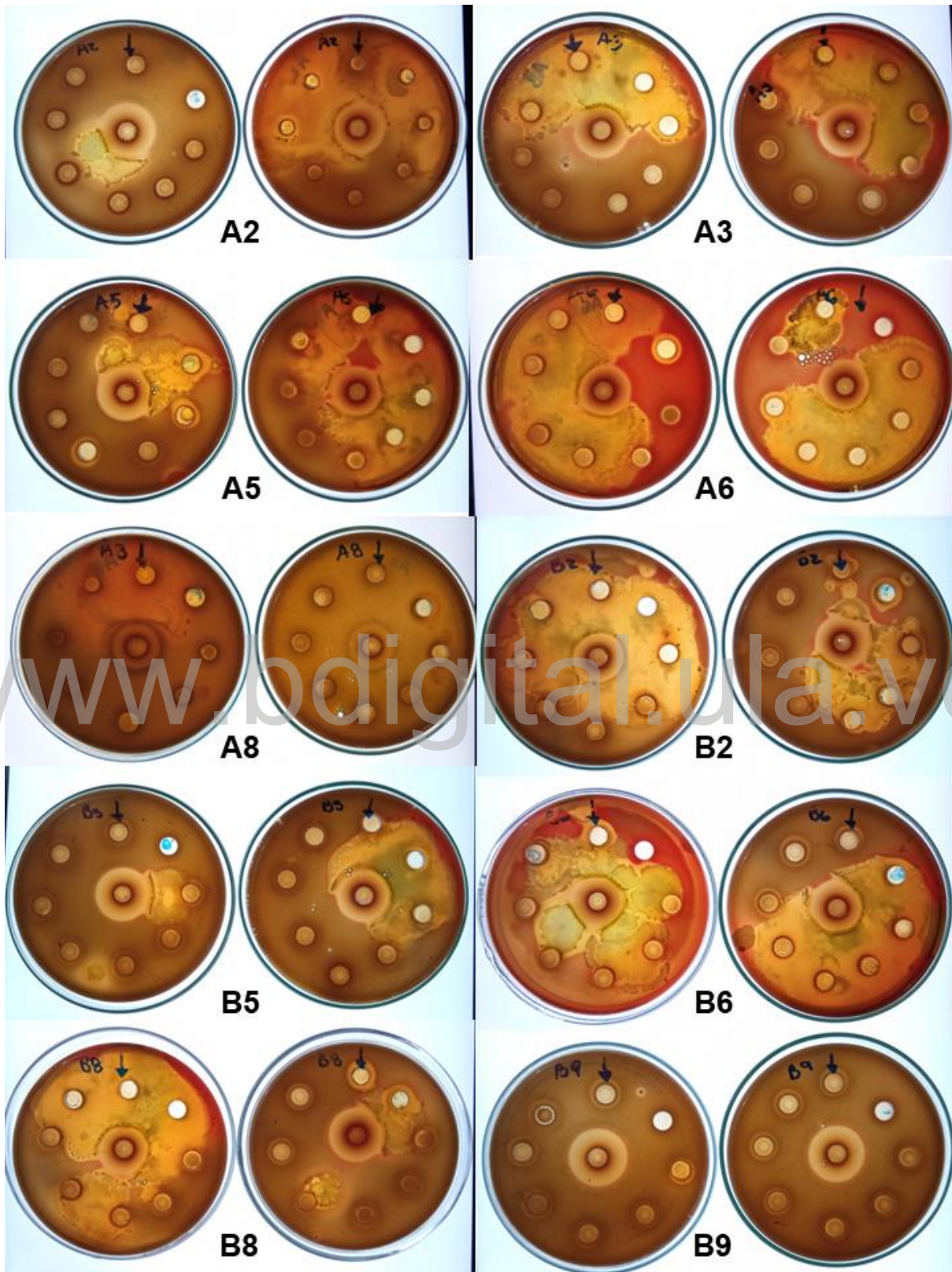


Figura 4.8. Halos inhibitorios sobre las bacterias identificadas



Figura 4.9. Halos inhibitorios sobre la bacteria β -hemolítica

Tabla 4.7. Diámetro de los halos inhibitorios

Microorganismo Aislado	N° placa	Lr	Diámetro de halos inhibitorios (mm)							C(+)	C(-)
			71	75	174	8014	X3	X5			
A2	1	12	6	6	6	6	6	6	20	6	
	2	12	12	12	6	12	10	12	18	6	
A3	1	12	14	16	14	12	16	14	18	6	
	2	12	12	14	6	14	12	12	18	6	
A5	1	14	14	6	6	6	6	12	18	6	
	2	12	14	12	16	6	6	14	22	6	
A6	1	14	10	10	12	12	14	12	20	6	
	2	12	12	12	12	12	X	X	19	6	
A8	1	6	6	6	6	6	6	6	24	6	
	2	6	6	6	6	6	6	6	21	6	
B2	1	10	10	12	12	12	12	12	18	6	
	2	6	6	12	6	6	6	11	18	6	
B5	1	12	12	16	12	10	10	10	18	6	
	2	13	14	14	6	6	12	12	20	6	
B6	1	12	12	12	6	6	6	12	18	6	
	2	12	13	12	X	X	X	X	18	6	
B8	1	10	6	6	6	6	6	6	18	6	
	2	11	13	11	10	6	6	12	20	6	
B9	1	14	13	14	13	13	14	14	24	6	
	2	14	13	14	13	10	10	13	25	6	

X: No pudo ser medido.

Tomando en cuenta los datos numéricos obtenidos, se procedió a realizar un gráfico de cajas y bigotes (Figura 4.10) para ilustrar de una manera general los valores arrojados por la medición de los halos. En este gráfico se puede observar que los halos medidos estuvieron en un rango de (10-16) mm, cuyos valores promedios se acercaron a 12mm; analizando más a fondo, se puede observar que la mezcla **X5** mostró menos variabilidad en las medidas en comparación con la mezcla **X3**, la cual fue más variable. Las cinco cepas probióticas tuvieron un comportamiento similar en cuanto al tamaño de los halos inhibitorios y variabilidad, por lo que, no se puede determinar cuál cepa es más potente sobre otra, en comparación con las mezclas que evidenciaron ausencia de un comportamiento sinérgico, pues las medidas de los halos coinciden con los halos de los metabolitos puros.

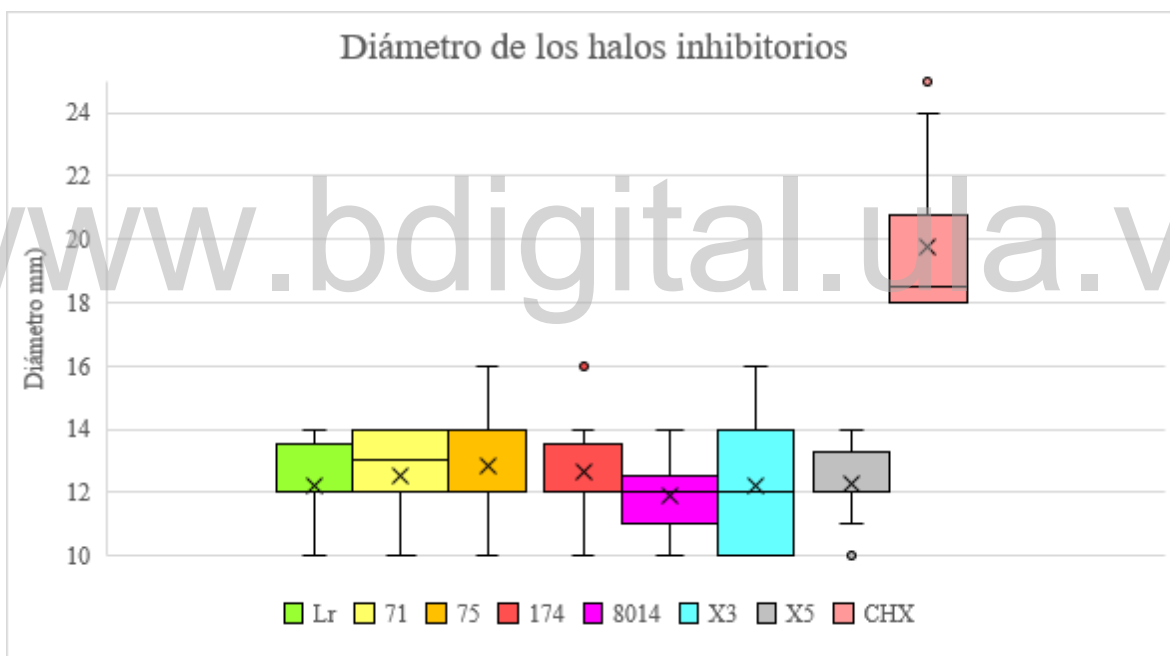


Figura 4.10. Distribución de las medidas de los halos inhibitorios por cepa probiótica y su metabolitos

