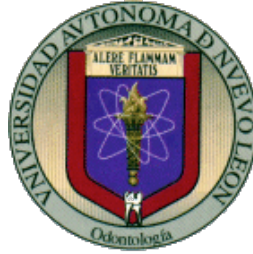


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



IMPACTO DE *Lactobacillus casei* **Shirota** EN EL DESARROLLO DE *Streptococcus mutans* EN PACIENTES CON APARATOLOGÍA ORTODÓNTICA

Por

DELIA ISABEL ARMENDÁRIZ ARIAS

MÉDICO ESTOMATÓLOGO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

2011

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

Diciembre, 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS CON ORIENTACIÓN EN
ODONTOPEDIATRÍA

Los miembros del jurado aceptamos la investigación y aprobamos el documento que
avala la misma, como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias
Odontológicas en el Area de Odontopediatria

HONORABLES MIEMBROS DEL JURADO

Presidente

Secretario

Vocal

IMPACTO DE *Lactobacillus casei* **Shirota** EN EL DESARROLLO DE *Streptococcus mutans* EN PACIENTES CON APARATOLOGÍA ORTODÓNICA

Comité de Tesis

Dra. Myriam Angélica de la Garza Ramos
Director de Tesis

Dra. Erandi Escamilla García
Co-Director

M.S.P Lic Gustavo Israel Martínez González
Asesor Estadístico

IMPACTO DE *Lactobacillus casei* **Shirota** EN EL DESARROLLO DE *Streptococcus mutans* EN PACIENTES CON APARATOLOGÍA ORTODONTICA

Dra. Martha Elena García Martínez
Coordinadora de Posgrado de Odontopediatría

Dr. Sergio Eduardo Nakagoshi Cepeda
Sub-Director de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS:

Por medio de esta sección quiero ampliamente agradecer a todas las personas que se han involucrado en este proyecto desinteresadamente, primero que nada quiero agradecer inmensamente a Dios y a la Virgen Maria por estar conmigo en cada paso que doy, y por llenar de bendiciones mi vida en todos los sentidos y poner a todas estas personas en mi camino para poder lograr una meta más.

A mi familia por siempre estar conmigo, por su apoyo incondicional en todos los sentidos, por impulsarme a más, por ser siempre mi pilar y mi mayor motivación, son mi motor para seguir, los amo mucho. En particular a mis padres por sus valores, su ejemplo, y porque gracias a ustedes he llegado hasta donde estoy.

A mi directora de tesis, la Dra. Myriam de la Garza Ramos por asesorarme en este proyecto e involucrarse de manera desinteresada, por poner su tiempo y apoyo, por su motivación.

A la Dra. Erandi Escamilla García que ha aportado mucho ha este proyecto, por compartir su experiencia, conocimiento e inteligencia, por estar ahí para mi siempre durante este proceso, por su ayuda incondicional y su dedicación, por su compromiso y profesionalismo.



CONACYT Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el periodo de Agosto 2013 a Julio 2014 con número de registro 546513 para la realización de este proyecto.



A la Universidad Autónoma de Nuevo León gracias por darme la oportunidad de formar parte de su gupo estudiantil, al Posgrado de Odontopediatría por ser sede de este proyecto y mi casa de estudios de posgrado, a mi coordinadora, sub-coordinadora y a todos mis maestros por ser parte de mi formación tanto académica como personal, por su enseñanza y entrega. A todas las personas que laboran ahí por ser parte de esto también.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN
Y DESARROLLO EN
CIENCIAS DE LA SALUD - UANL**

Muchas gracias por darme la oportunidad de realizar el estudio en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). En donde me facilitaron todo el equipo requerido e instrumental, sin ello esto no hubiera sido posible, a todas las personas que laboran ahí, por su ayuda, ideas y su amabilidad siempre.

A la Dra Hilda Torre Martínez por su apoyo y paciencia durante la realización de la tesis, por saber guiarme desde el inicio, hasta el término de esta.

Al M.SP. Gustavo Israel Martínez González por su colaboración.

A la Químico Bacteriólogo Parasitólogo (QBP), Vilma Rosa Suárez Martínez por su paciencia, enseñanza, y ayuda incondicional. A la Dra. Alejandra Cantú Tamez por su espíritu de servicio ante todo lo que se presentaba.

A mis compañeras de maestría por ser más que unas amigas y compañeras, por ser unas hermanas en todo el sentido de la palabra, por experimentar toda esta aventura a mi lado, por su apoyo, su positivismo, su compañerismo.

Mi más sincero agradecimiento al comité de tesis, que desde el inicio de este proyecto aportaron su experiencia y tiempo, desde la elaboración del protocolo hasta el manuscrito final corregido.

Muchas gracias a todas las personas que tanto directamente como indirectamente estuvieron ahí, por su preocupación, apoyo, consejos, por su entrega.

A todos mis pacientes por su confianza y colaboración, sin su ayuda esto no hubiera sido posible.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	5
LISTA DE TABLAS.....	10
RESUMEN.....	11
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	15
2. HIPÓTESIS.....	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo general.....	18
3.2 Objetivos particulares.....	18
4. ANTECEDENTES.....	19
4.1 Propiedades de los Probióticos en Cavidad Bucal	22
4.2 Maloclusión	22
4.3 Aparatos Ortodónticos	23
4.4 Caries Dental	24
4.5 Probióticos en Caries Dental	26
4.6 <i>Lactobacillus casei</i> Shirota (LcS).....	27
4.7 Los Probióticos en Aparatología Ortodóntica	27
4.8 pH salival	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
5.1 Universo de estudio.....	29
5.2 Determinación del tamaño de la muestra.....	30
5.3 Descripción de procedimientos.....	31
5.3.1 Validación de datos.....	40
6. RESULTADOS.....	41
7. DISCUSIÓN.....	50
8. CONCLUSIONES.....	53
9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍAS.....	54

ANEXOS A	58
ANEXOS B	61

LISTA DE TABLAS	Página
I. Microorganismos catalogados como probióticos.....	23
II. Absorbancia promedio de <i>S. mutans</i> manifestado por día, de todos los pacientes del grupo experimental (muestra matutina)	59
III. Concentración celular promedio de <i>S. mutans</i> manifestado por día, de todos los pacientes del grupo experimental (muestra matutina).....	59
IV. Valor del pH promedio de <i>S. mutans</i> manifestado por día, de todos los pacientes del grupo experimental (muestra matutina).....	59
V. Absorbancia promedio de <i>S. mutans</i> manifestado por día, de todos los pacientes del grupo experimental (muestra vespertina).....	59
VI. Absorbancia promedio de <i>S. mutans</i> manifestado por día, de todos los pacientes del grupo control.....	60
VII. Concentración celular promedio de <i>S. mutans</i> manifestado por día, de todos los pacientes del grupo control.....	60
VIII. Valor del pH promedio de <i>S. mutans</i> manifestado por día, de todos los pacientes del grupo control.....	60

RESUMEN

Delia Isabel Armendáriz Arias

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Odontología

Maestría en Ciencias Odontológicas con Orientación en Odontopediatría

Título del estudio: Impacto de *Lactobacillus casei* **Shirota** en el desarrollo de *Streptococcus mutans* en pacientes con aparatología ortodóntica.

Páginas: 67

Introducción: La flora microbiana de la boca contiene una amplia variedad de especies bacterianas; condiciones ambientales tales como temperatura, salinidad, oxígeno, nutrientes y pH, tienen un impacto en el ecosistema y contribuyen a la composición de especies en el biofilm. *Streptococcus mutans* es una bacteria eficiente para sintetizar glucanos extracelulares, factor de virulencia clave que contribuye a la patogénesis de la caries dental. La estimación de los niveles de *S. mutans* puede ser útil para la evaluación de riesgo de caries en los pacientes y para el seguimiento de su respuesta a las medidas preventivas. Se ha demostrado que el equilibrio entre las bacterias benéficas y patógenas es esencial para mantener la salud oral. El probiótico utilizado fué *Lactobacillus casei* **Shirota**, se encuentra en la bebida de leche fermentada del Yakult. Cada envase contiene 80 mL con un mínimo de 10^8 UFC/mL viables. **Propósito:** Determinar el efecto del consumo de la bebida probiótica sobre el desarrollo de *Streptococcus mutans* en pacientes con tratamiento ortodóntico. **Materiales y Métodos:** Se crearon 2 grupos de estudio, con 20 pacientes de entre 4 y 18 años con aparatología ortodóntica que acuden al Posgrado de Odontopediatría de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), cada grupo consta de 10 pacientes, la muestra se cultivó en un medio de cultivo selectivo, Agar Mitis Salivarius Bacitracina (MSB, BD Difco) y el resultado se obtuvo obteniendo la concentración celular por mL. **Resultados:** La concentración de *S. mutans* por mililitro, mostró una mayor concentración de células el día 3 con 212.89×10^8 /ml con una desviación estándar de ± 368.10 , sin embargo, en el resto de los días (4, 5, 6 y 7) los valores fueron inferiores a 91.82×10^8 (± 242.95) células/mL. En cuanto al pH, el más bajo correspondió al día 3 con un valor de 6 (± 1.51), el cual se adjudica a un paciente en particular que manifestó durante los primeros tres días un pH muy ácido de 4.0 a 5.5 (grupo control). **Conclusión:** Los resultados obtenidos no muestran relación con los trabajos previamente realizados con productos probióticos, solo en un paciente del grupo experimental se observó disminución en su valor de concentración celular.

Director de Tesis: PhD, Miryam Angélica de la Garza Ramos

Área de estudio: Odontopediatría

Palabras clave: *S. mutans*, *L. casei Shirota*, aparatos ortodónticos

ABSTRACT

Study title: *Lactobacillus casei Shirota* impact on the development of *Streptococcus mutans* in patients with orthodontic appliances

Pages: 67

Introduction: The microbial flora of the mouth is very complex, containing a wide variety of bacterial species. Environmental conditions such as temperature, salinity, oxygen, nutrients and pH, have an impact on the ecosystem and contribute to the composition of species in the biofilm. *Streptococcus mutans* is a gram positive bacteria found in the oral cavity, it is efficient to synthesize extracellular glucans key factor that contributes to the pathogenesis of dental caries in humans virulence. The estimation of the levels of *S. mutans* can be useful for assessing caries risk in patients and to monitor their response to preventive measures. It has been shown that the balance between beneficial and pathogenic bacteria is crucial in order to maintain oral health. Therefore, the oral cavity has been suggested as relevant target for the use of probiotics site given its antimicrobial properties. The probiotic used for this study was *Lactobacillus casei* **Shirota**, a lactic acid bacteria founded in the fermented milk drink Yakult. Each bottle contains 80 mL of Yakult with at least 10^8 CFU/ mL viable *L. casei* **Shirota**. **Purpose:** Determine the effect of consumption of probiotic drink on the development of *Streptococcus mutans* in patients with orthodontic treatment. **Material and Methods:** 2 study groups with 12 patients between 4 and 18 years with orthodontic appliances, the experimental group consists of 7 patients taking probiotic drink (Yakult) plus toothbrushing with 2 doses daily saliva, one in the morning on rising and after the seizure of Yakult after meals and before brushing. The control group consisted of 5 patients where only a test of saliva was taken daily to get up before toothbrushing. The sample was cultured in a selective medium, Bacitracin mitis salivarius agar (MSB, BD Difco) and the result was obtained by obtaining cellular mL concentration.

Results: The concentration of *S. mutans* per milliliter showed a greater concentration of cells on day 3 with 212.89×10^8 / ml with a standard deviation of +368.10 , however, on other days (4 , 5, 6 and 7) values were lower than 91.82×10^8 (+242.95) cells / mL . As to pH , the lowest corresponded to day 3 with a value of 6 (+1.51) , which in a particular patient expressed during the first three days very acidic pH of 4.0 to 5.5 (control group) awarded . **Conclusion:** The results show no relation to the previously realized work with probiotic products, only one patient in the experimental group was observed decrease in value of cell concentration.

Director of Thesis: PhD, Myriam Angélica de la Garza Ramos

Area of Study: Pediatric Dentistry

Keywords: *S. mutans*, *L. casei* **Shirota**, orthodontic appliances

1. INTRODUCCIÓN:

La flora microbiana de la boca es muy compleja, contiene una amplia variedad de especies bacterianas. Los tipos más comunes de enfermedad oral son la caries y la

enfermedad periodontal, ambas relacionadas con la placa dental y ocurren cuando se altera el equilibrio de la cavidad oral conteniendo la flora normal.

Las condiciones ambientales como temperatura, salinidad, oxígeno, nutrientes y pH, tienen un impacto en el ecosistema y contribuyen a la composición de especies en el biofilm.

Streptococcus mutans es una bacteria gram positiva que se encuentra en cavidad oral, es eficiente para sintetizar glucanos extracelulares, que es el factor de virulencia clave que contribuye a la patogénesis de la caries dental en los seres humanos. La estimación de los niveles de *S. mutans* puede ser útil para la evaluación de riesgo de caries en los pacientes y para el seguimiento de su respuesta a las medidas preventivas.

Otro factor etiológico importante a considerar es el pH ácido o básico y la capacidad de amortiguación que estabiliza el pH salival. En otras palabras, si aumenta la capacidad buffer, el pH de la boca fluctúa menos. Cuando el pH de la boca disminuye (o se convierte en ácido), bacterias cariogénicas prosperan, por lo que el biofilm saludable puede transformarse en biofilm cariogénico.

En pacientes con aparatología ortodóntica las áreas de retención de los alimentos y la acumulación de la placa se incrementan dramáticamente y esto se transformaría en un sustrato como fuente de carbono principalmente, que generará cambios en la flora microbiana, cambios en la capacidad buffer, acidez en el pH y el flujo salival también se ve alterado.

