Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Departamento de Microbiología y Parasitología
Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Microbiológicas
"Dra. Celina Araujo de Pérez".

ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE LACTOBACILOS PROBIÓTICOS SOBRE *Candida albicans* AISLADAS DE LESIONES BUCALES EN PACIENTES CON ENFERMEDADES SISTÉMICAS.

Trabajo de Grado para optar al título de Licenciadas en Bioanálisis

www.bdigital.ula.ve

Autoras:
Katherine Paola Serrano Quevedo.
Yuleiby Sarahy Galvis Castillo.
Tutora:
Dra. Elaysa Salas Osorio

Mérida, Octubre 2017

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Dedicatoria

A mi madre; que desde el cielo guía mis pasos siempre hacia la felicidad, quien puso a mi alcance todas las herramientas para cumplir esta meta. ¡Gracias por tus bendiciones, te amare por siempre!

A mi padre; porque la distancia nunca ha sido obstáculo para nuestra comunicación, sus grandes consejos de vida y sus palabras de amor, elevan siempre mi confianza y me ayudan a seguir de pie. Te amo.

A mis dos maravillosas abuelas y mis queridos tíos, que con devoción y cariño han hecho de mi una persona de bien. ¡Gracias por sus enseñanzas e infinitas oraciones!

A Gustavo, que con su amor llena de color mis días grises, me ha brindado su apoyo y ha sido mi sostén durante todo este proceso, quien me devolvió la vida y las ganas de sonreír. ¡Gracias por tanto, te amo!

www.bdigital.ula.ve

Espero siempre estén orgullosos de mi.
Todos mis logros serán para ustedes.

Katherine.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Dedicatoria

Estas líneas representan la culminación de una meta, para lograrla recorrí un largo camino, el cual estuvo cargado de grandes momentos y personas, para quienes son y serán todos mis logros.

A mis padres y mi hermana; por estar presentes en cada paso que doy, siempre apoyándome y brindándome lo mejor de cada uno, para hacer de mí la persona que soy hoy. ¡Gracias por ser seres humanos maravillosos, los amo!

A mi esposo; gracias por tu compañía, tus palabras y comprensión durante todo este camino que recorrimos juntos. ¡Te amo profundamente!

www.bdigital.ula.ve

A mi amado Santiago; la luz de mis ojos, quien llego a mi vida para llenarla de felicidad con amor, ternura y ocurrencias. ¡Esto es para ti, hijo!

Mis compañeros de clases; con quienes tuve la dicha de compartir todo este proceso, y en especial a mi compañera de tesis, gracias por permitirme formar parte de esta investigación y alcanzar esta meta juntas.

"El éxito no tiene sentido, si no tienes con quien compartirlo"

Yuleiby.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Agradecimientos

A Dios Todopoderoso, por guiarnos a lo largo de este proceso y por colocar en nuestro camino las personas esenciales para culminar esta meta.

A la Universidad de los Andes nuestra máxima casa de estudios, por la formación académica recibida durante estos años.

A la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, porque a pesar de las dificultades siempre nos brindo un nivel académico de excelencia, formando en nosotros profesionales éticos y capacitados en el ámbito laboral.

Al Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Microbiológicas “Dra. Celina Araujo de Pérez” del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y a todo el personal que allí labora por permitirnos hacer uso de las instalaciones para llevar a cabo la investigación, y en especial al profesor José Manuel Jiménez por su dedicación y entrega.

Al CDCHTA por el aporte financiero destinado a la realización de ésta investigación.

A nuestra turora, Dra. Elaysa Salas por guiarnos con dedicación y despertar en nosotras el interés por la investigación. Por su carisma, pasión, por su constante apoyo, motivación y por creer en nosotras como equipo al confiarnos tan valioso tema. Sabemos lo importante que es para usted así que éste logro también es suyo. ¡Lo logramos!

Además, gratificamos a nuestro jurado por su apoyo a nuestra formación académica.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

INDICE DE CONTENIDO

Dedicatoria iii

Agradecimientos v

INDICE DE CONTENIDO vi

INDICE DE FIGURAS viii

INDICE DE TABLAS ix

INDICE DE GRÁFICOS x

Resumen xi

INTRODUCCION 1

CAPITULO I. EL PROBLEMA 3

Planteamiento del Problema 3

Objetivos de la Investigación 5

Objetivo General 5

Objetivos Específicos 5

Justificación de la Investigación 5

CAPITULO II. MARCO TEÓRICO 7

Antecedentes de la Investigación 7

Bases Teóricas 11

Bacterias Ácido Lácticas (BAL) 11

Género Lactobacillus 12

Probióticos 13

Actividad Antagónica 14

Género Candida 15

Candida albicans 16

Asociación de Candida albicans con lesiones bucales en pacientes con enfermedades sistémicas 18

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Hipótesis 21
CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO 22
Tipo de Investigación 22
Diseño de la Investigación 22
Población y Muestra 23
Sistema de Variables 24
Variable Dependiente 24
Variable Independiente 24
Metodología 25
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES 29
Resultados 29
Discusiones 36
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 39
Conclusiones 39
Recomendaciones 40
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS 41

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Eliminación de la franja central	26
Figura 2.	Vaciamiento del agar sabouraud dextrosa	26
Figura 3.	Realización del patrón Mc Farland	27
Figura 4.	Inoculación de las cepas de *Candida albicans* sobre el crecimiento de los lactobacilos probióticos	27
Figura 5.	Interpretación de Resultados	28
Figura 6.	Comportamiento del Lactobacilo probiótico E14V2 sobre Cepas de *Candida albicans*	30
Figura 7.	Comportamiento del Lactobacilo probiótico R75 sobre Cepas de *Candida albicans*	31
Figura 8.	Comportamiento del Lactobacilo probiótico R71 sobre Cepas de *Candida albicans*	32
Figura 9.	Comportamiento del Lactobacilo probiótico E174 sobre Cepas de *Candida albicans*	33
Figura 10.	Comportamiento del Lactobacilo probiótico E57 sobre Cepas de *Candida albicans*	34

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Origen de las cepas de *Candida albicans* 24

Tabla 2. Origen y especie de las cepas de Lactobacilos probióticos 24

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Antagonismo de los Lactobacilos probióticos sobre cepas de *Candida albicans.* 35

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Departamento de Microbiología y Parasitología
Laboratorio de Diagnostico e Investigaciones Microbiológicas
"Dra. Celina Araujo de Pérez".

ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE LACTOBACILOS PROBIÓTICOS SOBRE *Candida albicans* AISLADAS DE LESIONES BUCALES EN PACIENTES CON ENFERMEDADES SISTÉMICAS.

Trabajo de Grado para optar al título de Licenciadas en Bioanálisis

Autoras:

Katherine Paola Serrano Quevedo.

Yuleiby Sarahy Galvis Castillo.

Tutora:

Dra. Elaysa Salas Osorio.

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

Candida albicans es un hongo levaduriforme que coloniza de manera habitual al organismo en diversos lugares. En la cavidad bucal de pacientes con enfermedades sistémicas convergen condiciones fisiológicas que propician el desarrollo de candidiasis, por esta razón es reconocida como uno de los patógenos oportunistas más importantes. Dentro de la microbiota habitual del ser humano se encuentra el género bacteriano *Lactobacillus,* reconocido por presentar propiedades beneficiosas al individuo que lo consume en cantidades apropiadas, es por ello que los probióticos constituyen una interesante alternativa en la prevención y tratamiento de enfermedades, una de ellas la Candidiasis bucal. De allí que, el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antagónica de especies de *Lactobacillus* probióticos sobre *Candida albicans* aisladas de lesiones bucales en pacientes con enfermedades sistémicas. Se evaluó mediante la técnica de antagonismo descrita por Juliana Guerreio, la actividad de cinco cepas de Lactobacilos (*L. rhamnosus L. plantarum L. acidophilus L. paracasei* ssp. *paracasei)* sobre doce cepas de *Candida albicans*, dando como resultado inhibición del crecimiento del hongo en el 88,26% de las cepas ensayadas. Sin embargo, los resultados obtenidos con la cepa R71 (*Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei*), se destacan con respecto a los demás, pues la inhibición total del crecimiento de *Candida albicans* fue del 91,66%, siendo el más alto porcentaje de inhibición de la investigación.

Palabras clave: Candida, *Lactobacillus*, probióticos, antagonismo, enfermedades sistémicas, candidiasis.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

INTRODUCCIÓN

Dentro de los diferentes microorganismos que colonizan de manera habitual al organismo, el género fúngico *Candida* comprende un grupo de especies que pueden encontrarse formando parte de la microbiota de áreas anatómicas como la cavidad bucal, el tubo digestivo, vagina, uretra, piel e inclusive el ano. Prácticamente todos los seres humanos pueden albergar una o más especies de *Candida,* sin embargo, *Candida albicans* es reconocida por comportarse como un patógeno oportunista causando infecciones de tipo endógena, las cuales se presentan con más frecuencia en pacientes con enfermedades sistémicas.

Generalmente los pacientes con enfermedades sistémicas deben consumir diariamente tratamientos farmacológicos que controlen su padecimiento. Las complicaciones con infecciones como por ejemplo Candidiasis ameritan la adición de tratamientos antifúngicos, los cuales presentan efectos secundarios a nivel del sistema gastrointestinal, y en algunos casos a nivel hepático y renal.

www.bdigital.ula.ve

Desde tiempos inmemoriales, el concepto de “microbio” como agente perjudicial para la salud es el que ha sido exaltado y se ha minimizado el potencial benéfico de algunas bacterias. Desde el siglo pasado cuando científicos como Pasteur y Metchnikoff observaron el potencial benéfico de algunas bacterias por su antagonismo con agentes infecciosos, se han venido haciendo esfuerzos para comprender la delicada relación que existe entre los microorganismos que coexisten en los diversos nichos ecológicos que se desarrollan tanto en los seres vivos como fuera de ellos y sus posibles aplicaciones en la terapéutica. Es ahí donde toman un papel importante los probióticos, microorganismos vivos que al ser ingeridos en una cantidad adecuada mejoran el equilibrio de la microbiota habitual del

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

organismo ejerciendo un efecto favorecedor para la salud del paciente que los consume. Dentro de este grupo de microorganismos los géneros bacterianos *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* reúnen una cantidad considerable de especies con propiedades probióticas probadas y certificadas.