El control positivo exhibió un comportamiento esperado, pues, los halos medidos son mayores y concentrados en 20 mm. En la Tabla 4.8 se resumen los valores de tendencia central por cepas probióticas. Como se puede apreciar, los valores promedios de los diámetros de los halos son muy similares entre sí, al igual que los valores de mediana y moda. Por lo que se infiere que los metabolitos probióticos tienen un comportamiento similar entre

ellos, o que la molécula que produce el efecto, es común para el Género *Lactobacillus* y no exclusivo de la especie.

Tabla 4.8. Valores de tendencia central para las cepas probióticas

	Lr (mm)	71 (mm)	75 (mm)	174 (mm)	8014 (mm)	X3 (mm)	X5 (mm)	C(+) (mm)
Media	12,24	12,53	12,87	12,67	11,89	12,22	12,29	19,75
DE	1,25	1,30	1,73	1,66	1,27	2,11	1,14	2,31
Mediana	12	13	12	12	12	12	12	18
Moda	12	12	12	12	12	10	12	18

Los datos obtenidos de la medición de halos fueron comparados entre grupos de metabolitos para determinar con una prueba de χ^2 el comportamiento de los probióticos con una significancia estadística $p < 0,05$. Se tomó como premisa que los metabolitos se comportan diferente entre sí, por lo que los resultados ante esta prueba estadística se resumen en la Tabla 4.9, en donde se puede evidenciar que las parejas de metabolitos **71-75**, **71-174**, **75-174**, **75-X3**, **174-8014**, **174-X3**, **8014-X3** presentaron un comportamiento similar estadísticamente significativo

Tabla 4.9. Valor p de la comparación entre metabolitos

	Lr	71	75	174	8014	X3	X5	CHX
Lr	-	0,053	0,059	0,064	0,652	0,097	0,536	0,628
71		-	0,020*	0,027*	0,210	0,223	0,112	0,680
75			-	0,013*	0,294	0,029*	0,274	0,723
174				-	0,034*	0,034*	0,290	0,115
8014					-	0,004*	0,106	0,383
X3						-	0,075	0,831
X5							-	0,119

*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral)

Para efectos de análisis microbiológicos la escala Duraffourd es más representativa para la prueba de susceptibilidad por medición del diámetro del halo, en la Tabla 4.10 se encuentra el equivalente de los halos utilizando esta escala, observándose que la muestra **A8** mostró ser

resistente ante todos los metabolitos probióticos, en contraste las muestras **A3**, **A6**, **B2**, **B5** y **B9** mostraron ser sensibles ante los 5 metabolitos y sus mezclas. Los resultados obtenidos de esta escala se resumen en la Tabla 4.11, en la que se puede observar la frecuencia de los datos registrados, como hallazgos destaca que la cepa **174** mostró ser el metabolito con más pruebas nulas, en comparación con **Lr** quien fue el metabolito con más pruebas sensibles, sin embargo, **A3** y **B5** resultaron muy sensibles ante la cepa **75**, mientras que **A5** fue muy sensible ante **174**. En relación a las mezclas se observó que **X3** tuvo más pruebas nulas y **X5** más resultados sensibles, por otro lado, **A3** resultó ser muy sensible ante **X3**.

Tabla 4.10. Equivalencia de halos representados en escala de Duraffourd

Microorganismo Aislado	N° placa	Escala Duraffourd para los halos inhibitorios							
		Lr	71	75	174	8014	X3	X5	C (+)
A2	1	+	-	-	-	-	-	-	+++
	2	+	+	+	-	+	+	+	++
A3	1	+	+	++	+	+	++	+	++
	2	+	+	+	-	+	+	+	++
A5	1	+	+	-	-	-	-	+	++
	2	+	+	+	++	-	-	+	+++
A6	1	+	+	+	+	+	+	+	+++
	2	+	+	+	+	+	X	X	++
A8	1	-	-	-	-	-	-	-	++
	2	-	-	-	-	-	-	-	++
B2	1	+	+	+	+	+	+	+	++
	2	-	-	+	-	-	-	+	++
B5	1	+	+	++	+	+	+	+	++
	2	+	+	+	-	+	-	-	+++
B6	1	+	+	+	-	-	-	+	++
	2	+	+	+	X	X	X	X	++
B8	1	+	-	-	-	-	-	-	++
	2	+	+	+	+	-	-	+	+++
B9	1	+	+	+	+	+	+	+	+++
	2	+	+	+	+	+	+	+	+++

X: No pudo ser medido

Tabla 4.11. Frecuencia de resultados según escala de Duraffourd

	- % (n)	+ % (n)	++ % (n)	+++ % (n)	Total
Lr	15 (3)	85 (17)	0	0	100 (20)
71	25 (5)	75 (15)	0	0	100 (20)
75	25 (5)	65 (13)	10 (2)	0	100 (20)
174	52,6 (10)	42,1 (8)	5,3 (1)	0	100 (19)
8014	47,4 (9)	52,6 (10)	0	0	100 (19)
X3	55,6 (10)	38,9 (7)	5,6 (1)	0	100 (18)
X5	27,8 (5)	72,2 (13)	0	0	100 (18)
CHX	0	0	65 (13)	35 (7)	100 (20)

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

En este apartado se analizan los resultados obtenidos de las diferentes fases del desarrollo de la investigación, así como el contraste de los mismos con la evidencia encontrada más resaltante

Los probióticos se han usado frecuentemente en la odontología para restablecer el estado eubiótico de la cavidad bucal con resultados satisfactorios, sin embargo, aún se siguen realizando investigaciones en este tópico para establecer una evidencia científica consistente. En este sentido esta investigación demostró que los metabolitos de ciertas cepas probióticas y la mezclas entre ellas tienen un efecto antimicrobiano sobre las bacterias patógenas asociadas a PAP.