Investigaciones actuales han demostrado que el equilibrio entre las bacterias benéficas y patógenas es esencial con el fin de mantener la salud oral. Por lo tanto, la cavidad bucal ha sido el sitio sugerido recientemente como un objetivo relevante para aplicaciones probióticas.

La definición de más aceptada de probióticos los define como “microorganismos vivos, que si se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio de salud al huésped”.

El probiótico utilizado para este estudio fue *Lactobacillus casei* **Shirota**, una bacteria

ácido láctica que se encuentra en la bebida de leche fermentada del Yakult. Se considera un probiótico debido a su capacidad para modular la composición y la actividad metabólica de la flora intestinal, así como para mejorar el sistema inmunológico humano sano. Cada envase de Yakult contiene 10^8 UFC/mL viables de *Lactobacillus casei* **Shirota**.

2. HIPÓTESIS:

H₁: La presencia *Lactobacillus casei* **Shirota** en la cavidad bucal disminuye el desarrollo

o aparición de *S. mutas* y mantienen el pH estable en pacientes con aparatología ortodóntica.

H₂: La presencia de *Lactobacillus casei* **Shirota** en la cavidad bucal no disminuye el desarrollo o aparición de *S. mutas* y no mantiene el pH estable en pacientes con aparatología ortodóntica.

3. OBJETIVOS:

Objetivo general:

Determinar la presencia de *Streptococcus mutans* en pacientes de 4 a 18 años de edad que acudieron al Posgrado de Odontopediatría de la FO de la UANL con tratamiento

ortodóntico, mediante el consumo de una bebida probiótica que contiene *Lactobacillus casei Shirota* (Yakult).

Objetivos específicos:

- 1: Evaluar durante 7 días los cambios en el desarrollo del *S. mutans* en saliva de pacientes con aparatología ortodóntica que consumen la bebida probiótica (grupo experimental).
- 2: Evaluar durante 7 días los cambios en el desarrollo del *S. mutans* en saliva de pacientes con aparatología ortodóntica que no consumen la bebida (grupo control).
- 3: Comparar el desarrollo de *S. mutans* del grupo experimental y con el grupo control.
- 4: Evaluar el pH salival matutino en ambos grupos durante 7 días

Especificaciones del estudio:

- 1: Abierto: por no tener una característica metodológica determinada.
- 2: Longitudinal: porque existe un lapso de tiempo entre las distintas variables, de forma que puede establecerse una secuencia temporal entre ellas.
- 3: Prospectivo: porque los pacientes son incluidos a partir del momento en que se decide su comienzo.
- 4: Comparativo: por la comparación de las variables del grupo experimental y grupo control.
- 5: Experimental: estudio prospectivo, en los que se va a valorar el efecto de una o varias intervenciones.

ANTECEDENTES:

El término probiótico se deriva del griego, que significa "en pro de la vida" (Reid G et al., 2003).

La teoría o hipótesis de que ciertas bacterias pueden tener efectos benéficos sobre la salud fue presentado a principios de 1900 por el premio Nobel Elie Metchnikof, inmunólogo ruso (Bonifait L et al., 2009), Afirmó que el consumo de productos lácteos fermentados llevó a la salud y la longevidad de los campesinos búlgaros. Por otra parte, señaló que las bacterias lácticas contenidas en el yogur fueron capaces de proteger al intestino de los efectos destructivos de otras bacterias patógenas (Abbas Ali et al., 2013).

La idea era que las bacterias en los productos fermentados compitieron con los microorganismos que son perjudiciales para la salud (Sullivan and Nord, 2002).

Lilly y Stillwell fueron los primeros en utilizar el término "probióticos" en 1965, lo utilizaron para describir aquellas sustancias secretadas por un microorganismo que estimula el crecimiento de otro, en contraposición al término antibiótico, entendido como cualquier compuesto químico utilizado para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos. Sin embargo el concepto no era totalmente correcto. Posteriormente Parker definió a los probióticos como microorganismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal. En 1989, Fuller intentó mejorar la definición hecha por Parker, y definió "probiótico" como cualquier suplemento alimenticio vivo que beneficia al huésped mediante la mejora de su equilibrio microbiano intestinal. Desde entonces, la definición de probiótico ha evolucionado (Sugumari et al., 2012; Amores et al., 2004).

La definición de "probióticos" adoptada por la Asociación Científica Internacional, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas (ONU) para la Agricultura y la Alimentación los menciona como "microorganismos vivos, que si se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio de salud al huésped" (Li-Chuan et al., 2011). Esta es la definición que se debe utilizar, y no referirnos a ellos como agentes bioterapéuticos (Reid et al., 2003).

Los prebióticos se definen generalmente como ingredientes alimentarios que afectan benéficamente al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y / o

actividad de una o un número limitado de especies bacterianas ya establecidos en el colon, y por lo tanto mejorar la salud del huésped (WHO 2002).

Los simbióticos se definen como mezclas de probióticos y prebióticos que afectan benéficamente al huésped mediante la mejora de la supervivencia y la implantación de los suplementos alimenticios microbianos vivos en el tracto gastrointestinal del huésped (Sugumari et al., 2012).

Durante las últimas dos décadas (promoción de la salud) los microorganismos probióticos se han incluido cada vez más en diversos tipos de productos alimenticios, especialmente en leches fermentadas (Saarela M et al., 2000).

Entre los beneficios a la salud que se han reportado se encuentran: a) Equilibrio en la flora intestinal, b) Prevención y tratamiento de la diarrea, efectos sobre el estreñimiento leve, mejorar la digestión de la lactosa en los pacientes con intolerancia a ésta, c) Reducción de actividad de enzimas pro-cancerígenas, Inmunoestimulador, tratamiento de gastritis y úlceras, se han reportado estudios para la prevención y tratamiento de infecciones urinarias, reducción del colesterol, d) Infecciones respiratorias, otitis media y caries entre otros (Amores et al., 2004).

Para ser llamado un probiótico, una cepa bacteriana debe estar completamente caracterizada. El género y la especie del microorganismo deben ser identificados de acuerdo con los métodos aceptados internacionalmente, y su nomenclatura corroborados por referencia a las listas aprobadas de nombres bacterianos.

Además, estudios tanto *in vitro* como *in vivo* deben llevarse a cabo pruebas e investigaciones para demostrar el mecanismo de acción de los probióticos, de tal manera que se pueda predecir su aplicación y efectos secundarios potenciales.

La FAO y la OMS han recomendado que las cepas bacterianas probióticas se caracterizan por su espectro de resistencia a los antibióticos, sus actividades metabólicas y hemolíticas, su capacidad de producir toxinas, su poder infeccioso en modelos animales inmunosuprimidos y sus efectos secundarios en los seres humanos.

Los probióticos que se han caracterizado deben pasar ensayos clínicos aleatorios. Los

resultados de estos estudios deberán demostrar una mejoría en la salud de los participantes y su calidad de vida (Bonifait et al., 2009).

El efecto protector de los probióticos se realiza mediante 2 mecanismos: el antagonismo que impide la multiplicación de los patógenos y la producción de toxinas que imposibilitan su acción patogénica. Este antagonismo está dado por la competencia por los nutrientes o los sitios de adhesión.

Mediante la inmunomodulación protegen al huésped de las infecciones, induciendo a un aumento de la producción de inmunoglobulinas, aumento de la activación de las células mononucleares y de los linfocitos (Cagigas and Blanco, 2002).

Entre los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran las bacterias ácido lácticas, que agrupan una gran cantidad de géneros que incluyen un considerable número de especies. Las cepas utilizadas generalmente pertenecen a especies de los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus* y *Bifidobacterium* (Amores et al., 2004)

Tabla 1. Microorganismos catalogados como probióticos

Microorganismos usados como probióticos

<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.	Otras especies
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. lactis</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecium</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>L. lactis</i>	<i>B. longum</i>	<i>L. cremoris</i>	<i>S. lactis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>cerevisiae</i>
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>L. diacetyllactis</i>				<i>Saccharomyces</i>
<i>L. rhamnosus</i> GG	<i>B. breve</i>					<i>boulardii</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. Lactis</i>					<i>Leuconostoc</i>
<i>L. kefir</i>	<i>B. adolescentis</i>					<i>spp.</i>
<i>L. brevis</i>						
<i>L. reuteri</i>						
<i>L. helveticus</i>						
<i>L. plantarum</i>						
<i>L. johnsonii</i>						
<i>L. salivarius</i>						

4.1 PROPIEDADES DE LOS PROBIÓTICOS EN CAVIDAD BUCAL:

Las propiedades de los probióticos que se han encontrado a nivel bucal podrían ser:

- Unión a la superficie dental
- La producción de sustancias antimicrobianas contra los patógenos orales (producción de peróxido de hidrógeno)
- Alteración del medio ambiente (modulación del pH y / o el potencial de oxidación-reducción, que pone en peligro la capacidad de los patógenos a que se establezcan.)
- Reducción de la respuesta inflamatoria (inmunomodulación), (Twetman, 2012; Bonifait, 2009).

4.2 MALOCLUSIÓN

La maloclusión es uno de los problemas dentales más comunes, durante las últimas tres décadas ha habido un aumento general en la preocupación de la gente con la estética personal y su conciencia de la maloclusión, lo que ha dado lugar a un notable aumento de la demanda de un tratamiento de ortodoncia. Las maloclusiones son la 3a causa más común de la cavidad oral (Lara-Carrillo et al., 2010).

La maloclusión se define como una irregularidad de los dientes o de una posición incorrecta de los arcos dentales que se encuentran fuera del rango ideal. Además de esta irregularidad de los dientes o los maxilares, una maloclusión puede causar problemas periodontales, alteraciones de la función oral, como la masticación, la deglución y el habla y problemas psicosociales relacionados con la estética dentofacial (Ruhi et al., 2012).

4.3 APARATOS ORTODÓNTICOS

La Ortodoncia provoca cambios dentales y/o ortopédicos mediante la aplicación de fuerzas, esta misma aplicada sobre un cuerpo origina una potencia de la misma magnitud y trayectoria, pero en sentido contrario (Acción - reacción) para responder a esta ley de la dinámica, dentro de la aparatología Ortodóntica tendremos en cuenta la existencia de elementos retentivos que se oponen a elementos activos (Generadores de Fuerza). Los aparatos pueden ser removibles o fijos.

Por la alta incidencia de pacientes que requieren este tratamiento, es de suma importancia encaminar de manera preventiva las consecuencias que pudieran tener, entre gingivitis, caries dental, periodontitis ya que la retención de la placa dentobacteriana al aparato aunado a un cepillado deficiente, nos habla de factores de riesgo para el paciente. Además, el complejo diseño de bandas y brackets de ortodoncia puede crear un ambiente ecológico que facilita la creación y el crecimiento de las cepas de *S. mutans*.

La formación de una lesión de mancha blanca puede ser visto como un desequilibrio entre la pérdida de mineral y ganancia mineral. También se han observado cambios en la capacidad buffer, acides del pH y el flujo saliva (Carrillo et al., 2010).

A partir de los primeros instantes posteriores a la cementación de los dispositivos, las áreas para la retención de los alimentos y la acumulación de la placa se incrementan dramáticamente, la placa bacteriana que no sea removidas adecuadamente, se convertirán en un sustrato que generará cambios cuantitativos en la flora microbiana (Marín, 2007).

4.4 CARIES DENTAL:

La caries dental es considerada un problema de salud pública a nivel mundial debido a su alta prevalencia y el impacto social significativo. La OMS reporta un porcentaje de entre 60 a 90% de niños en edad escolar en todo el mundo tienen caries, siendo más prevalente en países asiáticos y latinoamericanos debido a factores dietéticos y ambientales (Lonim et al., 2013).

La flora microbiana de la boca es muy compleja, contiene una amplia variedad de especies bacterianas. Los tipos más comunes de enfermedad oral son la caries y la enfermedad periodontal, ambos relacionados con la placa dental y parecen ocurrir cuando se altera el equilibrio normal entre los microorganismos y el anfitrión de alguna manera (Hardie, 1992).

El entorno de la cavidad oral se transforma constantemente con la edad, y por lo tanto la flora oral, cambia también, en la vida intrauterina se encuentra en un ambiente libre de bacterias, y la primera colonización es por el canal de parto, (Struzycka, 2014). Durante los 2 primeros meses de vida las bacterias colonizan solo las superficies mucosas, y con la erupción de los dientes deciduos, estas superficies se colonizan, los factores cambiantes como alimentación, la erupción de los dientes permanentes, extracciones,

caries, obturaciones, prótesis dentales y, a veces ser edentulo, pueden afectar el ecosistema de la flora oral (Tweman et al., 2000). Pueden observarse cambios en la estabilidad también por la dieta, la variabilidad en el flujo salival, o el uso a largo plazo de antibióticos (Sheiham, 2001; Nasidze *et al.*, 2009).

Las condiciones ambientales como temperatura, salinidad, oxígeno, nutrientes y pH tienen un impacto en el ecosistema y contribuyen a la composición de especies en el biofilm (Takahashi and Nyvad, 2011).

La placa dental es una comunidad permanente compleja, y la presencia de un gran número con la presencia de un gran número de especies autóctonas sin correlación con caries o enfermedad periodontal. Es el balance entre estas especies, características anatómicas del diente, la dieta, la higiene que cuando se desequilibra nos lleva a una enfermedad (Liljemark and Bloomquist, 1996).

La caries dental se asocia generalmente con un mayor número de *S. mutans* y lactobacilos en los sitios de la enfermedad (Hardie, 1992).

En un estudio realizado por Rosenbloom y Tinanoff en 1991, se evaluaron los niveles de *S. mutans* en saliva en pacientes antes, durante y después del tratamiento ortodóntico, en donde como resultado obtuvo que los niveles de esta bacteria aumentan considerablemente durante el tratamiento activo ortodóntico (Rosenbloom, Tinanoff, 1991).