En la Unidad de Probióticos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes se adelantan investigaciones desde el año 1992 en el ámbito de los Probióticos, contando con cepas autóctonas cuyas propiedades probióticas se han evaluado en el tiempo, siendo el efecto antagónico sobre microorganismos patógenos uno de los parámetros a estudiar. En el área odontológica, se han comenzado a hacer estudios acerca del uso de los probióticos como terapia coadyuvante en el tratamiento de infecciones endógenas tales como la periodontitis y la candidiasis. De allí que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antagónico de Lactobacilos probióticos sobre aislados de *Candida albicans* obtenidos de lesiones bucales presentes en pacientes con enfermedades sistémicas.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

El género *Lactobacillus* comprende un grupo de bacterias acido lácticas que crecen en diversidad de condiciones y forman parte de la microbiota normal de la boca, tracto gastrointestinal y aparato genitourinario; representando un complejo ecosistema compuesto por microorganismos capaces de promover efectos beneficiosos para la salud, y proveer protección frente a aquellos patógenos capaces de afectar nocivamente al hospedero. Las especies *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus brevis, Lactobacillus delbrueckii y Lactobacillus plantarum,* forman parte de las bacterias probióticas, las cuales se pueden ingerir en una gran variedad de alimentos tales como el yogurt y los alimentos fermentados (Kolida, 2006), (Niedzielin, Kordecki, Birkenfeld, 2001).

Por otra parte, el género fúngico *Candida*, es un tipo de levadura que forma parte de la microbiota habitual del ser humano, encontrándose en el tracto gastrointestinal, cavidad bucal, mucosa vaginal y región perianal. El equilibrio entre dicho microorganismo y el hospedero puede verse alterado por diversos factores, tales como, cambios fisiológicos en el individuo, compromisos en su sistema inmunológico y exposición prolongada a antibióticos, favoreciendo la proliferación de la levadura y generando así

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

afecciones en el hombre. Además, *Candida* representa el grupo más importante de hongos patógenos oportunistas, donde las especies como *Candida albicans, C. tropicalis*, *C. krusei* , *C. glabrata*, *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis* constituyen la cuarta causa más frecuente de infecciones nosocomiales septicémicas y son mucho más patógenas que otros microorganismos como *Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Haemophilus influenzae, Neisseria menigitidis, Neisseria gonorrhoeae* (Andrade, 2011).

En otro contexto, es ampliamente aceptado que las tasas de portadores bucales de *Candida* son significativamente mayores en la población pediátrica, los pacientes hospitalizados, los pacientes inmunosuprimidos, las personas con prótesis dentales y los diabéticos. (Rodríguez et al, 2011) Ademas se sabe que los antifúngicos presentan una gran variedad de efectos colaterales sobre los sistemas de órganos de los pacientes que los consumen, es por ello que se hace necesario el estudio de los microorganismos probióticos como una alternativa terapéutica en el tratamiento de la Candidiasis bucal.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Evaluar la actividad antagónica *in vitro* de cepas de Lactobacilos probióticos sobre el crecimiento de *Candida albicans,* aisladas de lesiones bucales en pacientes con enfermedades sistémicas.

Objetivos Específicos

Demostrar mediante pruebas microbiológicas el efecto antagónico de cepas de Lactobacilos probióticos sobre cepas de *Candida albicans*.

www.bdigital.ula.ve

Comparar el efecto inhibitorio producido entre las diferentes cepas de lactobacilos probióticos sobre los aislados de *Candida albicans* en estudio.

Justificación

Los probióticos constituyen una interesante alternativa en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades. Desde tiempos remotos las bacterias ácido lácticas han sido utilizadas en la preservación de los alimentos, cuya vida útil podía extenderse mediante procesos fermentativos, por otra parte, dichas bacterias poseen innumerables propiedades que les permite brindarle al ser humano ciertos beneficios para su salud. Existen estudios que afirman la acción de los probióticos para mejorar la digestibilidad de la lactosa, como reguladores del tracto gastrointestinal y el colesterol plasmático, en la prevención de diarrea inducida por antibióticos, en la modulación de

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

enfermedades atópicas, e incluso como terapia coadyuvante para la erradicación de *Helicobacter pylori.*

Si bien es cierto que estas bacterias ejercen efectos positivos sobre los seres humanos, es necesario resaltar que actúan como un mecanismo de control para prevenir el sobrecrecimiento de patógenos, formando una barrera natural que protege contra las infecciones, esto se conoce como antagonismo. Su capacidad antagónica, se basa en la producción de ácidos orgánicos y otros metabolitos inhibidores, entre los que cabe mencionar el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y otros derivados del metabolismo del oxígeno, así como compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehido), derivados deshidratados del glicerol (reuterina), enzimas bacteriolíticas, bacteriocinas y otros. Su actividad antagónica sobre otras bacterias, genera un interés creciente por caracterizar microorganismos para uso probiótico, ya que no solo ayudarán al paciente a controlar una infección inicial sino que también le brindará ciertos beneficios adicionales, pues estos microorganismos sirven como punto de partida para la obtención de productos biotecnológicos aplicables a la solución de problemas de la salud tanto humana como animal. (Müller, Carrasco, Simonetta, Tonarelli, 2001)

www.bdigital.ula.ve

En otro contexto, las enfermedades infecciosas ocasionadas por *Candida*, incluidas las infecciones bucales, respiratorias y gastrointestinales, son un problema sanitario importante entre las poblaciones. Existen evidencias que confirman la actividad antagónica de *Lactobacillus* sp sobre otro tipo de bacterias patógenas como *Staphylococcus aureus* (Montero, Diaz, Duran, 2015), enteropatógenos (Moreno, Salas, Perez, Jimenez, 2012) y *Escherichia coli* (Gutiérrez & Acosta, 2008). Sin embargo, hay pocos antecedentes sobre el antagonismo contra hongos (Guerreiro, 2013). De allí pues, el propósito de este estudio fue evaluar la actividad antagónica de cepas de Lactobacilos probióticos sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans,* aisladas de lesiones bucales en pacientes con enfermedades sistémicas, con la finalidad de hallar una nueva opción terapéutica.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

Antecedentes de la Investigación

La aplicación de los antimicrobianos a mediados del siglo XX revolucionó de manera significativa el tratamiento de las infecciones. No obstante, el rápido desarrollo de resistencia hizo necesaria la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas para controlar las enfermedades infecciosas. (López & Domingo, 2007)

www.bdigital.ula.ve

Dentro del concepto “antibioticoterapia”, se ha usado últimamente otro término denominado “bacterioterapia”, para definir el efecto antimicrobiano que poseen determinadas bacterias y otros microorganismos como mohos y levaduras. Es así que el término “probiótico” hace referencia a la utilización de microorganismos vivos como suplementos nutricionales para mejorar el equilibrio microbiano del hospedero y así ofrecerle un efecto beneficioso para su salud. (López & Domingo, 2007)

La observación original de los efectos positivos de estas bacterias la hizo, Elie Metchnikoff, científico ruso y profesor del Instituto Pasteur premio Nobel en 1908. Este postuló que las bacterias ácido lácticas (BAL) conferían beneficios a la salud y además eran capaces de promover la longevidad. (López & Domingo, 2007). También sugirió que la “autointoxicación intestinal” y el envejecimiento resultante podrían suprimirse modificando la microbiota habitual, reemplazando microorganismos nocivos por bacterias útiles,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ocasionando así un impacto favorable en la salud humana (Castro & De Roveto, 2006). Por otra parte, desarrolló una dieta de leche fermentada donde se incluía la bacteria *Bulgarian bacillus* y en 1908 publicó en los *Anales del Instituto Pasteur* "Études sur la flore intestinale" y "Poissons intestinaux et sclérose" (1910) (Kaufmann, 2008).

Ante la situación planteada, en el año 2008 Gutiérrez y Acosta, mediante de la técnica de difusión de pozos, investigaron el potencial bactericida de *Lactobacillus cassei* frente a *Escherichia coli*, en la cual la antibiosis se reflejaba a través de un halo de inhibición entre diez y catorce milímetros transcurridos diez días del experimento. De esta manera se determino que la bacteria ácido láctica producía sustancias antimicrobianas que podran ser usadas para la bioconservación natural de los alimentos. Simultáneamente concluyeron que el extracto del aislado usado era activo incluso en diluciones altas, es decir que conservaba su potencial bactericida a muy pequeñas concentraciones (Gutiérrez & Acosta, 2008).

www.bdigital.ula.ve

De igual manera Montero y cols en 2015, bajo la misma técnica de difusión de pozos, demostraron la actividad antagónica generada por *Lactobacillus* spp. sobre *Staphylococcus aureus*, ambos microorganismos encontrados en queso de capa Mompox. De allí, sugirieron la sustitución de los agentes químicos de conservación de alimentos, por bacterias acido lácticas (Montero et al, 2015).