El ambiente generado por una lesión apical es favorable para el crecimiento de bacterias periodontopatógenas donde las condiciones mínimas de oxígeno, humedad, pH y sustratos (fuentes nutricionales) para el desarrollo son aprovechadas al máximo, por lo que un diagnóstico temprano y una desinfección químico-mecánica del sistema de conducto pronostica una remisión de la lesión, sin embargo, se ha encontrado en lesiones de PAP tempranas perfiles microbianos consistentes entre 10 a 30 especies por canal radicular⁶

Las bacterias asociadas a PAP halladas en esta investigación, corresponden a cepas salvajes aisladas de ápices dentales con patología, se identificaron 5 cepas de bacilos Gram negativos anaeróbicos estrictos y facultativos, 3 cepas de cocos Gram positivos anaeróbicos facultativos y 2 cepas de bacilos Gram positivos anaeróbicos facultativos, bacterias pertenecientes a la microbiota de los procesos periapicales. Estas bacterias coinciden en morfología y metabolismo con las descritas en la literatura, entre los especímenes aislados con mayor prevalencia se encuentran cocos Gram positivos del género *Streptococcus* (*S. constellatus*) siendo el género más predominante en las lesiones^{6,68-72}, bacilos Gram negativos del género *Fusobacterium* (*F. nucleatum*), *Parvimonas* (*P. micra*), *Porphyromonas* (*P. endodontalis*), *Prevotella* (*P. oris*), *Dialister* (*D. pneumosintes*), *Fretibacterium* (*F. fastidiosum*) y *Selenomonas* spp.^{6,68-70,72}, estos bacilos son los más diversos y caracterizan la PAP con menos de 50 especies anaeróbicas⁷³, especies de bacilos

Gram positivos de *Lactobacillus* spp., *Actinomyces* spp., *Pseudoramibacter* (*P. alactolyticus*), *Olsenella* (*O. uli*), *Mogibacterium* (*M. timidum*)^{6,69,72}, y especies de espiroquetas como *Treponema denticola*⁶⁹.

En la identificación bioquímica obtenida en este trabajo, se encontraron cepas bacterianas de *Serratia* sp., *Klebsiella* sp., *Enterococcus moraviensis*, *Enterococcus innesii* y *Lactiplantibacillus pentosus*. La presencia de estas especies en la cavidad bucal es poco frecuente, ya que no son parte de la microbiota bucal normal. Su aislamiento puede indicar contaminación o infección oportunista en pacientes inmunocomprometidos⁷⁴. La literatura reporta que los géneros *Serratia* y *Klebsiella* han sido identificados en periodontitis apical primaria, específicamente especies como *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella ozaenae*, aunque con muy baja prevalencia^{74,75}. En relación a *E. moraviensis* y *E. innesii*, no se han encontrado estudios que reporten específicamente la presencia de estos microorganismos en la microbiota bucal humana. Estas especies bacterianas han sido aisladas a partir de muestras de agua⁷⁶, de la cavidad bucal de caballos⁷⁷ y de gusanos de seda⁷⁸, pero no se ha establecido claramente su prevalencia o papel dentro de la microbiota bucal humana o animal. Por otro lado, la presencia de *L. pentosus* está asociada principalmente con su uso como alimento probiótico, comúnmente hallado en vegetales y alimentos fermentados como el vino, algunos quesos y derivados de aceitunas. Sin embargo, su presencia en cavidad bucal no está descrita⁷⁹.

A pesar que la PAP está caracterizada por la colonización de múltiples especies de bacilos Gram negativos, no es frecuente hallar cepas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en estas lesiones, como es sabido, se encuentra más prevalente en pacientes con periodontitis estadio IV por la gravedad de la patología, sin embargo, Siqueira⁶⁹ reporta que se puede hallar en enfermedades postratamiento endodóntico que derivan en fracasos, por lo que la cepa beta hemolítica hallada probablemente sea de un género diferente. Es importante destacar que algunos aislados no se pudo lograr la identificación bioquímica por dificultades al momento de la incubación, es por ello que algunos aislados (A3, A5 y A6) solo presentan las características macroscópicas, microscópicas y una orientación a los géneros probables a ser identificados.

Las interacciones bacterianas son fundamentales para mantener una microbiota balanceada y establecer la eubiosis de la cavidad bucal, estas interacciones incluyen competencias por nutrientes, modulación de la respuesta inmune, producción de sustancias antibacterianas, entre otras²¹. La bioterapia con probióticos se vale de este último mecanismo para lograr el efecto benéfico, esto lo logran produciendo bacteriocinas, ácidos orgánicos, antiadhesinas, peróxido de hidrógeno y otras sustancias que inhiben el crecimiento de las bacterias patógenas^{24,42,46,49}. Está descrito en la evidencia que la actividad inhibitoria de ciertas especies bacterianas probióticas es dependiente de la dosis y del tiempo de exposición, evidenciando que a mayor dosis y por mayor tiempo de exposición resulta en una mayor inhibición del crecimiento bacteriano, sin embargo, en esta investigación se empleó una concentración estandarizada de probióticos y un tiempo de contacto de 24 horas, por lo que estos parámetros se consideraron constantes para el experimento.

Es bien sabido que la PAP presenta una etiología bacteriana con mayor proporción de bacilos Gram negativos, anaeróbicos estrictos y facultativos según su estadio^{4,5,7,64,70,80}, entre los hallazgos de este estudio, fue posible determinar que la mayoría de las bacterias aisladas de PAP, resultaron inhibidas por las cepas probióticas y sus metabolitos, específicamente 4 aislados fueron sensibles ante los 5 probióticos de prueba, 3 aislados a 4 de los probióticos; sin embargo, aquellos anaeróbicos facultativos formadores de biopelícula como especies del género *Enterococcus* (A8) y *Kebsiella* (B8) presentaron poca o nula sensibilidad ante las cepas probióticas y sus metabolitos. Es posible que la ausencia de inhibición esté relacionada con la tolerancia a ambientes hostiles, producción de un exopolisacárido muy denso por parte de estos patógenos, así como, a la velocidad de replicación de las mismas, lo cual dificulta la entrada y efecto inhibitorio de los subproductos sobre estas especies.

Se ha establecido que los compuestos producidos por las bacterias probióticas en este trabajo tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos aislados de PAP planctónicos en un ambiente *in vitro*, por lo que su difusión en los medios es variable cuando se administran en forma de solución o gel. En la literatura se ha evidenciado que los metabolitos, ya sean puros o combinados, son efectivos contra *E. faecalis* y *C. albicans* tanto en su forma planctónica como en biopelícula. No obstante, es fundamental considerar la

concentración de estas sustancias en las mezclas para garantizar su eficacia inhibitoria, así como el vehículo utilizado para su administración. En este contexto, el Poloxámero 407 se perfila como un vehículo prometedor para la administración de probióticos dentro del sistema de conductos radiculares^{32,48,81,82}.

El metabolismo bacteriano del género *Lactobacillus* produce diversos subproductos con propiedades antimicrobianas que pueden ser efectivos contra patógenos endodónticos. De estas especies *Lactobacillus rhamnosus* produce ácidos orgánicos, como el ácido láctico, que reducen el pH del medio, promoviendo la desnaturalización de proteínas y alterando la permeabilidad de la membrana celular del patógeno. Adicionalmente, produce bacteriocinas, que forman poros en la membrana celular del microorganismo objetivo, y peróxido de hidrógeno, que crea un ambiente oxidativo letal para numerosos patógenos anaerobios. Cada uno de estos compuestos posee mecanismos de acción específicos que contribuyen a su capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos como *E. faecalis* y *C. albicans*⁸². En particular, el rhamnolípido, a una concentración superior a 0,097 mg/ml, muestra un efecto inhibitorio significativo contra *Streptococcus anginosus* y, a una concentración de 0,048 mg/ml, frente a *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus intermedius*. Además, este compuesto exhibe una notable actividad antiadherente⁴⁹. Este comportamiento fue evidenciado en las cepas utilizadas en la presente investigación (Lr y 71), donde se observó una mayor actividad antimicrobiana. A pesar de que ambas cepas pertenecen a la misma especie, el desempeño, estadísticamente significativo difirió, probablemente debido a la naturaleza de cada una; Lr es una cepa de referencia de la colección ATCC, mientras que 71 es una cepa salvaje.

Lactiplantibacillus plantarum, una especie ampliamente estudiada por su potencial en el tratamiento de infecciones, produce una variedad de subproductos metabólicos con actividad antimicrobiana. El ácido láctico, la plantaricina F y las proteínas antiadhesinas inhiben el crecimiento de biopelículas de bacterias patógenas como *S. anginosus* y *E. faecalis*^{48,49}. El ácido lipoteicoico (Lp.LTA), otro producto del metabolismo de *L. plantarum*, reduce significativamente la formación de biopelículas bacterianas multiespecíficas en placas de cultivo y cortes de dentina (incluyendo *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus salivarius*,

Streptococcus mutans y *E. faecalis*) y potencia la eficacia de los antibióticos intracanal en su eliminación^{34,83}.