Cephas y colaboradores en el 2011, observaron la diversidad en la composición bacteriana en saliva entre adultos y niños, predominando en pacientes jóvenes el *S. mutans*. Los *Streptococcus* son los principales agentes causantes de la formación de placa; y el *S. mutans* es el agente etiológico principal en la placa dental y caries.

S. mutans es una bacteria gram positiva que se encuentra en cavidad oral, es eficiente para sintetizar glucanos extracelulares, que es el factor de virulencia clave que contribuye a la patogénesis de la caries dental en los seres humanos (Salehi et al., 2014). Es el

organismo cariogénico llave de acuerdo con la "hipótesis de la placa específica" y se ha realizado una cantidad considerable de investigación sobre el papel de este organismo en la causa de la caries y como un factor de riesgo alto. (Holbrook and Magnúsdóttir, 2012). Estos patógenos productores de ácido causan el daño mediante la disolución de las estructuras del diente en presencia de hidratos de carbono fermentables tales como sacarosa, fructosa y glucosa (Hakan et al., 2013).

La estimación de los niveles salivares de estos organismos como *S. mutans* puede ser útil para la evaluación de riesgo de caries en los pacientes y para el seguimiento de su respuesta a las medidas preventivas (Hardie, 1992).

En un estudio realizado por Lara-Carrillo y su equipo (2010), se trabajó con 34 pacientes de 16.2 ± 3.4 años de edad en la Clínica de Ortodóncia de la Universidad Autónoma de Mexico (UAM), Aquí se observaron cambios en las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *S. mutans* en pacientes con aparatología ortodóntica. Antes del tratamiento 14/34 tenían valores altos ($>10^5$) UFC/mL; y después de 1 mes de la cementación de bandas, 16/34 mostraron valores altos.

4.5 PROBIÓTICOS EN CARIES DENTAL:

Investigaciones actuales han demostrado que el equilibrio entre las bacterias benéficas y aquellas patógenas, resulta esencial con el fin de mantener la salud oral. Por lo tanto, la cavidad bucal ha sido el sitio sugerido recientemente como un objetivo relevante para aplicar las propiedades de los probióticos (Bizzini et al., 2012).

Varios estudios clínicos han demostrado que el consumo regular de yogur, leche o queso que contienen prebióticos, condujeron a una disminución en el número de estreptococos cariogénicos en la saliva y, así como también una reducción en placa dental.

Nikawa y col., reportaron que el consumo de yogurt que contiene *Lactobacillus reuteri* durante un período de 2 semanas, redujo la concentración de *S. mutans* en la saliva hasta en un 80%. Se obtuvieron resultados comparables mediante la incorporación de los probióticos en la goma de mascar o pastillas (Bonifait et al., 2009).

En un estudio realizado por Näse L y col., con el consumo de *Lactobacillus rhamnosus* LGG por 7 meses en 694 niños de 1 a 6 años de edad, mostró menos caries en el grupo LGG y más bajos recuentos de *S. mutans* al final del estudio. Siendo más evidente en niños de 3 a 4 años, por lo que el consumo de LGG fue efectivo para reducir el riesgo de caries significativamente. Por lo que la leche que contiene las bacterias LGG probióticas puede tener efectos beneficiosos sobre la salud dental de los niños (Näse et al., 2001).

Otro estudio realizado por Caglar E. y col. (2005), concluyo que bifidobacterias probióticas en el yogur puede reducir los niveles de microorganismos seleccionados asociadas a caries en saliva. El uso de probióticos ha sido propuesto para el tratamiento de la caries mediante la prevención de la colonización oral de patógenos cariogénicos (Pavitra et al., 2011).

En un estudio de Sudhir y col. (2012), se observó el efecto de los probióticos sobre *S. mutans* y el pH salival. Concluyeron que alimentos probióticos que contienen *Lactobacillus acidophilus*, tienen un efecto inhibitor sobre *S. mutans* en saliva, y causó una pequeña disminución en el pH salival, por lo que pueden utilizarse como adyuvantes, para la prevención de la caries dental, especialmente como una parte de la modificación de la dieta en los niños de diferente riesgo de caries dental.

4.6 *Lactobacillus casei* Shirota (LcS)

Lactobacillus casei **Shirota**, un microorganismo que se encuentra exclusivamente en la leche fermentada de Yakult, se considera un probiótico. Esto debido a su capacidad para modular la composición y la actividad metabólica de la flora intestinal, así como mejorar el sistema inmunológico humano sano. Este microorganismo es capaz de sobrevivir durante el paso a través del tracto gastrointestinal después de su consumo, debido a sus propiedades acidúricas y acidogénicas (Lima et al., 2005). Cada envase de Yakult contiene un mínimo de 10^8 UFC/mL de *Lactobacillus casei* **Shirota** (LcS), (Sutula et al., 2012).

4.7 LOS PROBIÓTICOS EN APARATOLOGÍA ORTODÓNTICA

En un estudio realizado por Caglar y col. (2005), cruzado y doble ciego a 24 adolescentes sanos de 12 a 16 años de edad y con tratamiento de ortodoncia. Los sujetos ingirieron 200 g de yogur de fruta conteniendo 2×10^8 UFC/g de *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis DN-173 010 una vez al día, o un yogur de control sin bacterias viables. Se hicieron análisis de *S. mutans* en saliva y *Lactobacilos* antes y después del consumo del yogurt.

Una reducción estadísticamente significativa de los *Streptococos mutans S. mutans* se registró después del consumo de yogur probiótico ($p < 0,05$) ($P < 0,05$), que estaba en contraste con el yogur de control. No se observaron alteraciones significativas de los recuentos de lactobacilos salivares.

4.8 pH SALIVAL

La saliva juega un papel muy importante en la salud oral, adopta propiedades tales como la lubricación, el aclaramiento de sustancias no deseadas, la digestión, la neutralización de ácidos o bases, la protección contra la desmineralización y también una función antimicrobiana (Bekkem et al., 2014).

La tasa de flujo de saliva es también un modulador de pH salival. A bajo flujo, menos bicarbonato se libera y disminuye el pH (Tremblay et al., 2012).

El pH puede ser ácido o básico, pero la capacidad de amortiguación estabiliza el pH salival. Es decir, si aumenta la capacidad buffer, el pH de la boca fluctúa menos. Cuando el pH de la boca disminuye (o se convierte en ácido), bacterias cariogénicas prosperan (Hurlbutt M, 2010). Si el pH de la saliva en reposo es demasiado bajo (por debajo de 6,6), el biofilm saludable puede transformarse en biofilm cariogénico (Hurlbutt et al., 2010). La acidificación ambiental (dentro de boca), es el determinante principal de los cambios fenotípicos y genotípicos que ocurren en la microflora en la caries (Takahashi and Nyvad, 2011).

La caries dental resulta del metabolismo bacteriano en el biofilm y las interacciones de este con la estructura del diente. Todos los humanos tienen biofilm, el cual se forma 20 minutos después del cepillado. Cuando el pH de este biofilm cae a 5.5, minerales del esmalte dental especialmente el calcio, se ven afectados. Cuando el pH del biofilm sube otra vez, el esmalte se remineraliza. Este proceso ocurre de manera natural varias veces, pero cuando la desmineralización excede la remineralización hay una pérdida de minerales, que resultan en lesiones de mancha blanca y cavitación.

La dieta tiene un efecto dramático en la caries dental, cada vez que una persona ingiere algún producto alimenticio o alguna bebida rica en azúcares, la bacteria del biofilm usa estos azúcares como fuente de carbono y mediante un proceso fermentativo convierte esta comida en ácidos orgánicos, el pH del biofilm cae a 5.5 y la desmineralización comienza. El pH de las bebidas gaseosas más populares es de 2.5 a 3, (White and Gordon, 2014).

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Universo de Estudio:

Universo del estudio: los pacientes que requieran tratamiento ortopédico y/o ortodóntico que acudan a la Facultad de Odontología al Posgrado de Odontopediatria de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Estudio comparativo que consistió en una muestra de 10 pacientes de edades entre 4 y 18 y 10 controles en donde se evaluó *S. mutans* en saliva.

Tamaño de la muestra: 10 pacientes de estudio y 10 pacientes de control.

Forma de asignación de los casos a los grupos de estudio: cuota, secuencial.

Características del grupo control y grupo experimental

Los pacientes que acuden a los Posgrados de Odontopediatria y al Posgrado de Ortodoncia, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, que cuenten con aparatología ortodóntica y cumplan con los criterios de selección; fueron invitados a participar en la investigación para esta tesis con el uso de bebida probiótica (Yakult). Con el consentimiento informado autorizado por el paciente y/o representante legal, se clasificó de manera secuencial a la categoría a la que los pacientes pertenecieron en el estudio.

Criterios de selección

Criterios de inclusión

1. Pacientes de 4 a 18 años de edad, femeninos y masculinos que acuden a la clínica de posgrado de Odontopediatria y/o clínica de Ortodoncia del Posgrado de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
2. Técnica de cepillado previamente establecida
3. Sanos sistémicamente
4. Con necesidad de un aparato ortopédico y/o ortodóntico
5. Pacientes que hayan acudido a todas sus citas previas
6. Sin reacciones adversas a los productos lácteos o fermentados

Criterios de exclusión

1. Paciente no cooperadores
2. Pacientes que se encuentran o estuvieron previamente al estudio bajo tratamiento de antibiótico.

Criterios de eliminación

1. Pacientes que no acudan a más de 2 citas de revisión
2. Pacientes que suspendan la toma de la bebida probiótica.

5.2 Determinación del tamaño muestral:

El modelo estadístico analítico consistió en la aplicación de un análisis comparativo mediante una prueba t-student de diferencia de medias para muestras independientes. En el caso de que la variable muestre evidencia de normalidad, dicha prueba será determinada considerando un 95% de confiabilidad.

El modelo será aplicado para comparar el crecimiento de la flora bacteriana en cada uno de los grupos de estudio al que pertenezca (Con bebida prebiótica o sin bebida prebiótica)

La estadística de prueba que será empleada para analizar los resultados es el siguiente:

$$z = \frac{\mu_1 - \mu_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$$

En caso de que la variable muestre evidencia de libre distribución será aplicada una prueba de *U de Mann Whitney* para dichas muestras, la prueba será determinada considerando también un 95% de confiabilidad.

$$\sigma_U = \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}{12}}$$

La muestra fué conformada por todos aquéllos pacientes que cumplieron con los requisitos para ser incluidos en el estudio.

Los datos fueron capturados en una base de datos en el programa IBM Statistics 19 con el que se realizaron tablas de frecuencia de dos variables dentro de las cuales se consideran las variables principales (crecimiento de la flora bacteriana), confrontadas con el grupo de estudio y el control. Para el vaciado de datos y la realización de graficos se empleó el programa Microsoft Excel 2010.

El presente proyecto contó con un modelo estadístico de presentación de datos que consiste en la elaboración y descripción de tablas de frecuencias y porcentajes para las variables cualitativas y de intervalo, así como un modelo descriptivo de medidas de tendencia central y dispersión para las variables cuantitativas. Además del uso de gráficos para las tablas mayormente relacionadas con el análisis de los datos, posterior a este diseño se realizó una descripción detallada de los resultados.

5.3 Descripción de procedimientos

El estudio se integra de la siguiente manera:

Grupo experimental:

10 pacientes con aparatología ortodontica que consumieron bebida probiótica (Yakult). Se pide al paciente el consumo de una bebida probiótica diaria después de la comida. Se indican 2 tomas de muestra por día, una al levantarse y otra 10 minutos después de la toma de la bebida y antes del cepillado. Previamente se da al paciente un kit que contiene: 2 tubos eppendorf con 1 mL de solución salina por día previamente esterilizado y marcado con número de muestra para comodidad del paciente, Isopos estériles y tiras

reactivas de pH con escala de color también marcadas por día. Se muestra al paciente un video previo de como tomar la muestra diaria, que consiste en colocar el isopo en el área retromolar y se impregne de saliva directo de la glándula parótida. Se coloca dentro de la solución salina y se mantiene en refrigeración hasta la entrega de muestra para su posterior análisis microbiológico. El pH se mide en ese momento también, la tira debe estar en contacto con saliva, se aguarda unos segundos a que seque para enseguida verificar con la escala previamente dada, finalmente se marca el número correspondiente al valor del pH según el color de la escala y se anota en la hoja de datos.

Grupo control:

10 pacientes con aparatología ortodoncia sin consumo de bebida probiotica. Se les proporciona un kit similar al grupo experimental con tubos eppendorf conteniendo solución salina, isopos estériles y las tiras reactivas de pH. Aquí, el paciente toma una muestra diaria al levantarse y se refrigerara, se realizara en conjunto la prueba de pH matutina y se registró el número obtenido como se procedió con el grupo experimental.

Elaboración de kits para toma de muestra:

- Esterilización de tubos eppendorf de 1.5ml a 120 °C por 15 minutos (All American USA).
- Fabricación de isopos estériles a la medida del tubo (3 cm cada uno).
- Elaboracion de sustancia transportadora (Solución Salina)
Componentes: 9 gr de Cloruro de Sodio (NaCl) por 1 litro de agua destilada. El NaCl utilizado fué Cloruro de Sodio ACS de TCR scientific.
Se pesan los 9 gr en la balanza analítica (AND GR-200) y posteriormente se pasa al agitador magnetico y calentador (Thermo Scientific) para obtener una sustancia homogenea. Por ultimo se esteriliza en autoclave a 120°C por 15 minutos (min).
- Se coloca la solución transportadora (Solución Salina) 1ml por tubo eppendorf pipeteado dentro de la cabina de bioseguridad A2 (LABCONCO Purifier Biological Safety Cabinet).
- Conservación de solución transportadora a 4°C (Refrigeración)
- Al kit se le agregan tiras indicadoras de color (MN), una para cada día del estudio.