Adicionalmente, Moreno en 2012 evaluaron el antagonismo de seis cepas del género *Lactobacillus* aisladas a partir de heces de lactantes y leche materna, sobre cepas de bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Enterococcus fecalis, Salmonella typhi, Salmonella typhimurium, Shigella dysenteria, Salmonella enteritidis)* mediante el ensayo de difusión en pozos. En dicho estudio se observaron halos de inhibición mayores a diez milímetros, superando así el requerimiento de antibiosis mínima. Además, resaltaron que no existía diferencia en la actividad antagónica con respecto a las características que presentaba la pared celular

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

pues las cepas probióticas fueron capaces de inhibir el crecimiento tanto de bacterias grampositivas como gramnegativas (Moreno, Salas, Perez, Jimenez, 2012).

Por otra parte Matsubara en 2011, realizó un estudio *in vivo* con ratones de experimentación, a los cuales le inoculó con una cepa ATCC de *Candida albicans* y sometió a un tratamiento característico con un antifungico comercial (nistatina), así como también a un tratamiento con bacterias ácido lácticas como *L. rhamnosus* y *L. acidophillus.* Este observo la reducción significativa de la colonización patógena en la mucosa bucal de los animales, gracias al antagonismo ejercido por las bacterias probióticas. De esta manera concluyó que el tratamiento con *Lactobacillus* podía ser una alternativa eficaz para la reducción de la levadura en la cavidad bucal. Incluso, demostró que el tratamiento con nistatina no fue suficiente para contrarrestar la infección por *Candida albicans.* De igual manera dedujo que *Lactobacillus* son capaces de generar una acción profiláctica en la colonización bucal por el mismo hongo (Matsubara, 2011).

www.bdigital.ula.ve

En este propósito, en el trabajo realizado por Mendoça en 2012, se evaluó la muestra salival de 50 mujeres de edad avanzada, las cuales dividió para el análisis microbiológico y evaluar los niveles de IgA en cada una de las pacientes. Para el estudio antagónico, administró una mezcla de bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus cassei* y *Bifidobacterium breve* durante un mes, al final del experimento determinó la reducción en la prevalencia de *Candida albicans* en un 92,9%. Los mismos concluyeron que las bacterias probióticas podían reducir significativamente la cantidad de *Candida* presente en la cavidad bucal de ancianos. También, un aumento de la respuesta inmune específica para esta levadura, lo que sugiere la posibilidad de su uso en el control de la candidiasis bucal (Mendoça, Santos, Faria, Gonçalves, 2012).

Así mismo, Guerreiro en 2013, utilizando la técnica descrita por Fitzsimmons y Berry, modificada por Ishikawa, evaluó un total de 81

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

muestras donde estaban incluidas tanto cepas ATCC de *C. albicans* como muestras aisladas de pacientes con prótesis bucales totales. Con este estudio demostró que a través de la producción de ácido láctico, los lactobacilos son capaces de inhibir totalmente el crecimiento de *Candida*, siendo éste el mecanismo de acción más importante para reducir el contaje de las unidades formadoras de colonias (UFC). Concluyó además, que es importante identificar exactamente la especie de *Candida* ya que la inhibición ocurre a través de múltiples factores que pueden variar de acuerdo al tipo de *Lactobacillus* que se use en cualquier investigación.

En este orden de ideas, en 2015 Pereira utilizó una cepa ATCC de *Lactobacillus rhamnosus* para evaluar su posible potencial probiótico contra *Candida albicans,* estos autores indicaron que las cepas de *L. rhamnosus,* tenian la capacidad de interferir directamente sobre la expresión de factores de virulencia de *Candida*, pues el crecimiento y la patogenicidad de esta levadura, estaba influenciado por la presencia de dicha bacteria probiótica (Pereira, Goncalves, Ferreira, Correa, 2015).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Bases Teóricas

Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Con la denominación de “bacterias ácido lácticas” (BAL) se generaliza a un grupo de bacterias que fermentan azúcares como glucosa y lactosa para producir ácido láctico. Dentro de este grupo se reconoce la existencia de microorganismos aerobios, anaerobios y anaerobios facultativos. Entre los géneros representativos de las BAL se escuentran: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus, Bifidobacterium* y *Pediococcus*. Con excepción de *Bifidobacterium,* todos son aeróbicos (Del Campo & Gomez, 2008).

Ademas estos microorganismos se pueden clasificar por su metabolismo, en homofermentativos y heterofermentativos. Los primeros producen exclusivamente ácido láctico, mientras que los segundos, producen además ácido acético, etanol y dióxido de carbono. La actividad antimicrobiana de las BAL ha sido atribuida a la acumulación de los productos finales de los procesos de fermentación, como ácido láctico, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno o a la producción de bacteriocinas (Del Campo y Gomez, 2008).

www.bdigital.ula.ve

Las BAL se han utilizado desde hace algunas décadas en la industria de alimentos como bioconservadores debido a la producción de sustancias que ejercen acción antibacteriana, que contribuyen a la prevención de la descomposición de los alimentos y evitan el desarrollo de microorganismos patógenos. Otras características deseables de las BAL, son que pueden mejorar el sabor y la textura y en algunos casos aumentan el valor nutricional, por sus efectos sobre la digestibilidad (Rodrigues & Rodrigues, 2011).

Por ello las BAL son importantes durante toda la vida del individuo, debido a que su consumo es fundamental para un buen funcionamiento intestinal,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

evitando así diversas enfermedades. Tanto en el nacimiento y durante el crecimiento, es importante tratar de beneficiarse de estas bacterias a través de comidas sanas y satisfactorias, evitando el uso de antibióticos y antiparasitarios, controlar también el estrés, ya que puede alterar la microbiota del intestino (Rodrigues & Rodrigues, 2011).

Género *Lactobacillus.*

Como indica el nombre genérico, estas bacterias son de morfología bacilar variando en su longitud y grosor. Los lactobacilos son generalmente más resistentes a las condiciones ácidas que otras bacterias lácticas, siendo capaces de crecer hasta en pH 4. Por ello, son fácilmente aislables de una gran cantidad de hábitat por selección directa en medios conteniendo azúcares y ácidos. Esta resistencia al pH les permite seguir el crecimiento durante las fermentaciones lácticas naturales, aun cuando el pH haya disminuido. Así, los Lactobacilos son los responsables de terminar la mayoría de las fermentaciones lácticas, y no son consideradas bacterias patógenas (Madigan, 2004).

www.bdigital.ula.ve

Por otra parte, el género *Lactobacillus* es capaz de sintetizar ATP a través de fermentaciones de carbohidratos que producen ácido láctico como elemento principal, y a veces, como único producto final. Otra característica fisiológica es su elevada tolerancia a los ácidos, consecuencia necesaria de su modo de metabolismo productor de energía. Asi, tienen la capacidad de producir y tolerar una concentración relativamente elevada de ácido láctico, lo cual les confiere un valor selectivo, ya que les permite eliminar la competencia de la mayoría de las otras bacterias en ambientes que son ricos en nutrientes. Esto queda demostrado por el hecho que los lactobacilos pueden enriquecerse fácilmente a partir de fuentes naturales mediante el uso de medios complejos con un elevado contenido de azúcar (Stanier, 1984).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Probióticos

Los probióticos son microrganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas producen efectos benéficos para la salud, además promueve la prevención de diversas enfermedades, incluyendo el cáncer. (Rodríguez & Rodrigues, 2011). También sirven como tratamiento y prevención de la diarrea por rotavirus en niños y la reducción de la diarrea asociada con el uso de antibióticos. Además, se ha encontrado que contribuyen en la prevención de la diarrea del viajero, vaginitis, infecciones urinarias, alergia a los alimentos y reacciones atópicas en niños y pueden mejorar la intolerancia a la lactosa (Castro & De Roveto, 2006).

El efecto beneficioso para la salud es dependiente de las cepas administradas, forma de administración y características inherentes al hospedero. Estos efectos de los probióticos tienen implicaciones en la salud pública porque son altamente efectivos en enfermedades prevalentes. (Rodríguez & Rodríguez, 2011). Sus beneficios se pueden evidenciar en las diferentes etapas fisiológicas del ser humano y al parecer, con cepas y dosis dependientes, y aunque las diferencias halladas entre las cepas pueden ser de gran utilidad para obtener un beneficio potenciado sobre algunas condiciones o signos específicos de una patología o de un proceso fisiológico (Manzano, Estupiñan, Proveda, 2012).

www.bdigital.ula.ve

Las principales especies de probióticos que se integran en alimentos son bacterias capaces de producir acido láctico y que pertenecen a dos géneros principalmente: *Lactobacillus*, utilizados en la fermentación de alimentos y *Bifidobacterium*, microorganismos anaerobios estrictos. En cuanto a su mecanismo de acción se encuentra la inducción de un pH ácido, por debajo de 4, debido a la producción de ácidos grasos de cadena corta (biuratos y acetatos) llegando así a un ambiente que impide el crecimiento de otras

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

bacterias patógenas u oportunistas. El pH ácido favorece la colonización de las BAL (Rondon, Salvatierra, Meneses, 2015).

Cabe agregar, que las bacterias consideradas probióticas, poseen la capacidad de aumentar la expresión de mucinas ileocolónicas, coadyuvando a la lucha bacteriana mediante el recubrimiento del intestino por una capa de moco. Así como también están en la capacidad de producir antibióticos naturales con amplio espectro de actividad como lactocinos, helveticinos, curvacino, nicinas, etc, que acortan la duración de la patología intestinal. Por sobre todo, estas bacterias probióticas ejercen un efecto competitivo con otras bacterias, ocupando sus lugares de nidación e inhibiendo su crecimiento, siendo consideradas antagónicas de patógenos (Rondón et al, 2015).