El Lp.LTA también interfiere con la descomposición de sacarosa por *S. mutans*, necesaria para la producción del exopolisacárido, componente principal de la biopelícula, y atenúa la unión de dextrano a esta bacteria⁴². Además, inhibe la formación de biopelículas de *S. aureus*, incluso en cepas resistentes a meticilina, sin afectar su crecimiento⁴². En contraste, las cepas utilizadas en esta investigación (174 y 8014) difieren de lo reportado en la evidencia, estas mostraron un desempeño desfavorable en comparación a las otras especies (Lr, 71, 75). Este resultado podría atribuirse a la concentración utilizada, la cual no fue suficiente para inhibir las bacterias en estado planctónico. No obstante, la actividad antimicrobiana de las cepas empleadas fue similar entre sí.

Entre otras bacteriocinas es relevante destacar la reuterina aislada de *Limosilactobacillus reuteri*, efectiva contra las biopelículas *in vivo* y *ex vivo* de *E. faecalis*, *C. albicans*, *F. nucleatum* y *P. gingivalis*, siendo la concentración de 100 mg/ml la más efectiva con una eficacia similar al hipoclorito de sodio⁴⁴. Además, la presentación de estos probióticos en forma de suplemento sistémico en combinación de varias especies, tales como *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* y *Streptococcus thermophilus*, ha demostrado una disminución del infiltrado inflamatorio mediado por IL-1 β , IL-6 y RANKL, así como un aumento de IL-10 y una reducción en el número de osteoclastos maduros³¹. Estos efectos sugieren un potencial terapéutico significativo de los probióticos en el manejo de infecciones endodónticas y en la modulación de la respuesta inflamatoria.

El uso de metabolitos de diversas cepas probióticas ofrece una ventaja significativa sobre el empleo de cepas individuales, debido a que permite aprovechar las bacteriocinas producidas por cada especie para inhibir el crecimiento y la formación de biopelículas patogénicas^{48,82}. En el estudio realizado por Shymaa Shaaban, se demostró que la mezcla de metabolitos de tres cepas probióticas (*L. plantarum*, *L. rhamnosus* y *L. acidophilus*) mostró zonas de inhibición superiores a las obtenidas con las cepas individuales. De manera similar, la combinación utilizada por Shatha Safadi, compuesta por *L. plantarum* y *Lacticaseibacillus casei*, fue suficiente para prevenir totalmente el crecimiento de biopelículas⁸⁴. Además, tanto

la mezcla de *L. plantarum*, *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* de Shymaa Shaaban⁴⁸, como la mezcla de *L. plantarum* de cultivo americano, *L. rhamnosus* y *Bifidobacterium bifidum* de Garapati⁸², mostraron una inhibición bacteriana significativa.

En comparación, los resultados de inhibición obtenidos en esta investigación son congruentes con los reportados en la literatura. Las mezclas X3 y X5 demostraron actividad antibacteriana contra las bacterias estudiadas; sin embargo, X3 mostró un mejor desempeño que X5, obteniendo mayores zonas de inhibición, lo cual puede atribuirse a la mayor concentración de metabolitos utilizada. No obstante, en el caso de las bacterias formadoras de biopelículas, no se logró una inhibición efectiva debido a la baja concentración de metabolitos empleada en la experimentación. Estos hallazgos subrayan la importancia de la concentración adecuada de los compuestos activos para maximizar la eficacia antimicrobiana de los metabolitos probióticos.

Para la eliminación de bacterias en los tratamientos de conducto, el hipoclorito de sodio (NaOCl) en diversas concentraciones es el irrigante de elección debido a sus propiedades oxidativas. En investigaciones *in vitro*, se utiliza como control positivo por su alta toxicidad para las bacterias planctónicas; sin embargo, no es efectivo contra las células de la biopelícula a bajas concentraciones, pudiendo inducir la formación de biopelículas dependientes de eDNA. Para una desinfección química óptima, esta sustancia debe ser utilizada en concentraciones superiores al 3 %⁸⁴. En el presente estudio, el control positivo empleado fue la clorhexidina al 2 % de concentración, utilizada como irrigante durante el protocolo de desinfección química del sistema de conductos. Las zonas de inhibición obtenidas fueron significativamente más extensas que las observadas con los metabolitos probióticos y sus mezclas, esto puede atribuirse a las propiedades fisicoquímicas de la clorhexidina en el agar. No obstante, no es posible establecer una comparación directa con la literatura existente, ya que la mayoría de los estudios utilizan como control positivo el hipoclorito de sodio o el hidróxido de calcio⁴⁸.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

Los probióticos presentan un campo de estudio emergente y prometedor dentro de la endodoncia, ofreciendo una alternativa potencialmente eficaz, natural y biocompatible, no sólo para combatir infecciones endodónticas resistentes eliminando las bacterias patógenas, sino también en la modulación de la microbiota y la cicatrización de heridas. Las especies probióticas *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Lacticaseibacillus paracasei* usados en esta investigación demostraron un gran potencial como una alternativa terapéutica efectiva para la eliminación de bacterias causantes de PAP.

Los resultados evidenciaron que los metabolitos de las cepas probióticas empleadas ejercen un efecto antimicrobiano significativo sobre la microbiota planctónica asociada a PAP, pero no lograron una inhibición completa de las bacterias formadoras de biopelícula a la concentración elegida. Este efecto se debe, en gran medida, a las bacteriocinas producidas por estos probióticos, las cuales exhiben una acción inhibitoria que es dependiente de la dosis y del tiempo de exposición.

Es importante considerar que la experimentación se realizó en condiciones de laboratorio, lo que limita la extrapolación directa de los resultados a escenarios clínicos, por lo que se necesitan más investigaciones para determinar la dosis óptima de probióticos y la forma de administración más efectiva para el tratamiento de la PAP, aspectos fundamentales para la implementación clínica de estas terapias probióticas. Las investigaciones futuras deben centrarse en estudios en modelos animales y ensayos clínicos en humanos para validar la eficacia y seguridad de los probióticos en el tratamiento de PAP.

La comparación entre metabolito probióticos y los irrigantes tradicionales, como el hipoclorito de sodio y la clorhexidina, demuestra que estos siguen siendo efectivos, sin embargo, los probióticos ofrecen una alternativa más biocompatible y potencialmente menos tóxica para los pacientes y sus tejidos. La clorhexidina, utilizada como control positivo en este estudio, mostró zonas de inhibición más extensas que los metabolitos probióticos, atribuible a su mecanismo de acción y propiedades fisicoquímicas en el agar, no obstante, la

búsqueda de tratamientos menos nocivos y más naturales sigue siendo una prioridad en la odontología moderna.

Los resultados de esta investigación sugieren que los probióticos y sus metabolitos podrían ser utilizados como bioterapia durante el proceso de desinfección de conductos, proporcionando una alternativa a los métodos tradicionales de tratamiento que a menudo conllevan mayores efectos secundarios y un aumento de la prevalencia de infecciones persistentes que complican el proceso de curación. La integración de probióticos en los tratamientos endodónticos podría representar un avance significativo en la mejora de los resultados terapéuticos ofreciendo tratamientos más seguros, eficaces y respetuosos con el equilibrio microbiológico del paciente lo que se traduce en un estado de salud bucal a largo plazo.