- Tiras recortadas a medida de papel parafilm (Parafilm M)

Recolección de muestras:

El paciente acude con sus muestras a sus citas de revisión. Las muestras se transportan en una hielera prevista a la Unidad de Odontología Integral y Especialidades, del CIDICS/UANL, y se refrigeran hasta su uso la prueba de selección de *S. mutans*.

Pruebas *in vitro*

Preparación de medio de cultivo selectivo para *S. mutans*.

Agar Mitis Salivarius Bacitracina (MSB, BD Difco)

Este medio se obtuvo a partir del MSA adicionado de bacitracina (Sigma) y 15% de agarosa (Sigma), para así tener mayor selectividad para estreptococos grupos mutans (EGM). Se esteriliza el medio en un autoclave durante 60 minutos a 180°C, (ver figura 4).

Preparación del Agar Mitis Salivarius Bacitracina, (figura 1):

- Disolver 90g del medio deshidratado MSA en 1000 ml de agua destilada
- Homogeneizar en el agitador magnético y calentador (Thermo Scientific) por 15 min aproximadamente y posteriormente se esteriliza.
- Enfriar hasta 45°C
- Adicionar 1ml de telurito potásico al 1% (BD BBL)
- Incorporar 0.5 ml de bacitracina a concentración de 200 U/ml (Sigma)
- Agitar manualmente

Para calcular el resultado del cultivo se efectúa un recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) sobre la superficie del agar MSB, que se contabiliza con el contador para placas (EASI-GRID) y se registra el nivel de *S. mutans* de forma semi-cuantitativa. Se interpreta como negativo bajo: hasta 20 UFC, moderado: de 21 a 100 UFC y a alto: mayor de 100.

Se colocan 15 mL de MSB en cada caja Petri ya esterilizada dentro de la cabina de bioseguridad A2 (LABCONCO Purifier Biological Safety Cabinet), (figura 4).

Esperar a que gelifique en presencia de luz ultravioleta durante 15 minutos en la cabina de bioseguridad (figura 2 y 3).

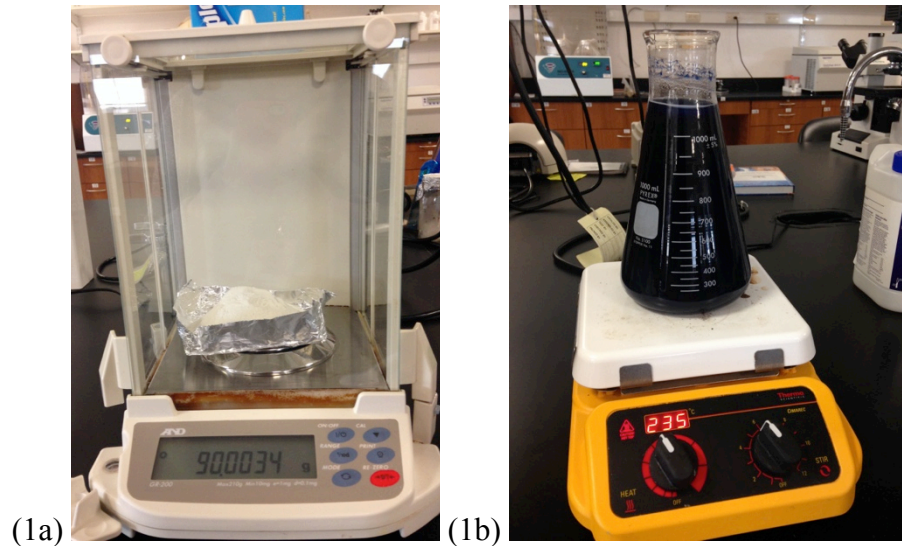


Figura 1. A la derecha en la imagen (1a), se observa el peso del agar (90gr) en la balanza analítica. A la izquierda en la imagen (1b), se observa ya el medio de cultivo con agua destilada en el agitador magnetico a una temperatura de 235°C

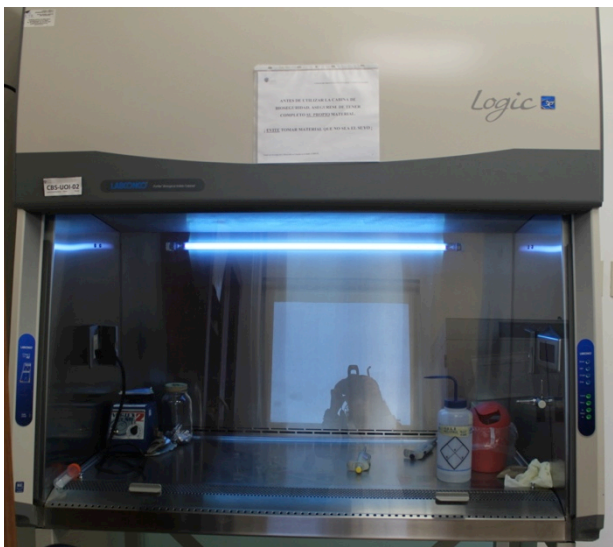


Figura 2.

Cabina de bioseguridad A2 (LABCONCO Purifier Biological Safety Cabinet), se observa en la imagen el encendido de los rayos UV.



Figura 3: medio de cultivo MSB posterior a su esterilización ya en la cabina de bioseguridad.



Figura 4. Cajas petri ya con el agar selectivo MSB en cabina con micropipetas eppendorp de 1 mL y 200 µL, ya listo para la inoculación de *S. mutans*.

Análisis cualitativo y cuantitativo de muestras

Procedimiento:

De cada tubo de muestra entregado por el paciente, se pasa por el Vortex (Scientific Industries), para homogeneizar el contenido. Se toman 100 μl que se distribuyen de manera uniformemente sobre toda la superficie de la caja de Petri con Agar (MSB).

Todas las cajas se incuban 48 horas a 37°C (Incubadora Thermo Scientific). (figura 5)

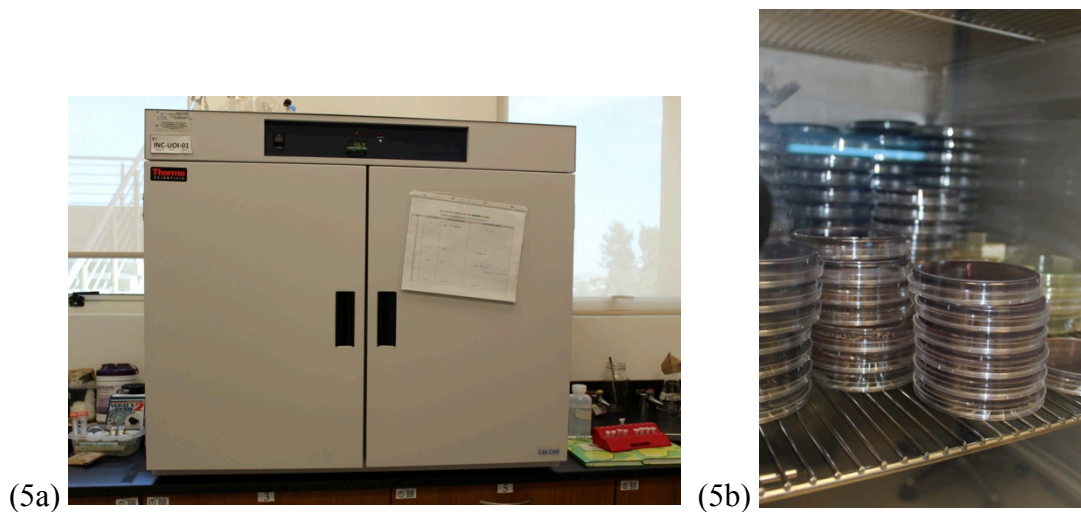


Figura 5. Lado izquierdo (5a), se observa la incubadora en donde dentro de ella se mantienen las cajas a una temperatura de 37°C. Lado derecho (5b) interior de la incubadora donde se almacenan las cajas por un mínimo de 24 horas y un tiempo máximo de 72.

Para medir la Absorbancia (Abs) de cada muestra, se colocan 500 μl de muestra la celda de 1 mL y se completa con 500 μl de agua destilada (figura 6), se homogeneiza en el Vortex y se coloca en el Espectrofotometro Genesys 10 UV scanning (Thermo Scientific), programado a una longitud de onda de 600 nanometros (nm), la lectura obtenida se multiplica por el factor de dilución= 2, y así determinar la absorbancia real (figura 7).

Para el análisis de resultados, los valores obtenidos de la absorbancia, las UFC y el pH, son capturados en una hoja de Excel.

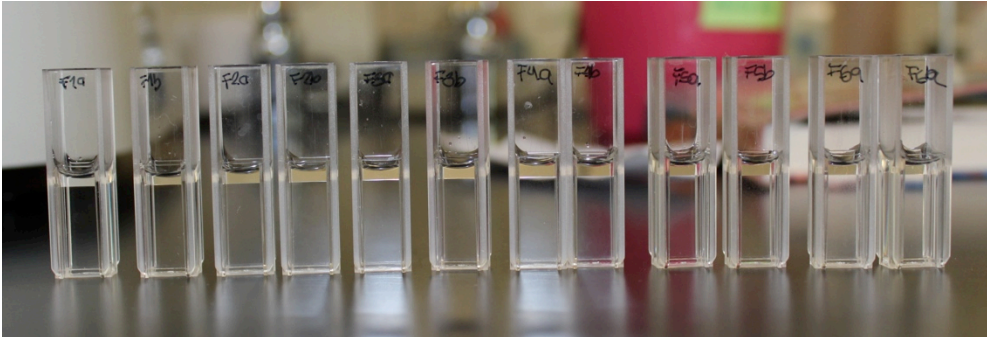
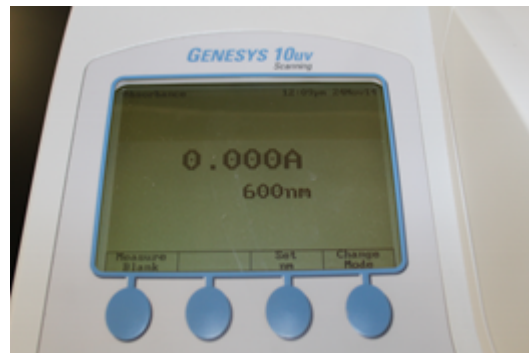


Figura 6. Celdas para espectrofotometro con la mezcla de 500ml de agua destilada y 500 ml de muestra de saliva del paciente.



(7a)



(7b)

Figura 7. Imagen (7a) se aprecia el espectrofotometro, imagen izquierda (7b) longitud de onda a 600nm y ya calibrado a 0.000.

Análisis e interpretación de resultados

Variables del estudio:

Dependiente: Cuantificación de los niveles de *S. mutans* en saliva, pH salival matutino, edad y Absorbancia.

Independiente: sexo, aparato utilizado.

Estas variables se determinaron mediante:

- Medio específico de cultivo compuesto de agar mitis salivarius con bacitracina y telurito en donde se aislaran UFC.
- Cuantificación celular por microscopia para obtener datos de concentración de células en equivalencia con las UFC formadas. La interpretación celular es en células por mililitro (células/mL)
- Tiras reactivas de pH
- Espectrofotometro Genesys 10 UV scanning programado a una longitud de onda de 600 nm.

Microscopio Invertido

Para corroborar la morfología de la bacteria que integran las UFC (*S. mutans*), se realiza un frotis; tomando 50 μ L de una asada de la colonia. Se coloca la muestra sobre un portaobjetos, el cual se cubre con un cubreobjetos. Las muestras son observadas en un aumento de 100x en el microscopio de luz visible (Van Guard, USA), (Figura 8).

El objetivo utilizado (100x) requiere del uso de aceite de inmersión.

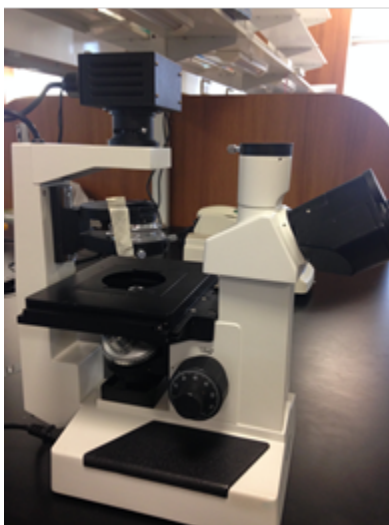


Figura 8: Microscopio de luz visible (Van Guard, USA).

Tinción de Gram

Debe su nombre al Bacteriologo danés Christian Gram que la desarrollo en 1844.

Es una tinción diferencial mediante la cual se confirma la morfología celular y su diferenciación bacteriana (positiva o negativa), de acuerdo a las propiedades de su pared celular.

Los pasos a seguir son:

- 1: Fijar la muestra mediante calor.
- 2: Colocación de violeta cristal (tine todas las bacterias Gram + y -) 1 minuto.
- 3: Enjuagar con agua corriente.
- 4: Se fija con Lugol 1 minuto.
- 5: Decolorar con una mezcla alcohol cetona (los Gram – se decoloran).
- 6: Colocación de Safranina (colorante de contraste, tiñe los Gram -), 1 min.
- 7: Enjuagar con agua corriente, (figura 9).

Interpretación:

En la tinción se observan de color azul-violeta las Gram + y de color rosa las Gram -.

El *Streptococcus mutans* es un coco Gram +, (figura 10).



Figura 9. (9a) Reactivos colorantes y de fijación observamos los envases de los líquidos utilizados para la tinción. (9b) portaobjetos con la muestra fijada, reacción de la safranina.