Actividad Antagónica

www.bdigital.ula.ve

Son todas aquellas prácticas dirigidas a disminuir la tendencia de enfermedades, excluyendo el control químico; tales como el uso de microorganismos que interfieren en la supervivencia de patógenos. En la naturaleza existe una interacción continua entre los potenciales patógenos y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que no haya enfermedad en la mayoría de los casos, es decir, el control biológico funciona naturalmente. Este término se refiere a una asociación de dos organismos en la que uno de ellos es dañado por el otro. (Angarita, 2008)

Así, los mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas para controlar los agentes patógenos se agrupan: competencia, antibiosis, predación, inducción de competencia, parasitismo, interacción directa con el patógeno (Angarita, 2008).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Género *Candida*

Candida es un miembro habitual de la microbiota normal de las membranas mucosas de los tractos respiratorio, gastrointestinal y genital femenino, en pacientes debilitados puede producir una enfermedad sistémica o lesiones localizadas en la piel, boca, vagina o pulmones. La mayoría de los individuos están colonizados por ella, por lo que la transmisión no es un factor en la enfermedad. La prevención exige el mantenimiento de las defensas del hospedero, incluida su microbiota normal (Varela et al, 2014).

Después del fenómeno de adherencia, se establecen interacciones entre el hongo y el hospedero que son críticas para el balance entre la enfermedad y la salud. Éste género es capaz de adoptar diversas formas que indudablemente constituyen un mecanismo de adaptación a su ambiente. La patogenicidad depende de modificaciones de la barrera de defensa del hospedero, los cuales inician secundariamente transformaciones en el comportamiento del agente etiológico (Panizo & Reviakina, 2001).

www.bdigital.ula.ve

Los principales factores de virulencia asociados con *Candida* se relacionan con su dimorfismo, secreción enzimática, cambio de fenotipo, expresión diferencial de genes en respuesta al ambiente, síntesis de adhesinas y su capacidad para formar biopelículas. Las levaduras de este género son polimórficas, ya que existen en forma de levadura (blastosporas) o como filamentos (pseudohifa o hifa). La morfogénesis se refiere a la transición entre las levaduras (unicelulares) y la forma de crecimiento filamentosa del microorganismo, que puede convertirse de forma reversible a células de levadura, con crecimiento de hifa o pseudohifa (Castrillón, Palma, Padilla, 2005).

La Candidiasis es una micosis ocasionada por levaduras del género *Candida*, representa el mayor porcentaje de las enfermedades asociadas a

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

hongos. Se presenta en pacientes recién nacidos, trasplantados, con quemaduras graves, entre otros. La gravedad de esta afección depende del hospedero más que del propio hongo. La Candidiasis se presenta en individuos de cualquier edad, raza o género y no guarda ninguna relación con el clima, situación geográfica o nivel socioeconómico. (Stanier, 1984)

Las especies de *Candida* son ubicuas y dentro de ellas es *Candida albicans* quien comúnmente produce las infecciones orales, aunque también se han descrito otras como *Candida glabrata, Candida tropicalis, Candida guilliermondii, Candida parapsilosis*, etc. y recientemente *Candida dubliniensis*, específicamente en los pacientes infectados por VIH, donde es importante profundizar estudios ya que están involucrados en los casos de resistencia a los antifúngicos (Aguirre, 2002).

Candida albicans

www.bdigital.ula.ve

La colonización por *Candida albicans* puede llevar a la infección sistémica cuando el hospedero tiene varios factores de riesgo, como el uso de antibióticos de amplio espectro, esteroides u otros agentes inmunosupresores, diabetes mellitus, SIDA, depresión de las funciones fagocíticas o alteraciones locales del sistema gastrointestinal. Estas situaciones pueden ocasionar candidiasis gastrointestinal o diseminación hematógena (Castrillón et al 2005).

El reconocimiento de receptores celulares en el hospedero por *C. albicans* es esencial para su supervivencia. La evolución de este microorganismo de comensal a patógeno es el resultado de su habilidad para colonizar células epiteliales en la mucosa y seleccionar adicionalmente otros atributos que promuevan su invasión (Aguirre, 2002).

Aunque la invasión inicial depende de los mecanismos inmunes del hospedero, *C. albicans* posee características intrínsecas que promueven su habilidad de causar enfermedad. Entre sus factores de virulencia se incluyen

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

las adhesinas, la conversión morfogenética del microorganismo de la fase levaduriforme a la fase filamentosa, la secreción de enzimas como proteasas y fosfolipasas y la inmunomodulación de los mecanismos de defensa del hospedero (Varela et al 2014).

La adherencia de *C. albicans* a las células epiteliales de la boca facilita la colonización y puede ser considerada como el primer paso en la patogénesis de la enfermedad. Como comensal de la cavidad bucal, *C. albicans* puede adherirse tanto a proteínas de la saliva como a bacterias para evitar su eliminación. En estas interacciones intervienen múltiples mecanismos, observándose por ejemplo, aglutinación microscópica y macroscópica de aislados de *C. albicans* con cepas de diferentes especies bacterianas (Panizo & Reviakina, 2001).

La Candidiasis bucal, causada principalmente por *Candida albicans*, es de gran importancia estomatológica, por su frecuencia y variedad clínica. Estas infecciones se observan frecuentemente en personas con distintos tipos de factores predisponentes. Las formas clínicas de Candidiasis bucal es variable y se han usado diferentes clasificaciones (Lazarde & Avilan, 2003).

www.bdigital.ula.ve

Recientemente, se propuso una nueva clasificación, donde se establece que la Candidiasis bucal se divide en dos amplias categorías: primaria y secundaria. La Candidiasis primaria es aquella confinada a los tejidos orales y periorales. Esta se subdivide en: Candidiasis pseudomembranosa (aguda y crónica), Candidiasis eritematosa (aguda y crónica), Candidiasis hiperplásica (leucoplásica).

La candidiasis secundaria donde la candidiasis bucal es una manifestación de una infección sistémica o generalizada como se puede encontrar candidiasis mucocutánea (crónica) (Lazarde & Avilan, 2003).

La candidiasis pseudomembranosa, es la forma clínica más conocida y se caracteriza por la presencia de grumos o placas blancoamarillentas de consistencia blanda o gelatinosa, que crecen de manera centrífuga, localizadas en cualquier parte de la mucosa oral. En la mayoría de los casos,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

la sintomatología es mínima, pero en los casos masivos, los pacientes pueden quejarse de dolor, ardor o disfagia. En los pacientes VIH (+) pueden aparecer formas crónicas difíciles de erradicar (Aguirre, 2002).

La candidiasis eritematosa, se presenta clínicamente como un área rojiza de bordes mal definidos en la mucosa oral sin la presencia de placas blanquecinas. Representa en la actualidad la forma clínica más común tanto en los inmunocompetentes como en lo inmunodeprimidos. Es más frecuente identificarla en el dorso de la lengua y en el paladar, en una imagen doble en espejo. En general es una lesión asintomática o que produce un ligero picor, por lo que en muchas ocasiones es un hallazgo casual. Esta forma es común en los VIH (+) (Lazarde & Avilan, 2003).

La candidiasis hiperplásica, se define como una lesión oral en placas o pequeños nódulos blancos, que no pueden ser desprendidos por raspado y no pueden ser atribuidos a ninguna patología diagnosticable. Se pueden localizar en cualquier lugar de la mucosa oral, pero aparecen más frecuentemente en la mucosa yugal cerca de las áreas retrocomisurales y en la lengua (Aguirre, 2002).

www.bdigital.ula.ve

Asociación de Candida albicans con lesiones bucales de pacientes con enfermedades sistémicas.

Un pequeño número de especies fúngicas producen lesiones profundas y ampliamente diseminadas en el organismo, son habitantes normales de la microbiota, que se hacen invasores solo cuando han sido alteradas las defensas del individuo, cuando el equilibrio inmunológico está en supresión por acción de algún antibiótico o cuando el paciente está fuertemente debilitado por otra patología (Stanier, 1984).

La candidiasis bucal como tal no es una enfermedad mortal, aunque provoca molestias de diferente grado y altera el gusto, haciendo desagradable y dolorosa la ingesta, lo que lleva a una disminución del apetito

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

y a la emaciación del paciente, que puede resultar fatal en enfermos que precisen una ingesta hipercalórica como es el caso de los VIH (+), pacientes hospitalizados o incluso ancianos con un régimen alimenticio estricto. Junto a ello, puede ser la puerta de entrada de otras formas de candidiasis mas graves, como la esofágica o la sistémica (Aguirre, 2002).

C. albicans coloniza la mucosa bucal entre el 5-50% de los individuos sanos. El uso de corticosteroides es un factor predisponente para la aparición de candidiasis bucal, presentándose con frecuencia en pacientes que reciben quimioterapia a causa de linfoma y enfermedades hematológicas malignas, de igual modo en los transplantados y los pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Panizo & Reviakina, 2001).