RECOMENDACIONES

Como recomendaciones finales se sugiere:

- Investigar a profundidad las cepas probióticas usadas para evaluar su efectividad antimicrobiana y su potencial terapéutico en la eliminación de bacterias patógenas, especialmente aquellas que forman biopelículas y muestran resistencia a los tratamientos convencionales.
- Determinar las concentraciones más efectivas para la inhibición de bacterias patógenas sin comprometer la salud del paciente.
- Explorar diferentes vehículos de administración de los probióticos para identificar cuál proporciona el mejor efecto inhibitorio y más conveniente para el paciente.
- Realizar estudios para observar efectos a largo plazo del uso de probióticos como tratamiento de la PAP.
- Evaluar la posible sinergia entre los probióticos y otros tratamientos antimicrobianos o terapias físicas, como el uso de luz láser, para maximizar la eliminación de bacterias patógenas.

REFERENCIAS

1. Ørstavik D. Essential Endodontology: Prevention and Treatment of Apical Periodontitis. 3 era. Ørstavik D, editor. John Wiley & Sons Ltd.; 2020. 1-178 p.
2. American Association of Endodontists. Endodontic Diagnosis [Internet]. Colleagues for Excellence. 2013. p. 3-4. Disponible en: <https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2017/07/endodonticdiagnosisfall2013.pdf>
3. Siqueira Jr J, Rôças I. Present status and future directions in endodontic microbiology. Endod Top [Internet]. 2014;(30):3-22. Disponible en: <https://megabiteandco.be/wp-content/uploads/2018/01/Present-status-and-future-directions-in-endo-micro-Siqueira-et-al-2014.pdf>
4. Qian W, Ma T, Ye M, Li Z, Liu Y, Hao P. Microbiota in the apical root canal system of tooth with apical periodontitis. BMC Genomics. 2019;20(Suppl 2).
5. Buonavoglia A, Zamparini F, Lanave G, Pellegrini F, Diakoudi G, Spinelli A, et al. Endodontic Microbial Communities in Apical Periodontitis. J Endod [Internet]. 2023;49(2):178-89. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0099239922008226>
6. Korona-Glowniak I, Piatek D, Fornal E, Lukowiak A, Gerasymchuk Y, Kedziora A, et al. Patterns of oral microbiota in patients with apical periodontitis. J Clin Med [Internet]. 2021;10(12):1-14. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2077-0383/10/12/2707/pdf>
7. Ordinola-Zapata R, Costalonga M, Nixdorf D, Dietz M, Schuweiler D, Lima BP, et al. Taxonomic abundance in primary and secondary root canal infections. Int Endod J [Internet]. 2023;56(2):278-88. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Ronald-Ordinola-Zapata/publication/365154033_Taxonomic_Abundance_in_Primary_and_Secondary_Root_Canal_Infections/links/6398c915e42faa7e75bdb25d/Taxonomic-Abundance-in-Primary-and-Secondary-Root-Canal-Infections.pdf
8. Tibúrcio-Machado CS, Michelon C, Zanatta FB, Gomes MS, Marin JA, Bier CA. The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis.

Int Endod J. 2021;54(5):712-35.

9. Vengerfeldt V. Apical periodontitis : prevalence and etiopathogenetic aspects [Internet]. Universitatis Tartuensis; 2018. Disponible en: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/106028098/187733043-libre.pdf?1695881560=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DApikaalne_periodontiit_levimus_ja_etiopa.pdf&Expires=1698011262&Signature=VkSbXfe6reJlCgjEVJNyfEp~P1CymQ7WoSOOd9HTsht1KeXOjPl
10. T. Baban M, M. Talabani R, O. Rashid M. Prevalence of Apical Periodontitis by Cone Beam Computed Tomography: A Cross Sectional Study. Sulaimani Dent J [Internet]. 2020;7(2):45-53. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Ranjdar-Talabani/publication/346546903_Prevalence_of_Apical_Periodontitis_by_Cone_Beam_Computed_Tomography_A_Cross_Sectional_Study/links/5fc6a645a6fdcc697bd32beb/Prevalence-of-Apical-Periodontitis-by-Cone-Beam-Computed
11. Jakovljevic A, Nikolic N, Jacimovic J, Pavlovic O, Milicic B, Beljic-Ivanovic K, et al. Prevalence of Apical Periodontitis and Conventional Nonsurgical Root Canal Treatment in General Adult Population: An Updated Systematic Review and Meta-analysis of Cross-sectional Studies Published between 2012 and 2020. J Endod [Internet]. 2020;46(10):1371-1386.e8. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.07.007>
12. Berman LH, Hargreaves KM. Cohen's Pathways of the Pulp. 12th ed. Elsevier; 2020. 1191-2046 p.
13. Law A, Hons BDS, Messer H. An Evidence-Based Analysis of the Antibacterial Effectiveness of Intracanal Medicaments. J E [Internet]. 2004;30(10):689-94. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0099239905600921>
14. del Rio DG, Romero AA, Torres JE. Evaluación de la actividad antimicrobiana de cementos Biocerámicos frente a Enterococcus faecalis. Universidad de Cartagena;

2016.

15. Friedman S. Considerations and concepts of case selection in the management of post-treatment endodontic disease (treatment failure). *Endod Top* [Internet]. 2002;1:54-78. Disponible en: <https://doi.org/10.1034/j.1601-1546.2002.10105.x>
16. Al-ahmad A, Ameen H, Pelz K, Karygianni L, Wittmer A, Anderson AC, et al. Antibiotic Resistance and Capacity for Biofilm Formation of Different Bacteria Isolated from Endodontic Infections Associated with Root-filled Teeth. 2014;40(2).
17. Domínguez-pérez RA, Torre-luna R De, Ahumada-cantillano M, Vázquez-garcidueñas MS, Pérez-serrano RM, Martínez-martínez RE, et al. Detection of the antibiotic resistance genes blaTem-1 , cfxA , tetQ , tetM , tetW , and ermC in endodontic infections of a Mexican population *Journal of Global Antimicrobial Resistance* Detection of the antimicrobial resistance genes bla TEM-1 , cfxA , tet. *Integr Med Res* [Internet]. 2018;15(May):20-4. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.05.011>
18. Heredia- Veloz D, Abad-Coronel D, Villavicencio-Caparó E. Eficacia antibacteriana de tres selladores endodónticos frente al *Enterococcus faecalis*. *Rev Estomatol Hered* [Internet]. 25 de octubre de 2017;27(3):132-40. Disponible en: <https://revistas.upch.edu.pe/index.php/REH/article/view/3197>
19. Ramirez W. Actividad antimicrobiana del cemento experimental portland asociado con nanopartículas de plata en comparación al cemento portland y el BIODENTINE® frente al *Enterococcus faecalis* atcc 29212 y *Candida albicans* atcc90028. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2019.
20. Brito Fermín T, Olano Dextre TL, Teixeira das Neves L, Ramos Pinheiro C, Kenji Nishiyama C. Actividad antimicrobiana y biocompatibilidad de los cementos endodónticos a base de hidróxido de calcio. *Rev ADM*. 2016;73(2):60-4.
21. Fierro-Monti C, Aguayo-Saldías C, Lillo-Climent F, Riveros-Figueroa F. Role of probiotics as bacteriotherapy in dentistry: a literature review. *Odontoestomatol* [Internet]. 2017;19(30):4-13. Disponible en: <http://library1.nida.ac.th/termpaper6/sd/2554/19755.pdf>