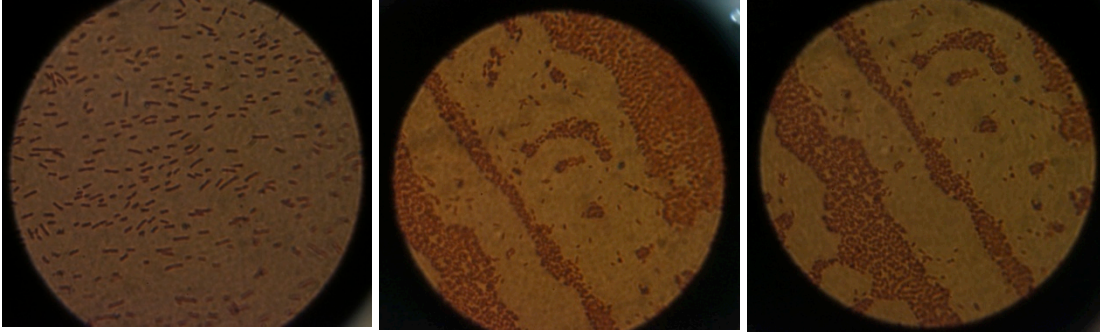


Figura 10. Tinción de Gram. Presencia de *S. mutans* después de 40 horas de cultivo en MSB. Microscopio invertido, objetivo 100x.

5.3.1 Validación de datos (Análisis estadístico)

El análisis estadístico consiste en la aplicación de un análisis comparativo mediante una prueba t-student de diferencia de medias para muestras independientes en caso de que la variable muestre evidencia de normalidad, dicha prueba será determinada considerando un 95% de confiabilidad.

El modelo será aplicado para comparar el crecimiento de la flora bacteriana de interés (*S. mutans*) en cada uno de los grupos de estudio al que pertenezca.

RESULTADOS

De acuerdo a los objetivos establecidos en este estudio, se tenía contemplada una muestra de 10 pacientes para conformar el grupo experimental que consistía en pacientes que consumían la bebida probiótica manteniendo la higiene oral cotidiana de cepillado; y, un segundo grupo denominado control también integrado por 10 pacientes, y quienes efectuarían únicamente la limpieza por cepillado sin consumir el producto lácteo. Cabe precisar que durante el periodo de tiempo contemplado en el estudio, se presentaron algunos inconvenientes que trajeron como consecuencia la exclusión de pacientes y por ende de muestras y resultados esperados para el estudio. En el grupo experimental la muestra se redujo a 7, mientras que en el grupo control quedó la mitad.

Es importante señalar que la muestra que se obtuvo de cada paciente a primera hora del día colocada en 1mL de solución salina fué homogeneizada con la ayuda del vortex para su posterior lectura de absorbancia que arroja un indicio sobre el contenido de bacterias en general, así como su pH, lo cual se muestra en cada gráfica a continuación.

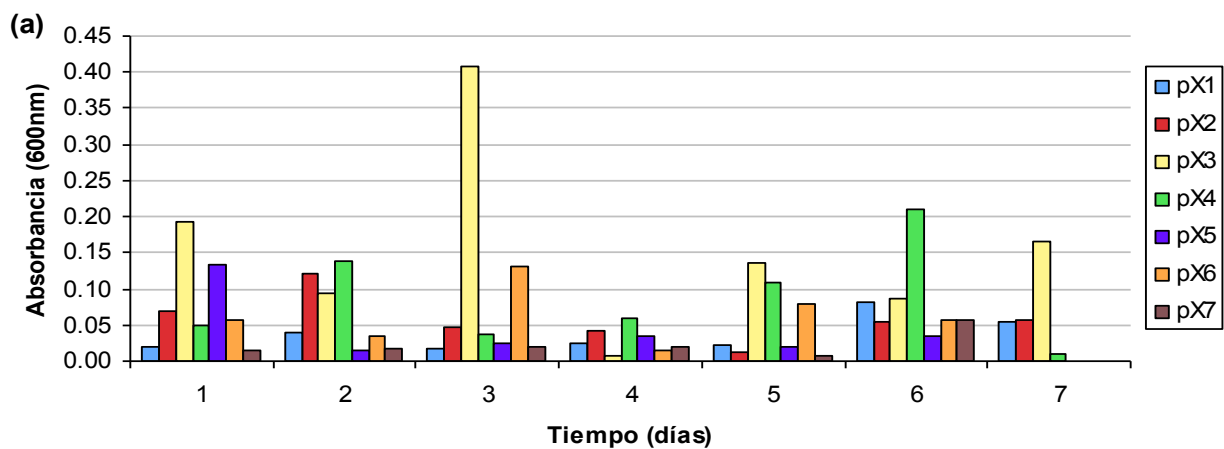
Por otra parte esta misma suspensión bacteriana fue utilizada para el aislamiento de *S. mutans* de cada paciente infantil.

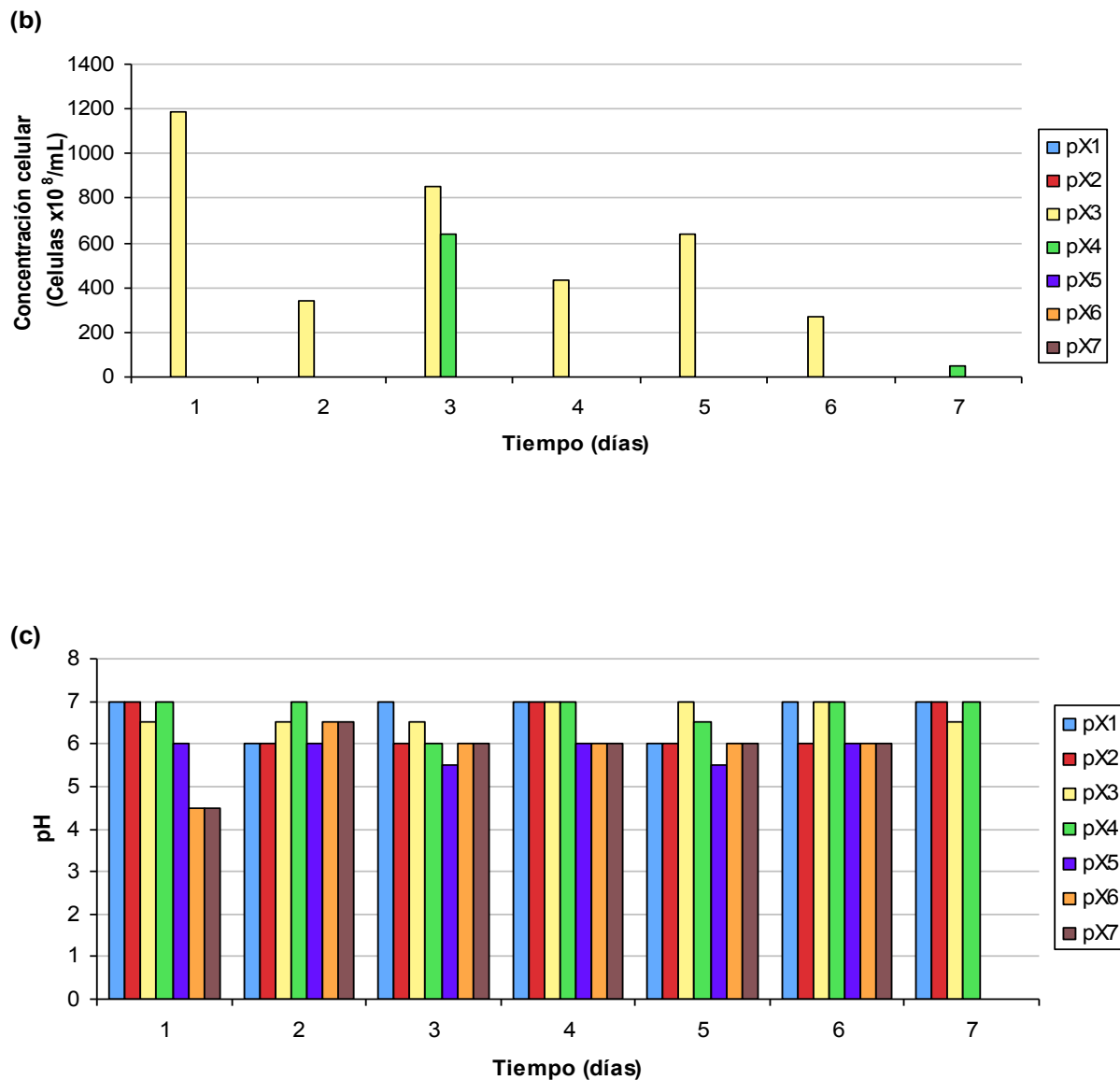
GRUPO EXPERIMENTAL: *L. casei* Shirota + Cepillado

Detección inicial de la flora microbiana presente en la solución salina como primera muestra del día, y *S. mutans* aislado con medio de cultivo selectivo. Resultados detallados por paciente (pX)

Los resultados obtenidos en el grupo experimental con respecto a la presencia de *S. mutans*, es decir en aquellos pacientes infantiles que tenían la consigna de consumir la bebida probiótica conteniendo *L. Casei Shirota* una vez al día durante un periodo de siete días consecutivos y siguiendo la limpieza oral de cepillado habitual, mostraron que de forma general no existe un efecto significativo de la disminución de *S. mutans* desde el día uno y durante el transcurso de los días de ingesta de la bebida probiótica, tal y como se muestra en la gráfica 1. En el caso de los valores de absorbancia detectados para cada paciente, se observó un promedio de cuatro pacientes con niveles de absorbancia por debajo de 0.05, mientras que los tres restantes, tuvieron una lectura mayor a esta, incluso

se vió incrementada en los tres últimos días del tratamiento con valores por encima de los 0.08, de 0.2 e inclusive arriba de 0.409 en un paciente en el día tres. No existe una tendencia clara ni homogénea (gráfica 1a). El resultado anterior se puede corroborar claramente con lo representado en la gráfica 1b, en donde se observó una formación de UFC en seis de los siete días de tratamiento con la bebida probiótica, teniendo una equivalencia de alrededor 1200×10^8 células/mL de *S. mutans* en el primer día de tratamiento reduciendo hasta cuatro veces su concentración quedando en 300×10^8 células/mL en el sexto día respectivamente. Mismo si fué el unico paciente en quien se manifestó una disminución de la concentración celular, sigue siendo una cantidad importante que tiene el riesgo de seguir proliferando. Finalmente el pH que también fué evaluado en cada uno de los infantes al inicio del día, no se vió alterado, es decir en todos los pacientes y a lo largo del tiempo de estudio, el pH se mantuvo muy similar al pH normal de la cavidad oral, es decir con valores de entre 6.5 y 7.5, ver gráfica 1c, salvo por tres pacientes dos de los cuales en el día uno con un pH muy ácido (4.5) y un tercer paciente con un pH de 5.5 en el día tres y cinco. Gráfica 1 (c)

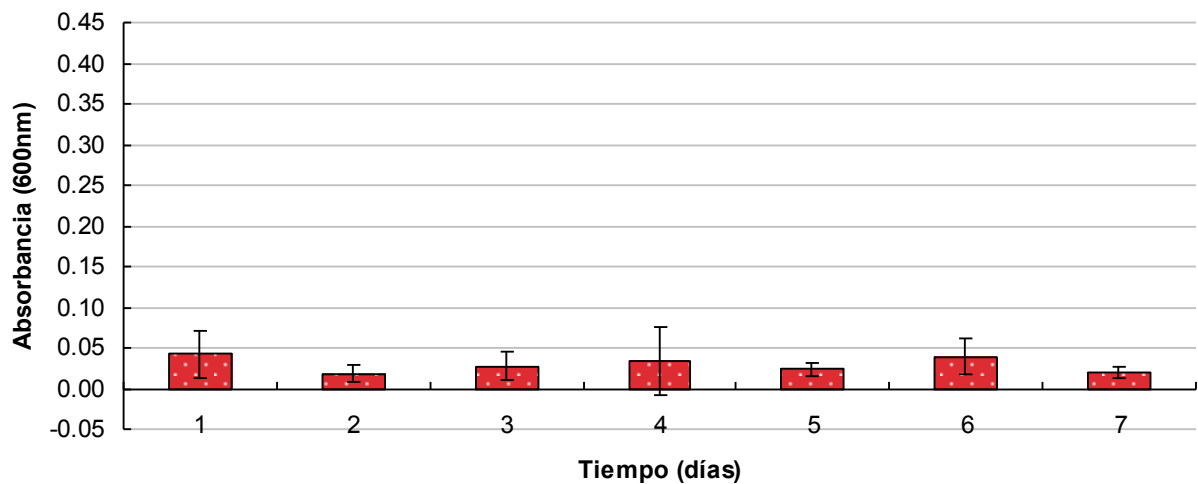
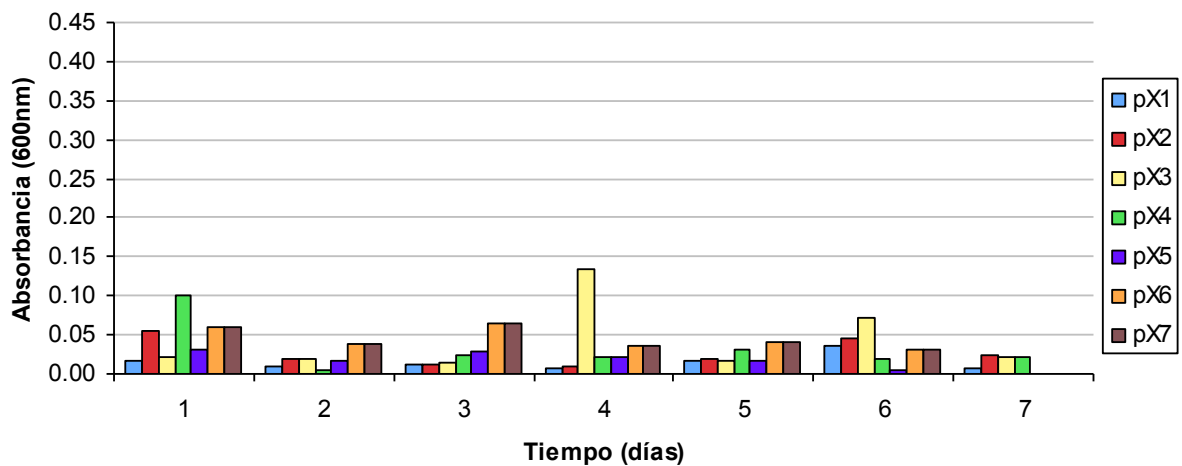




Gráfica 1: Detección de *S. mutans* mediante espectrofotometría a una Absorbancia de 600 nm (a), conteo celular (Células x10⁸/mL) (b) y pH salival (c).