En los pacientes VIH (+) parece existir una progresión clínica en las candidiasis, asociada a *Candida albicans,* desde las formas clínicas leves iniciales como la eritematosa a formas más graves y tardías cronificadas del tipo pseudomembranoso o hiperplásico. Esta progresión puede estar relacionada con la evolución de la inmunosupresión, el número de linfocitos CD4 y la carga viral. La candidiasis bucal constituye en estos pacientes una característica clave de la enfermedad por VIH y ha sido incluida como marcadores de la proguecion de la infección (Aguirre, 2002).

www.bdigital.ula.ve

Por otra parte la candidiasis bucal asociada a *Candida albicans* es la complicación encontrada frecuentemente en los pacientes que padecen diabetes tipo 2. Su mayor prevalencia puede ser atribuida al aumento de la glucosa en saliva, lo que provee un sustrato adecuado para la proliferación de *Candida* aumentando a su vez la capacidad de adhesión a la superficie bucal, favoreciendo la colonización y expresión de sus factores de virulencia. Adicionalmente, en estos pacientes, se ve favorecida la infección por *Candida* debido al compromiso inmunológico y la presencia de hiposialia, que al disminuir la acción limpiadora salival, favorece la adhesión de los hongos (Torrealba et al, 2016).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Finalmente, el tratamiento de la candidiasis bucal resulta sencillo en los pacientes inmunocompetentes o con inmunosupresión leve, en los que generalmente los antifúngicos tópicos resultan eficaces, unidos siempre a la solución del proceso desencadenante. No obstante, en los estados de inmunosupresión más importante se plantea el problema de la alta tasa de recurrencias, requiriendo la combinación de una terapia intensiva tanto sistémica como local. En algunos casos se ha llegado incluso a plantear la posibilidad de instaurar un tratamiento profiláctico con azoles, como en los pacientes VIH (+). A pesar de los resultados con los antifúngicos azólicos orales, se presentan formas clínicas de candidiasis bucal crónica resistentes al tratamiento (Aguirre, 2002).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Hipótesis

Los Lactobacilos probióticos pertenecientes al cepario de la Unidad de Probióticos del Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Microbiológicas “Prof. Celina Araujo de Pérez” del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ejercen un efecto antagónico sobre el crecimiento de *Candida albicans* aisladas de lesiones bucales de pacientes con enfermedades sistémicas.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

La investigación estuvo ubicada dentro de la metodología de investigación descriptiva, debido a que se buscaron aquellos aspectos que se deseaban conocer y de los que se pretendía obtener respuesta (Arias, 2006), ya que el objetivo de la investigación fue evaluar la actividad antagónica de *Lactobacillus* probióticos sobre *Candida albicans*.

www.bdigital.ula.ve

Diseño de la Investigación

El diseño de esta investigación fue experimental; ya que consistió en someter a un grupo de individuos (aislados de *Candida albicans*) a determinadas condiciones, estímulos o tratamiento (técnicas microbiológicas estandarizadas), para así observar los efectos o reacciones que se producen (el efecto antagónico generado por cepas de Lactobacilos probióticos) Es decir, se pretende establecer con precisión una relación causa - efecto. (Arias,2006)

El enfoque de la investigación fue cualitativo ya que para llegar a la verificación del problema planteado (evaluar la actividad antagónica de cepas de Lactobacilos probióticos sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*) se utilizó como técnica de recolección de datos la observación del efecto

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

inhibidor de los lactobacilos, con el propósito de recabar la información necesaria y responder a la interrogante planteada por parte del investigador.

Población y Muestra

Población

La población según Hurtado y Toro (1997) conforma el total de los individuos o elementos a quienes va dirigido el estudio, por lo que también se les llama Universo. Estos individuos se relacionan por una o varias características comunes, que les permiten ser estudiados en determinadas circunstancias. Refiere el autor que la población es el conjunto de todas las cosas que concuerdan con una serie determinada de especificaciones. En consecuencia, la población estuvo conformada por todas las cepas de *Candida albicans* aisladas de lesiones bucales en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y pacientes VIH(+).

www.bdigital.ula.ve

Muestra

Según Hurtado y Toro (1997) “es el conjunto de elementos representativos de la población, con los cuales se trabajará realmente en el proceso de la investigación”. Una muestra significativa es la que permite obtener resultados importantes para un buen análisis de los mismos. En este estudio, la muestra estuvo representada por 12 cepas de *Candida albicans* aisladas de cavidad bucal de pacientes con enfermedades sistémicas y 5 cepas de Lactobacilos probióticos pertenecientes al Cepario de la Unidad de Probióticos del Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Microbiológicas “Prof. Celina Araujo de Pérez” del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 1. Origen de las cepas de *Candida albicans*.

Código	Origen
VIH.01A	Paciente portador de VIH
VIH.02B	Paciente portador de VIH
VIH.03ALE	Paciente portador de VIH
VIH.06A	Paciente portador de VIH
VIH.07B	Paciente portador de VIH
VIH.07E	Paciente portador de VIH
VIH.09DLA	Paciente portador de VIH
D2.27	Paciente con Diabetes mellitus tipo 2
D2.35	Paciente con Diabetes mellitus tipo 2
D2.53	Paciente con Diabetes mellitus tipo 2
D2.54	Paciente con Diabetes mellitus tipo 2
D2.55	Paciente con Diabetes mellitus tipo 2

www.bdigital.ula.ve

Fuente: Elaborado por las autoras.

Tabla 2. Origen y especie de las cepas de Lactobacilos probióticos.

Código	Especie	Origen
R71	*L. paracasei* ssp.*paracasei*	Leche materna
R75	*L. rhamnosus*	Heces de neonato
E174	*L. plantarum*	Queso fresco artesanal
E57	*L. paracasei* ssp.*paracasei*	Queso fresco artesanal
E14V2	*L. acidophilus*	Fluido vaginal de mujer sana

Fuente: Elaborado por las autoras.

Sistema de variables

Variable dependiente: Crecimiento de *Candida albicans.*

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Variable independiente: Efecto antagónico de los Lactobacilos probióticos

Metodología

Se realizó la reactivación de cada Lactobacilo probiótico inoculando 50µL de cada microorganismo en 3 mL de caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe), los cuales fueron incubados a 37 °C durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó el cultivo durante 20 minutos a 3500 rpm, se descartó el sobrenadante, conservando el sedimento celular. Se realizó un lavado al sedimento utilizando 3 mL de solución salina fisiológica estéril (SSFE), se centrifugó nuevamente durante 20 minutos a 3500 rpm, se descartó el sobrenadante y finalmente se conservó el sedimento celular.

Con el sedimento obtenido de cada Lactobacilo, se realizó una suspensión bacteriana equivalente al tubo 1.0 de la escala de Mac Farland ($3 \times 10^8 \mathrm{UFC/mL}$). Posteriormente se inocularon tubos de agar MRS (Man, Rogosa y Sharpe) temperado a 40-45°C con 300 µL de la suspensión anteriormente preparada, se mezcló hasta homogeneizar y se vertió en placas de Petri estériles, una vez solidificado el contenido de las placas, estas se incubaron en condiciones de microaerofilia 35 +/- 2 °C por 24 horas.

www.bdigital.ula.ve

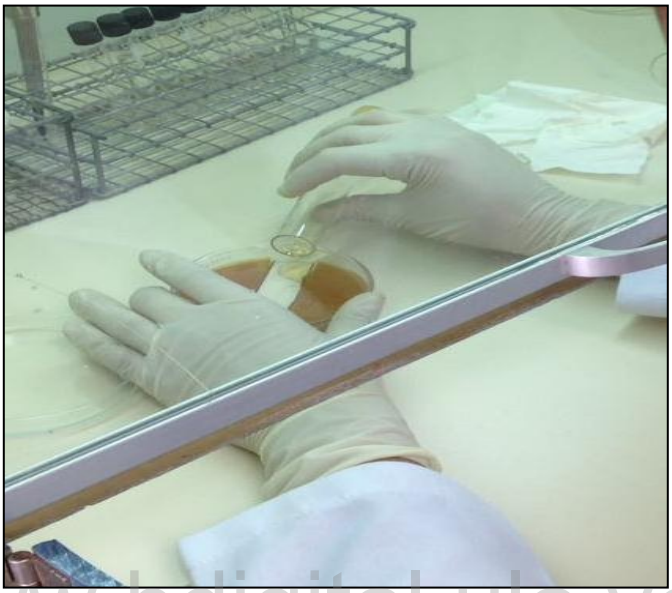
Finalizado el tiempo de incubación, con ayuda de un bisturí fue retirada una franja de agar de 2cm de la región central de la placa.



Figura 1. Eliminación de la franja central.
Fuente: Elaborada por las autoras.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Sobre este espacio se vertió agar de Sabouraud Dextrosa fundido y temperado a 45°C, hasta alcanzar el nivel del agar MRS y se permitió que solidificara, obteniendo así el agar MRS/SD.



www.bdigital.ula.ve

Figura 2. Vaciamiento del agar Sabouraud Dextrosa sobre la franja central.
Fuente: Elaborada por las autoras.

Por otra parte, se preparó suspensión de cada aislado de *Candida albicans* a evaluar, usando como referencia el patrón 0,5 Mc Farland ($1{,}5\text{x}\,10^{8}\,\text{UFC/mL}$). Se procedió a inocularlos sobre la superficie del agar MRS/SD haciendo uso de un hisopo de algodón, por último, las placas fueron incubadas en condiciones aeróbicas a 37 °C por 24 horas.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)



Figura 3. Realización del Patrón de Mc Farland**.**

Fuente: Elaborada por las autoras.

www.bdigital.ula.ve



Figura 4. Inoculación de las cepas de *Candida albicans* sobre el crecimiento de los Lactobacilos Probióticos.

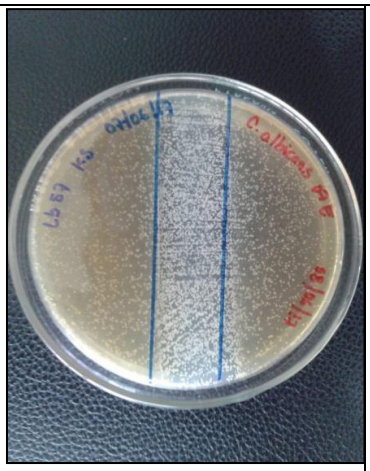
Fuente: Elaborada por las autoras.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

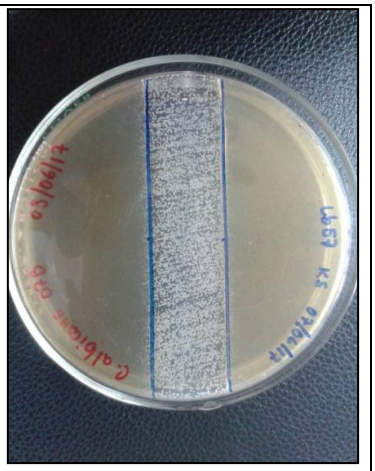
Los resultados obtenidos fueron evaluados visualmente, comparando el crecimiento de la levadura sobre la franja de 2cm de agar Saboraud Dextrosa y sobre el agar MRS, interpretándose como no hubo inhibición, inhibición parcial e inhibición total.