22. Orellana-Centeno J, Morales-Castillo V. Los probióticos y su relación en la odontología preventiva. *Av en Ciencia, Salud y Med* [Internet]. 2019;6(4):116-21. Disponible en:
https://www.researchgate.net/profile/Jose_Orellana10/publication/342453506_Los_probioticos_y_su_relacion_en_la_odontologia_preventiva/links/5ef531e7a6fdcc4ca3100a0/Los-probioticos-y-su-relacion-en-la-odontologia-preventiva.pdf
23. Poornima P, Shashikala K, Keshava Prasad BS, Atul UR. Probiotics - The Future of Bacteriotherapy in Endodontics : A Review. *IOSR-JDMS* [Internet]. 2020;19(12):1-6. Disponible en: 10.9790/0853-1912110106
24. Bohora AA, Kokate S. Concept of Probiotics in Endodontics. *Int J Adv Res* [Internet]. 2016;4(7):1137-42. Disponible en: 10.21474/IJAR01
25. Osorio Ayala LD, Buestán Zambrano JF, Yamunaqué Vire JM, Pinos Gavilanes MP, Rodríguez Coyago M de L. Modulation of Oral Biofilm and Immune Response Associated to Mucosa with Probiotic Bacteria as a Potential Approach in the Prevention of Dental Caries: A Systematic Review. *Dent Oral Biol Craniofacial Res.* 2020;3(5):2-7.
26. Seifelnasr K. A preliminary study evaluating potential probiotic use in endodontics [Internet]. West Virginia University; 2014. Disponible en:
<http://search.proquest.com/docview/1617408748?accountid=178282>
27. Kasper RH, Machado GM. Impacto do uso de probióticos sobre o biofilme bucal. *Rev da Fac Odontol Univ Passo Fundo* [Internet]. 2020;25(1):138-49. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.5335/rfo.v25i1.10065> *
28. Bohora A, Kokate S. Evaluation of the role of probiotics in endodontic treatment: A preliminary study. *J Int Soc Prev Community Dent* [Internet]. 2017;7(1):46-51. Disponible en: 10.4103/2231-0762.200710
29. Bohora A, Kokate S. Evaluation of the role of probiotics in endodontic treatment: A preliminary study. *J Int Soc Prev Community Dent* [Internet]. 2017;7(1):46-51. Disponible en: <http://www.jispcd.org/text.asp?2017/7/1/46/200710>

30. Widyarman A, Lazaroni N. Persistent Endodontics Pathogens Biofilm Inhibited by Lactobacillus reuteri Indonesian Strain Lactobacillus reuteri Indonesian. J Dent Indones [Internet]. 2019;26(3):160-4. Disponible en: 10.14693/jdi.v26i3.1113
31. Cosme-Silva L. Efeito de probióticos no desenvolvimento de lesão periapical induzida em ratos [Internet]. Universidade Estadual Paulista «Julio Mesquita Filho»; 2019. Disponible en:
https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/181929/silva_lc_dr_int_int.pdf?sequence=4
32. Bohora A, Kokate S, Khedkar S, Vankudre A. Antimicrobial activity of probiotics against endodontic pathogens:- A preliminary study. Indian J Med Microbiol [Internet]. 2019;37(1):5-11. Disponible en:
https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_18_333
33. Rai P, Kochhar R, Kumari M. Antimicrobial activity of three different Probiotic strains and 5.25% Sodium hypochlorite against E.faecalis and C.albicans at two different time period: An in-vitro study. Int J Sci Res Publ [Internet]. 2019;9(4):88-79. Disponible en: 10.29322/ijsrp.9.04.2019.p8879
34. Jung S, Park OJ, Kim AR, Ahn KB, Lee D, Kum KY, et al. Lipoteichoic acids of lactobacilli inhibit Enterococcus faecalis biofilm formation and disrupt the preformed biofilm. J Microbiol [Internet]. 2019;57(4):310-5. Disponible en: 10.1007/s12275-019-8538-4
35. Noushad MC, Gokul N, Kavya M, Rakhi R, Nithin A, Nisha AJ. Comparative evaluation of antibacterial efficacy of probiotics, calcium hydroxide and triple antibiotic paste against E. faecalis biofilm: in vitro study. Int J Sci Res [Internet]. 2019;8(11):50-3. Disponible en: 10.36106/ijsr
36. Chen C, Hasselgren G, Serman N. Prevalence and Quality of Endodontic Treatment in the Northern Manhattan Elderly. 2007;33(3):230-4. Disponible en: 10.1016/j.joen.2005.12.016
37. Sunay H, Tanalp J, Dikbas I, Bayirli G. Cross-sectional evaluation of the periapical status and quality of root canal treatment in a selected population of urban Turkish

adults. 2007;139-45. Disponible en: [10.1111/j.1365-2591.2007.01217.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01217.x)

38. Ahmed I, Ali RW. Prevalence of apical periodontitis and frequency of root - filled teeth in an adult Sudanese population. 2017;(December 2016):142-7. Disponible en: [10.1002/cre2.73](https://doi.org/10.1002/cre2.73)
39. Marroquin J. Prevalencia de Periodontitis Apical en Primeros Y Segundos Molares Inferiores de Pacientes Tratados por Alumnos de Pre-Grado en el Área De Endodoncia, Utilizando el Índice de Periodontitis Apical (Pai), de La Clínica Integral de la Facultad de Odontología [Internet]. 2017. Disponible en: http://www.repositorio.usac.edu.gt/8375/1/T_2699.pdf
40. Canales A. Frecuencia de periodontitis apical asintomática en pacientes tratados endodónticamente en la unidad de posgrado de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos durante los años 2015 - 2016 [Internet]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12672/8065/Canales_la.pdf?sequence=1
41. Bohora AA, Kokate SR. Good Bugs vs Bad Bugs: Evaluation of Inhibitory Effect of Selected Probiotics against *Enterococcus faecalis*. J Contemp Dent Pract [Internet]. abril de 2017;18(4):312-6. Disponible en: <https://www.thejcdp.com/doi/10.5005/jp-journals-10024-2037>
42. Ahn KB, Baik JE, Park OJ, Yun CH, Han SH. Lactobacillus plantarum lipoteichoic acid inhibits biofilm formation of *Streptococcus mutans*. PLoS One [Internet]. 2018;13(2):1-16. Disponible en: [10.1371/journal.pone.0192694](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192694)
43. Chavez de Paz LE, Molander A, Dahlen G. Gram-positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment. Int Endod J [Internet]. septiembre de 2004;37(9):579-87. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2591.2004.00845.x>
44. Widyarman AS, Halim LA, Jesslyn, Irma HA, Richi M, Rizal MI. The potential of reuterin derived from Indonesian strain of *Lactobacillus reuteri* against endodontic pathogen biofilms in vitro and ex vivo. Saudi Dent J [Internet]. 2023;35(2):154-64.

Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2023.01.002>

45. Shaaban S, Genena S, Elraggal A, Hamad GM, Meheissen MA, Moussa S. Antibacterial effectiveness of multi-strain probiotics supernatants intracanal medication on *Enterococcus faecalis* biofilm in a tooth model. *BMC Oral Health* [Internet]. 2023;23(1):1-11. Disponible en: <https://bmcoralhealth.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12903-023-02914-2>
46. Castillo-Ruiz M, Daille LK, Machuca P, Bittner M. Antibacterial activity of a complex bacteriocin secreted by *Staphylococcus epidermidis* against *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2023;152(August):1-5. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003996923001188?via%3Dihub>
47. Safadi S, Maan H, Kolodkin-Gal I, Tsisis I, Rosen E. The Products of Probiotic Bacteria Effectively Treat Persistent *Enterococcus faecalis* Biofilms. *Pharmaceutics*. 2022;14(4):1-11.
48. Shaaban S, Hamad GM, Genena S, Meheissen MA, Moussa S. Evaluation of the antibacterial activity of Lactobacilli probiotics supernatants against *Enterococcus faecalis* (in-vitro study). *BMC Oral Health* [Internet]. 2022;22(1):1-11. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12903-022-02434-5>
49. Hashim ZA, Maillard JY, Wilson MJ, Waddington RJ. Determining the potential use of biosurfactants in preventing endodontic infections. *Eur J Oral Sci* [Internet]. 2022;130(6):1-15. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/eos.12900>
50. Khan H. Probiotic Use in Endodontic Therapy [Internet]. University of Illinois; 2014. Disponible en: https://indigo.uic.edu/articles/thesis/Probiotic_Use_in_Endodontic_Therapy/10797536/files/19309196.pdf
51. Cosme-Silva L, Dal-Fabbro R, Cintra LTA, Ervolino E, Piazza F, Mogami Bomfim S, et al. Reduced bone resorption and inflammation in apical periodontitis evoked by dietary supplementation with probiotics in rats. *Int Endod J* [Internet]. 21 de agosto

de 2020;53(8):1084-92. Disponible en:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/iej.13311>