En cuanto a la Absorbancia detectada a 600nm en el grupo experimental vespertino (gráfica 2), después del consumo de bebida probiótica se observaron el primer día 3 pacientes por debajo de 0.05 (paciente 1, 3 y 5) los restantes por encima de este rango, a

lo largo de la semana se observa una tendencia a disminuir, encontrándose por debajo de este rango, a excepción de px 3 donde el día 4 es muy notorio su aumento siendo el más alto reportado durante esa semana (superior a 0.10) en este grupo de estudio.



Gráfica 2: Detección vespertina de *S. mutans* mediante espectrofotometría a una Absorbancia de 600 nm. Muestra tomada 10 minutos después de consumir la bebida probiótica

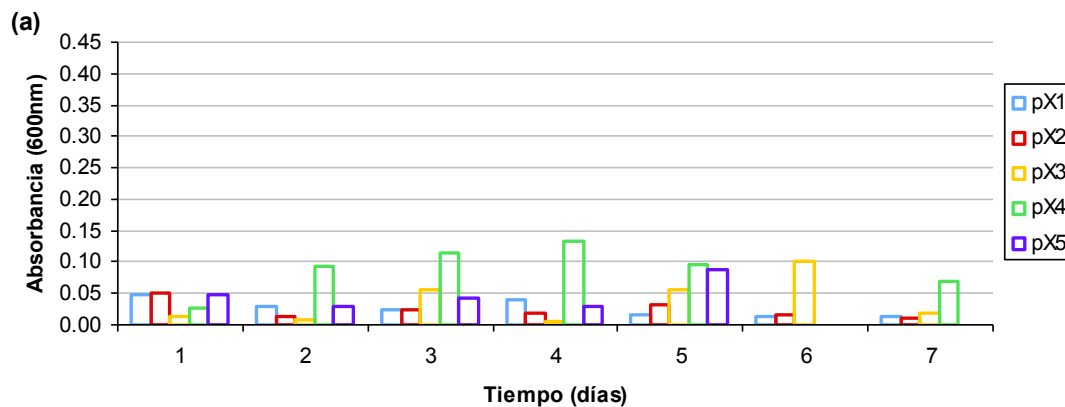
La Absorbancia observada en la Gráfica 2 en comparación con la 1 (a) muestra la disminución general, en particular en los pacientes 3 y 4 después de la toma del Yakult.

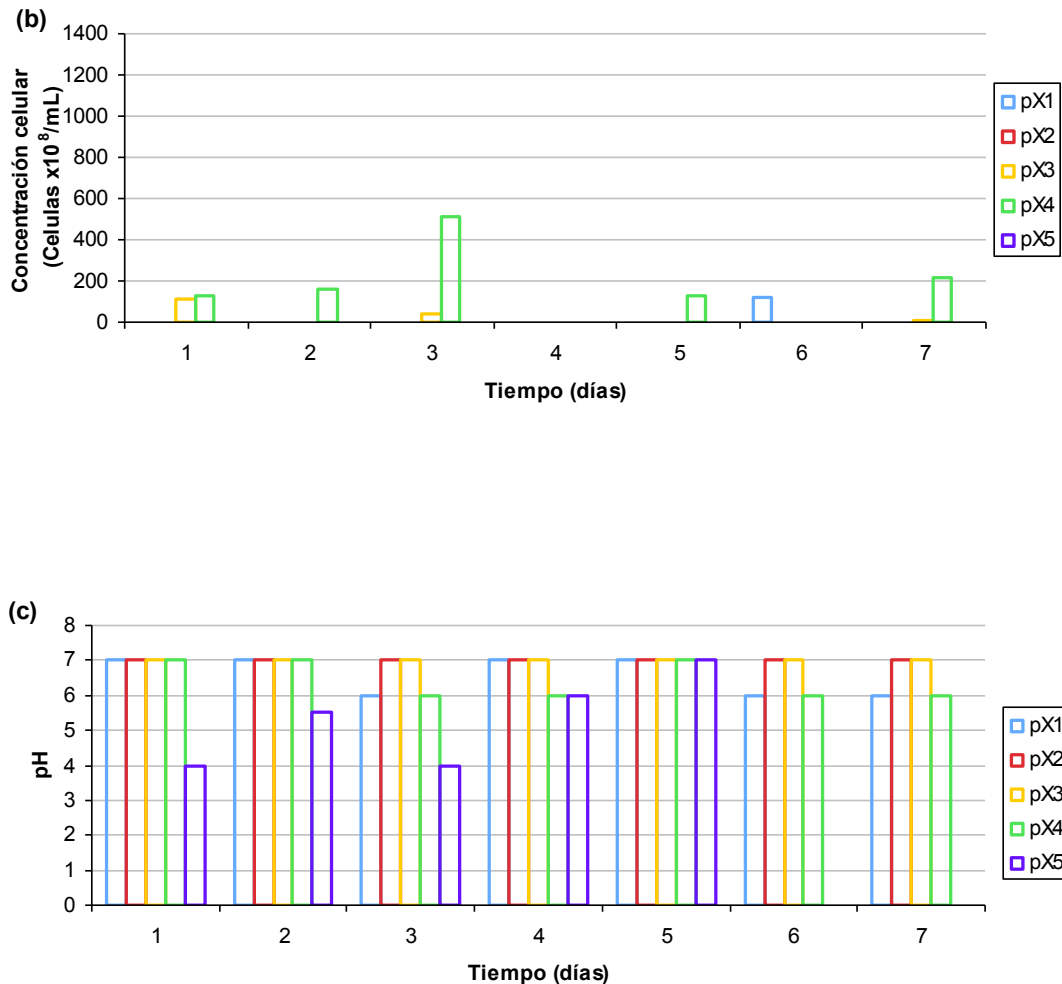
GRUPO CONTROL: CEPILLADO

Detección inicial de la flora microbiana presente en la solución salina como primera muestra del día, y *S. mutans* aislado con medio de cultivo selectivo.

Resultados detallados por paciente (pX)

En el grupo control donde solo se llevó acabo el cepillado, muestra un aumento considerable de absorbancia en el paciente 4, donde la la lectura más elevada registrada fué al cuarto día con $Ab_{S_{600nm}}$ de 0.132 (gráfica 3a), siendo el valor más elevado de este grupo. El paciente 3 durante tres días obtuvo una cifra superior a 0.05 y los 4 pacientes restantes durante la semana se mantuvieron estables por debajo de 0.05.





Gráfica 3. Detección de *S. mutans* mediante espectrofotometría a una Absorbancia de 600 nm (a), conteo celular (Células x10⁸/mL) (b) y pH salival (c).

Siguiendo con el grupo control, en la grafica 3b se detecto la presencia de células en 5 de los 7 días con un solo paciente, mientras que en otros 2 se detectaron una cantidad menor en 1 y 2 días respectivamente. El resto de los pacientes no mostraron crecimiento alguno de células.

El pH se vio afectado unicamente en 1 paciente con valores de entre 4 (en 2 ocasiones) a 7, mientras que para el resto el valor se matuvo dentro del rango considerado normal en la cavidad oral, superior a 6 (Gráfica 3c).

GRUPO EXPERIMENTAL: *L. casei* Shirota + Cepillado**Detección inicial de la flora microbiana presente en la solución salina como primera muestra del día, y *S. mutans* aislado con medio de cultivo selectivo. Resultados Promedio del Total de Pacientes (pX)**

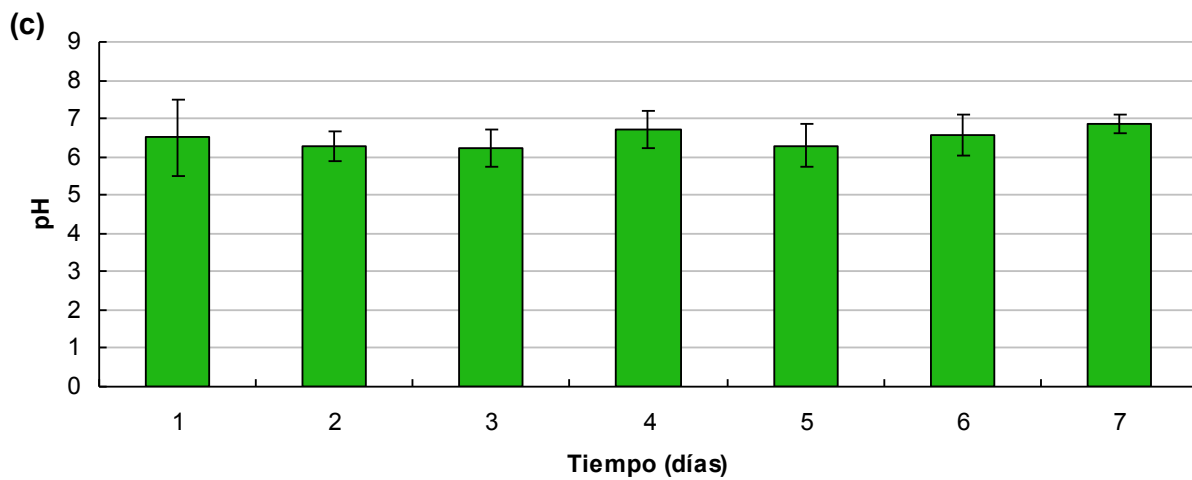
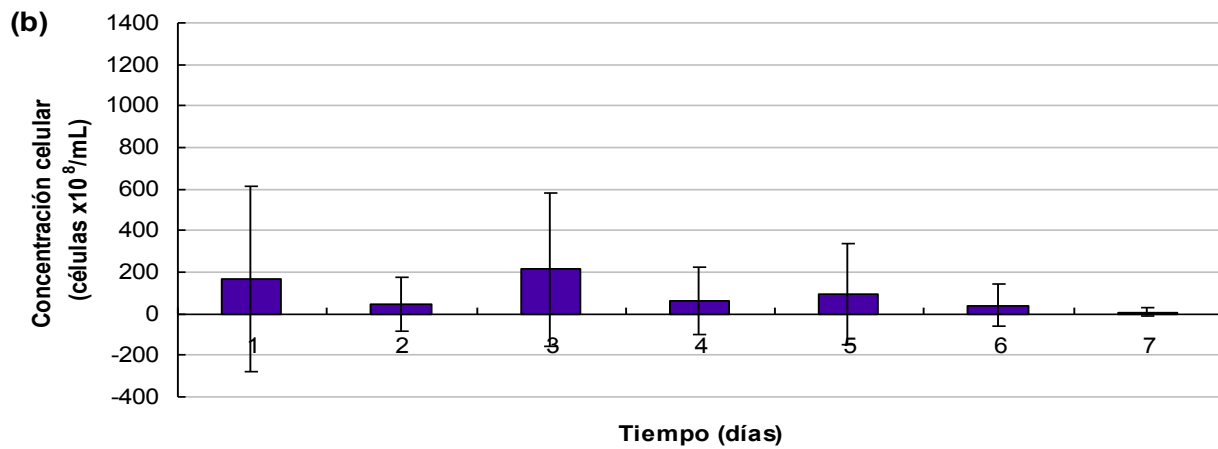
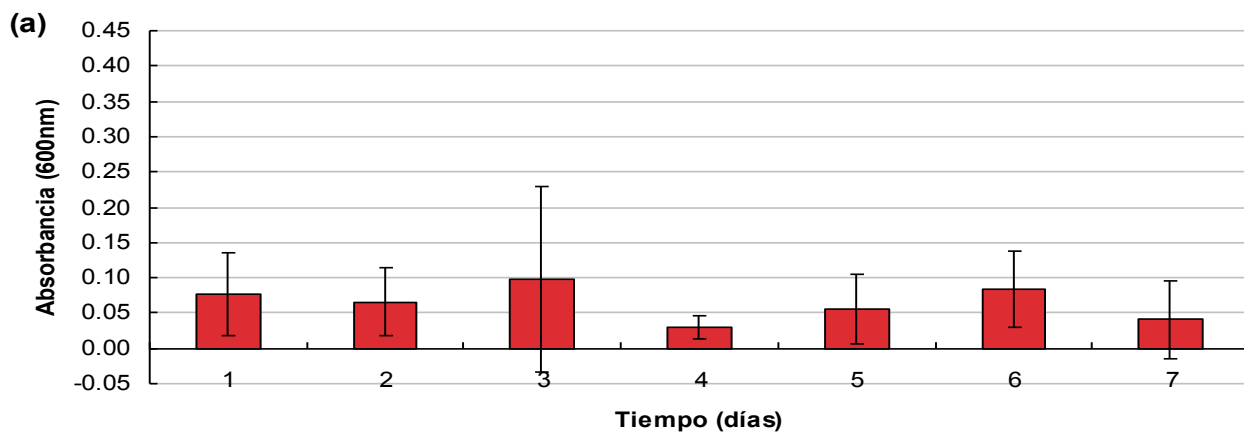
De todos los datos que se obtuvieron por cada paciente por los siete días de ingesta de Yakult (grupo experimental), se sacó un promedio para evaluar los valores obtenidos del *S. Mutans*.