Ausencia de inhibición



Inhibición parcial



Inhibición total

www.bdigital.ula.ve

Figura 5. Interpretación de resultados.

Fuente: Elaborada por las autoras.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

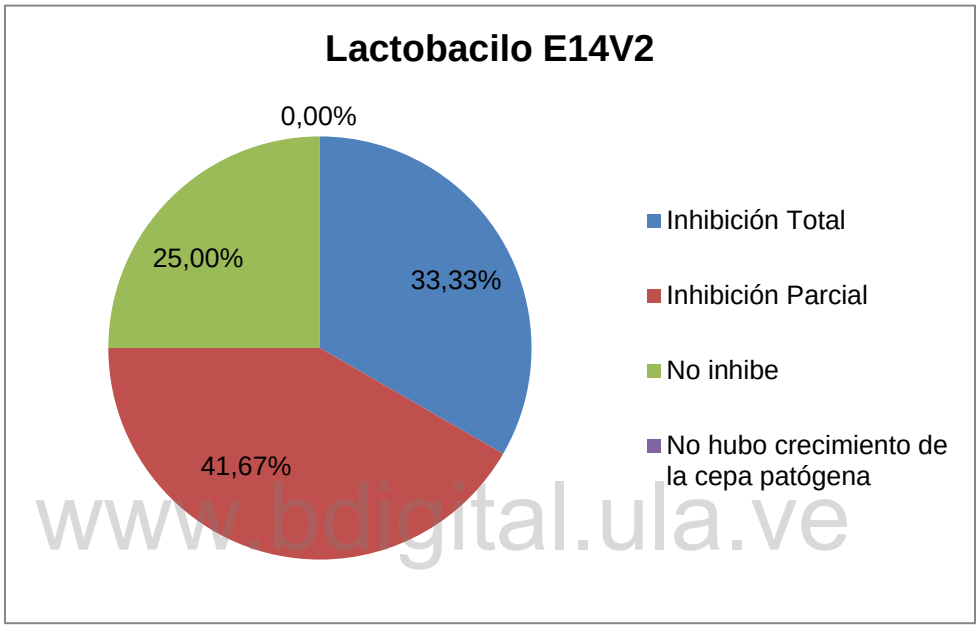
Resultados

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación y la recolección de la información se empleó como técnica la observación. Se elaboraron tablas de registro, donde se plasmaron los resultados obtenidos y las observaciones adicionales pertinentes de tal manera que solo permitió anotar especificamente lo que se observó. Estos resultados fueron procesados a través de estadística descriptiva y se obtuvieron promedios para las variables cualitativas. Los cuales fueron presentados en tablas y gráficos analizados previamente en la hoja de cálculo de Excel.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

La figura 6 representa la inhibición del Lactobacilo probiótico E14V2 con respecto a *Candida albicans*. De las doce cepas evaluadas, cuatro presentaron inhibición total, cinco inhibición parcial y tres cepas donde el Lactobacilo no logro impedir el crecimiento de *Candida*.



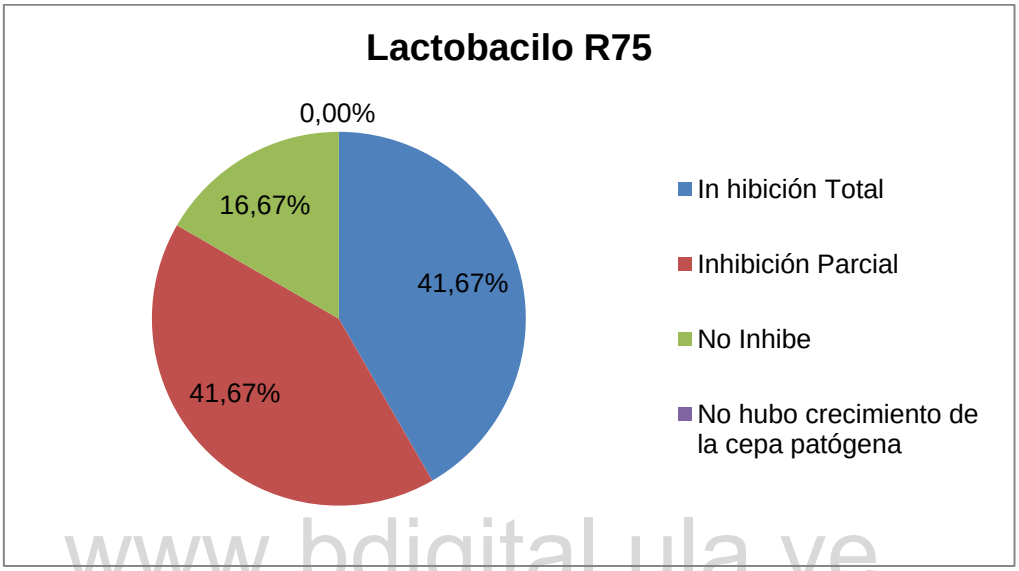
www.bdigital.ula.ve

Figura 6. Comportamiento del Lactobacilo probiótico E14V2 sobre Cepas de *Candida albicans.*

Fuente: Elaborada por las autoras

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

La figura 7 representa la inhibición del Lactobacilo probiótico R75 con respecto a *Candida albicans*. De las doce cepas evaluadas, cinco presentaron inhibición total, de igual manera cinco inhibición parcial y dos cepas que no inhiben el crecimiento de *Candida.*



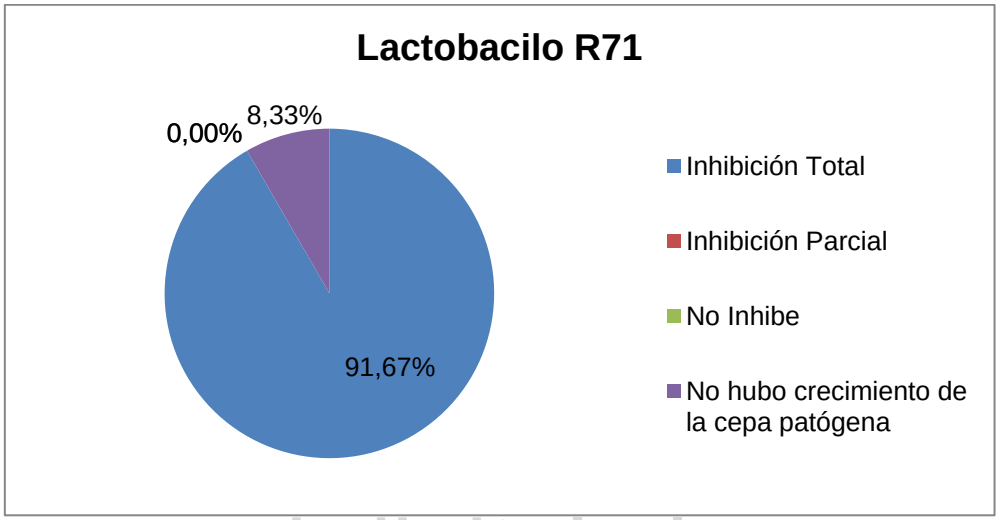
www.bdigital.ula.ve

Figura 7. Comportamiento del Lactobacilo probiótico R75 sobre Cepas de *Candida albicans.*

Fuente: Elaborada por las autoras.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

La figura 8 representa la inhibición del Lactobacilo probiótico R71 con respecto a *Candida albicans*. De las doce cepas evaluadas, once presentaron inhibición total y en una cepa no se observó crecimiento de la levadura patógena.



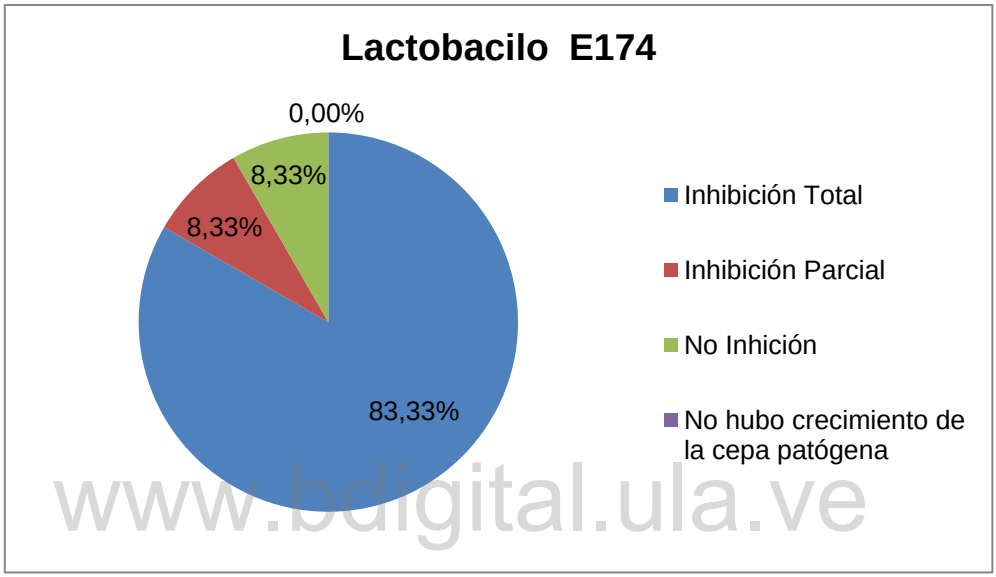
www.bdigital.ula.ve

Figura 8. Comportamiento del Lactobacilo probiótico R71 sobre Cepas de *Candida albicans.*

Fuente: Elaborada por las autoras

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

La figura 9 representa la inhibición del Lactobacilo probiótico E174 con respecto a *Candida albicans*. De las doce cepas evaluadas, diez presentaron inhibición total, una cepa obtuvo inhibición parcial y otra única cepa, en la cual la bacteria acido láctica no pudo contrarrestar el crecimiento de la levadura patógena.