52. Misuriya A, Bhardwaj A, Aggrawal S, Kumar PP awa., Gajjarepu S. A Comparative Antimicrobial Analysis of Various Root Canal Irrigating Solutions on Endodontic Pathogens: An in vitro Study. *J Contemp Dent Pract* [Internet]. abril de 2014;15(2):153-60. Disponible en: <https://www.thejcdp.com/doi/10.5005/jp-journals-10024-1506>
53. Tirali RE, Bodur H, Sipahi B, Sungurtekin E. Evaluation of the antimicrobial activities of chlorhexidine gluconate , sodium hypochlorite and octenidine hydrochloride in vitro. *Aust Endod J* [Internet]. 2013;(17):15-8. Disponible en: [10.1111/j.1747-4477.2010.00266.x](https://doi.org/10.1111/j.1747-4477.2010.00266.x)
54. Dametto FR, Ferraz CCR, De Almeida Gomes BPF, Zaia AA, Teixeira FB, De Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* [Internet]. 2005;99(6):768-72. Disponible en: [10.1016/j.tripleo.2004.08.026](https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2004.08.026)
55. Ye L, Cao L, Song W, Yang C, Tang Q, Yuan Z. Interaction between apical periodontitis and systemic disease (Review). *Int J Mol Med* [Internet]. 2023;52(1):1-19. Disponible en: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2023.5263/download>
56. Pérez-Losada F de L, Estrugo-Devesa A, Castellanos-Cosano L, Segura-Egea JJ, López-López J, Velasco-Ortega E. Apical periodontitis and diabetes mellitus type 2: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Med* [Internet]. 2020;9(2). Disponible en: <https://www.mdpi.com/2077-0383/9/2/540/pdf>
57. Marashdeh MQ, Gitalis R, Levesque C, Finer Y. *Enterococcus faecalis* Hydrolyzes Dental Resin Composites and Adhesives. *J Endod* [Internet]. 2018;44(4):609-13. Disponible en: [10.1016/j.joen.2017.12.014](https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.12.014).*Enterococcus*
58. John G, Kumar KP, Gopal SS, Kumari S, Reddy BK. *Enterococcus faecalis* , a nightmare to endodontist : A systematic review. 2015;9(13):898-908. Disponible en:

10.5897/AJMR2014.7122

59. Gatti J, Dobeck J, Socransky S, Skobe Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol* [Internet]. 2000;16:197-204. Disponible en: <https://doi.org/10.1034/j.1600-9657.2000.016005197.x>
60. Liu Y, Liu L, Wang H, Tang B. Prevalence of apical periodontitis in a Chinese subpopulation detected in cone beam CT images. *2021 IEEE Int Conf Med Imaging Phys Eng ICMIPe 2021 - Proc* [Internet]. 2021;1-4. Disponible en: doi: 10.1109/ICMIPe53131.2021.9698965.
61. Hernandez Sampieri R, Fernandez Collado C, Baptista Lucio P. Metodología de la investigación. 5ta ed. México D.F.: Mc Graw Hill; 2010. 83-143 p.
62. Zandi H, Kristoffersen AK, Ørstavik D, Rôças IN, Siqueira JF, Enersen M. Microbial Analysis of Endodontic Infections in Root-filled Teeth with Apical Periodontitis before and after Irrigation Using Pyrosequencing. *JOE* [Internet]. marzo de 2018;44(3):372-8. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0099239917312645>
63. Cedillo Medina IA, Fernandez Becerra Y del V. Efecto Antimicrobiano de Membranas Quitosano y Propóleo Sobre Bacterias Odontopatógenas. Universidad de Los Andes; 2019.
64. Moura Teles A, Manso MC, Pina C, Cabeda J. A review of microbiological root canal sampling: updating and emerging picture. *Arch Oral Res* [Internet]. 2013;9(1):41-59. Disponible en: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/9462/1/A_review_of_microbiological_root_canal_sampling-_updating_an_emerging_picture_2013.pdf
65. Kluge M, Trüschler J, Elamin F, Anderson A, Hellwig E, Altenburger M, et al. Improving the microbial sampling and analysis of secondary infected root canals by passive ultrasonic irrigation. *Clin Oral Investig* [Internet]. 2022;26(6):4575-86. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00784-022-04424-x>

66. Serrano Quevedo K, Galvis Castillo YS, Varela Rangel YY, Jiménez Medina JM, Martínez Amaya C, Salas Osorio E. Actividad antagónica de lactobacilos probióticos sobre *Candida albicans* aisladas de lesiones bucales en pacientes con enfermedades sistémicas. *ODOUS CIENTÍFICA*. 2021;22(1):1-45.
67. Asociación Médica Mundial. Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. [Internet]. Fortaleza: Asociación Médica Mundial; 2013. p. 1-4. Disponible en: <https://www.wma.net/es/policies-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>
68. Bouillaguet S, Manoil D, Girard M, Louis J, Gaïa N, Leo S, et al. Root microbiota in primary and secondary apical periodontitis. *Front Microbiol* [Internet]. 2018;9(OCT):1-11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2018.02374/full>
69. Siqueira JF, Silva WO, Romeiro K, Gominho LF, Alves FRF, Rôças IN. Apical root canal microbiome associated with primary and posttreatment apical periodontitis: A systematic review. *Int Endod J* [Internet]. 2024;(October 2023):1-16. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38634795/>
70. Shin JM, Luo T, Lee KH, Guerreiro D, Botero TM, McDonald NJ, et al. Deciphering Endodontic Microbial Communities by Next-generation Sequencing. *J Endod* [Internet]. 2018;44(7):1080-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.04.003>
71. Wong J, Manoil D, Näsman P, Belibasakis GN, Neelakantan P. Microbiological Aspects of Root Canal Infections and Disinfection Strategies: An Update Review on the Current Knowledge and Challenges. *Front Oral Heal* [Internet]. 2021;2(June). Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/froh.2021.672887/full>
72. Manoil D, Al-Manei K, Belibasakis GN. A Systematic Review of the Root Canal Microbiota Associated with Apical Periodontitis: Lessons from Next-Generation Sequencing. *Proteomics - Clin Appl* [Internet]. 2020;14(3). Disponible en:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/prca.201900060>

73. Claesson R, Johansson A, Belibasakis GN. Clinical laboratory diagnostics in dentistry: Application of microbiological methods. *Front Oral Heal* [Internet]. 2022;3. Disponible en:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/froh.2022.983991/full>
74. Invernizzi-Mendoza CR, Chamorro-Giménez SA, Cardozo-Vera RM. Frecuencia de Bacilos Gram Negativos en la cavidad bucal de estudiantes de una Universidad de Asunción. *Rev del Inst Med Trop* [Internet]. 2023;18(1):57-64. Disponible en:
<http://scielo.iics.una.py/pdf/imt/v18n1/1996-3696-imt-18-01-57.pdf>
75. Lee LW, Lee YL, Hsiao SH, Lin HP. Bacteria in the apical root canals of teeth with apical periodontitis. *J Formos Med Assoc* [Internet]. 2017;116(6):448-56. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfma.2016.08.010>
76. Švec P, Devriese LA, Sedláček I, Baele M, Vancanneyt M, Haesebrouck F, et al. *Enterococcus haemoperoxidus* sp. nov. and *Enterococcus moraviensis* sp. nov., isolated from water. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51(4):1567-74.
77. Lauková A, Styková E, Mad'ar M. *Enterococcus moraviensis* EMO1-1Nik of horse origin: characteristics and potential bacteriocin-producing strain. *Vet Res Commun* [Internet]. 2024;47:1471-8. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36929156/>
78. Gooch HCC, Kiu R, Rudder S, Baker DJ, Hall LJ, Maxwell A. *Enterococcus innesii* sp. Nov., isolated from the wax moth galleria mellonella. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 2021;71(12):1-8. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8744253/pdf/ijsem-71-5168.pdf>
79. Gu M, Cho JH, Suh JW, Cheng J. Potential oral probiotic *Lactobacillus pentosus* MJM60383 inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by inhibiting sucrose decomposition. *J Oral Microbiol* [Internet]. 2023;15(1). Disponible en:
<https://doi.org/10.1080/20002297.2022.2161179>
80. Marinković J, Marković T, Brkić S, Radunović M, Soldatović I, Ćirić A, et al.