La Gráfica 4 (a) muestra un valor máximo promedio detectado en absorbancia menor a 0.097 con una desviación estándar de ± 0.13 . Mientras que la absorbancia mínima detectada fue a los cuatro días con un valor de 0.029 (± 0.016).

En la subsecuente medición para determinar la concentración de *S. mutans* por mililitro (4b), se obtuvo una mayor concentración de células el día 3 con 212.89×10^8 /ml con una desviación estándar de 368.10, sin embargo, en el resto de los días (4,5,6 y 7) los valores fueron inferiores a 91.82×10^8 (± 242.95) células/mL.

Finalmente en la verificación de cambios en el pH durante el consumo de la bebida (4c) se pudo constatar que el pH se mantuvo entre los valores normales de la cavidad oral, dichos valores corresponden a un pH de 6.3 a 7.0.

En el grupo experimental en la muestra vespertina los valores de absorbancia reportados indican valores máximos el primer día, siguiéndole el 6° día con valores de 0.042 (± 0.029) y 0.039 (± 0.022), respectivamente.



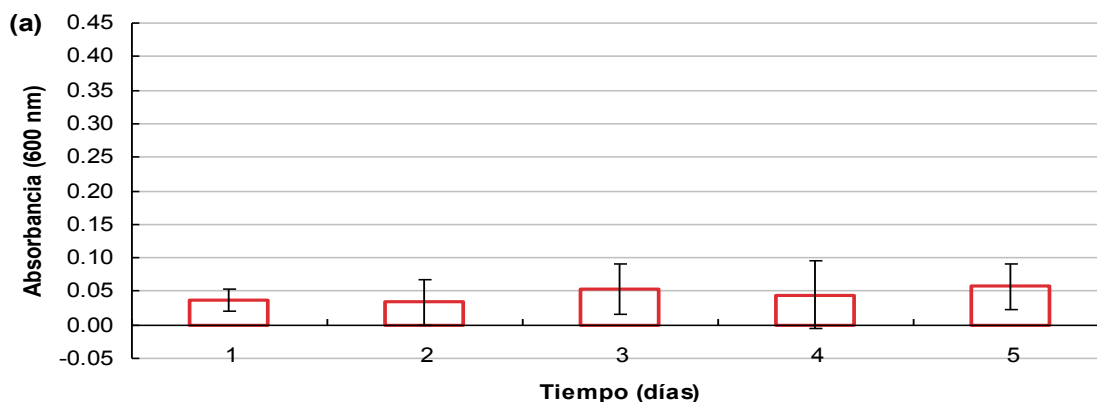
GRUPO CONTROL: CEPILLADO

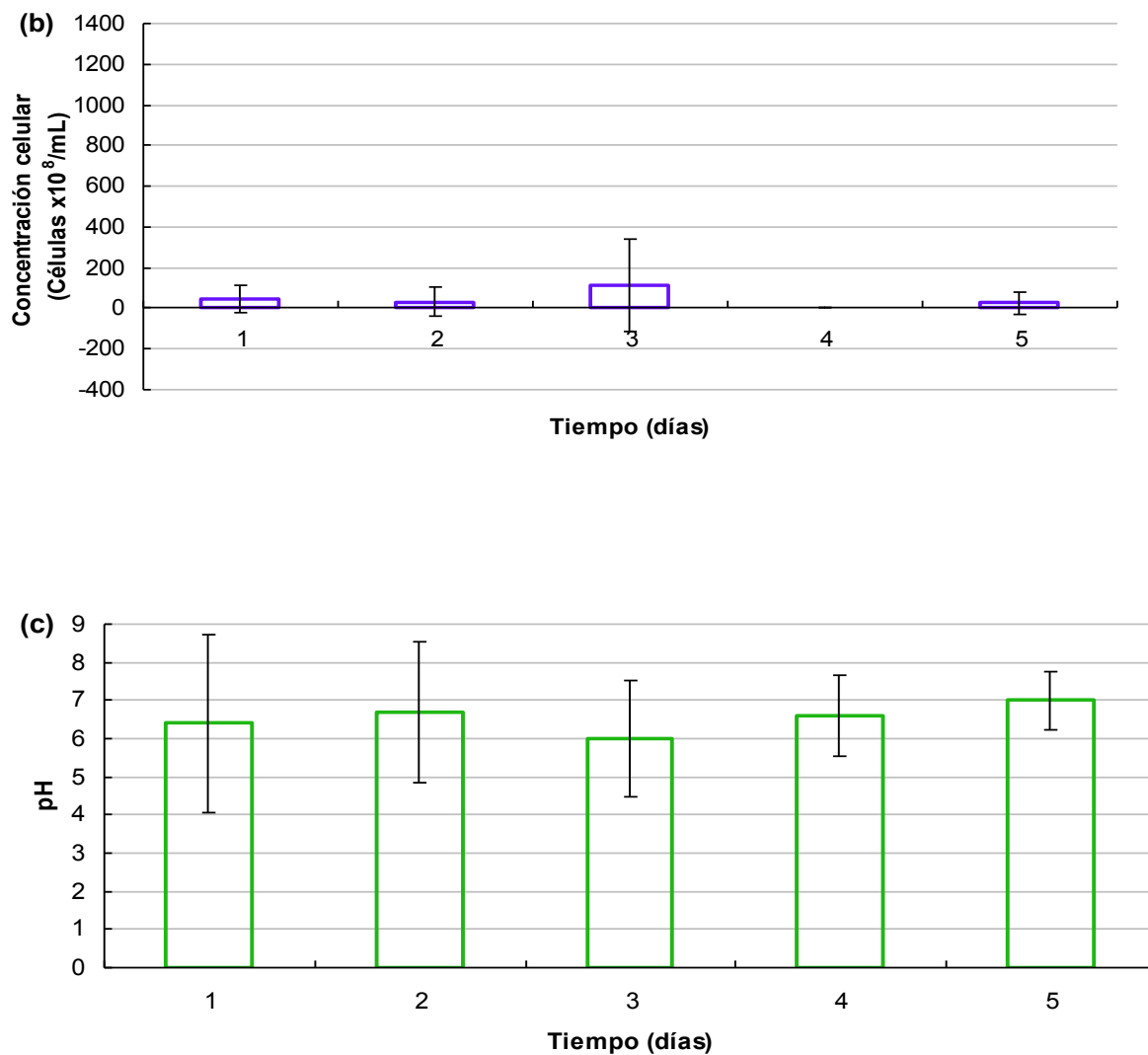
Detección inicial de la flora microbiana presente en la solución salina como primera muestra del día, y *S. mutans* aislado con medio de cultivo selectivo. Resultados Promedio del Total de Pacientes (pX)

En el grupo control la absorbancia detectada en la solución salina que contenía el isopo de los cinco pacientes de esta muestra, se mantuvieron entre 0.034 (± 0.034) y 0.057 (± 0.034) durante los cinco días de ingesta del Yakult. Gráfica 4 (a)

Mientras que la concentración celular (gráfica 5 b) se obtuvieron valores muy variados desde donde se presentó una ausencia celular (caso del día 4) para todos los pacientes y una máxima concentración de *S. mutans* en el día 3 con 111.22×10^8 células/ml (± 225.37) dichos valores se ven incrementados puesto que únicamente dos pacientes fueron los que manifestaron una presencia y/o desarrollo de *S. mutans* desde el día 1 al 5 que duró el tratamiento.

En cuanto al pH de este grupo el más disminuido correspondió al día 3 con un valor de 6 (± 1.51) el cual se adjudica a un paciente en particular que manifestó durante los primeros tres días un pH muy ácido de 4.0 a 5.5. El resto de los días el pH fue muy similar para todos los pacientes en un rango de 6.70 a 7.0 con una desviación estándar de ± 1.08 y 0.76 respectivamente. Gráfica 5c





Gráfica 5. Detección de *S. mutans* mediante espectrofotometría a una Absorbancia de 600 nm (a), conteo celular (Células x10⁸/mL) (b) y pH salival (c). Incluye desviación estándar (DE).

DISCUSIÓN

Por vivir hoy en día en una era preventiva, nos topamos con el reto de buscar alternativas coadyuvantes en la prevención de diversas patologías y siendo la cavidad bucal el área de interés; surge la duda de encontrar alguna alternativa para disminuir el *S. mutans*, patógeno principal en la formación de la caries dental. La caries dental es considerada un problema de salud pública a nivel mundial debido a su alta prevalencia y el impacto social significativo. Lonim et al en su estudio en el 2013 mencionan la prevalencia de caries reportada por la Organización Mundial de la Salud en niños de edad escolar en todo el mundo siendo de 60 a 90%. Hardie en 1992 reporta que la estimación de los niveles salivares de *S. mutans* puede ser útil para la evaluación de riesgo de caries en los pacientes y para el seguimiento de su respuesta a las medidas preventivas.

Se han obtenido resultados positivos en la disminución de *S. mutans* en pacientes con ingesta de microorganismos probióticos abriendo una nueva ventana de investigación. Bizzini et al en el 2012, en su trabajo mencionan que el equilibrio entre las bacterias benéficas y patógenas, es esencial con el fin de mantener la salud oral.

Nikawa et al en el 2004 reportaron que el consumo de yogurt que contiene *Lactobacillus reuteri* durante un período de 2 semanas redujo la concentración de *S. mutans* en la saliva hasta en un 80%.

Bonifait et al., en el 2009 obtuvieron Buenos resultados incorporando la bacteria probiótica a goma de mascar y pastillas masticables.

Confirmando lo anterior, en un estudio realizado por Näse L y col. en el 2001 reportaron que el consumo de *Lactobacillus rhamnosus* LGG por 7 meses en niños de 1 a 6 años, en 594 pacientes, mostró menos caries en el grupo experimental y más bajos recuentos de *Streptococos mutans*.

Sudhir y col. en el 2012, observaron el efecto de los probióticos sobre *S. mutans* y el pH salival, y concluyeron que alimentos probióticos que contienen *Lactobacillus acidophilus*

tienen un efecto inhibitor sobre los *Streptococos mutans* en saliva, y causó una pequeña disminución en el pH saliva. En base a este artículo se decidió agregar a este estudio la variable del pH.

En niños y adolescentes el uso de algún aparato ortopédico y ortodóntico es muy común, siendo los aparatos dentales un factor de riesgo para caries, descrito por la AAPD donde entre otros se encuentran: pacientes con alguna discapacidad física, alteración del flujo salival, anatomía dental retentiva y niños de bajos recursos económicos.

Cildir et al., en el 2009, publicaron que el consumo diario y a corto plazo de yogur con *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DN-173 010, puede reducir los niveles de *Streptococos mutans* en la saliva durante el tratamiento ortodóntico con aparatos fijos.

En base a lo anterior, se eligieron 2 grupos de estudio para esta investigación, siendo el grupo experimental y control de 10 niños. Donde como microorganismo probiótico administrado fue el *Lactobacillus casei* **Shirota** administrado en el grupo experimental durante 1 semana tomando muestras de saliva para detectar posteriormente el crecimiento de *S. mutans* en un medio de cultivo selectivo.

En los resultados se observan discrepancias en lo referente al conteo de *S. mutans* en donde solo un paciente del grupo experimental mostro reducción en los niveles de *S. mutans* durante el consumo del Yakult. No hubo en este grupo una disminución significativa en el pH como lo sugiere el estudio de Sudhir y col. en el 2012, aunque esto puede deberse a que la toma de pH no fue inmediatamente despues de la ingesta del probiótico. Otro paciente de este grupo experimental el fenomeno contrario, en donde su muestra inicial estaba en cero y al 3er y 7mo día mostraron un amento en la concentración celular matutina, aunque se restablecio en la muestra vespertina, esto puede deberse a diversos factores tales como: mala higiene, tecnica de cepillado deficiente, tomando en cuenta que esto es importante ya que son pacientes con presencia de aparatología en donde el acumulo de comida es una realidad en la mayoría de estos.

5 pacientes de los 7 estudiados en el grupo experimental no mostraron UFC/mL durante el estudio (7días) esto no puede adjudicarse a la bebida probiótica ya que sus niveles

iniciales ya se mostraban en cero, discrepando con la absorbancia de este grupo inicial, donde ninguna se mostro en cero, aunque es importante tener en cuenta que nos arroja un resultado general de conteo celular.

En un estudio realizado por Sutula et al. en el 2013 realizado a pacientes adultos sanos, detectaron que el *Lactobacillus casei* **Shirota** deja de detectarse en la cavidad oral a los 15 días después de su última ingesta habiéndolo tomado por 1 mes consecutivo, por lo que cualquier efecto que pueda tener, la bacteria sigue presentándose en boca aún después de dejarse de consumir la bebida.

8. CONCLUSIONES

El estudio realizado muestra el efecto del *L. Casei* **Shirota** sobre el *S. mutans* en pacientes con aparatología ortodóntica de 4 a 18 años de edad, los resultados obtenidos no muestran relación con los trabajos previamente realizados con productos probióticos, pudiera deberse a que la bacteria no tiene efecto sobre *S. mutans* o el vehículo donde se encuentra suspendida la bacteria probiotica, no es el ideal para inhibir el crecimiento bacteriano. De ser así, podría pensar en aislarse la bacteria *Lactobacillus casei* **Shirota** del mismo producto de leche fermentada (Yakult). Otra posible hipótesis es que no se ha visto efecto por el suficiente tiempo de incubación y número de pacientes.