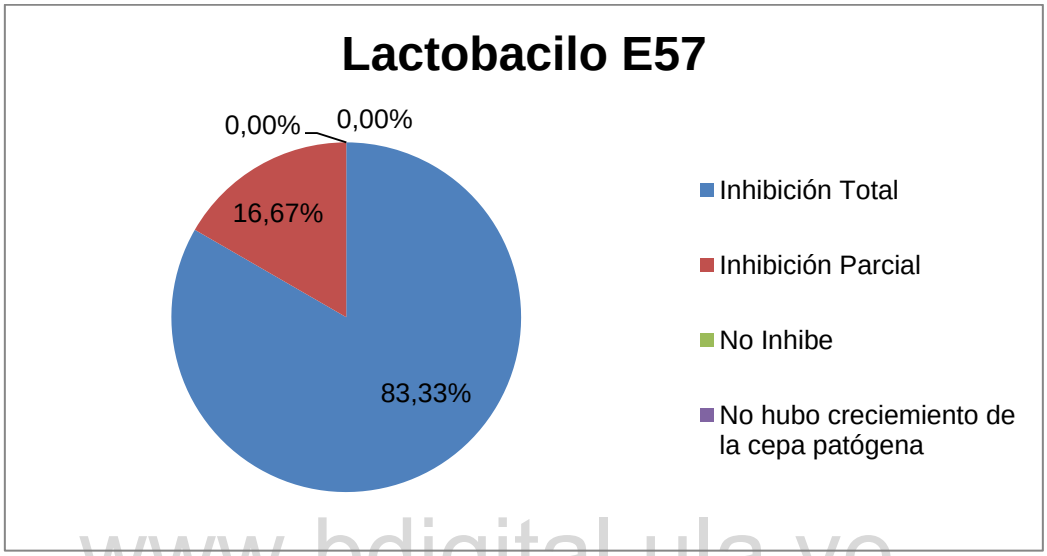
www.bdigital.ula.ve

Figura 9. Comportamiento del Lactobacilo probiótico E174 sobre Cepas de *Candida albicans.*

Fuente: Elaborada por las autoras

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

La figura 10 representa la inhibición del Lactobacilo probiótico E57 con respecto a *Candida albicans*. De las doce cepas evaluadas, diez cepas presentaron inhibición total y dos cepas con un resultado de inhibición parcial.



www.bdigital.ula.ve

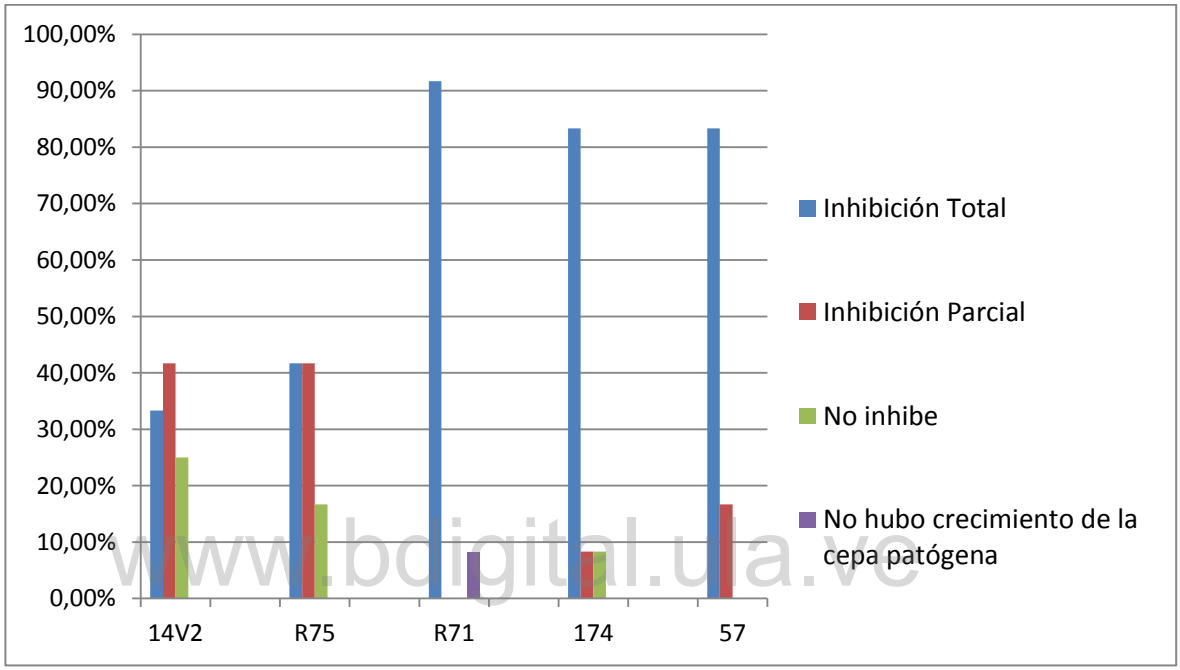
Figura 10. Comportamiento del Lactobacilo probiótico E57 sobre Cepas de *Candida albicans.*

Fuente: Elaborada por las autoras

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

El siguiente grafico representa el comportamiento general de los Lactobacilos probióticos sobre cepas de *Candida albicans*.

Grafico 1. Antagonismo de los Lactobacilos probióticos sobre cepas de *Candida albicans.*



www.bdigital.ula.ve

Fuente: Elaborada por las autoras

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Discusión

Los microorganismos probióticos brindan al individuo grandes beneficios en materia de salud. Se ha evidenciado en la literatura sus efectos positivos en diferentes problemas gastrointestinales y el mejoramiento de la respuesta inmunitaria. Se observan claramente los diversos atributos que poseen las bacterias probióticas, donde es importante resaltar su capacidad antagónica sobre otras bacterias patógenas y hongos oportunistas. El antagonismo microbiano se refiere a la competencia entre los microorganismos, esta competencia resulta beneficiosa para el individuo, pues su microbiota evita el crecimiento de patógenos mediante procesos como producción de sustancias que afectan la colonización de estos, cambios de pH y disponibilidad de oxigeno y nutrientes (Tortora, 2007).

Al realizar la prueba de antagonismo, se obtuvo inhibición total del crecimiento de *Candida albicans* en el 66,6% de la cepas evaluadas, el 21,66% de las cepas mostro inhibición parcial, no hubo inhibición en el 10% de las cepas, y no hubo crecimiento de *Candida albicans* en el 1,6%.

www.bdigital.ula.ve

Con referencia a lo anterior, se observó inhibición del crecimiento en el 88,26% de las cepas de *Candida* evaluadas, resultado que concuerda con el obtenido por Guerreiro (2013), quien evaluó mediante la misma técnica, la inhibición de diferentes especies de *Candida*, aisladas de cavidad bucal de pacientes sanos con prótesis total por especies de lactobacilos reconocidos como probióticos, determinando que la especie *Candida albicans*, era la más susceptible al efecto inhibidor

Por otra parte, es necesario resaltar el comportamiento de la cepa R71 (*Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*), pues los resultados obtenidos se destacan con respecto a los demás. Para este microorganismo la inhibición total del crecimiento de *Candida albicans* fue del 91,66%, siendo el más alto porcentaje de inhibición de la investigación. Este resultado puede estar condicionado al origen de la cepa, pues esta fue aislada de leche materna, y

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

según Manzano (2012) los probióticos incrementan el potencial de inmunoprotección proporcionado por la leche materna. Es decir, estos microorganismos presentan ciertas condiciones que le brindan al individuo efectos beneficiosos durante los primeros meses de vida donde este se encuentra desprotegido inmunológicamente. Es importante destacar que al evaluar los resultados obtenidos se observó escaso crecimiento de *Candida albicans* sobre esta cepa de lactobacilos, lo que permite sugerir la difusión de un péptido antimicrobiano sobre la superficie del agar, impidiendo así el crecimiento de la levadura sobre el medio control.

Dentro de los factores de riesgo requeridos para la colonización de *Candida* se incluyen las particularidades del hongo, especialmente sus mecanismos de adhesión a las células epiteliales y características acidogénicas y heterofermentativas, así como factores locales de la mucosa bucal. Aunado a las características del hongo, se adiciona la predisposición de los pacientes diabéticos y la condición inmune del hospedero, en el caso de los pacientes inmunosuprimidos. Así, *Candida* se favorece de la poca respuesta inmunológica que presenta el individuo, instalándose como patógeno oportunista. Por otra parte, en el caso de pacientes diabéticos, los elevados niveles de glucosa en los fluidos tisulares, favorecen el desarrollo de la levadura, lo que sugiere que existe una relación directamente proporcional entre el grado de colonización en la cavidad bucal y los niveles de glucosa sanguínea (Torrealba et al, 2016). Se observó como los mecanismos empleados por dicha levadura, fueron completamente diferentes en ambos casos, sin embargo, es necesario resaltar que los resultados de esta investigación no se vieron condicionados por el origen de las cepas de *Candida*, pues para ambos casos los hallazgos fueron similares.