Microbiological analysis of primary infected root canals with symptomatic and asymptomatic apical periodontitis of young permanent teeth. *Balk J Dent Med* [Internet]. 2020;24(3):170-7. Disponible en: <https://scindeks-clanci.ceon.rs/data/pdf/2335-0245/2020/2335-02452003170M.pdf>

81. Ravi S, Ananthan HB, Reddy BN, Sankar S, Natarajan SN, Sankar S. Evaluation of Antibacterial Efficacy of Two Commercially Available Probiotics as Intracanal Medicament against *Enterococcus faecalis*: An In Vitro Study. *J Contemp Dent Pract* [Internet]. 2023;24(3):157-61. Disponible en: <https://www.thejcdp.com/doi/JCDP/pdf/10.5005/jp-journals-10024-3466>
82. Charan Teja GV, Nandana Raju MR, Neelima Reddy UL, V Satyanarayana U V, Praneeth D, Maheswari K. An In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of Probiotics Against Endodontic Pathogens. *Cureus*. 2022;14(6).
83. Kim AR, Ahn KB, Yun CH, Park OJ, Perinpanayagam H, Yoo YJ, et al. *Lactobacillus plantarum* Lipoteichoic Acid Inhibits Oral Multispecies Biofilm. *J Endod* [Internet]. 2019;45(3):310-5. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2018.12.007>
84. Safadi S, Maan H, Kolodkin-gal I, Tsesis I. The Products of Probiotic Bacteria Effectively Treat Persistent *Enterococcus faecalis* Biofilms. 2022;

ANEXO A



Universidad de Los Andes
Facultad de Odontología
Departamento de Biopatología
Mérida –Venezuela

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

TÍTULO DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO: EFECTO DE PROBIÓTICOS Y SUS METABOLITOS APLICADOS A AISLADOS BACTERIANOS ASOCIADOS A PERIODONTITIS APICAL PRIMARIA

Autores: Angélica Sivira, y Jormany Quintero.

Fecha:

www.bdigital.ula.ve

Ítem 1. Prueba de susceptibilidad microbiana. Seleccione con un No (Sin AA) o Si (con AA) el recuadro correspondiente.

Placas		Tratamiento				
Microorganismo Asociado PAP	Nº de placa	Metabolito P1	Metabolito P2	Metabolito P3	Control Positivo	Control Negativo
<i>Especie #1</i>	1					
	2					
	3					
<i>Especie #2</i>	1					
	2					
	3					
<i>Especie #3</i>	1					
	2					
	3					

AA: Actividad Antimicrobiana

Ítem 2. Determinación de actividad antimicrobiana por medición de halos de inhibición.

Placas		Diámetro de Halo inhibitorio (mm)			
Microorganismo	Nº de placa	Metabolito P1	Metabolito P2	Control Positivo	Control Negativo
<i>Especie #1</i>	1				
	2				
	3				
<i>Especie #2</i>	1				
	2				
	3				
<i>Especie #3</i>	1				
	2				
	3				

APÉNDICE A



Universidad de Los Andes
Facultad de Odontología
Departamento de Biopatología
Mérida –Venezuela

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título de la investigación:

EFFECTO DE PROBIÓTICOS Y SUS METABOLITOS APLICADOS A AISLADOS BACTERIANAS ASOCIADAS A PERIODONTITIS APICAL PRIMARIA

La Periodontitis Apical Primaria (PAP) se conoce como la inflamación de los tejidos que sostienen la porción final de la raíz dental y se manifiesta con una respuesta dolorosa al morder y al tacto, suele aparecer en caries profundas o por fallas en el sellado marginal de una restauración. Usualmente es ocasionado por microorganismos que no son beneficiosos y que proliferan bajo condiciones específicas en esa área, iniciando un proceso de infección que incurre en lesiones del periodonto como lisis óseas y destrucción del ligamento periodontal.

Es por ello que se propone realizar este estudio experimental, de laboratorio cuyo objetivo es determinar el efecto de bacterias probióticas aplicadas a bacterias que se asocian Periodontitis Apical Primaria.

INVESTIGADORES RESPONSABLES

Br. ANGÉLICA SIVIRA

Br. JORMANY QUINTERO

Tutora: PhD. ELAYSA SALAS

Para cumplir con la finalidad de este estudio se tomarán muestras biológicas intraconducto de pacientes diagnosticados con PAP. Posteriormente, el material biológico obtenido será cultivado en medios de cultivo especializados para el transporte y posteriormente en placas de agar para determinar el efecto de bacterias probióticas y sus subproductos sobre los microorganismos patógenos identificados a partir de la muestra de dichos pacientes.

En tal sentido:

- 1- Todo paciente participante estará continuamente informado acerca del curso de la investigación y los resultados del análisis microbiológico.
- 2- Todo paciente está en su derecho de negarse a participar o abandonar el estudio en cualquiera de sus fases sin que ello conlleve represalias o pérdida de algún beneficio.
- 3- Los beneficios de esta investigación suponen generar evidencia científica en cuanto a alternativas terapéuticas que en un futuro podrían o no considerarse al momento de tratar la Periodontitis Apical Primaria.
- 4- No se usará ningún resultado de análisis microbiológico sin el consentimiento expreso del paciente y en todo caso se protegerá su identidad.

- 5- Todos los datos, especialmente los publicados al término de la investigación mantendrán el compromiso de confidencialidad sin causar identificación o daño personal.

DECLARACIÓN DE PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Declaro haber comprendido el propósito y los términos de mi participación en el proyecto de investigación “**EFECTO DE PROBIÓTICOS Y SUS METABOLITOS APLICADOS A AISLADOS BACTERIANOS ASOCIADOS A PERIODONTITIS APICAL PRIMARIA**”; el cual consiste en un estudio experimental *In Vitro* que servirá para determinar el efecto de probióticos y sus metabolitos sobre aislados bacterianos asociados a Periodontitis Apical Primaria (PAP). Declaro entender también que mi participación es voluntaria y que en cualquier momento de la investigación, puedo retirarme de la misma, si así lo deseo, sin que mi decisión conlleve a represalias o a la pérdida de cualquier beneficio como producto de la investigación.

Así declaro y firmo en Mérida, a los _____ días del mes de _____ del año 20____

Nombre y Firma del Participante

Nombre y Firma del Testigo

DECLARACIÓN DE LOS INVESTIGADORES

Luego de haber explicado detalladamente al paciente _____ la naturaleza del protocolo de investigación mencionado, certifico mediante la presente que, a mi leal saber, el/la participante que firma este formulario de CONSENTIMIENTO comprende los requerimientos, riesgos y beneficios de su participación. Este consentimiento establece un común acuerdo con la persona participante, con el tiempo previo que sea necesario para que esta última pueda ampliar su consulta y comprenderla, de manera que pueda tomar conscientemente la decisión de participar en la investigación.

Nombre y firma de los Investigadores