El pH en la mayoría de los pacientes se mantuvo dentro del rango saludable, solo pocos pacientes 3/12 tuvieron en más de una ocasión una caída crítica en el; aunque en los días próximos se restableció. 2 de estos 3 pacientes fueron del grupo experimental, se descarta la relación con el probiótico, aun a pesar de que el pH del yakult es de 4 (ácido). Un factor importante a considerar es que todos los pacientes después de la toma de muestra posterior a la bebida probiótica cumplían con su cepillado de rutina, la posible caída de pH momentánea es simultánea con la de la comida, por lo que su efecto no es durante diferentes periodos al día.

Es probable que existan UFC/mL no cuantificadas en este estudio, ya que se observó un lento desarrollo en la colonias expresadas en el medio de cultivo, la literatura reporta que después de 24 hrs de incubar la bacteria ya existe desarrollo de la misma a una temperatura de 37°C, en este caso se comenzó a ver crecimiento bacteriano a las 48 horas y a las 72 ya contábamos con resultados previos, aunque no se descarta la idea de un retraso en su desarrollo, factores tales como la temperatura ambiental juegan un factor clave en esto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas A, Hamideh M, Mohammad R, Soghra K, Seyed M. 2013. Probiotic as a Novel Treatment Strategy Against Liver Disease. *Hepat Mon.* 13(2): e7521. Published online 2013 February 25. doi: 10.5812/hepatmon.7521 PMID: PMC3631524
2. Amores R, Calvo A, Maestre J, Martínez D. 2004. Probióticos. *Rev Esp Quimioterap.* Vol.17 (No 2): 131-139
3. Animireddy D, Reddy B, Vallala P, Kotha SB, Ankireddy S, Mohammad N. 2014. Evaluation of pH, buffering capacity, viscosity and flow rate levels of saliva in caries-free, minimal caries and nursing caries children: An in vivo study. *Contemp Clin Dent.* 5(3):324-8. doi: 10.4103/0976-237X.137931.
4. Bizzini B, Pizzo G, Scapagnini G, Nuzzo D, Vasto S. 2012. Probiotics and oral health *Curr Pharm Des.* 18(34):5522-31.
5. Bonifait L, Chandad F, Grenier D. 2009. Probiotics for oral health: myth or reality?. *J Can Dent Assoc.* 75(8):585-90.
6. Cagigas A, Blanco J. 2002. Prebióticos y Probióticos, una relación beneficiosa. *Revista Cubana Aliment Nutr;*16(1):63-8.
7. Caglar E, Sandalli N, Twetman S, Kavaloglu S, Ergeneli S, Selvi S. 2005. Effect of yogurt with Bifidobacterium DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odontol Scand.* 63(6):317-20.
8. Cildir S, Germec D, Sandalli N, Ozdemir FI, Arun T, Twetman S, Caglar E. Reduction of salivary mutans streptococci in orthodontic patients during daily consumption of yoghurt containing probiotic bacteria. 2009. *Eur J Orthod.* 31(4):407-11. doi: 10.1093/ejo/cjn108. Epub 2009 Feb 4.
9. Çolak H, Dülgergil Ç, Dalli M, Mehmet M. 2013. Early childhood caries update: A review of causes, diagnoses, and treatments. *J Nat Sci Biol Med.* 4(1): 29–38. doi: 10.4103/0976-9668.107257 PMID: PMC3633299
10. Hardie J. 1992. Oral microbiology: current concepts in the microbiology of dental caries and periodontal disease. *Br Dent J.* 11;172(7):271-8.

11. Holbrook P, Magnúsdóttir M. 2012. Studies on strains of *Streptococcus mutans* isolated from caries-active and caries-free individuals in Iceland. *J Oral Microbiol*. doi: 10.3402/jom.v4i0.10611. Epub 2012 Mar 29.
12. Hurlbutt M, Novy B, Young D. 2010. *Dental Caries: A pH-mediated disease*. CDHA Journal.
13. Lara-Carrillo E, Montiel-Bastida N, Sánchez-Pérez L, Alanís-Tavira J. 2010. Effect of orthodontic treatment on saliva, plaque and the levels of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 1;15(6):e924-9.
14. Li-Chuan C, Chiung-Shing H, Li-Wei O, Shiao-Yu L. 2011. Probiotic *Lactobacillus paracasei* effect on cariogenic bacterial flora. *Clin Oral Investig*. 15(4): 471–476.
15. Liljemark W, Bloomquist C. 1996. Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. *Crit Rev Oral Biol Med*. 7(2):180-98.
16. Lima L, Motisuki C, Spolidorio M, Santos-Pinto L. 2005. In vitro evaluation of probiotics microorganisms adhesion to an artificial caries model. *European Journal of Clinical Nutrition* 59, 884–886. doi:10.1038/sj.ejcn.1602158
17. Lonim P, Ajay S, Manash S, Ayush S. 2013. Dental caries prevalence, oral health knowledge and practice among indigenous Chepang school children of Nepal. *BMC Oral Health*. 13: 20. doi: 10.1186/1472-6831-13-20
18. Marín C. 2007. Importancia del control de placa bacteriana en el tratamiento ortodóncico. *Revista Estomatología*. 15(1):24-28
19. Moye Z, Zeng L, Burne R. 2014. Fueling the caries process: carbohydrate metabolism and gene regulation by *Streptococcus mutans*. *J Oral Microbiol*. 5;6. doi: 10.3402/jom.v6.24878. eCollection 2014. Review.
20. Näse L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, Korpela R, Meurman JH. 2001. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res*. 35(6):412-2
21. Nikawa H, Makihira S, Fukushima H, Nishimura H, Ozaki Y, Ishida K, Darmawan S, Hamada T, Hara K, Matsumoto A, Takemoto T, Aimi R. 2004.

- Lactobacillus reuteri in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *International Journal of Food Microbiology*. 95(2):219-223.
22. Pavitra R, Himani S, Jaya D, Rameshwari S. 2011. Probiotics and oral health. *Natl J Maxillofac Surg*. 2(1): 6–9. doi: 10.4103/0975-5950.85845
 23. Reid G, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev*. 16(4):658-72.
 24. Rosenbloom R, Tinanoff N. 1991. Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients before, during and after orthodontic treatment. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 100:35-37.
 25. Ruhi N, Serhat D, Firat O, Burcu A, Oral S, Vildan B. 2012. The Relationship of Orthodontic Treatment Need with Periodontal Status, Dental Caries, and Sociodemographic Factors *ScientificWorldJournal*. Published online. doi: 10.1100/2012/498012 PMID: PMC3485904
 26. Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol*. 28;84(3):197-215.
 27. Salehi R, Savabi O, Kazemi M, Kamali S, Salehi A, Eslami G, Tahmourespour A. 2014. Effects of Lactobacillus reuteri-derived biosurfactant on the gene expression profile of essential adhesion genes (gtfB, gtfC and ftf) of *Streptococcus mutans*. *Adv Biomed Res*. 19;3:169. doi: 10.4103/2277-9175.139134.
 28. Sheiham A. 2001. Dietary effects on dental diseases. *Public. Health. Nutr*. 4: 569–591.
 29. Struzycka I. 2014. The oral microbiome in dental caries. *Pol J Microbiol*. 63(2):127-35.
 30. Sudhir R, Praveen P, Anantharaj A, Venkataraghavan K. 2012. Assessment of the effect of probiotic curd consumption on salivary pH and streptococcus mutans counts. *Niger Med J*. 53(3):135-9. doi: 10.4103/0300-1652.104382.
 31. Sugumari E, Piranitha J, Thamaraiselvan M. 2012. Bugs that debugs: Probiotics. *J Pharm Bioallied Sci*. 4(Suppl 2): S319–S322. doi: 10.4103/0975-7406.100286

32. Sullivan Å, Nord C. 2002. Probiotics in human infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 50, Issue 5 Pp. 625-627.
33. Sutula J, Coulthwaite L, Thomas L, Verran J. 2012. The effect of a commercial probiotic drink on oral microbiota in healthy complete denture wearers. *Microb Ecol Health Dis.* 3;23.
34. Takahashi N, Nyvad B. 2011. The role of bacteria in the caries process: ecological perspectives. *J Dent Res.* 90(3):294-303
35. Tremblay M, Brisson D, Gaudet D. 2012. Association between salivary pH and metabolic syndrome in women: a cross-sectional study. *BMC Oral Health.* 12:40 doi:10.1186/1472-6831-12-40
36. Tweman, Garcia-Godoy T, and Geopferd S. 2000. Infant oral health. *Dental. Clin. North. Am.* 44: 487–492.
37. Twetman S. 2012. Are we ready for caries prevention through bacteriotherapy?. *Braz Oral Res.* 26 Suppl 1:64-70.
38. White B, Gordon S. 2014 Preventing dental caries through community water fluoridation. *N C Med J.* 75(6):430-1.
39. WHO 2002

ANEXOS A

Tabla 2: Muestreo matutino grupo control. Absorbancia (600nm)

Días	Promedio	Desviación estándar
1	0.037	0.017
2	0.034	0.034
3	0.052	0.038
4	0.045	0.050
5	0.057	0.034

Tabla 3: Muestreo matutino grupo control. Concentración (Células x108/mL)

Días	Promedio	Desviación estándar
1	48.038	65.949
2	32.054	70.413
3	111.226	225.374
4	0	0.000
5	25.36	56.707

Tabla 4: Muestreo matutino grupo control. pH

Días	Promedio	Desviación estándar
1	6.40	2.32
2	6.70	1.86
3	6.00	1.51
4	6.60	1.08
5	7.00	0.76

Tabla 5: Muestreo matutino grupo experimental. Absorbancia (600nm)

Días	Promedio	Desviación estándar
1	0.0766	0.0597
2	0.0656	0.0476
3	0.0976	0.1322
4	0.0291	0.0164
5	0.0554	0.0486
6	0.0830	0.0542

7	0.0409	0.0558
----------	--------	--------

Tabla 6: muestreo matutino grupo experimental. Conteo celular (cell/ml)

Días	Promedio	Desviación estándar
1	169.111	447.425
2	48.714	128.886
3	212.893	368.101
4	61.614	163.016
5	91.829	242.956
6	38.568	102.041
7	7.486	19.805

Tabla 7: muestreo matutino grupo experimental. pH

Días	Promedio	Desviación estándar
1	6.5	1.0
2	6.3	0.4
3	6.2	0.5
4	6.7	0.5
5	6.3	0.6
6	6.6	0.5
7	6.9	0.3

Tabla 8: muestreo vespertino grupo experimental. Absorbancia (600nm)

Días	Promedio	Desviación estándar
1	0.0423	0.0295
2	0.0180	0.0102
3	0.0271	0.0171
4	0.0343	0.0421
5	0.0233	0.0085
6	0.0393	0.0228
7	0.0188	0.0069

ANEXOS B

CONSENTIMIENTO INFORMADO

DECLARO:

Que la Dra. Delia Isabel Armendáriz Arias me ha explicado la importancia del tratamiento ortodóntico a realizar a mi hijo (a)

Y que en consecuencia es conveniente proceder, en la situación de mi hijo/a al tratamiento de ortodoncia y/o ortopedia.

- El propósito del tratamiento es corregir aquellas alteraciones dentales y/o esqueléticas.
- Tomar muestras de saliva para medir el número de *S. mutans*, que se tomara con un isopo estéril 1 ó 2 al día.
- Observar el número de *S. mutans* presentes en la saliva.

Me ha advertido también de la necesaria colaboración del niño en tanto la higiene como en su uso y en caso de estar en el grupo de ingesta de Yakult, es necesario el compromiso total en la toma de la bebida probiótica según las especificaciones.

Tras sus informaciones he tenido la oportunidad de aclarar todas mis dudas al respecto.

Me ha explicado las formas en que dicho estudio se llevara a cabo, las consecuencias de no hacerlo y la importancia de mi responsabilidad en conseguirlo.

CONSIENTO

He comprendido las explicaciones que se me han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, y el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y me ha aclarado todas las dudas que le he planteado.

También comprendo que, en cualquier momento puedo revocar el consentimiento que ahora presto.

Por ello, manifiesto que estoy satisfecho con la información recibida y que comprendo el alcance y los riesgos del tratamiento, y en tales condiciones.

Monterrey, Nuevo León a los _____ días del mes de _____ del 20__

Nombre y firma del padre o tutor

Dra. Delia Isabel Armendáriz Arias

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma del testigo

Hoja de captura de datos del grupo A (orto + yakult)	
Fecha	
Nombre del paciente:	
fecha de entrega:	
Toma inicial (fecha):	
toma final (fecha):	
número de muestras que entrega el paciente:	
número completo de muestras por día:	

Grupo A captura de resultados				
Día	toma matutina UFC	toma después de Yakult UFC	Absorbancia mañana	Absorbancia tarde
Día 1				
Día 2				
Día 3				
Día 4				
Día 5				
Día 6				

Día 7				
Día 8				
Día 9				
Día 10				
Día 11				
Día 12				
Día 13				
Día 14				
Día 15				
Día 16				
Día 17				
Día 18				
Día 19				
Día 20				
Día 21				
Día 22				
Día 23				
Día 24				
Día 25				
Día 26				
Día 27				
Día 28				
Día 29				

Día 30				
--------	--	--	--	--

Hoja de captura de datos del grupo control (orto + sin yakult)	
Fecha	
Nombre del paciente:	
fecha de entrega:	
Toma inicial (fecha):	
toma final (fecha):	
número de muestras que entrega el paciente:	
número completo de muestras por día:	

Grupo control (orto + sin yakult)		
captura de resultados		
Día 1	toma matutina UFC	Absorbancia
Día 2		
Día 3		
Día 4		
Día 5		
Día 6		

Día 7		
Día 8		
Día 9		
Día 10		
Día 11		
Día 12		
Día 13		
Día 14		
Día 15		
Día 16		
Día 17		
Día 18		
Día 19		
Día 20		
Día 21		
Día 22		
Día 23		
Día 24		
Día 25		
Día 26		
Día 27		
Día 28		
Día 29		

Día 30		
--------	--	--