Existen diversas metodologías que permiten evaluar el efecto antagónico de los microorganismos. En el año 2016 Schlaefli y Paz estudiaron la actividad antagónica de lactobacilos probióticos comerciales sobre cepas de

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Candida albicans, empleando la técnica de difusión por pozos de Kirby Bauer, quienes no lograron evidenciar la antibiosis de las cepas estudiadas. El uso de la técnica descrita por Gerreiro (2013), permitió demostrar la inhibición de lactobacilos probióticos sobre *Candida*, esta divergencia se presenta por el tiempo de incubación de los lactobacilos, pues para observar la inhibición del crecimiento de la levadura es necesario permitir el desarrollo de sustancias fungicidas y fungistáticas.

Por último, Matsubara (2011) indicó que el tratamiento con Lactobacilos puede ser una alternativa para la disminución de *Candida albicans* en cavidad bucal. Así mismo, Pereira (2015) señaló que los Lactobacilos producen sustancias con actividad antifúngica que modifican el ambiente y perjudican el crecimiento de las levaduras, alterando así la expresión de factores de virulencia, y por ende la patogenicidad del microorganismo. De igual manera, Mendoça (2012) plantea que algunos probióticos tienen la capacidad de adherirse a la pared epitelial, compitiendo con patógenos por los receptores y nutrientes, estimulando así la respuesta inmune. Es por ello, que los hallazgos de esta investigación, respaldados por las conclusiones de otros autores nos permiten sugerir, la utilización de Lactobacilos probióticos como opción terapéutica en la candidiasis bucal ocasionada por *Candida albicans,* pues permite potenciar el efecto del tratamiento antimicótico principal, generando otros beneficios como la disminución de la tolerancia y la toxicidad, así como reducción de la dosis y los efectos secundarios de los diferentes fármacos.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Las cepas de Lactobacilos probióticos evaluadas, presentaron efecto antagónico total o parcial sobre las cepas de *Candida albicans.* Se observó inhibición total en un 66,66% e inhibición parcial en el 21,66% de las cepas evaluadas, por lo que dichas bacterias pueden considerarse una opción terapéutica adyuvante.
- El efecto antagónico no se vio condicionado por el origen de las cepas de *Candida*, observándose un resultado similar tanto en las cepas provenientes de pacientes diabéticos tipo 2 como las provenientes de pacientes portadores de VIH.
- La cepa R71 demostró el mejor comportamiento produciendo inhibición total del crecimiento de *Candida albicans* en el 91,66% de las cepas evaluadas.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Recomendaciones

- Evaluar la actividad antagónica de los Lactobacilos probióticos farmacéuticos, sobre *Candida albicans* y no *albicans*, aisladas de lesiones bucales.
- Continuar el estudio del comportamiento de estas bacterias probióticas sobre microorganismos de origen nosocomial o de interés en salud pública.
- Realizar ensayos clínicos para evaluar el comportamiento *in vivo* de los Lactobacilos probióticos como opción terapéutica en el tratamiento de lesiones bucales candidiasicas.
- Establecer la metodología empleada en esta investigación como técnica de elección para pruebas de antagonismo microbiológico.
- Formular preparados farmacéuticas dirigidos al tratamiento de la candidiasis bucal que garanticen un efecto beneficioso en los pacientes.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

Aguirre, J. (2002). Candidiasis Orales. *Revista Iberoamericana de Micología*. 19, 17-27.

Andrade, M. (2011). Identificación de las especies del género *Candida* en gestantes con Candidiasis vulvovaginal, que acuden al hospital Gineco-Obstetrico Dr. Jaime Sánchez. Porcel Sucre 2011. Bolivia.

Angarita, L. (2008). Antibiosis. Recuperado de http://es.scribd.com/doc/3288649/ANTIBIOSIS#scribd.

Arias, F. (2006). *Introducción a la Metodología Científica 5ta edición*. Caracas-Venezuela: Epistime.

Barrios, A. (1996). *Microbiología General*. Universidad de los Andes, Mérida Venezuela.

Bautista, M. (2004). *Manual de Metodología de Investigación*. Caracas-Venezuela: Talipip

Castrillon, L., Palma, R., & Padilla, D. (2005). Factores de virulencia de *Candida sp. Revista Mexicana de Dermatología*. 49, 12-27.

Castro, L. & De Roveto, C. (2006, diciembre). Probioticos. Utilidad Clinica. *Colombia Medica*. 37, 308-314.

De las Cagigas, A. & Blanco, J. (2002). Prebioticos y probioticos, una relacion beneficiosa. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*. 16, 63-68.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Del Campo, M. & Gomez, H. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y actividad bacteriocinogenética aisladas de quesos frescos. *e-Gnosis*. 6, 1-17.

Guerreiro, J. (2013). Validación de dos posibles mecanismos de acción de dos probioticos contra *Candida* spp. aisladas de usuarios de prótesis totales. (Tesis de Maestria). Universidad de Sao Paulo, Brasil.

Gutierrez, A. & Acosta, E. (2008). Determinación del potencial bactericida In vitro de un aislado nativo de *Lactobacillus cassei* frente *E. coli. Revista Lasallista de investigación*. 5, 68-73.

Kaufmann, S. (2008). Elie Metchnikoff's and Paul Ehrlich's impact on infection biology. *Microbes and Infection*. 10, 1417-1419.

www.bdigital.ula.ve

Kolida, S. (2006). Gastrointestinal microflora: probiotics. *Advances in Applied Microbiology*. 59, 187-219.

Lazarde, J. & Avilan, I. (2003). Candidiasis eritematosa de la cavidad bucal. Reporte de un caso y revisión de la literatura. *Acta Odontológica Venezolana V41n3*.

López, M. & Domingo, D. (2007). Antibioticoterapia con probióticos. *Revista Española de Quimioterapia*. 20 (2), 170-181.

Madigan, M. (2004). *Biología de los microorganismos*. España: Pearson pretice hall.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Madigan, M., Takagi, A., Ikimura, H., Matsuguchi, T. & Yokokura, T. (2004) Intestinal microflora: probiotics and autoimmunity. *The Journal of Nutrition.* 137, 798S-802S.

Manzano, C., Estupiñan, D. & Proveda, L. (2012, Marzo). Efectos clínicos de los probióticos: qué dice la evidencia. *Revista Chilena de Nutrición*. 39 (1), 98-110.

Matsubara, V. (2011). Colonización oral experimental por *Candida albicans* en pacientes inmunosuprimidos y tratados con *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacilllus rhamnosus*. (Tesis de Maestria). Universidad de Sao Paulo, Brasil.

Mendonça, F., Santos, S., Faria, I. & Gonçalves, C. (2012). Effects of Probiotic Bacteria on Candida Presence and IgA Anti-Candida in the Oral Cavity of Elderly. Brazilian Dental Journal. 23, 534-538.

www.bdigital.ula.ve

Montero, P., Diaz, A. & Duran, M. (2015). Acción antagónica de *Lactobacillus* spp. frente a *Staphylococcus aureu*s encontrados en queso de capa de Mompox – Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomia*. 68, 7721-7727.

Moreno, R., Salas, E., Perez, C. & Jimenez, J. (2012). Estudio preliminar de la actividad antagónica sobre microorganismos patógenos de cepas de *Lactobacillus* aisladas a partir de heces de lactantes y leche materna. *Revista Ciencia*. 20, 109-115.

Müller, D., Carrasco, M,. Simonetta, A. & Tonarelli, G. (2001). Bioactive peptides produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. Characterization and partial purification. *American Peptide Symposia*. 7, 772-775.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Murray, P. (2008). *Microbiologia Medica*. España: Elsevier.

Niedzielin, K., Kordecki, H. & Birkenfeld, B. (2001). A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 13.

Panizo, M. & Reviakina, V. (2001). *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia*. 21, 38-45.

Pereira, M., Goncalves, C., Ferreira, S. & Correa, P. (2015). *Lactobacillus rhamnosus* pode alterar la virulencia de *Candida albicans. Revista Brasileira de Ginecología y obstetricia*. 39 (7), 17-20.

www.bdigital.ula.ve

Rodrigues, J. & Rodrigues, M. (2011). Probioticos - Revisando la literatura. *Revista Brasilera de ciencias de la salud*. 15, 487-492.

Rodríguez,. Van der Heijden, I., Costa, S., Sousa, A., Sienra, R. & Gobara, S. (2011). *Candida* colonization as a source for Candidaemia. Journal of Hospital Infection. 7, 9-16.

Rondón, L., Salvatierra, A. & Meneses, R. (2015). Probióticos: Generalidades. *Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría.* 78, 123-128.

Schlaefli, A. & Paz, I. (2016). Actividad antagónica de Lactobacilos probióticos farmacéuticos y el fluconazol sobre *Candida albicans* aisladas de

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

pacientes con estomatitis subprotésica grado II. (Tesis de Pregrado). Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

Stanier (1984). *Microbiología*. España: Reverte s.a.

Torrealba, B., Vielma, R., Salas, E., Carrero,S., Martinez., Moreno, C., Varela, Y. & Jimenez, J. (2016). Especies de Candida asociadas a lesiones bucales en pacientes con diabetes tipo 2. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiologia*. 36, 58-62.

Tortora et al. (2007). *Introducción a la Microbiología.* Argentina: Médica Panamericana. 9° edición.

Varela, Y. et al. (2014). Especies de *Candida* colonizantes de cavidad oral en pacientes pediátricos oncológicos hospitalizados en el IAHULA, Mérida, Venezuela*. Revista Venezolana de Microbiología*. 34 (1), 22-29.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)